



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Untersuchung verschiedener GABA<sub>A</sub>-Liganden am  
Tiermodell in Bezug auf Anxiolyse und Sedierung“

Verfasserin

Denise Luger

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuer:

Univ. Prof. Dr. Steffen Hering



# DANKSAGUNG

Zu Beginn bedanke ich mich sehr herzlich bei Herrn Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes, die Zuteilung des interessanten Themas und das fortwährende Interesse am Fortschritt dieser Arbeit.

Großer Dank gebührt Frau Mag. Juliane Hintersteiner, mit deren Hilfe alle praktischen Arbeiten durchgeführt wurden und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht entstehen hätte können.

Bei Frau Dr. Sophia Khom möchte ich mich für die vielen fachlichen Hilfestellungen, die engagierte Betreuung und für die geduldige Beantwortung vieler Fragen bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Arbeitsgruppe rund um Herrn Prof. Mihovilovic (Institut für angewandte Synthesechemie, TU Wien), die die untersuchten Substanzen zur Verfügung gestellt hat.

Stellvertretend für meine vielen lieben Studienkollegen danke ich Lena und Verena für die schöne gemeinsame Zeit.

Einen großen Dank möchte ich auch meinem Vater aussprechen, ohne dessen Unterstützung ich mein Studium nicht hätte abschließen können, und meinen Brüdern, die ein wichtiger Teil meines Lebens sind.

Abschließend bedanke ich mich bei meinem Freund Johannes, der mir immer geduldig zur Seite stand.



# INHALTSVERZEICHNIS

## **ALLGEMEINER TEIL ..... 1**

<b>1 Das GABAerge System.....</b>	<b>1</b>
1.1 Funktion, Biosynthese, Freisetzung und Metabolismus von GABA .....	1
1.2 GABA-aktivierte Rezeptoren.....	4
1.2.1 Der GABA <sub>A</sub> -Rezeptor .....	4
1.2.2 Der GABA <sub>B</sub> -Rezeptor .....	9
<b>2 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulatoren.....</b>	<b>12</b>
2.1 Benzodiazepine.....	13
2.2 Barbiturate .....	17
2.3 Neurosteroid.....	18
2.4 Anästhetika.....	22
2.5 Ethanol.....	25
2.6 Loreclezol.....	27
<b>3 GABA-assoziierte Erkrankungen.....</b>	<b>28</b>
3.1 Angststörungen .....	28
3.2 Schlafstörungen .....	33
3.3 Epilepsie.....	36

## **PRAKTISCHER TEIL ..... 39**

<b>4 Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>39</b>
<b>5 Material und Methoden.....</b>	<b>40</b>
5.1 Versuchstiere.....	40
5.2 Injektionslösungen .....	40
5.3 Verhaltenspharmakologische Tests.....	41
5.3.1 Elevated Plus-Maze (EPM).....	41
5.3.2 Light/Dark-Choice Test (LDT).....	43
<b>6 Ergebnisse.....</b>	<b>44</b>
6.1 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM .....	44
6.1.1 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 15 Minuten nach i.p. Applikation.....	44
6.1.2 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 30 Minuten nach i.p. Applikation.....	47
6.1.3 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 60 Minuten nach i.p. Applikation.....	50
6.2 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation .....	53
<b>7 Diskussion.....</b>	<b>59</b>
<b>8 Zusammenfassung .....</b>	<b>73</b>
<b>9 Abstract .....</b>	<b>75</b>
<b>10 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>77</b>
<b>11 Lebenslauf.....</b>	<b>89</b>



## Allgemeiner Teil

# 1 Das GABAerge System

## 1.1 Funktion, Biosynthese, Freisetzung und Metabolismus von GABA

### **Funktion**

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) ist der im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren am weitesten verbreitete inhibitorische Neurotransmitter (Schofield et al., 1987; Sivilotti und Nistri, 1991; Richter et al., 2012) und stellt den wichtigsten Botenstoff für etwa 30 % aller Neuronen dar (Hendry et al., 1987; Rudolph und Knoflach, 2011).

Das Vorhandensein von GABA im Gehirn von Wirbeltieren wurde erstmals 1950 sowohl von Roberts und Frankel als auch von der Arbeitsgruppe rund um Awapara dokumentiert (Roberts und Frankel, 1950; Awapara et al., 1950). GABAerge Neuronen konnten 1987 in sieben Großhirnarealen von Affen nachgewiesen werden, wobei sie in verschiedenen Gehirnschichten in unterschiedlicher Konzentration gefunden wurden (Hendry et al., 1987).

### **Biosynthese**

GABA wird in präsynaptischen Nervenendigungen durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) im Rahmen einer Decarboxylierungs-Reaktion aus L-Glutamat gebildet (Awapara et al., 1950; Tian et al., 1999; Treiman, 2001). So entsteht in einem Schritt aus dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat der inhibitorische Neurotransmitter GABA (siehe Abb. 1). Die Konzentration von GAD korreliert in verschiedenen Gehirnarealen direkt mit der Konzentration von GABA (Tian et al, 1999).

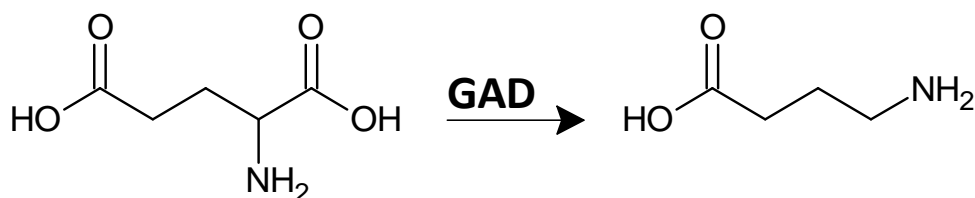


Abb. 1:  
Synthese der GABA aus Glutamat

Die GAD kommt in zwei Isoformen vor: GAD 67 und GAD 65 (Roth und Draguhn, 2012). GAD 67 ist als cytosolisches Enzym ubiquitär in der Zelle verbreitet, wohingegen GAD 65 hauptsächlich in den Nervenendigungen lokalisiert ist. GAD 65 ist reversibel an synaptische Vesikelmembranen gebunden, weswegen man annimmt, dass dieses Isoenzym eine spezifische Rolle für die Regulation der Freisetzung von GABA aus Synapsen spielt (Tian et al., 1999).

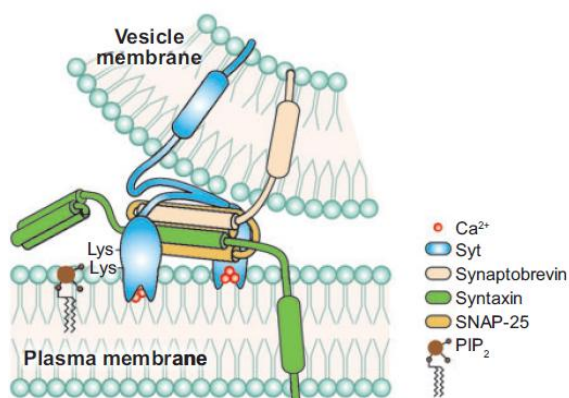
Eine Hemmung der GAD durch Substanzen wie D- oder L-Allylglycin vermindert die Synthese der GABA, wodurch deren inhibitorische Effekte reduziert und beispielsweise eine erhöhte Krampfneigung hervorgerufen wird (Kudo und Wada, 1990; Meldrun et al., 1979; Treiman, 2001). GAD 65-defiziente Mäuse zeigen im Open Field und Elevated Zero-Maze ängstliches Verhalten und sprechen weniger gut auf GABA-Rezeptor-Modulatoren wie Diazepam und Pentobarbital an (Kash et al., 1999).

### Freisetzung

Neu synthetisierte GABA wird über den vesikulären GABA-Transporter (vGAT) in kleine synaptische Vesikel befördert, wo sie gespeichert wird (siehe Abb. 3; Jorgensen, 2005).

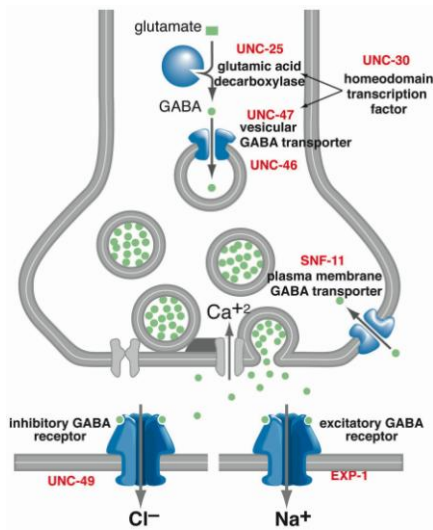
Die Freisetzung von GABA erfolgt dann im Rahmen einer Membranfusion dieser synaptischen Vesikel mit der präsynaptischen Plasmamembran und wird hauptsächlich durch präsynaptische Stimulation induziert (Kochubey et al., 2011, Tucker und Chapman, 2002; Jorgensen, 2005).

Diese präsynaptische Stimulation erfolgt durch ein einlaufendes Aktionspotential, welches eine Membrandepolarisation induziert und unter anderem spannungsabhängige Calcium-Kanäle öffnet. Dadurch kommt es zu einem vermehrten Calciumeinstrom in die Zelle, wo Calcium an Synaptotagmine (Syt) bindet. Synaptotagmine sind Zellmembranproteine, die über spezifische C2-Domänen Calcium binden können und daher als Calciumsensoren bezeichnet werden. Diese Zellmembranproteine sind Teil des SNARE-Komplexes (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor complex), der essentiell für die Membranfusion ist (siehe Abb. 2; Chapman, 2008; Kochubey et al., 2011).



**Abb. 2:**  
Darstellung des SNARE-Komplexes, der essentiell für die Fusion des Vesikels mit der Zellmembran ist (Chapman, 2008)

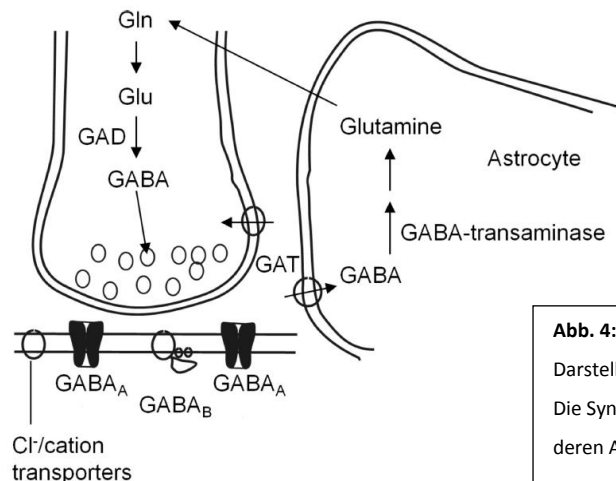




**Abb. 3:**  
Darstellung der Aufnahme von GABA in den Vesikel und anschließender Freisetzung nach Membranfusion (Jorgensen, 2005; Schuske et al., 2004)

**Metabolismus**

Nach Freisetzung in den synaptischen Spalt und Interaktion mit spezifischen Rezeptoren (siehe Kapitel 1.2) wird GABA über GABA-Transporter (GAT; siehe Abb. 3) wieder in präsynaptische Nervenendigungen und Gliazellen aufgenommen (Treiman, 2001; Jorgensen, 2005), um dann durch das Enzym GABA-Transaminase (GABA-T) metabolisiert zu werden (siehe Abb. 4). GABA-T baut GABA zum Succinat-Semialdehyd ab, welcher wiederum in Form der Bernsteinsäure in den Citratzyklus eingespeist wird (Belebony et al., 2004). Eine Hemmung der GABA-Transaminase erhöht daher die GABA-Konzentration im Gehirn, wodurch beispielsweise die Krampfschwelle erniedrigt und damit das Auftreten epileptischer Anfälle reduziert wird (Jung et al., 1977; Sills, 2003). GABA-T-Inhibitoren wie  $\gamma$ -vinyl-GABA (Vigabatrin) werden bereits erfolgreich in der Therapie der Epilepsie eingesetzt (Qume und Fowler, 1997; Sills, 2003; Roth und Draguhn, 2012). Weiters spielt GABA-T auch eine wesentliche Rolle bei anderen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie beispielsweise Appetitregulation, Angst, Alkoholabhängigkeit und Sedierung (Sherif et al., 1994a,b).



**Abb. 4:**  
Darstellung einer GABAergen inhibitorischen Synapse. Die Synthese von GABA wird durch GAD katalysiert, deren Abbau durch GABA-T (Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

## 1.2 GABA-aktivierte Rezeptoren

Nach Freisetzung aus GABAergen Neuronen bindet GABA an spezifische Rezeptoren sowohl in prä- als auch in postsynaptischen Membranen. Diese Rezeptoren unterscheiden sich unter anderem aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften, weswegen Hill und Bowery 1981 die Unterteilung in GABA Typ A ( $GABA_A$ ) und GABA Typ B ( $GABA_B$ ) Rezeptoren einführten (Hill und Bowery, 1981). Später konnte zusätzlich ein dritter Rezeptortyp in der Retina nachgewiesen werden, welcher anfänglich als GABA Typ C ( $GABA_C$ ) Rezeptor bezeichnet wurde (Bormann und Feigenspan, 1995). Mittlerweile wurde dieser vom Nomenklaturkomitee der IUPHAR (International Union of Pharmacology) jedoch ebenfalls der Gruppe der  $GABA_A$ -Rezeptoren zugeordnet und als  $GABA_{A\alpha 1}$ -Rezeptor bezeichnet. Dennoch ist der Terminus „ $GABA_C$ -Rezeptor“ noch weit verbreitet, da sich dieser Rezeptor in seinen pharmakologischen Eigenschaften deutlich vom klassischen  $GABA_A$ -Rezeptor unterscheidet (siehe 1.2.1 Unterpunkt „Der  $GABA_C$ -Rezeptor“; Bormann, 2000).

### 1.2.1 Der $GABA_A$ -Rezeptor

$GABA_A$ -Rezeptoren gehören zur Gruppe der „Cys-Loop“-Rezeptoren, die wiederum zur Superfamilie der ligandengesteuerten Ionenkanäle gehören und daher auch als ionotrope Rezeptoren bezeichnet werden. Ebenfalls zur Gruppe der „Cys-Loop“-Rezeptoren gehören nikotinsche Acetylcholin- ( $nACh$ ), Serotonin Subtyp 3- ( $5-HT_3$ ) und Glycinrezeptoren (Conolly und Wafford, 2004; Olsen und Sieghart, 2008; Forman, 2011).

$GABA_A$ -Rezeptoren werden definitionsgemäß neben GABA durch Agonisten wie Muscimol aktiviert, wohingegen sie durch Antagonisten wie Bicucullin kompetitiv und durch Picrotoxin nicht-kompetitiv gehemmt werden (Korpi et al., 2002).

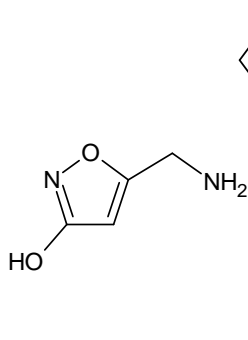


Abb. 5: Muscimol

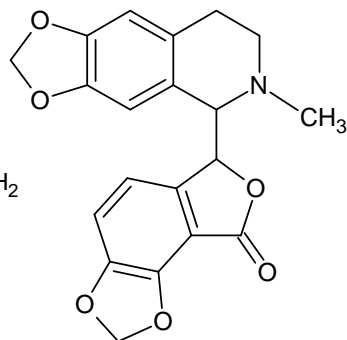


Abb. 6: Bicucullin

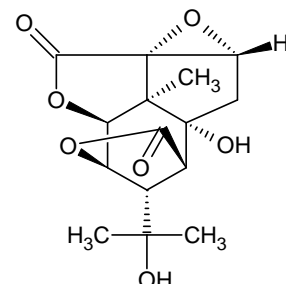
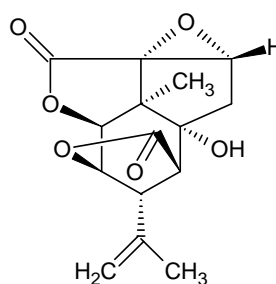
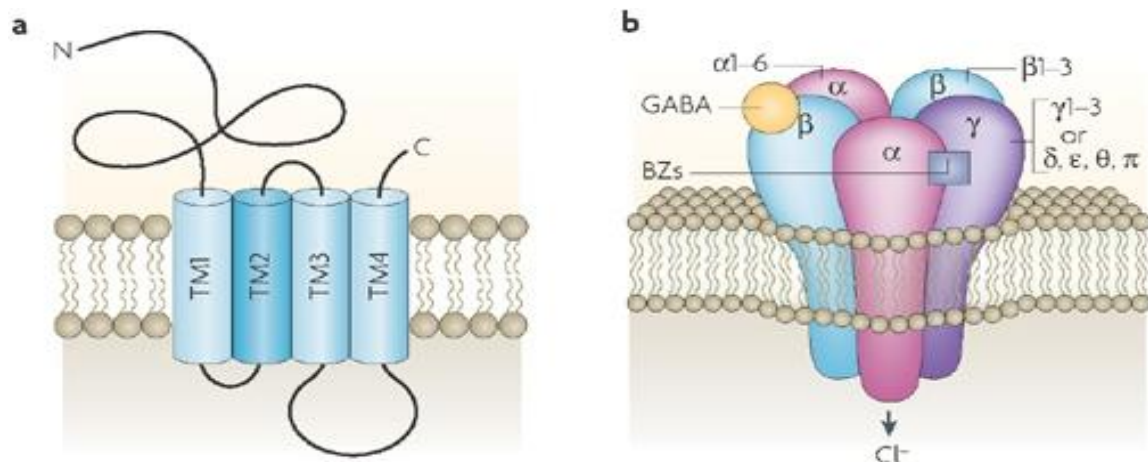


Abb. 7: Picrotoxin, ein äquimolares Gemisch aus Picrotoxinin (links) und Picrotin (rechts) (Yang et al., 2007)

### Struktur und Funktion

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind Heteropentamere und bestehen daher aus einer Kombination von 5 Untereinheiten. Insgesamt sind 19 verschiedene Untereinheiten bekannt, die in zahlreichen Kombinationen arrangiert sein können (Goetz et al., 2007; Olsen und Sieghart, 2008; Macdonald und Olsen, 1994; Mehta und Ticku, 1999; Berezhnoy et al., 2009). Die daraus resultierende Vielzahl an möglichen Isoformen zeigt die Heterogenität des GABA<sub>A</sub>-Rezeptortyps (Vinkers und Olivier, 2012; Olsen und Sieghart, 2008).

Man unterscheidet sechs  $\alpha$  ( $\alpha_{1-6}$ )-, drei  $\beta$  ( $\beta_{1-3}$ )-, drei  $\gamma$  ( $\gamma_{1-3}$ )-, eine  $\delta$ -, eine  $\epsilon$ -, eine  $\pi$ -, eine  $\theta$ - und drei  $\rho$  ( $\rho_{1-3}$ )-Untereinheiten (siehe Abb. 8b; Jacob et al., 2008; Bormann, 2000; Jones-Davis und Macdonald, 2003; Macdonald 1994; Goetz et al., 2007; McKernan et al., 2000; Richter et al., 2012), wobei die Sequenzidentität zwischen den einzelnen Subfamilien 30 – 40 % und innerhalb einer Subfamilie 70 – 80 % beträgt (Macdonald und Olsen, 1994; Mehta und Ticku, 1999). Jede Untereinheit besteht wiederum aus einem langen extrazellulären N-Terminus, vier Transmembrandomänen (TM1 – TM4), einer cytoplasmatischen Schleife („Cys-Loop“) zwischen TM3 und TM4 und einem kurzen extrazellulären C-Terminus (siehe Abb. 8a; Jacob et al., 2008; Bormann, 2000; Cutting et al., 1991; Garret et al., 1997; Luscher et al., 2011).



**Abb. 8:**

- a:** Schematische Darstellung einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit bestehend aus einem langen extrazellulären N-Terminus, vier Transmembrandomänen (TM1 – TM4), einer cytoplasmatischen Schleife und einem kurzen extrazellulären C-Terminus.
- b:** Fünf Untereinheiten aus sieben Subfamilien ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ) formen einen heteropentameren chloridpermeablen Kanal (Jacob et al., 2008).

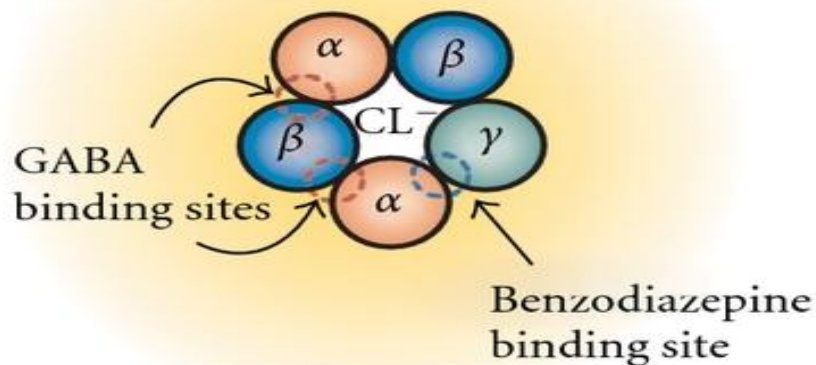
Die Mehrheit der im Gehirn exprimierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besteht aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit (Jacob et al., 2008; Chang et al., 1996; Bali und Akabas, 2004; Vinkers und Olivier, 2012; Sieghart et al., 2012), wobei die γ-Untereinheit durch δ, ε, oder π ersetzt sein kann (Jacob et al., 2008). Am häufigsten ist die Kombination α<sub>1</sub>β<sub>2</sub>γ<sub>2</sub> (60 % aller GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren), gefolgt von α<sub>2</sub>β<sub>3</sub>γ<sub>2</sub> (15 – 20 %) und α<sub>3</sub>β<sub>1/2/3</sub>γ<sub>2</sub> (10 – 15 %). Rezeptoren, die α<sub>4/5/6</sub>-, γ<sub>1/3</sub>-, δ-, π-, oder θ-Untereinheiten enthalten, kommen seltener vor (Rudolph und Knoflach, 2011; Wang, 2011). ρ-Untereinheiten kommen ausschließlich in GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren vor (Bormann, 2000).

Die fünf Untereinheiten – genauer gesagt die TM2 jeder Untereinheit – formen eine Kanalpore, welche für Chloridionen durchlässig ist (Jacob et al., 2008). Nach Bindung von GABA kommt es zu einer Öffnung des Ionenkanals, zu einem Einstrom von Chloridionen ins Zellinnere, damit zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran und einer reduzierten Erregbarkeit postsynaptischer Neuronen (Beleboni, 2004; Rudolph und Knoflach, 2011; Vinkers und Olivier, 2012), wobei für eine vollständige Aktivierung des Kanals mindestens zwei Moleküle GABA an den Rezeptor binden müssen (Macdonald und Olsen, 1994).

### **GABA-Bindungsstelle**

Von den fünf Untereinheiten, die den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor bilden, ist zumindest ein Vertreter der α- und ein Vertreter der β-Familie nötig, damit GABA an den Rezeptor binden kann (Schofield et al., 1987), da sich die spezifische Bindungsstelle für GABA zwischen diesen beiden Untereinheiten befindet (siehe Abb. 9; Vinkers und Olivier, 2012).

Ein typischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, der aus zwei α-, zwei β- und einer γ-Untereinheit besteht, besitzt daher zwei Bindungsstellen für GABA (Smith und Olsen, 1995; Sieghart et al., 2012).



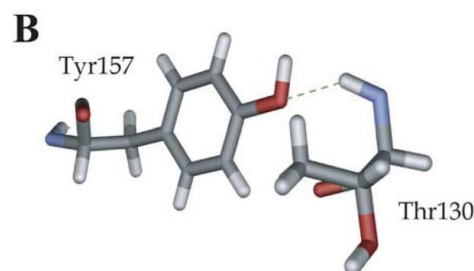
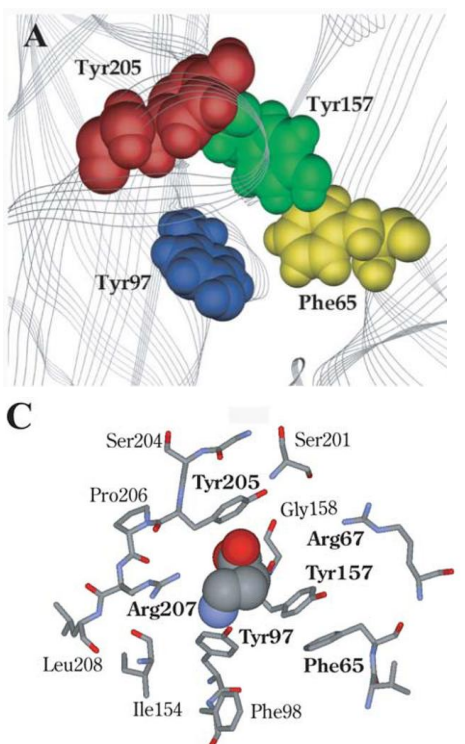
**Abb. 9:**  
Darstellung der spezifischen Bindungsstellen von GABA und Benzodiazepinen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Vinkers und Olivier, 2012)

Die Bindungstasche für GABA wird von Aminosäuren, die in nicht-zusammenhängenden Proteinsegmenten der extrazellulären N-terminalen Domänen benachbarter  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten lokalisiert sind, gebildet (Newell und Czajkowski, 2003).

In beiden Subfamilien konnten bereits einige Aminosäuren identifiziert werden, die essentiell für die hohe Bindungsaffinität der GABA an den Rezeptor sind (Sigel et al., 1990, 1992). Neuere Untersuchungen zeigen, dass vor allem aromatische Aminosäuren an der Ausbildung der Bindungstasche beteiligt sind und eine „aromatische Box“ formen. Besonders  $\alpha_1$ Phe<sup>65</sup>,  $\beta_2$ Tyr<sup>97</sup>,  $\beta_2$ Tyr<sup>157</sup> und  $\beta_2$ Tyr<sup>205</sup> scheinen hier eine wichtige Rolle zu spielen (siehe Abb. 10; Padgett et al., 2007).

Jedoch konnten auch zahlreiche weitere Aminosäuren, unter anderem Arg<sup>66</sup>, Ser<sup>68</sup>, Arg<sup>119</sup>, Ile<sup>120</sup>, Thr<sup>130</sup> in der  $\alpha_1$ -Untereinheit und Leu<sup>99</sup>, Thr<sup>160</sup>, Thr<sup>202</sup>, Ser<sup>204</sup>, Arg<sup>207</sup> und Ser<sup>209</sup> in der  $\beta_2$ -Untereinheit, mit der Bindungstasche in Zusammenhang gebracht werden (Newell und Czajkowski, 2003; Boileau et al., 2002). Von diesen Resten interagieren vermutlich nur einzelne direkt mit GABA, während andere beispielsweise allosterische Übergänge beeinflussen könnten (Newell und Czajkowski, 2003).

Newell und Czajkowski zeigten, dass vermutlich auch das Segment Pro<sup>174</sup> – Asp<sup>191</sup> in der  $\alpha_1$ -Untereinheit für die Bindung von GABA an den Rezeptor wichtig ist. Vor allem Val<sup>178</sup>, Val<sup>180</sup> und Asp<sup>183</sup> sollen essentiell für die Ausbildung der Bindungsstelle sein. Dafür spricht auch, dass Pentobarbital in diesem Bereich Änderungen der Rezeptorkonformation induziert (Newell und Czajkowski, 2003).



**Abb. 10:**

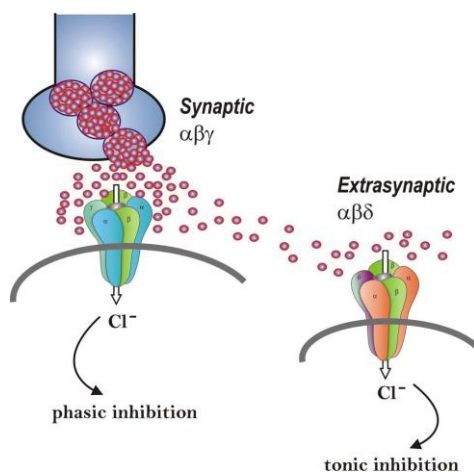
**A:** Darstellung der „aromatischen Box“, die als Teil der Bindungstasche zwischen  $\alpha_1/\beta_2$  identifiziert werden konnte

**B:** vermutete Wasserstoffbrückenbindung zwischen  $\alpha_1$ Thr<sup>130</sup> und  $\beta_2$ Tyr<sup>157</sup>

**C:** GABA-Molekül innerhalb der aromatischen Bindungstasche (Padgett et al., 2007)

### Lokalisation

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kommen sowohl synaptisch als auch peri- und extrasynaptisch vor. Die Mehrheit der synaptischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besteht aus zwei  $\alpha_{(1-3)}$ , zwei  $\beta$ - und einer  $\gamma$ -Untereinheit (Jacob et al., 2008; Kumar et al., 2009). Derartige  $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptoren desensibilisieren schnell und vermitteln phasische Inhibition (siehe Abb. 11; Reddy, 2011; Pavlov und Walker, 2012).  $\alpha_4$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind überwiegend extrasynaptisch lokalisiert, jedoch können einzelne Isoformen – wie beispielsweise  $\alpha_4\beta_2$ -Rezeptoren – auch synaptisch vorkommen (Kumar et al., 2009). Auch  $\delta$ -Untereinheiten konnten bislang ausnahmslos extrasynaptisch nachgewiesen werden (Kumar et al., 2009; Roth und Draguhn, 2012).  $\alpha\beta\delta$ -Isoformen desensibilisieren langsam und vermitteln tonische Inhibition (siehe Abb. 11; Reddy, 2011; Pavlov und Walker, 2012). Extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren haben eine deutlich höhere Affinität für GABA als synaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und werden daher schon durch geringe Mengen an GABA aktiviert (Wang, 2011).



**Abb. 11:**  
Synaptische  $\alpha\beta\gamma$ -Isoformen vermitteln phasische Inhibition, während extrasynaptische  $\alpha\beta\delta$ -Isoformen tonische Inhibition vermitteln (Reddy, 2011)

### Untereinheiten-spezifische Effekte

Die Kombination der Untereinheiten in einem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist entscheidend für dessen pharmakologische und biophysikalische Eigenschaften (Hill-Venning et al., 1997). Während die Bedeutung der  $\epsilon$ -,  $\rho$ -,  $\pi$ -, und  $\theta$ -Untereinheiten noch weitgehend unklar ist (Beleboni et al., 2004), konnte die  $\alpha_1$ -Untereinheit bereits mit Effekten wie Sedierung, anterograde Amnesie, Abhängigkeit und antikonvulsiver Wirkung in Zusammenhang gebracht werden, während  $\alpha_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Anxiolyse vermitteln. Muskelrelaxation wird vor allem über  $\alpha_2$ -, teilweise auch über  $\alpha_3$ -, und  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt (Rudolph und Knoflach, 2011; Lalive et al., 2011). Eine Blockade von  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren soll die Merk- und Gedächtnisfähigkeit verbessern (Vinkers und Olivier, 2012).

### Der GABA<sub>C</sub>-Rezeptor (GABA<sub>A0r</sub>-Rezeptor)

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sind in geringer Dichte im gesamten Gehirn exprimiert, kommen aber in erster Linie in der Retina vor (Thomet et al., 2000; Groves et al., 2006). Sie gehören – wie klassische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren – ebenfalls zur Gruppe der pentameren ionotropen Rezeptoren (Johnston, 1996), werden jedoch ausschließlich aus Untereinheiten der  $\rho$ -Subfamilie gebildet ( $\rho_{1-3}$ ) (Bormann, 2000).

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren unterscheiden sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften deutlich von klassischen GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren. Während GABA<sub>A</sub>- und GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren durch spezifische Empfindlichkeiten gegenüber Bicucullin und Baclofen gekennzeichnet sind, reagieren GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren unempfindlich gegenüber beiden Substanzen (Johnston, 1996; Bormann 2000).

GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren sprechen nicht auf klassische GABA<sub>A</sub>-Modulatoren wie Benzodiazepine, Barbiturate oder Neurosteroiden an (Sivilotti und Nistri, 1991; Johnston, 1996; Bormann und Feigenspan, 1995) und werden durch Picrotoxin antagonisiert (Bormann und Feigenspan, 1995).

### 1.2.2 Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor

Zusätzlich zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor konnte ein weiterer Rezeptortyp nachgewiesen werden, der definitionsgemäß empfindlich gegenüber Baclofen, aber unempfindlich gegenüber Bicucullin reagiert und als GABA<sub>B</sub>-Rezeptor bezeichnet wurde (Hill und Bowery, 1981).

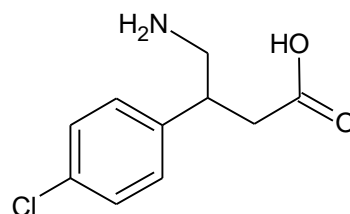


Abb. 12: Strukturformel von Baclofen

Die weite Verbreitung von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren sowohl im peripheren als auch im zentralen Nervensystem offenbart deren Bedeutung für zahlreiche physiologische Prozesse (Jones et al., 2000) wie beispielsweise Regulation von Magensaftsekretion (Piqueras und Martinez, 2004), REM-Schlaf (Ulloor et al., 2004), Krampfschwelle, Schmerzwahrnehmung oder Gedächtnisleistung (Schuler et al., 2001).

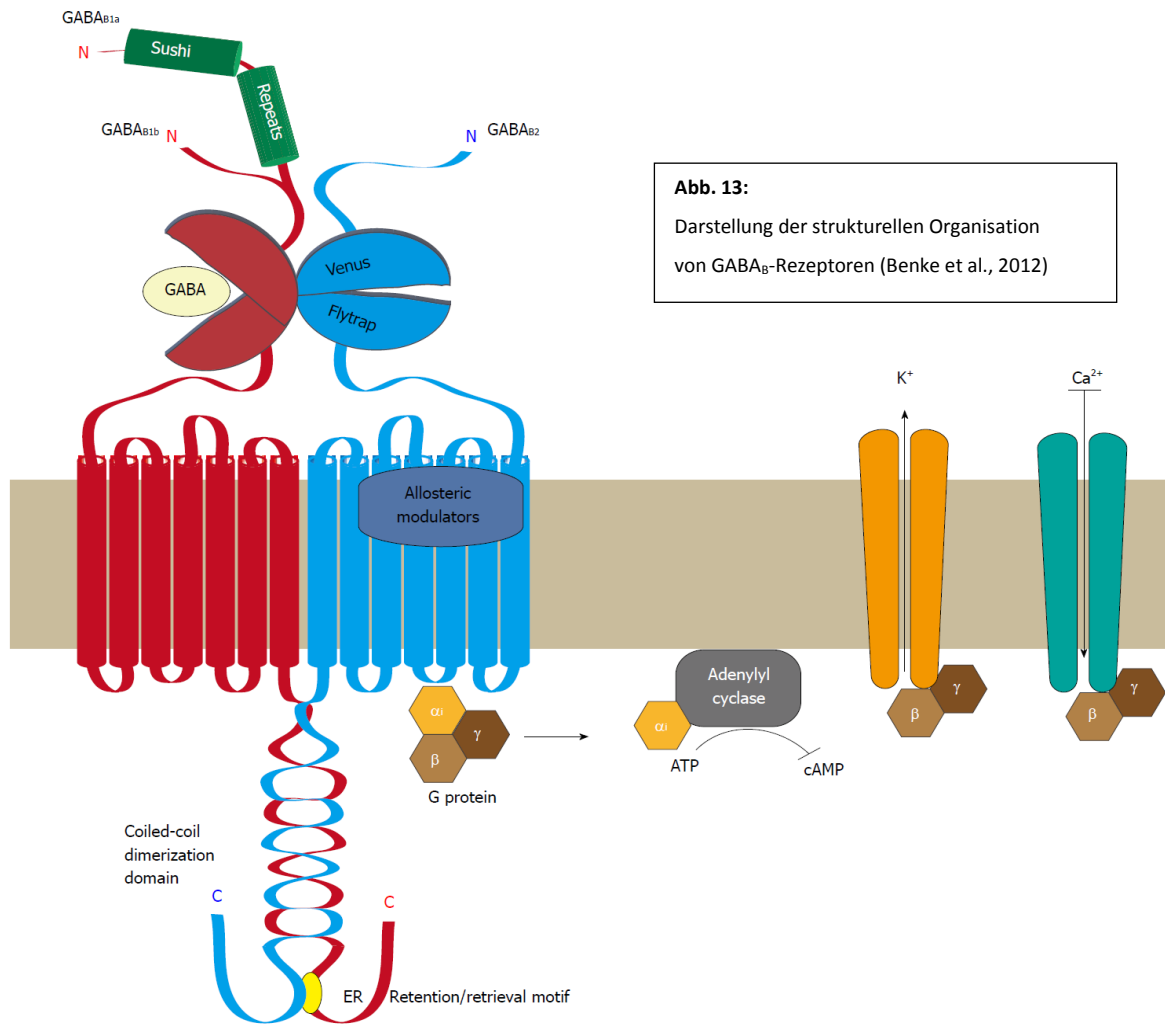
### **Struktur und Funktion**

Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor ist ein Heterodimer aus zwei Untereinheiten (GABA<sub>B1</sub> und GABA<sub>B2</sub>) und gehört zur Gruppe der metabotropen Rezeptoren (Bowery und Enna, 2000; Benke et al., 2012). Beide Untereinheiten sind heptahelikale Membranproteine mit einer extrazellulären N-terminalen Domäne und einer intrazellulären C-terminalen Domäne (siehe Abb. 13). Die GABA<sub>B1</sub>-Untereinheit enthält die Bindungsstelle für GABA und existiert in zwei Isoformen, die als GABA<sub>B1a</sub> und GABA<sub>B1b</sub> bezeichnet werden. GABA<sub>B1a</sub> unterscheidet sich von GABA<sub>B1b</sub> ausschließlich durch das Vorhandensein einer zusätzlichen N-terminalen Sequenz. Diese Sequenz wird als „Sushi Domäne“ bezeichnet und enthält zwei Protein-Protein-Interaktions-Domänen (Benke et al., 2012).

Die GABA<sub>B</sub>-Rezeptorfamilie weist eine deutlich geringere Diversität als die GABA<sub>A</sub>-Rezeptorfamilie auf, da hier im Genom nur drei mögliche Codierungen für Untereinheiten bekannt sind, wohingegen für GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten 19 verschiedene Gene nachgewiesen werden konnten (Rudolph und Knoflach, 2011).

Durch eine G<sub>i/o</sub>-Protein gekoppelte Signalkaskade kommt es nach Bindung von GABA zu einer Öffnung von Kalium- und einer Inaktivierung von Calciumkanälen, wodurch es präsynaptisch zu einer reduzierten Transmitterfreisetzung und postsynaptisch zu einer Hyperpolarisation der Zellmembran kommt (Bormann, 1988; Rudolph und Knoflach, 2011). Da GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren nur indirekt – via G-Proteine – mit Ionenkanälen interagieren, führen sie zu einer langsam einsetzenden, aber lang anhaltenden Inhibition. Demgegenüber vermitteln GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine schnelle inhibitorische Neurotransmission, da sie selbst Chloridkanäle sind (Beleboni et al., 2004; Rudolph und Knoflach, 2011).

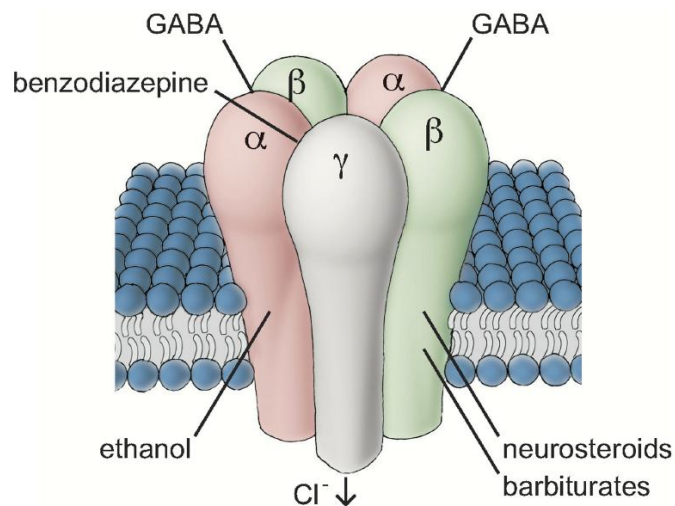




**Abb. 13:**  
Darstellung der strukturellen Organisation von GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren (Benke et al., 2012)

## 2 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulatoren

Es sind zahlreiche pharmakologisch wichtige Substanzen bekannt, deren Wirkungen unter anderem auf die Modulation von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zurückzuführen sind. Dazu gehören beispielsweise Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroide, Anästhetika und Ethanol. Diese Substanzen interagieren mit bestimmten Untereinheiten am Rezeptor und verstärken somit die GABAerge Neurotransmission (siehe Abb. 14; Sieghart, 1994; Rüscher et al., 2004; Sieghart et al., 2012; Bormann, 2000; Macdonald und Olsen, 1994; Korpi et al., 2002; Uusi-Oukari und Korpi, 2010).

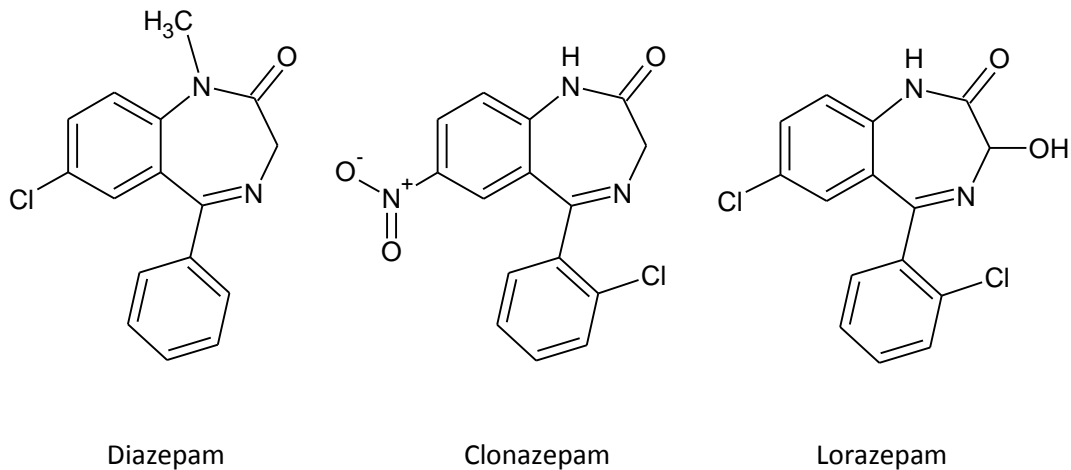


**Abb. 14:**

Schematische Darstellung der Bindungsstellen diverser Agonisten am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Uusi-Oukari und Korpi, 2010)

## 2.1 Benzodiazepine

Wie der Name schon sagt, besteht die Grundstruktur eines Benzodiazepins aus einem Benzenring, an den ein Diazepin anneliert ist, wobei sich die beiden Stickstoffatome im Normalfall an den Positionen 1 und 4 befinden (Rudolph und Knoflach, 2011).



**Abb. 15:**

Darstellung der Strukturformeln ausgewählter Benzodiazepine

In den 1950er Jahren entdeckte man durch Zufall, dass Benzodiazepine anxiolytisch, sedierend, antiepileptisch und muskelrelaxierend wirken (Rudolph und Knoflach, 2011; Richter et al., 2012). Benzodiazepine werden daher seit Jahrzehnten therapeutisch eingesetzt und gehören zu den am häufigsten verschriebenen Wirkstoffen zur Therapie von Angst- und Schlafstörungen (Rudolph und Knoflach, 2011; Wafford, 2005; Chen et al., 2012). In der Behandlung von Schlafstörungen konnten sie die bis dato häufig eingesetzten Barbiturate ablösen, da sie über einen erheblich günstigeren therapeutischen Index verfügen (Rudolph und Knoflach, 2011).

Benzodiazepine gehören zu den wirksamsten anxiolytischen Substanzen und haben den Vorteil, dass sie selektiv auf das GABAerge System wirken. Aufgrund ihrer großen therapeutischen Breite ist eine Monotherapie weiters sehr sicher und Überdosierungen sind meist ungefährlich (Rang und Dale, 2007).

Der Einsatz der Benzodiazepine wird jedoch durch einige zusätzliche Effekte limitiert: Obwohl ihre sedierend-hypnotische Potenz zur Therapie von Schlafstörungen erwünscht ist (Rudolph und Knoflach, 2011), ist diese zugleich unerwünscht in der Therapie von Angststörungen und

führt hier häufig zu unerwünschten zentralnervösen Wirkungen wie Benommenheit, Schläfrigkeit und Konzentrationsschwäche. Weiters kann es vor allem bei langfristiger Einnahme zu Toleranzentwicklung und Abhängigkeit kommen, weswegen man bemüht ist, Substanzen zu entwickeln, die ähnliches therapeutisches Potential besitzen, aber ohne diese unerwünschten Effekte auskommen (Wafford, 2005).

### ***Modulation der GABAergen Neurotransmission***

Benzodiazepine binden als positiv allosterische Modulatoren an den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, wodurch es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors und dadurch zu einer Steigerung der Affinität der GABA zum Rezeptor kommt (Rudolph und Knoflach, 2011; Chen et al., 2012). Weiters wird die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chloridkanals erhöht, wodurch in Summe die inhibitorischen Effekte der GABA verstärkt werden (Sieghart, 1994; Rudolph und Knoflach, 2011). Im Gegensatz zu Barbituraten können Benzodiazepine GABA nicht imitieren, sondern deren Wirkung nur verstärken, weswegen sie nur dann wirksam sind, wenn gleichzeitig GABA anwesend ist (Sieghart et al., 2012).

### ***Benzodiazepin-Bindungsstelle***

Benzodiazepine binden an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, wenn diese zumindest sowohl eine  $\alpha$ - ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ , und/oder  $\alpha_5$ ) als auch eine  $\gamma$ -Untereinheit enthalten, da sich zwischen diesen beiden Untereinheiten eine spezielle Bindungsstelle für Benzodiazepine befindet (siehe Abb. 16; Vinkers und Olivier, 2012; Doble und Martin, 1992; Sieghart et al., 2012; Sieghart, 1994).

Benzodiazepine sind unterschiedlich sensitiv für verschiedene Rezeptor-Isoformen. So weisen  $\gamma_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Gegensatz zu  $\gamma_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine deutlich höhere Affinität für Benzodiazepine auf (Sieghart, 1994). Derartige hochaffine Bindungsstellen kommen auf einer Mehrzahl der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vor, da 90 % aller GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren  $\gamma_2$ -Untereinheiten enthalten (Rudolph und Knoflach, 2011).

### ***Untereinheiten-spezifische Effekte***

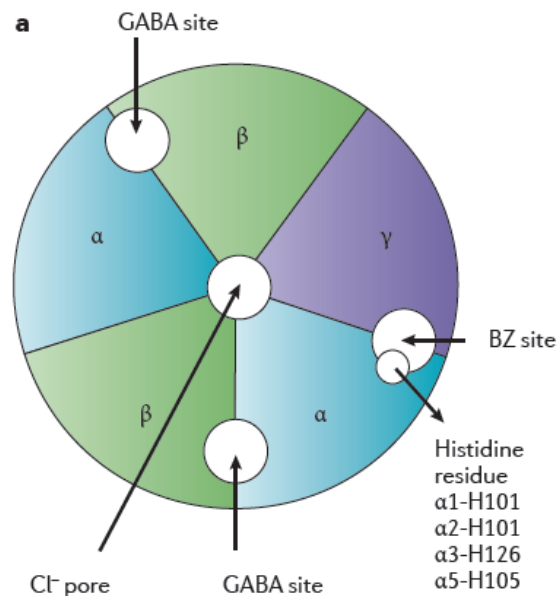
Die Vielzahl an pharmakologischen Wirkungen wird über die verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Isoformen vermittelt (Sieghart, 1994; Smith et al., 2012). Daher sind Kenntnisse über die Verteilung der einzelnen Rezeptorsubtypen im Gehirn und deren Untereinheitenzusammensetzung essentiell für die Entwicklung neuer, selektiver Substanzen mit günstigerem Nebenwirkungsprofil (Sieghart, 1994).

Durch die Induktion von Histidin-Arginin-Punktmutationen in  $\alpha_{1/2/3/5}$ -Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass Sedierung über  $\alpha_1$ - und Anxiolyse hauptsächlich über  $\alpha_2$ -Untereinheiten vermittelt wird (siehe Abb. 16; Rudolph und Knoflach, 2011).

So geht die sedierende und die amnestische Wirkung von Diazepam verloren, wenn  $\alpha_1\text{His}^{101}$  nach Arginin mutiert wird ( $\alpha_1\text{H}^{101}\text{R}$ ) (Rudolph et al., 1999; Rudolph und Knoflach, 2011), was dafür spricht, dass nur  $\alpha_1$ -enthaltende Rezeptoren Sedierung vermitteln (McKernan et al., 2000; Chen et al., 2012). Neben dem Verlust der sedierenden und der amnestischen Wirkung wird durch diese Punktmutation zusätzlich die antikonvulsive Wirkung reduziert, während die anxiolytische Wirkung erhalten bleibt (Rudolph und Knoflach, 2011).

Analog dazu ist keine anxiolytische Wirkung zu erkennen, wenn sich dieselbe Histidin-Arginin-Punktmutation in der  $\alpha_2$ -Untereinheit befindet ( $\alpha_2\text{H}^{101}\text{R}$ ), während die sedierende Wirkung erhalten bleibt und die muskelrelaxierende Wirkung abnimmt (Rudolph und Knoflach, 2011; Rudolph et al., 1999). Die  $\alpha_2$ -Untereinheit ist damit hauptverantwortlich für die anxiolytische Wirkung, aber auch die  $\alpha_3$ -Untereinheit wird mit Anxiolyse in Zusammenhang gebracht (Smith et al., 2012; Sieghart et al., 2012).

Wird die Histidin-Arginin-Mutation in  $\alpha_3$  ( $\text{H}^{126}\text{R}$ ) oder  $\alpha_5$  ( $\text{H}^{105}\text{R}$ ) induziert, wird ebenfalls die muskelrelaxierende Wirkung vermindert, wohingegen sowohl die sedierende als auch die anxiolytische Wirkung erhalten bleibt (Rudolph und Knoflach, 2011).



**Abb. 16:**

Darstellung der Benzodiazepin-Bindungsstelle zwischen  $\alpha/\gamma$ . Histidin-Arginin-Mutationen in der  $\alpha$ -Untereinheit verändern die Bindungsstelle funktionell und beeinflussen pharmakologische Effekte (Rudolph und Knoflach, 2011).

Stimulation der  $\alpha_5$ -Untereinheit durch Benzodiazepine wird mit kognitiven Nebenwirkungen wie Konzentrations- und Gedächtnisschwäche in Zusammenhang gebracht (Chen et al., 2012).

Rezeptoren, die  $\alpha_4$ - oder  $\alpha_6$ -Untereinheiten enthalten, sind unempfindlich gegenüber Benzodiazepinen (Joshi et al., 2011; Jacob et al., 2008), da der für die Bindung essentielle Histidinrest in  $\alpha_{1/2/3/5}$ -Untereinheiten (siehe Abb. 16:  $\alpha_1\text{His}^{101}$ ,  $\alpha_2\text{H}^{101}$ ,  $\alpha_3\text{H}^{126}$  und  $\alpha_5\text{H}^{105}$ ) in  $\alpha_{4/6}$ -Untereinheiten in homologer Position durch einen Argininrest ersetzt ist (Wieland et al., 1992; Pym et al., 2005). Dass Rezeptoren, die diese Untereinheiten enthalten, weniger stark durch Benzodiazepine moduliert werden, konnte auch im Tierversuch bestätigt werden: Die Arbeitsgruppe um Gulinello zeigte, dass eine gesteigerte Expression von  $\alpha_4$ -Untereinheiten im Hippocampus mit einer reduzierten Sensitivität für Lorazepam einhergeht (Gulinello et al., 2001).

### **Toleranzentwicklung**

Obwohl Wirkungen und Nebenwirkungen von Benzodiazepinen in einer Vielzahl an Studien untersucht wurden, ist dennoch nicht vollständig geklärt, weswegen es bei längerer Einnahme zum Phänomen der Toleranzentwicklung kommt. Während sich der Toleranzeffekt in Bezug auf die sedierende, die hypnotische sowie die antikonvulsive Wirkung relativ schnell einstellt, ist bislang noch unklar, ob auch die anxiolytische und die amnestische Wirkung mit der Zeit nachlassen. Ursachen für die Toleranzentwicklung könnten möglicherweise adaptive Veränderungen im GABA<sub>A</sub>-Rezeptor selbst oder Veränderungen in anderen Neurotransmittersystemen, beispielsweise durch Glutamat vermittelt, sein (Vinkers und Olivier, 2012). So konnte die Arbeitsgruppe um Pesold im Tierversuch beobachten, dass Diazepam nach 14-tägiger Applikation bei Ratten zu einer Reduktion der Expression von  $\alpha_1$ -Untereinheiten führt, wohingegen die Expression von  $\alpha_5$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten stark zunimmt (Pesold et al., 1997). Die  $\alpha_5$ -Untereinheit scheint eine wichtige Rolle für die Toleranzentwicklung bezüglich der sedierenden Wirkung zu spielen (van Rijnsoever, 2004).

### **Abhängigkeit**

Bei abruptem Absetzen der Medikation nach einer länger andauernden Therapie (ab etwa 3 bis 4 Wochen) kann sich relativ rasch eine Entzugssymptomatik entwickeln (Heberlein et al., 2009). Betroffene Patienten leiden an starken Entzugerscheinungen, die sich in Form von

Schlafstörungen, gastrointestinalen Beschwerden, Tremor, Unruhe, Ängstlichkeit und Muskelspasmen äußern können (Lalive et al., 2011).

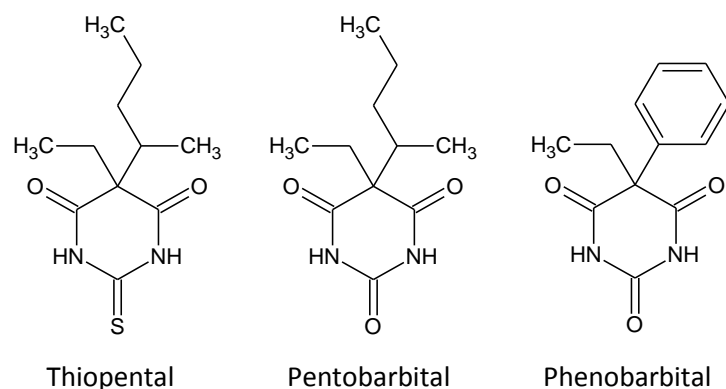
Welche pharmakologischen und molekularen Ursachen im Detail für die Ausbildung der Abhängigkeit verantwortlich sind, ist noch unklar. Vermutlich kommt es jedoch bei chronischer Anwendung ebenfalls zu Veränderungen im Rezeptor, wodurch dieser weniger sensitiv für Benzodiazepine wird (Wafford, 2005). Tan et al. zeigten, dass das Abhängigkeitspotential von Benzodiazepinen vor allem über  $\alpha_1$ -Untereinheiten vermittelt wird. Daher könnten Untereinheiten-selektive Benzodiazepine, welche nicht an  $\alpha_1$ -Rezeptoren binden, das Abhängigkeitspotential reduzieren (Tan et al., 2010).

## 2.2 Barbiturate

Barbiturate sind Derivate der Barbitursäure. Sie wirken dämpfend auf das zentrale Nervensystem und fanden Verwendung als Sedativa, Hypnotika, Anästhetika und Antikonvulsiva. Nachdem ihr Einsatz jedoch in den 1930iger und 1940iger den Höhepunkt erreicht hatte, wurden Barbiturate größtenteils durch Propofol und Benzodiazepine ersetzt, da diese weniger anfällig für Überdosierung, Missbrauch und Abhängigkeit sind (López-Muñoz et al., 2005; Ito et al., 1996; Prajapati et al., 2009).

Bei langfristiger Gabe von Barbituraten kommt es vermutlich zu Desensibilisierung und Rezeptordownregulation, wodurch sich – ähnlich wie bei Benzodiazepinen – eine Toleranz und Abhängigkeit ausbilden kann (Ito et al., 1996).

Phenobarbital wird noch gelegentlich als Einschlafhilfe und als Antikonvulsivum bei einem Status epilepticus eingesetzt (Raj et al., 2011; Oakley et al., 2012), Thiopental als Injektionsanästhetikum und Pentobarbital als Anästhetikum in der Veterinärmedizin (Oakley et al., 2012).



**Abb. 17:**  
Darstellung der Strukturformeln  
ausgewählter Barbiturate

Obwohl Barbiturate mit einer Vielzahl an ionotropen Rezeptoren interagieren, stellen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren dennoch die wichtigsten Targets dar (Smith und Riskin, 1991). In geringer Konzentration führen sie allosterisch zu einer Verstärkung der GABA-Wirkung, wohingegen sie in höherer Konzentration – im Gegensatz zu Benzodiazepinen – auch ohne gleichzeitige Anwesenheit von GABA den Chloridkanal öffnen und eine Hyperpolarisation induzieren können (Sieghart, 1994; Sieghart et al., 2012). In noch höheren Konzentrationen führen Barbiturate wie Pentobarbital schließlich zu einer Blockade des Kanals (Thompson et al., 1996).

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Thompson deuten darauf hin, dass Barbiturate wie Pentobarbital mit mehreren Bindungsstellen am Rezeptor interagieren und diese von der Untereinheiten-Zusammensetzung des Rezeptors abhängen.

Die Untersuchungen zeigen, dass verschiedene  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten im GABA<sub>A</sub>-Rezeptor die Wirksamkeit von Pentobarbital unterschiedlich stark beeinflussen. Die Wirksamkeit von Pentobarbital und dessen Affinität zum Rezeptor scheint dabei stark von der  $\alpha$ -Untereinheit abhängig zu sein. Die Aktivierung des Chloridkanals durch 100 – 1000  $\mu$ M Pentobarbital beträgt an  $\alpha_6$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zwischen 150 und 170 % der maximalen Aktivierung durch GABA, während an  $\alpha_5\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren 45 % und an  $\alpha_2\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren 82 % des maximalen GABA-Effekts gemessen werden konnte. Demgegenüber scheint die  $\beta$ -Untereinheit die Aktivierung des Rezeptors durch Pentobarbital weniger stark zu beeinflussen: Es konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Affinität oder der Wirksamkeit an  $\alpha_6\beta_{1/2/3}\gamma_{25}$ -Rezeptoren festgestellt werden.  $\alpha_1\beta\gamma_{25}$ -Rezeptoren wurden jedoch stärker durch Pentobarbital aktiviert, wenn sie  $\beta_3$ -Untereinheiten enthielten (Thompson et al., 1996).

## 2.3 Neurosteroide

Klassische Steroidhormone werden in endokrinen Drüsen gebildet. Sie binden an spezielle nukleäre Rezeptoren, wirken als Transkriptionsfaktoren und regulieren so die Genexpression (Rupprecht, 2002).

Andere, sogenannte Neurosteroide, beeinflussen neuronale Funktionen hauptsächlich durch Bindung an ligandengesteuerte Ionenkanäle und werden entweder aus Hormonsteroiden gebildet oder in Neuronen und Gliazellen direkt im Gehirn aus Cholesterol de novo synthetisiert (siehe Abb. 18; Rupprecht und Holsboer, 1999; Rupprecht, 2002; Joshi et al., 2011; Wang, 2011).



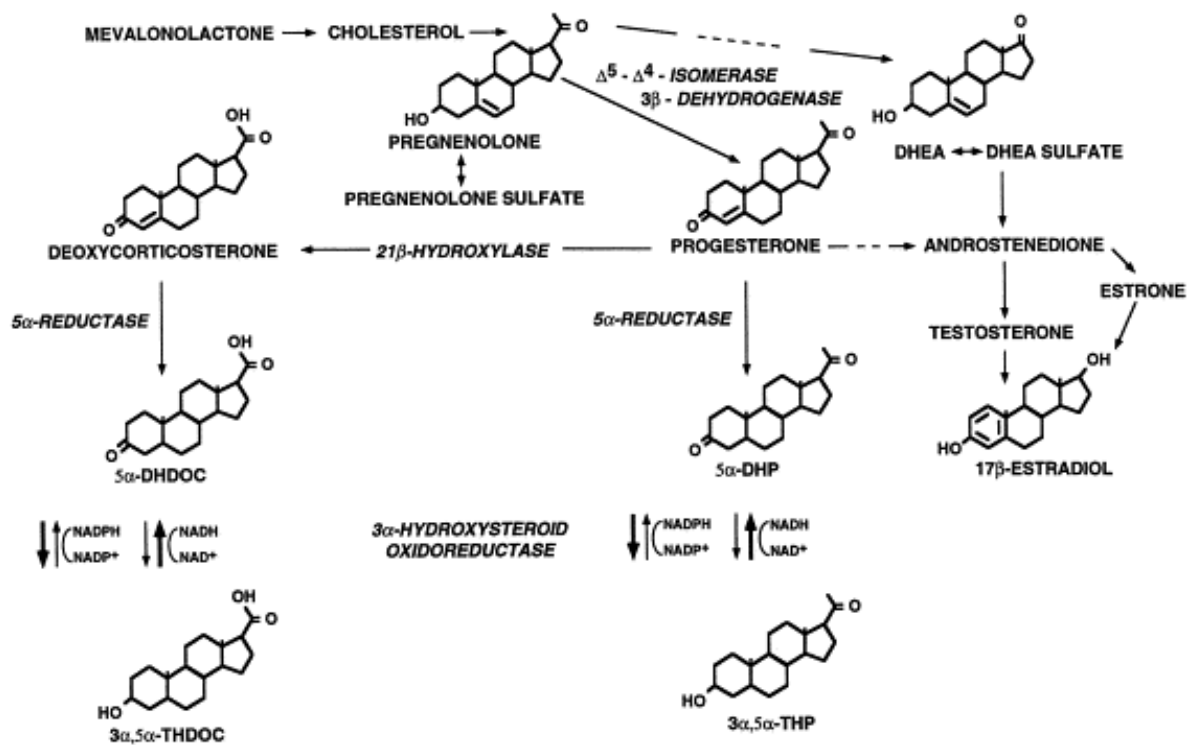


Abb. 18: Synthese und Metabolisierung endogener Neurosteroiden (Rupprecht und Holsboer, 1999)

Neurosteroiden können, abhängig von ihren chemischen Eigenschaften, am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte zeigen:

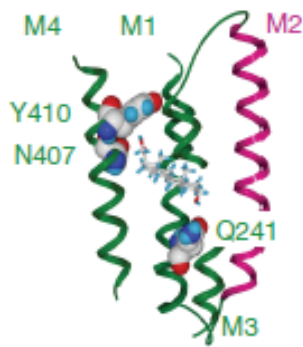
Niedrige, nanomolare Konzentrationen von 3α-OH-Neurosteroiden wie Allopregnanolon (3α-OH-5α-Tetrahydroprogesteron; 3α,5α-THP) sowie von Progesteron oder Pregnanolon potenzieren GABA-induzierte Chloridströme ( $I_{GABA}$ ), erhöhen die Affinität des Rezeptors für GABA und verstärken so die GABAerge Neurotransmission, während höhere, submikromolare bis mikromolare Konzentrationen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren direkt aktivieren (Chisari et al., 2010). Sie aktivieren sowohl synaptische als auch extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und verstärken daher phasische wie auch tonische Inhibition (Reddy, 2011). Derartige Neurosteroiden sind allosterische Modulatoren am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und besitzen unter anderem antikonvulsives, anxiolytisches, hypnotisches und anästhetisches Potential (Gasior et al., 1999; Wang, 2011). Im Gegensatz dazu wirken 3β-OH-Steroide wie 3β-OH-5α-Tetrahydroprogesteron (Isoallopregnanolon) und 3β-OH-5β-Tetrahydroprogesteron (Epipregnanolon) sowie sulfatierte Neurosteroiden wie Pregnenolonsulfat (PS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) antagonistisch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Wang, 2011; Reddy, 2011).

*In vivo* zeigen Neurosteroiden wie Pregnenolon, Progesteron, Allopregnanolon und Dehydroepiandrosteron (DHEA) am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor biphasische Effekte: Pregnenolonsulfat zeigte im Elevated Plus-Maze an Mäusen in niedriger Dosis einen anxiolytischen Effekt, während hohe Dosen anxiogen wirkten. Auch DHEA und Allopregnanolon wirken in niedriger Konzentration agonistisch und damit anxiolytisch, in höherer Konzentration jedoch antagonistisch und anxiogen (Melcangi et al., 2011; Schüle et al., 2011). Dieser konzentrationsabhängige, paradoxe Effekt spielt unter anderem bei der Entstehung von Stimmungsschwankungen bei Frauen mit prämenstruellem Syndrom (PMS) oder während der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle, da hier große Mengen an Neurosteroiden gebildet werden (siehe Unterpunkt „Neurosteroiden und Schwangerschaft/PMS“; Wang, 2011).

### **Bindungsstellen**

Spezifische Bindungsstellen für Neurosteroiden konnten sowohl direkt in der  $\alpha$ - als auch zwischen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Untereinheit nachgewiesen werden (Hosie et al., 2007; Li et al., 2009). Derartige Bindungsstellen kommen vermutlich auf allen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten vor, weswegen ein typischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ( $2\alpha/2\beta/1\gamma$ -Isoform) mehrere Bindungsstellen für Neurosteroiden besitzt. Neurosteroiden binden daher an nahezu alle GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Isoformen, wobei sie besonders hohe Affinität für extrasynaptische  $\alpha\beta\delta$ -Isoformen zeigen (Hosie et al., 2007; Renny, 2011).

Für die Bindung der  $3\alpha$ -OH-Neurosteroiden wie Allopregnanolon an den Rezeptor spielt vermutlich ein Glutaminrest der  $\alpha_1$ -Untereinheit ( $\alpha_1\text{Gln}^{241}$ ) eine wichtige Rolle (siehe Abb. 19), da diese Aminosäure vermutlich eine Wasserstoffbrücke zur  $3\alpha$ -OH-Gruppe ausbildet (Hosie et al., 2006) und  $I_{\text{GABA}}$  um das 100-fache reduziert wird, wenn dieser Rest nach Tryptophan mutiert wird (Hosie et al., 2006, 2009). Die Arbeitsgruppe um Hosie zeigte weiters, dass vermutlich auch  $\text{Asn}^{407}$  und  $\text{Tyr}^{410}$  in der TM4 der  $\alpha_1$ -Untereinheit Teil der Bindungstasche für Neurosteroiden sind (siehe Abb. 19). Diese beiden polaren Reste könnten Wasserstoffbrückenbindungen zur Ketogruppe in Position C20 der Neurosteroiden ausbilden und befinden sich etwa 15 – 18 Angström von  $\alpha_1\text{Gln}^{241}$  entfernt, was einem Abstand entspricht, innerhalb dessen sich ein Molekül von der Größe eines Neurosteroids anlagern könnte (Hosie et al., 2006). Die Mutationen  $\text{N}^{407}\text{A}$  ( $\alpha_1\text{Asn}^{407} \rightarrow \alpha_1\text{Ala}^{407}$ ) und  $\text{Y}^{410}\text{F}$  ( $\alpha_1\text{Tyr}^{410} \rightarrow \alpha_1\text{Phe}^{410}$ ) reduzierten  $I_{\text{GABA}}$  um das 3 – 10-fache (Hosie et al., 2006).

**Abb. 19:**

Darstellung eines Neurosteroids, das über die Aminosäuren Q241, N407 und Y410 an die  $\alpha_1$ -Untereinheit bindet (Hosie et al., 2006)

### ***Pregnenolon***

Pregnenolon ist die wichtigste Vorstufe für die Synthese endogener Neurosteroiden (Schüle et al., 2011). Während Pregnenolon selbst keinen Effekt am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zeigt, wirkt sowohl 3 $\alpha$ - als auch 3 $\beta$ -Pregnenolonsulfat antagonistisch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Wang, 2011). Wie bereits erwähnt, wirkt Pregnenolonsulfat in höherer Konzentration anxiogen, zeigt in niedriger Konzentration jedoch anxiolytische Effekte (Reddy und Kulkarni, 1997; Schüle, 2011). Überraschend ist, dass die anxiolytischen Effekte von Pregnenolonsulfat scheinbar nicht durch den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten Picrotoxin blockiert werden, während die anxiolytischen Effekte von Allopregnanolon und Progesteron durch Picrotoxin aufgehoben werden (Reddy und Kulkarni, 1997).

### ***Progesteron***

Die anxiolytische Wirkung von Progesteron beruht vermutlich hauptsächlich auf der Umwandlung von Progesteron zu Allopregnanolon (Bitran et al., 1995). Für diese Theorie spricht auch, dass die anxiolytischen Effekte bei vorheriger Gabe von 5 $\alpha$ -Reduktasehemmern ausbleiben (Bitran et al., 1995) und die Gabe von Progesteron bei 5 $\alpha$ -Reduktase-Knock-out-Mäusen im Open Field zu keiner Veränderung des Angstverhaltens führte (Frye et al., 2004).

### ***Allopregnanolon***

Allopregnanolon zeigt ebenfalls anxiolytische Effekte am Tiermodell (Melcangi et al., 2011). Direkte Applikation von Pregnanolon – das in Bezug auf die anxiolytische Wirkung mit Allopregnanolon vergleichbar ist – in den Hippocampus reduziert ängstliches Verhalten bei Ratten (Bitran et al., 1999).

Das 3 $\beta$ -Diastereomer (3 $\beta$ ,5 $\alpha$ -THP; Isoallopregnanolon) inhibiert als GABA<sub>A</sub>-Antagonist die agonistische Wirkung des Allopregnanolon (Lundgren et al., 2003; Bäckström et al., 2005).

### **Neurosteroide und Schwangerschaft/PMS**

Neurosteroide wie Progesteron, Pregnenolon und Allopregnanolon zeigen biphasische Effekte am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und werden besonders während der Schwangerschaft und in der Lutealphase des weiblichen Zyklus vermehrt produziert. Die Konzentration an Allopregnanolon beträgt im Plasma fruchtbarer Frauen während der Follikelphase durchschnittlich 0,2 – 0,5 nmol/l und während der Lutealphase bis zu 4 nmol/l. Im dritten Trimester der Schwangerschaft kann die Serumkonzentration von Allopregnanolon auf über 100 nmol/l ansteigen. Diese erhöhte Konzentration an Neurosteroiden wird mit dem gehäuften Auftreten von Stimmungsschwankungen, Gereiztheit und ängstlichem sowie aggressivem Verhalten bei schwangeren Frauen und Frauen, die unter PMS leiden, in Verbindung gebracht (Wang, 2011).

Es ist nicht im Detail geklärt, warum bestimmte Neurosteroide in niedrigen Konzentrationen anxiolytisch und in hohen Konzentrationen anxiogen wirken. Möglicherweise spielen hier  $\delta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren eine entscheidende Rolle, die ausschließlich extrasynaptisch vorkommen und eine besonders hohe Affinität für Neurosteroide aufweisen (Wang, 2011).

Shen et al. zeigten, dass Allopregnanolon an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren nicht nur agonistisch wirkt, sondern an  $\alpha_4\beta_2\delta$ -Rezeptoren auch antagonistische Effekte vermittelt. Derartige Isoformen sind üblicherweise nur in sehr geringer Dichte exprimiert, werden jedoch beispielsweise in der Pubertät vermehrt gebildet und mit dem vermehrten Auftreten von Stimmungsschwankungen während dieser Zeit in Zusammenhang gebracht (Shen et al., 2007).

## **2.4 Anästhetika**

Durch die Applikation klassischer Anästhetika wird ein Zustand hervorgerufen, der durch Bewusstseinsverlust, Amnesie, Analgesie und Immobilität gekennzeichnet ist (Bali und Akabas, 2004). Glaubte man früher, dass die anästhetische Wirkung auf einer Interaktion mit der Lipiddoppelschicht beruht, so weiß man heute, dass spezielle Ligand-Rezeptor-Interaktionen eine entscheidende Rolle spielen (Bali und Akabas, 2004; Franks und Lieb, 2004).

Anästhetika wirken agonistisch an inhibitorischen Rezeptoren beziehungsweise antagonistisch an exzitatorischen Rezeptoren (van Dort et al., 2008; Forman und Miller, 2011; Olsen und Li, 2011).

Die Wirkung intravenöser Anästhetika ist konzentrationsabhängig. In niedrigen Konzentrationen verstärken sie  $I_{GABA_A}$ , wohingegen sie in hohen Konzentrationen den Ionenkanal auch ohne die

Anwesenheit von GABA öffnen. Noch höhere Konzentrationen mancher Anästhetika können sogar eine Blockade des Kanals hervorrufen (Bali und Akabas, 2004).

### **Bindungsstellen**

Intravenöse Anästhetika wie Etomidat und Propofol interagieren vor allem mit  $\beta$ -Untereinheiten, während die Wirkung inhalativer Anästhetika größtenteils über  $\alpha$ -Untereinheiten vermittelt wird (Bali und Akabas, 2004).

Allosterische Bindungsstellen für Anästhetika konnten mittels photoaktivierbarer Liganden bereits sowohl am nikotinischen Acetylcholin-Rezeptor (nAch) als auch am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor nachgewiesen werden (Forman und Miller, 2011).

Bislang konnten drei Arten von Bindungsstellen für Anästhetika identifiziert werden, die sich alle innerhalb der Transmembrandomänen befinden:

- innerhalb einer bestimmten Untereinheit (z.B. binden Halothan und Etomidat an die  $\rho$ -Untereinheit von nAch-Rezeptoren)
- zwischen den fünf Untereinheiten an der luminalen Seite des Ionenkanals (wie z.B. bei Etomidat und Alkohol an nAch-Rezeptoren)
- zwischen zwei bestimmten Untereinheiten (z.B. bindet Etomidat zwischen der  $\alpha_1$ - und der  $\beta_{2/3}$ -Untereinheit von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren) (Forman und Miller, 2011; Olsen und Li, 2011)

### **Etomidat**

Etomidat öffnet – wie auch Propofol – den Chloridkanal des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors in höherer Konzentration auch ohne Anwesenheit von GABA, während niedrige Konzentrationen nur die Wirkung von GABA verstärken (Forman und Miller, 2011). Es wäre daher möglich, dass am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor zwei Bindungsstellen für Etomidat mit unterschiedlicher Affinität vorhanden sind. Dagegen spricht jedoch, dass eine definierte Aminosäure in  $\beta$ TM2 ( $\beta_1$ Serin<sup>290</sup>,  $\beta_2$ Asn<sup>289</sup> bzw.  $\beta_3$ Asn<sup>290</sup>) sowohl mit der GABA-Modulation als auch mit der direkten Aktivierung des Kanals in Zusammenhang gebracht werden konnte (Rüsch et al., 2004; Bali und Akabas, 2004; Wingrove et al., 1994). Es ist jedoch unklar, ob diese Aminosäure wirklich Teil der Bindungsstelle für Etomidat ist oder die anästhetische Wirkung auf andere Weise beeinflusst (Olsen und Li, 2011).

In welchem Ausmaß die GABA-Wirkung durch Etomidat verstärkt wird, hängt nicht nur von der Konzentration sondern auch von der Untereinheitenzusammensetzung des Rezeptors ab. So

zeigen Rezeptoren, die  $\alpha_1$ -,  $\alpha_2$ - oder  $\alpha_6$ -Untereinheiten enthalten, durch Etomidat eine stärkere Potenzierung von  $I_{GABA}$ , wenn zusätzlich  $\beta_2$ -Untereinheiten vorkommen (Hill-Venning et al., 1997).

Für die GABA-mimetische Wirkung von Etomidat spielt die  $\beta_2$ -Untereinheit ebenfalls eine stärkere Rolle als die  $\beta_1$ -Untereinheit, wohingegen bei Propofol kein Unterschied zwischen  $\beta_1$  und  $\beta_2$  erkennbar ist (Hill-Venning et al., 1997). Weiters wurde gezeigt, dass die sedierende Wirkung von Etomidat über  $\beta_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt wird (Groves et al., 2006).

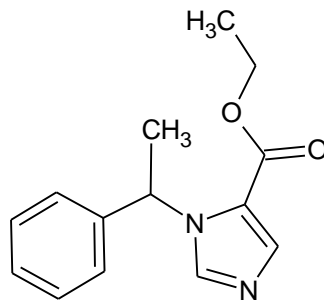


Abb. 20: Strukturformel von Etomidat

### Propofol

Propofol interagiert vermutlich mit einem Bereich im extrazellulären Teil der TM3 der  $\beta$ -Untereinheit (Bali und Akabas, 2004). Ähnlich wie bei Etomidat scheint auch hier eine bestimmte Aminosäure in  $\beta$ TM2 ( $\beta_1$ Serin<sup>290</sup>,  $\beta_2$ Asn<sup>289</sup> bzw.  $\beta_3$ Asn<sup>290</sup>) essentiell für die Wirkung zu sein, wohingegen dieser Rest unbedeutend für die Wirkung von Neurosteroiden ist (Li et al., 2009).

Propofol zeigt in einer Konzentration zwischen 30 nM – 30  $\mu$ M eine konzentrationsabhängige Potenzierung von  $I_{GABA}$  in Oozyten, die entweder  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ - oder  $\alpha_1\beta_1\gamma_{2L}$ -Rezeptoren exprimieren. Die Wirkstärke von Propofol an  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist unabhängig davon, welche  $\beta$ -Untereinheit im Rezeptor vorkommt. Im Gegensatz zu Etomidat scheint weder der EC<sub>50</sub>-Wert, noch der maximale Effekt von Propofol von der jeweiligen  $\beta$ -Isoform abhängig zu sein (Hill-Venning et al., 1997).

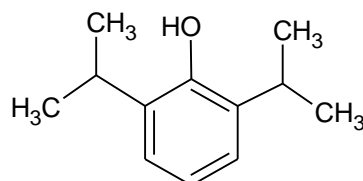


Abb. 21: Strukturformel von Propofol

### Isofluran

Isofluran ist eines der am besten untersuchten und am häufigsten eingesetzten Inhalationsanästhetika (van Dort et al., 2008).

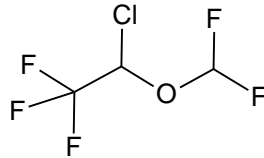


Abb. 22: Strukturformel von Isofluran

Klinisch relevante Konzentrationen von Isofluran verzögern die Dissoziation der GABA vom Rezeptor, wodurch die GABA-Wirkung verstärkt wird. Bei höheren Konzentrationen bleibt dieser Effekt aus, sodass  $I_{GABA}$  sogar gehemmt werden kann.

Die anästhetische Potenz von Isofluran ist wiederum von der Zusammensetzung des Rezeptors abhängig (van Dort et al., 2008). Durch eine Mutation in der  $\alpha_1$ -Untereinheit ( $\alpha_1\text{Ser}^{270} \rightarrow \alpha_1\text{His}^{270}$ ) wird der Rezeptor beispielsweise unempfindlich für Isofluran, zugleich wird die Empfindlichkeit für GABA jedoch erhöht (Borghese et al., 2006). Weiters konnte gezeigt werden, dass auch  $\gamma_{25}$ -Untereinheiten in Zusammenhang mit der Modulation von  $I_{GABA}$  durch Isofluran stehen (van Dort et al., 2008).

## 2.5 Ethanol

Ethanol hat starke, weitreichende Effekte auf das zentrale Nervensystem und beeinflusst die Aktivität von zahlreichen Rezeptoren, Kanälen und Enzymen.

Diese neurochemischen Veränderungen sind vermutlich für die sedierende, hypnotische und antikonvulsive Wirkung von Ethanol verantwortlich. Weiters führen sie zu kognitiven und motorischen Beeinträchtigungen sowie zur Zerstörung bestimmter Nervenbahnen im Gehirn (Korpi et al., 2007; Kumar et al., 2009).

Der Wirkmechanismus von Ethanol am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist noch nicht im Detail geklärt, diverse Untersuchungen lieferten kontroverse Ergebnisse (Korpi et al., 2002). Man nimmt an, dass Ethanol durch zahlreiche Mechanismen die inhibitorische Neurotransmission verstärkt. Ethanol erhöht beispielsweise die Konzentration endogener Neurosteroiden im Gehirn durch Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse (Follesa et al., 2006). Weiters führt Ethanol

vermutlich zu einer vermehrten Freisetzung von GABA aus GABAergen Golgizellen im Kleinhirn (Carta et al., 2004; Follesa et al., 2006; Kumar et al., 2009).

Die Arbeitsgruppe um Wafford zeigte, dass Ethanol ausschließlich den Chlorideinstrom in  $\gamma_{2L}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren potenziert, während kein Effekt an  $\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sichtbar ist. GABA und Flunitrazepam zeigten dagegen keinen unterschiedlichen Effekt an beiden Splicevarianten.  $\gamma_{2L}$  unterscheidet sich von  $\gamma_{2S}$  durch acht zusätzliche Aminosäuren, die vermutlich eine Konsensussequenz für Proteinkinase C (PKC) darstellen (Ser-X-Lys). Durch einen Austausch dieser Aminosäuren durch solche, die nicht phosphoryliert werden, wurde der Effekt von Ethanol am  $\gamma_{2L}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor aufgehoben. Wafford et al. vermuten daher, dass die Phosphorylierung dieser Reste durch die PKC entscheidend für die Ethanolwirkung sein muss (Wafford und Withing, 1992).

Im Gegensatz dazu konnte die Arbeitsgruppe um Sigel keinen Unterschied in der Empfindlichkeit für Ethanol zwischen  $\gamma_{2S}$ - und  $\gamma_{2L}$ -Untereinheiten feststellen (Sigel et al., 1993). Kurata et al. vermuten sogar, dass die Potenzierung von  $I_{GABA}$  zumindest durch langkettige Alkohole wie n-Octanol gänzlich unabhängig von  $\gamma$ -Untereinheiten ist (Kurata et al., 1993).

Neuere Untersuchungen zeigen, dass Ethanol eine besonders hohe Affinität für extrasynaptische  $\delta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besitzt (Wallner und Olsen, 2008; Glykys et al., 2007). Während typische  $\alpha_1\beta\gamma_2$ - und  $\alpha_2\beta\gamma_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren erst durch höhere Ethanolkonzentrationen (>60 mM) moduliert werden (Sigel et al., 1993), sprechen  $\delta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auch auf niedrigere Konzentrationen an (<30 mM) (Glykys et al., 2007; Hanchar et al., 2005). Wallner et al. fanden heraus, dass vor allem jene  $\delta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die gleichzeitig  $\alpha_{4/6}$ - und  $\beta_3$ -Untereinheiten enthalten, besonders empfindlich für Ethanol sind. Derartige  $\alpha_{4/6}\beta_3\delta$ -Rezeptoren besitzen vermutlich zwei verschiedene Bindungsstellen für Ethanol: Eine Bindungsstelle, die hochaffin (<30 mM Plasmakonzentration) für die Bindung von Ethanol und dem Ethanol-Antagonisten Ro15-4513 ist, und eine weitere, niedrigaffine (>100 mM Plasmakonzentration) Ethanol-Bindungsstelle. Für diese niedrigaffine Bindungsstelle scheint Asn<sup>256</sup> in der TM2 der  $\beta_3$ -Untereinheit von besonderer Bedeutung zu sein, da die Empfindlichkeit des Rezeptors für Konzentrationen >100 mM Ethanol drastisch reduziert wird, wenn dieser Rest durch Methionin ersetzt wird (Wallner und Olsen, 2008).

Hanchar et al. zeigten weiters, dass die Empfindlichkeit von Ethanol für  $\alpha_6\beta_3\delta$ -Rezeptoren noch weiter gesteigert wird, wenn Arg<sup>100</sup> in der  $\alpha_6$ -Untereinheit nach Glutamin mutiert wird (Hanchar et al., 2005). Die Arbeitsgruppe um Botta konnte diese These in ihren Untersuchungen nicht



bestätigen und beobachtete keinen Unterschied in der Empfindlichkeit zwischen Rezeptoren mit  $\alpha_6\text{Arg}^{100}$  und solchen mit  $\alpha_6\text{Gln}^{100}$  (Botta et al., 2007), die Resultate dieser Arbeitsgruppe werden jedoch angezweifelt (Otis, 2008).

Im Gegensatz dazu untersuchte die Arbeitsgruppe um Sigel verschiedene Anordnungen der Untereinheiten  $\alpha_6$ ,  $\beta_3$ , und  $\delta$  in einem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ( $\beta_3\text{-}\alpha_6\text{-}\delta/\alpha_6\text{-}\beta_3$ ,  $\alpha_6\text{-}\beta_3\text{-}\alpha_6/\beta_3\text{-}\delta$ ,  $\beta_3\text{-}\delta\text{-}\beta_3/\alpha_6\text{-}\beta_3$  und  $\alpha_6\text{-}\beta_3\text{-}\alpha_6/\delta$ ), konnte jedoch keinerlei Modulation der Rezeptoren durch Ethanol (7 – 30 mM) beobachten (Baur et al., 2009).

## 2.6 Loreclezol

Loreclezol ist ein Breitspektrum-Antiepileptikum, das spezifisch mit zwei separaten allosterischen Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor interagiert (Luszczki et al., 2005).

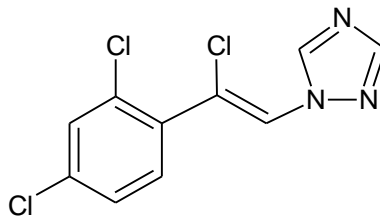


Abb. 23.: Strukturformel von Loreclezol

Loreclezol weist eine mehr als 300-fach höhere Selektivität für  $\beta_2$ - und  $\beta_3$ -, als für  $\beta_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf (Wingrove et al., 1994). Diese  $\beta_{2/3}$ -Selektivität erinnert an Etomidat, das auch strukturelle Ähnlichkeit mit Loreclezol aufweist (Hill-Venning et al., 1997; Groves et al., 2006). Als Grund für die höhere  $\beta_{2/3}$ -Selektivität konnte ein Asparaginrest identifiziert werden ( $\beta_2\text{Asn}^{289}$  bzw.  $\beta_3\text{Asn}^{290}$ ), der in  $\beta_1$  durch ein Serin ersetzt ist ( $\beta_1\text{Ser}^{290}$ ) und in einem Bereich lokalisiert ist, der vermutlich für die Bildung der Kanalpore von Bedeutung ist (Hill-Venning et al., 1997; Wingrove et al., 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die antikonvulsive als auch die sedierende Wirkung von Loreclezol hauptsächlich durch  $\beta_2$ -Untereinheiten vermittelt wird. Die Rolle der  $\beta_3$ -Untereinheit ist noch unklar. Sie ist vermutlich nicht für die anxiolytische und sedierende Wirkung verantwortlich,  $\beta_3$ -Knock-out Mäuse zeigen im Gegensatz zu  $\alpha_1$ - oder  $\beta_2$ -Knock-out-Mäusen aber vermehrt unwillkürliche Krampfanfälle (Groves et al., 2006).

Loreclezol moduliert abgesehen von  $\beta$ -Untereinheiten auch  $\rho$ - (Thomet et al., 2000) und vermutlich auch  $\theta$ -Untereinheiten. Derartige Rezeptoren sind im Gehirn jedoch deutlich schwächer exprimiert und spielen vermutlich nur eine untergeordnete Rolle für die Wirkung (Groves et al., 2006).

## 3 GABA-assoziierte Erkrankungen

### 3.1 Angststörungen

Obwohl physiologische Angst essentiell für das Überleben unter ständig wechselnden Umweltbedingungen ist, handelt es sich bei andauernder, generalisierter Angst oder unangemessener Furcht um pathologische Krankheitsbilder, die die Lebensqualität gravierend reduzieren können (Tasan et al., 2011).

Angststörungen gehören zu den häufigsten neuropsychiatrischen Erkrankungen (American Psychiatric Association, 2010; Satori et al., 2011) und weisen eine hohe Komorbidität auf. So leiden beispielsweise etwa 60 % der Angstpatienten zusätzlich an Depressionen (Sartori et al., 2011). Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens eine Angststörung zu entwickeln, beträgt etwa zwischen 14 und 29 % (Kessler et al., 2005; Hettema et al., 2001; Cryan und Sweeney, 2011).

Angststörungen sind gekennzeichnet durch übertriebene Furcht vor bestimmten Objekten oder Situationen, in denen keine echte Gefahr vorliegt (Shin und Liberzon, 2010). Sie stellen sowohl für die Betroffenen als auch für die gesamte Gesellschaft eine große soziale Belastung dar (Tasan et al., 2011) und bedeuten enorme Kosten für das Gesundheitssystem (Shin und Liberzon, 2010; Huh et al., 2011).

#### **Formen von Angststörungen**

Die APA (American Psychiatric Association) unterscheidet verschiedene Formen von Angststörungen:

#### Generalisierte Angststörung (GAD; General anxiety disorder)

Die GAD ist die häufigste Form der Angststörung und betrifft etwa 5 % aller Erwachsenen (Huh et al., 2011). Eine generalisierte Angststörung ist charakterisiert durch übertriebene, diffuse

Gefühle von Angst und Sorge, die schwer zu kontrollieren sind. Menschen mit GAD berichten weiters über Ruhelosigkeit, Müdigkeit, Reizbarkeit, Muskelverspannung sowie Schlaf- und Konzentrationsschwierigkeiten.

#### Panikstörung

Patienten mit Panikstörungen leiden unter wiederkehrenden, unerwartet auftretenden Panikattacken und leben mit der ständigen Angst vor neuen Attacken und deren Auswirkungen. Panikattacken sind einzelne Schübe intensiver Angstgefühle, die mit einer Aktivierung des sympathischen Nervensystems einhergehen und ohne Anwesenheit einer echten Gefahr auftreten.

#### Posttraumatisches Stress-Syndrom (PTSD; posttraumatic stress disorder)

PTSD kann sich bei Individuen entwickeln, die einer oder mehreren lebensbedrohlichen Situationen ausgesetzt waren und daraufhin mit intensiver Angst, Hilflosigkeit oder Entsetzen reagierten. Betroffene machen dieses traumatische Erlebnis immer wieder in Form von Alpträumen und Flashbacks durch. Häufig berichten Patienten auch über Übererregbarkeit, die sich in Form von Hypervigilanz, übertriebener Schreckhaftigkeit sowie Schlaf- und Konzentrationsstörungen äußert.

#### Zwangsneurose

Patienten mit Zwangsneurosen leiden unter wiederkehrenden, ungewollten zwanghaften Gedanken, die Unbehagen und übertriebene, ritualhafte Verhaltensweisen nach sich ziehen.

#### Sozialphobie

Sozialphobien sind gekennzeichnet durch eine ausgeprägte und anhaltende Furcht der Betroffenen vor sozialen Situationen, in denen sie im Mittelpunkt stehen und sich beschämend oder unpassend verhalten.

#### Spezifische Phobie

Spezifische Phobien sind gekennzeichnet durch übertriebene und andauernde Furcht vor bestimmten Objekten oder Situationen wie beispielsweise Tiere, Flugzeuge, geschlossene Räume, Höhe oder Blut. Spezifische Phobien sind relativ häufig und entwickeln sich im Laufe eines Lebens mit einer Wahrscheinlichkeit von 7 – 11 % (APA, 2010; Shin und Liberzon, 2010).

### **Ätiologie und Pathogenese**

Es gibt Hinweise, dass für die Ätiologie einer Angststörung das gemeinsame Auftreten bestimmter intrinsischer und extrinsischer Faktoren von Bedeutung ist (Sartori et al., 2011). So schätzt man, dass Angsterkrankungen zu etwa 30 – 40 % erblich sind (Hettema et al., 2001). Weiters konnte gezeigt werden, dass auch Umweltfaktoren – wie beispielsweise belastende Lebensereignisse – einen starken Einfluss auf die Entstehung von Angststörungen ausüben. Die Anfälligkeit eines Individuums für derartige Umweltfaktoren scheint wiederum von bestimmten Genen moduliert zu werden (Sartori et al., 2011).

Gehirnstrukturen, die häufig mit der Entstehung von Angststörungen in Zusammenhang gebracht werden, sind unter anderem die Amygdala, der Hippocampus und der präfrontale Cortex (siehe Abb. 24; Tasan et al., 2011; Gulinello et al., 2001; Jacobson-Pick et al., 2012; Rodrigues et al., 2009).

Jacobson-Prick et al. zeigten, dass juvenile Stressoren bei Mäusen in einem Alter von 26 – 28 Tagen zu einer Veränderung der Expression bestimmter GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten ( $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$ ,  $\alpha_5$  und  $\gamma_2$ ) im präfrontalen Cortex und der Amygdala führen. Mäuse, die diesen juvenilen Stressoren ausgesetzt waren, zeigten im Erwachsenenalter im Elevated Plus-Maze (EPM) ängstlicheres Verhalten als die Kontrollgruppe, wobei Weibchen im Vergleich zu Männchen deutlich ängstlicher waren (Jacobson-Pick et al., 2012).

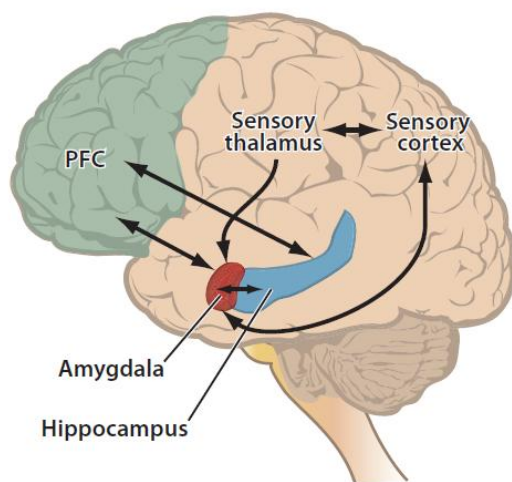
Es konnte nachgewiesen werden, dass derartige Stressoren außerdem die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse aktivieren und die Freisetzung von Stresshormonen wie Corticotropin-Freisetzung-Hormon (CRF; corticotropin releasing factor), adrenokortikotropes Hormon (ACTH) und Cortisol fördern, die ebenfalls eine Rolle in der Pathogenese von Angststörungen spielen (Shin und Liberzon, 2010). Die Arbeitsgruppe um Heinrichs konnte im Elevated Plus-Maze an Ratten zeigen, dass der CRF<sub>1</sub>-Rezeptor-Antagonist R121919 anxiolytische Wirkung besitzt (Heinrichs et al., 2002).

Die Verarbeitung von Emotionen wie Angstgefühlen wird vor allem durch die GABAerge Neurotransmission in der Amygdala kontrolliert (Tasan et al., 2011).

Tasan et al. zeigten, dass es in Nuclei der Amygdala von HAB-Mäusen (high anxiety-related behavior) im Vergleich zu NAB-Mäusen (normal anxiety-related behavior) zu zahlreichen Änderungen der Genexpression kommt. Beispielsweise war die mRNA-Expression der  $\beta_1$ -,  $\beta_2$ -

und  $\gamma_2$ -Untereinheiten in der basolateralen Amygdala der HAB-Mäuse deutlich erhöht, während die Transkription der  $\alpha_5$ - und  $\gamma_1$ -Untereinheiten in den zentralen und medialen Kerne der Amygdala reduziert war. Diese Ergebnisse deuten auf ein Ungleichgewicht der GABAergen Neurotransmission in der Amygdala hin. Es wird vermutet, dass durch die reduzierte GABAerge Inhibition über  $\alpha_5$ - und  $\gamma_1$ -Untereinheiten eine kompensatorische Aktivierung der GABAergen Neurotransmission induziert wird. Für diese Theorie spricht, dass bei HAB-Mäusen eine verstärkte Expression GABA-synthetisierender Enzyme (GAD 65 und GAD 67) nachgewiesen werden konnte und auch die Konzentration von GABA in der Amygdala der HAB-Mäuse erhöht war (Tasan et al., 2011).

Neben der Amygdala scheinen auch weitere Gehirnareale bei Angststörungen eine wichtige Rolle zu spielen. So zeigte die Arbeitsgruppe um Gulinello, dass es nach Absetzen einer Progesterontherapie zu einer Änderung der Genexpression im Hippocampus von Ratten kommt. Es konnte eine 2 – 3-fach erhöhte Expression von  $\alpha_4$ -Untereinheiten nachgewiesen werden, die direkt mit einer anxiogenen Wirkung im Elevated Plus-Maze in Zusammenhang gebracht wurde (Gulinello et al., 2001).



**Abb. 24:**  
Darstellung einiger Gehirnstrukturen,  
die in die Entstehung von Angst  
involviert sind (Rodrigues et al., 2009)

### ***Therapie von Angststörungen***

Selektive Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRIs) und Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Inhibitoren (SNRIs) stellen die Mittel der Wahl bei GAD dar (Dell'osso und Lader, 2012; Koen und Stein, 2011).

SSRIs wie Citalopram, Escitalopram, Fluoxetin, Fluvoxamin, Paroxetin oder Sertralin hemmen die Wiederaufnahme von Serotonin in präsynaptische Nervenendigungen und erhöhen damit dessen synaptische Konzentration, wohingegen SNRIs wie Venlafaxin oder Duloxetin auch den Noradrenalin-Reuptake hemmen.

Die anxiolytische Wirkung der SSRIs/SNRIs tritt erst verzögert ein, in den ersten Wochen der Anwendung kann die Angststörung sogar verstärkt werden, wodurch die Compliance häufig reduziert ist (Koen und Stein, 2011; Chen et al., 2012). Mögliche Nebenwirkungen sind beispielsweise Agitiertheit, sexuelle Dysfunktion und Müdigkeit (Huh et al., 2011).

TCA (Tricyclische Antidepressiva) wie Clomipramin und Imipramin sind ebenfalls wirksam zur Behandlung von Angststörungen. Sie sind jedoch nicht Mittel 1. Wahl, da sie unter anderem Herzrhythmusstörungen begünstigen, weswegen eine EKG-Überwachung des Patienten erforderlich ist. Zusätzlich können sie Nebenwirkungen wie Obstipation und Sedierung hervorrufen. Sie werden vor allem bei Intoleranz gegen SSRIs oder in Kombination mit diesen eingesetzt (Kodish et al., 2011).

Benzodiazepine haben zwar einen hohen therapeutischen Index und eine sehr gute anxiolytische Wirksamkeit, führen durch ihre unselektive Untereinheitenstimulation jedoch zu Sedierung ( $\alpha_1$ ) und kognitiven Beeinträchtigungen ( $\alpha_5$ ) (siehe Kapitel 2.1). Zusätzlich induzieren sie bei längerer Anwendung körperliche Abhängigkeit und Toleranz und sind daher nur für den kurzfristigen Einsatz geeignet (Sartori et al., 2011; Dell'osso und Lader, 2012). Weiters zeigen Benzodiazepine keine antidepressive Wirkung, was als großer Nachteil angesehen wird, da Angststörungen häufig in Kombination mit Depressionen auftreten (Dell'osso und Lader, 2012).

Buspiron ist ein Partialagonist an Serotoninrezeptoren des Subtyps 5HT<sub>1A</sub>. Buspiron ist besonders bei Angststörungen in Kombination mit Alkoholabhängigkeit geeignet und verstärkt die Wirkung von SSRIs bei therapierefraktärer GAD (Koen und Stein, 2011).

## 3.2 Schlafstörungen

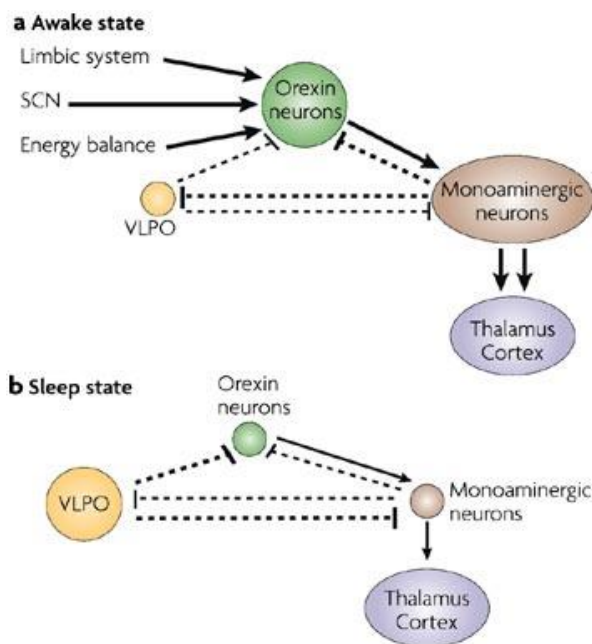
Schlaflosigkeit ist ein weit verbreitetes Leiden: Etwa 25 % der Erwachsenen sind unzufrieden mit ihrem Schlaf, 10 – 15 % leiden auch tagsüber unter den Auswirkungen und 6 – 10 % erfüllen die Kriterien für das Vorliegen einer echten Schlafstörung (Ohayon, 2002; Morin et al., 2006). Schlafprobleme nehmen mit dem Alter zu und treten bei Frauen doppelt so häufig auf wie bei Männern (Ohayon, 2002; Fernández-San-Martín et al., 2010).

Schlafstörungen sind charakterisiert durch eine reduzierte Schlafqualität, eine nicht ausreichende Schlafdauer oder Schwierigkeiten beim Ein- oder Durchschlafen (Morin und Benca, 2012; Fernández-San-Martín et al., 2010). Betroffene leiden tagsüber unter Müdigkeit, Kraftlosigkeit, kognitiven Beeinträchtigungen wie Konzentrations-, Aufmerksamkeits- oder Gedächtnisstörungen sowie Stimmungsschwankungen wie Reizbarkeit und Dysphorie (Morin und Benca, 2012).

Schlafstörungen können auch in isolierter Form auftreten, weisen jedoch häufig Komorbiditäten auf (Morin und Benca, 2012). Betroffene leiden im Vergleich zu Menschen ohne Schlafstörungen beispielsweise fünfmal häufiger unter Angststörungen und Depressionen und doppelt so oft an Herzinsuffizienz (Pearson et al., 2006).

### ***Regulation des Schlaf-Wachrhythmus durch GABA***

Der tägliche Kreislauf zwischen Schlaf- und Wachzuständen wird durch eine koordinierte Interaktion verschiedener Neuronen reguliert. Wachheit ist assoziiert mit neuronaler Aktivität cholinergischer Neuronen im Hirnstamm und im basalen Vorderhirn, monoaminergischer Neuronen im Hirnstamm und hinteren Hypothalamus und hypocretiner (orexiner) Neuronen im lateralen Hypothalamus. Diese Neuronengruppen stehen in direktem Zusammenhang mit kortikaler Stimulierung und Aktivierung des ZNS (Gvilia, 2010; Sakurai, 2007). Jene Neuronen, die während des Schlafes eine wichtige Rolle für die Dämpfung des ZNS spielen, sind in hoher Dichte im ventrolateralen präoptischen Feld (VLPO) im Hypothalamus und im medianen präoptischen Nucleus (MnPN) lokalisiert (Gvilia, 2010; Foster und Wulff, 2005). Diese VLPO- und MnPN-Neuronen inhibieren über Botenstoffe wie GABA und Galanin vermutlich jene Neuronengruppen, die die Wachheit fördern (siehe Abb. 25; Sakurai, 2007). Sowohl die Aktivierung der VLPO-Neuronen als auch die Freisetzung von GABA nimmt proportional zur Schlaftiefe zu (Foster und Wulff, 2005).



**Abb. 25:**

**a: Wachzustand**

Orexine Neurone senden exzitatorische Impulse zu monoaminergen Neuronen, die wiederum inhibitorische Feedback-Impulse zu orexinen Neuronen senden. Monoaminerge Zellen senden sowohl exzitatorische Impulse zum Thalamus und zur Großhirnrinde als auch inhibitorische Impulse an das VLPO-Schlaf-Zentrum.

**b: Schlafzustand**

VLPO-Neuronen sind aktiv und senden inhibitorische Impulse zu monoaminergen und orexinen Neuronen um den Schlafzustand aufrecht zu erhalten

(Sakurai, 2007).

### Therapie von Schlafstörungen

Zur Behandlung von Schlafstörungen wird eine Vielzahl von Arzneistoffen eingesetzt. Das Angebot reicht von rezeptfreien Produkten - wie beispielsweise Antihistaminika, Chronobiotika wie Melatonin oder pflanzliche Präparate - über verschreibungspflichtige Hypnotika wie Benzodiazepine bis hin zu ausgewählten Antidepressiva, Antipsychotika oder Antikonvulsiva, die neben der eigentlichen Indikation auch bei Schlafstörungen Anwendung finden (Morin und Benca, 2012).

Antihistaminika wie Diphenhydramin oder Doxylaminsuccinat induzieren Schläfrigkeit, es gibt jedoch nur wenige Daten bezüglich deren Wirksamkeit bei chronischen Schlafstörungen. Sie können Agitiertheit und anticholinerge Effekte wie beispielsweise Mundtrockenheit oder Harnretention begünstigen und ein Restless-legs-Syndrom verschlimmern. Bei längerer Einnahme kann sich eine Toleranz entwickeln und ein abruptes Absetzen kann zu einem Rebound führen (Morin und Benca, 2012). Die Arbeitsgruppe um Richardson zeigte, dass sich bereits nach dreitägiger Einnahme von 100 mg Diphenhydramin täglich eine Toleranz gegenüber der sedierenden Wirkung ausbildet (Richardson et al., 2002).



Melatonin ist ein Hormon aus der Zirbeldrüse und spielt eine wichtige Rolle für die Regulation des circadianen Tag-Nacht-Rhythmus. Die hypnotische Wirkung von Melatonin konnte in Studien nicht eindeutig belegt werden. Weiters sind Nebenwirkungen wie Benommenheit, Kopfschmerzen oder Alpträume möglich (Morin und Benca, 2012).

Zahlreiche Phytopharmaka – allen voran Baldrianpräparate – werden ebenfalls zur Behandlung von Schlafstörungen und Unruhezuständen eingesetzt. Wirkstoffe im Baldrian binden an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und verbessern die Ansprechbarkeit der Rezeptoren für GABA (Morin und Benca, 2012). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Baldrian zu einer subjektiven Verbesserung der Schlafstörungen führte, diese Verbesserung jedoch quantitativ und objektiv nicht messbar war. Weitere Untersuchungen werden empfohlen (Fernández-San-Martín et al., 2010; Salter und Brownie, 2010). Neben Baldrian werden traditionell auch Melisse, Hopfen, Lavendel und Passionsblume verwendet, jedoch ist auch deren Wirksamkeit für die Behandlung von Schlafstörungen wissenschaftlich nicht vollständig bewiesen (Volz, 2001; Wheatley, 2005; Salter und Brownie, 2010).

Zur größten Gruppe der schlaffördernden Arzneistoffe gehören jene, die die Aktivität von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verstärken, wie beispielsweise Benzodiazepine und Barbiturate, aber auch die meisten inhalativen Anästhetika und Ethanol (Saper et al., 2005).

Benzodiazepine sind die wirksamsten und am häufigsten eingesetzten Arzneistoffe zur Behandlung von Schlafstörungen (Fernández-San-Martín et al., 2010), für eine langfristige Behandlung sind sie jedoch ungeeignet (siehe Kapitel 2.1; Wafford, 2005). Derivate mit kurzer Halbwertszeit (z.B. Triazolam) erleichtern das Einschlafen, während Derivate mit langer Halbwertszeit (z.B. Clonazepam, Diazepam) bei Durchschlafstörungen geeignet sind (Morin und Benca, 2012; Dell'osso und Lader, 2012).

Neuere „Nicht-Benzodiazepine“, wie zum Beispiel Zolpidem oder Eszopiclon, binden wie Benzodiazepine an  $\alpha/\gamma$ -Bindungsstellen, unterscheiden sich jedoch in ihrer chemischen Struktur von typischen Benzodiazepinen. Sie weisen eine höhere Selektivität für  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf, die eine wichtige Rolle für die sedierende Wirkung spielen (Saper et al., 2005). Zolpidem besitzt beispielsweise eine 20-fach geringere Affinität für  $\alpha_{2/3}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren und keine Affinität für  $\alpha_5$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Rudolph und Knoflach, 2011).

### 3.3 Epilepsie

Epilepsie ist mit einer Häufigkeit von etwa 0,5 % die am weitesten verbreitete neurologische Erkrankung, wobei die Temporallappen-Epilepsie (TLE) mit etwa 30 – 40 % am häufigsten vorkommt (Bradford, 1995).

Epileptische Krämpfe können als anfallsartig auftretende, hypersynchrone elektrische Entladungen im Gehirn angesehen werden. Diese resultieren aus einer zu starken Exzitation oder einer zu geringen Inhibition im betroffenen Gehirnareal (Treiman, 2001).

#### ***Ätiologie und Pathogenese***

Es gibt überzeugende Beweise, dass eine Dysfunktion GABAerger Transmission eine entscheidende Rolle für die Pathogenese der Epilepsie und die Entstehung von Krampfanfällen spielt (Pavlov und Walker, 2012). Im Gehirn von Epileptikern konnte beispielsweise eine reduzierte GABA-assoziierte Inhibition, eine verringerte Aktivität der Glutamatdecarboxylase (GAD) sowie eine reduzierte Konzentration von GABA in der Rückenmarksflüssigkeit und dem Hirngewebe nachgewiesen werden (Treiman, 2001).

Die Arbeitsgruppe um Doring fand heraus, dass im Hippocampus von Epileptikern sowohl die Anzahl der GABA-Transporter als auch die Glutamat-induzierte Freisetzung von GABA erniedrigt ist (Doring et al., 1995).

Vermutlich kommt es bei TLE auch zu einer verminderten Ansprechbarkeit von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren auf inhibitorisch wirkende Neurosteroide (Joshi et al., 2011). Es konnte gezeigt werden, dass Allopregnanolon  $I_{GABA}$  in epileptischen Ratten weniger effektiv steigert als in der gesunden Kontrollgruppe. Als Grund für diese veränderte Sensitivität für Neurosteroide werden Veränderungen in der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Expression vermutet (Mtchedlishvili et al., 2001).

Die Arbeitsgruppe um Nusser zeigte, dass es bei Temporallappen-Epilepsie zu einer gesteigerten Expression synaptischer GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren kommt (Nusser et al., 1998). Eine vermehrte Expression von  $\alpha_4\gamma_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren könnte auch der Grund dafür sein, warum epileptische Tiere reduzierte Empfindlichkeit gegenüber Benzodiazepinen aufweisen (Joshi et al., 2011; Mtchedlishvili et al., 2001), da diese keinen Effekt an  $\alpha_4$ -enthaltenden Rezeptoren zeigen (Gulinello et al., 2001).

Patienten mit TLE zeigen auch charakteristische Veränderungen im Hippocampus, wo es zum Verlust von Neuronen in den Regionen CA1 und CA3 sowie zum Untergang GABAerger Interneurone im Hilus des Hippocampus kommt (Joshi et al., 2011). Daraus resultiert vermutlich eine reduzierte GABA-Freisetzung und eine verminderte Konzentration von GABA im Extrazellulärraum (Pavlov und Walker, 2012).

Viele Studien zeigen, dass es bei Epileptikern zu Veränderungen der schnellen, synaptischen Inhibition kommt. Jedoch scheinen auch extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren mit Epilepsie in Zusammenhang zu stehen. Extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren weisen eine hohe Affinität für extrazelluläre GABA auf, desensibilisieren langsam und vermitteln tonische Inhibition (Pavlov und Walker, 2012). Die Arbeitsgruppe um Dibbens zeigte, dass einige Epileptiker Missense-Mutationen am GABRD-Gen, das für die  $\delta$ -Untereinheit codiert, aufweisen (Dibbens, 2004). Diese Untereinheit konnte bislang ausschließlich extrasynaptisch nachgewiesen werden (Kumar et al., 2009).

### ***Therapie der Epilepsie***

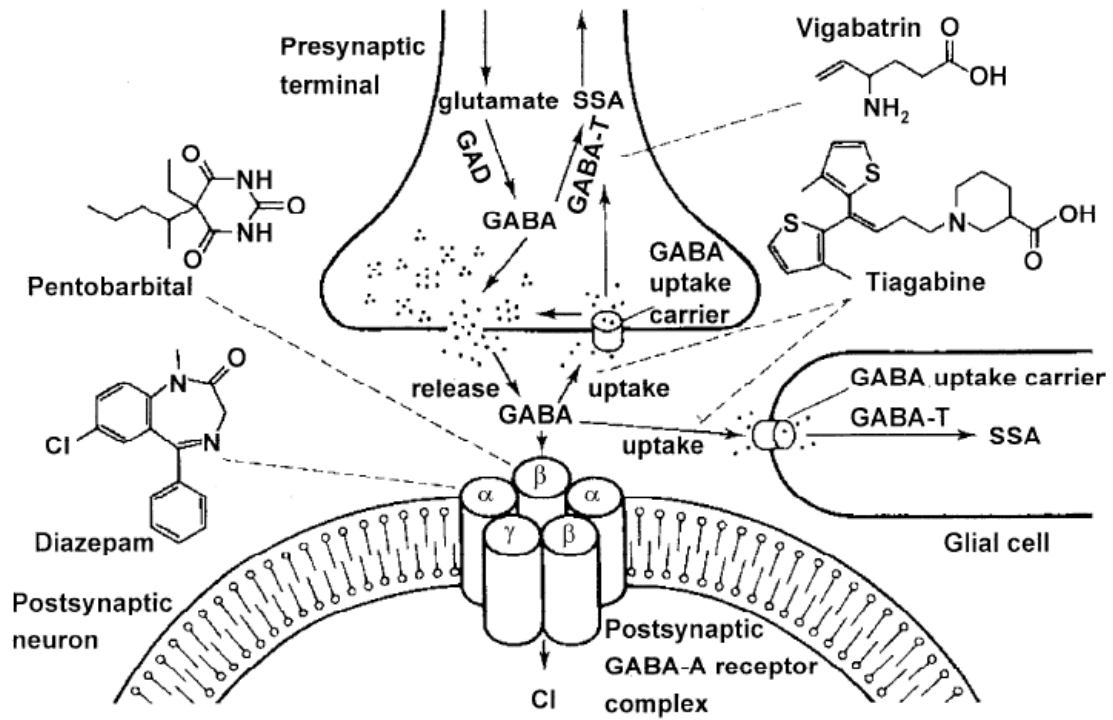
Benzodiazepine wirken antikonvulsiv, indem sie die Bindung von GABA an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verstärken, wodurch die Öffnungswahrscheinlichkeit der Chloridkanäle erhöht wird. Auch Barbiturate wirken antikonvulsiv und verlängern die Dauer, für die der Chloridkanal geöffnet ist (Treiman, 2001).

Vigabatrin erhöht die GABA-Konzentration im Gehirn durch Hemmung der GABA-Transaminase.

Tiagabin erhöht die synaptische GABA-Konzentration durch Blockade des GABA-Uptake-Transporters GAT1, wodurch die Wiederaufnahme von GABA in Neuronen und Gliazellen gehemmt wird.

Gabapentin ist ein cyclisches GABA-Analogon, verstärkt die GABA-Synthese und hemmt den neuronalen Calciumeinstrom durch Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle.

Topiramate wirkt unter anderem ebenfalls durch Interaktion mit dem GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Czuczwar und Patsalos, 2001).



**Abb. 26:** Darstellung der Angriffspunkte ausgewählter Antiepileptika  
(Suzdak und Jansen, 1995; Treiman, 2001)

## Praktischer Teil

# 4 Problemstellung und Zielsetzung

### ***Problemstellung***

Angststörungen sind derzeit die häufigsten psychiatrischen Erkrankungen in Europa und den USA und bedeuten eine extreme Belastung für das Gesundheitssystem (siehe Kapitel 3.1; Cryan und Sweeney, 2011).

SSRIs und SNRIs sind Mittel der Wahl bei generalisierten Angststörungen, gefolgt von TCA, Benzodiazepinen oder Buspiron. Diese First-line-Therapie führt jedoch nur bei etwa einem Drittel der Betroffenen zur Remission der Erkrankung, 30 – 60 % der Patienten bemerken keinerlei Besserung (Huh et al., 2011). Ein weiterer Nachteil der SSRIs/SNRIs ist, dass die Angststörung in den ersten Wochen sogar verstärkt werden kann und die Wirkung erst verzögert eintritt (Chen et al., 2012). Benzodiazepine besitzen zwar gute anxiolytische Wirksamkeit, sind jedoch unter anderem aufgrund der hohen Abhängigkeitsgefahr für die langfristige Therapie nicht geeignet (siehe Kapitel 2.1; Huh et al., 2011).

### ***Zielsetzung***

Die Arbeitsgruppe um Univ. Prof. Dr. Steffen Hering (Department für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien) identifizierte kürzlich einen Naturstoff (VA) als  $\beta_{2/3}$ -selektiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulator mit anxiolytischem Effekt im Mausmodell, für den im getesteten Dosierungsbereich keine sedierende Wirkung nachgewiesen werden konnte. Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte das anxiolytische Potential von sechs neu synthetisierten VA-Derivaten untersucht werden.

Die Substanzen wurden an c57Bl/6N Mäusen im Elevated Plus-Maze (EPM) und Light/Dark-Choice Test (LDT) untersucht, die als die beiden wichtigsten verhaltenspharmakologischen Tests zur Analyse des Angstverhaltens von Mäusen gelten (File, 2001). Zur Untersuchung des Wirkungseintritts und der Wirkdauer der einzelnen Substanzen wurden die Messungen im EPM zu drei unterschiedlichen Zeitpunkten (15, 30 und 60 Minuten nach intraperitonealer (i.p.) Applikation) durchgeführt. Anschließend wurde die Wirkung der Derivate zusätzlich 30 min nach i.p. Applikation im LDT untersucht, um die Ergebnisse aus dem EPM zu untermauern. VA wurde ebenfalls im EPM 15, 30 und 60 min und im LDT 30 min nach i.p. Injektion getestet, um zu untersuchen, ob die Derivate – wie erhofft - eine bessere Wirkung als der Naturstoff selbst aufweisen.

## 5 Material und Methoden

Alle durchgeführten Experimente wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung in Übereinkunft mit der europäischen Konvention für den Schutz von Wirbeltieren, die für wissenschaftliche und experimentelle Zwecke verwendet werden, genehmigt (ETS 123).

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

### 5.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche c57Bl/6N Mäuse verwendet, die über Charles River Laboratories (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden. Männliche Mäuse werden für verhaltenspharmakologische Untersuchungen häufig bevorzugt, da der weibliche Reproduktionszyklus durch schwankende Östrogen- und Gestagenspiegel das Angstverhalten der Weibchen beeinflussen und die Ergebnisse somit verfälschen könnte (Gadad et al., 2010; Walf und Frye, 2007).

Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Untersuchungen zwischen 3 und 6 Monate alt und wurden zu fünf in Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Im Tierstall wurde ein künstlicher Tag/Nacht-Rhythmus (Beleuchtung täglich von 07.00 bis 19.00) simuliert, die Temperatur betrug im Mittel 23 °C und die Luftfeuchtigkeit  $40 \pm 20$  %.

Am Tag vor der Untersuchung wurde das Gewicht jeder Maus bestimmt, um die individuell benötigte Menge an Injektionslösung zu berechnen. Anschließend wurden die Versuchstiere vom Tierstall in den Versuchsraum gebracht, damit sie sich über Nacht an die neue Umgebung gewöhnen konnten.

### 5.2 Injektionslösungen

Die zu untersuchenden Substanzen wurden vom Institut für angewandte Synthesechemie (TU Wien; Prof. Mihovilovic) zur Verfügung gestellt.

Die Injektionslösungen wurden von Frau Mag. Juliane Hintersteiner hergestellt und intraperitoneal (i.p.) appliziert.

### **Herstellung**

Zur Herstellung der Injektionslösungen wurden die Substanzen mit 0,9 % Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) versetzt, zur Verbesserung der Löslichkeit wurde jeweils 3 % Polysorbat 80 und 10 % DMSO (Dimethylsulfoxid) zugegeben. Die benötigten Injektionslösungen wurden an jedem Versuchstag frisch bereitet.

### **Applikation**

Nach Bereitung der Injektionslösungen wurden die Versuchstiere einzeln in einen separaten Raum gebracht, wo ihnen die jeweils zu untersuchende Substanz in einer Dosierung von 3 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal (i.p.) injiziert wurde. Den Kontrollmäusen wurde 0,9 % Kochsalzlösung i.p. verabreicht.

## **5.3 Verhaltenspharmakologische Tests**

Mäuse zeigen eine natürliche Abneigung gegenüber unvertrauter Umgebung, hell ausgeleuchteten Flächen (Bourin und Hascoët, 2003), offenen Flächen und Höhe (File, 2001). Wenn ein Tier einer neuen Umgebung ausgesetzt ist, dann entsteht ein natürlicher Konflikt zwischen der Tendenz zu explorieren und der Tendenz die unvertraute Umgebung zu meiden (Bourin und Hascoët, 2003).

Der Elevated Plus-Maze und der Light/Dark-Choice Test sind die beiden wichtigsten Tests, die für die Untersuchung des Angstverhaltens von Mäusen entwickelt wurden (File, 2001).

### **5.3.1 Elevated Plus-Maze (EPM)**

Der EPM ist ein häufig verwendeter verhaltenspharmakologischer Test zur Untersuchung des Angstverhaltens von Nagetieren und basiert auf deren natürlicher Abneigung gegenüber offenen und höher gelegenen Flächen (Walf und Frye, 2007; File, 2001). Der Test ist einfach durchzuführen, kann vollautomatisch ablaufen und liefert schon nach einer kurzen, 5-minütigen Testzeit validierte Ergebnisse (Walf und Frye, 2007).

#### ***Aufbau der Versuchsanordnung***

Die EPM-Versuchsanordnung ist ein Labyrinth, das die Form eines Plus aufweist und in einer Höhe von etwa einem Meter über dem Boden angebracht ist (siehe Abb. 27). Die vier Arme sind

jeweils 30 cm lang und 5 cm breit, zwei offene und zwei geschlossene Arme liegen einander jeweils gegenüber. Die beiden geschlossenen Arme sind von einer Wand umgeben, die 15 cm hoch ist. In der Mitte befindet sich eine neutrale Zone, die eine Fläche von 5 x 5 cm aufweist. Die Versuchsanordnung wird mit einer Lichtstärke von 180 Lux ausgeleuchtet, die Lichtstärke wird mithilfe eines Luxmeters überprüft.

Die beiden offenen Arme sind ungeschützt, über dem Boden gelegen und für die Mäuse neuartig, sie werden daher naturgemäß eher gemieden (File, 2001). Man nimmt jedoch an, dass die Abneigung der Tiere, offene Arme im EPM zu explorieren, hauptsächlich durch die Angst vor offenen Flächen bedingt ist, und weniger durch die Neuartigkeit des EPM oder dessen Höhe (Korte und De Boer, 2003).



Abb. 27: Foto der Versuchsanordnung

### **Durchführung**

Die Versuchstiere wurden je nach Versuchsaufbau 15, 30 oder 60 Minuten nach i.p. Injektion der zu untersuchenden Substanz einzeln in der Versuchsanordnung platziert. Die Maus wurde dabei in die neutrale Zone, mit dem Gesicht in Richtung eines offenen Arms, gesetzt. Das Verhalten der Maus wurde anschließend 5 Minuten lang mit Hilfe eines Videoüberwachungs-Systems (VideoMot 2) aufgezeichnet und anschließend ausgewertet.

Das EPM wurde vor und nach jedem Tier gründlich mit Ethanol 30 % gereinigt und getrocknet, eventuell zurückgelassener Urin oder Fäzes wurde entfernt und dokumentiert.



### 5.3.2 Light/Dark-Choice Test (LDT)

Der LDT basiert auf der angeborenen Abneigung von Nagetieren gegenüber hell ausgeleuchteten Flächen einerseits und deren explorierendem Verhalten in neuer Umgebung andererseits. Er bietet eine gute Möglichkeit, um anxiolytische oder anxiogene Wirkungen von Substanzen an Mäusen zu untersuchen (Bourin und Hascoët, 2003).

#### ***Aufbau der Versuchsanordnung***

Die Versuchsanordnung besteht aus einer Glasbox (50 x 50 cm), die in ein dunkles Kompartiment ( $\frac{1}{3}$ ) und ein hell beleuchtetes Kompartiment ( $\frac{2}{3}$ ) unterteilt ist. Das dunkle Kompartiment bildet eine schwarze Kunststoffbox mit Deckel, das helle Kompartiment wird mit einer Lichtstärke von 400 Lux hell ausgeleuchtet. Die schwarze Box enthält eine kleine Öffnung, durch die sich die Maus zwischen dem hellen und dem dunklen Kompartiment frei bewegen kann (siehe Abb. 28).



**Abb. 28:** Foto der Versuchsanordnung

#### ***Durchführung***

Die Versuchstiere wurden 30 Minuten nach i.p. Applikation der zu untersuchenden Substanz einzeln in die Versuchsanordnung gesetzt, mit dem Gesicht zur Öffnung in Richtung des dunklen Kompartiments. Sobald die Maus in der Versuchsanordnung platziert war, wurden Infrarot-Sensoren aktiviert, die jede Bewegung der Maus registrierten. Anschließend wurde das Verhalten der Maus 10 Minuten lang mithilfe eines automatischen Trackingsystems (ActiMot 2) aufgezeichnet und ausgewertet.

Die gesamte Versuchsanordnung wurde ebenfalls vor und nach jedem Versuchstier gründlich mit 30 % Ethanol gereinigt, zurückgelassener Urin oder Fäzes wurde entfernt und dokumentiert.

### Statistische Auswertung der Versuche

Für den Vergleich der Kontroll- mit den Verumgruppen wurde der Student's t-Test herangezogen. Der Vergleich mehrerer Gruppen miteinander erfolgte mittels Einweg-ANOVA (Microsoft Office; Origin MicroCal). p-Werte <0,05 gelten als statistisch signifikant. Alle Werte wurden als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

## 6 Ergebnisse

### 6.1 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte erstmals die *in vivo* Wirkung von sechs neu synthetisierten VA-Derivaten (Derivate A – F; Dosierung: 3 mg/kg Körpergewicht) im EPM 15, 30 bzw. 60 min nach i.p. Applikation an c57Bl/6N Mäusen untersucht werden. Für die Auswertung wurde sowohl die verbrachte Zeit in den offenen Armen (OA) des EPMS in Prozent als auch die zurückgelegte Gesamtstrecke in Zentimetern herangezogen (siehe Tabellen 1, 2 und 3 sowie Abb. 29 – 34).

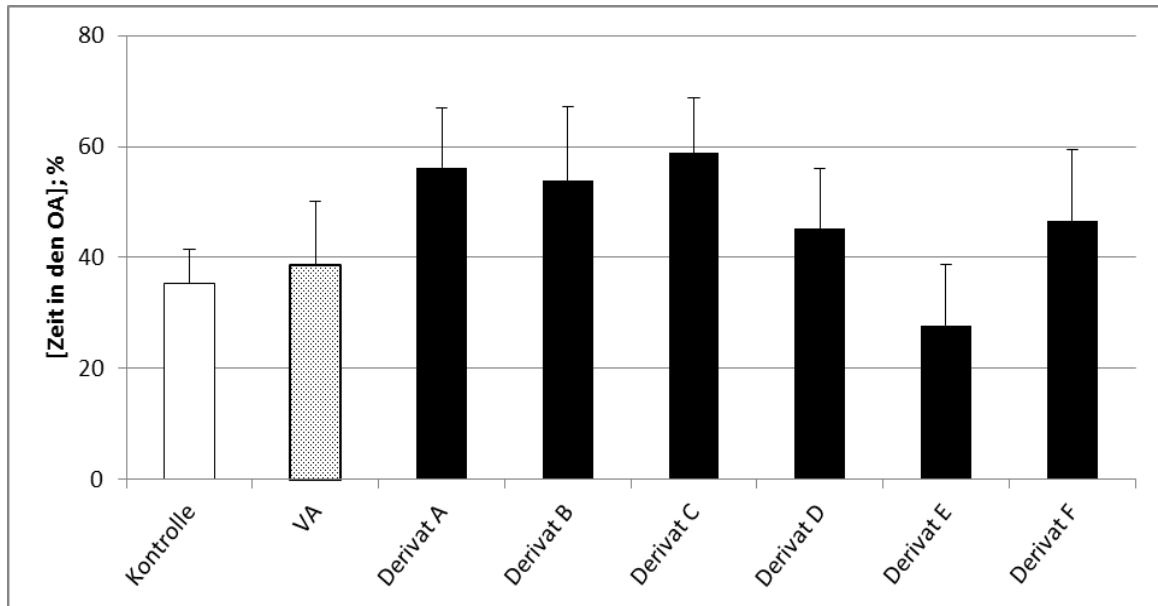
#### 6.1.1 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 15 Minuten nach i.p. Applikation

Zu Beginn wurde der Effekt dieser 6 VA-Derivate (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen 15 Minuten nach i.p. Applikation im EPM untersucht und mit dem Verhalten der Kontrollgruppe (0,9 % Kochsalzlösung) und dem der VA-Verumgruppe (3 mg/kg Körpergewicht) verglichen (siehe Tabelle 1 sowie Abb. 29 und 30).

	EPM 15 min		
	Zeit in den OA (%)	Gesamtstrecke (cm)	Versuchstiere (n)
<b>Kontrolle</b>	35,36 $\pm$ 6,00	1153,54 $\pm$ 86,39	12
<b>VA</b>	38,61 $\pm$ 11,54	1008,74 $\pm$ 99,46	5
<b>Derivat A</b>	56,18 $\pm$ 10,71	1126,7 $\pm$ 120,72	7
<b>Derivat B</b>	53,84 $\pm$ 13,30	856,63 $\pm$ 124,59	7
<b>Derivat C</b>	58,78 $\pm$ 9,93	1244,87 $\pm$ 106,88	7
<b>Derivat D</b>	45,16 $\pm$ 10,84	722,98 $\pm$ 123,78	7
<b>Derivat E</b>	27,76 $\pm$ 11,02	1006,19 $\pm$ 91,58	6
<b>Derivat F</b>	46,47 $\pm$ 12,98	838,97 $\pm$ 67,08	3

**Tabelle 1:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM 15 min nach i.p. Applikation. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben.

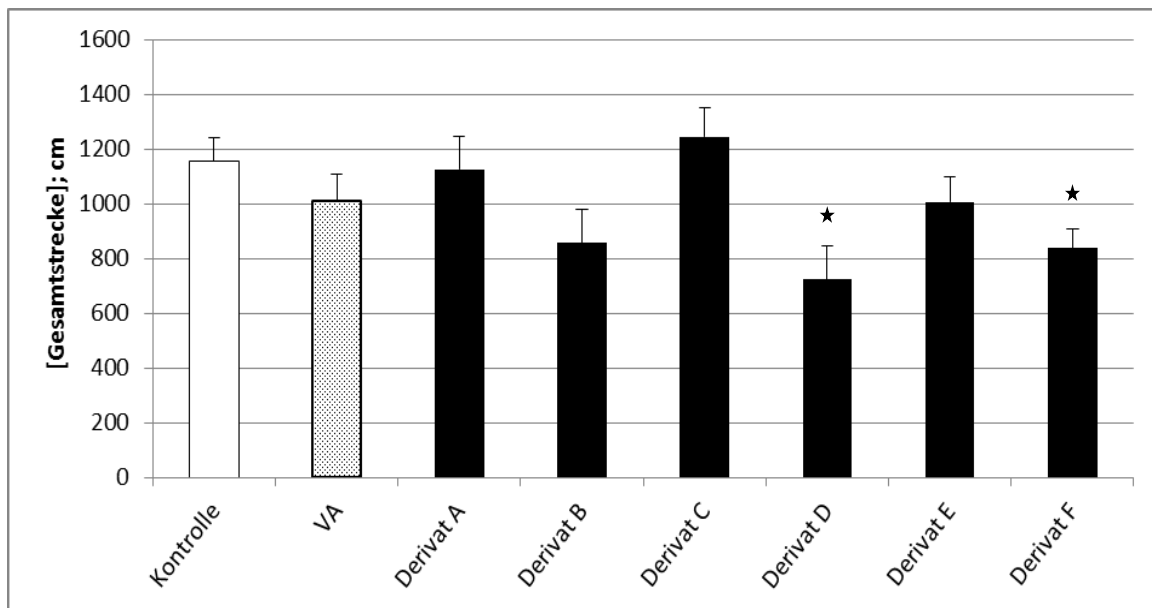
## Ergebnisse



**Abb. 29:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 15 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den offenen Armen in Prozent ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 1).

Wie in Abb. 29 gezeigt, verbrachten Kontrolltiere 15 Minuten nach i.p. Applikation der Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung) durchschnittlich  $35,36 \pm 6,00$  % ( $n=12$ ) der gesamten Versuchszeit in den offenen Armen (OA) des EPMs. Die i.p. Applikation von VA (3 mg/kg Körpergewicht) führte zu keiner signifikanten Änderung dieses Parameters ( $38,61 \pm 11,54$  %;  $n=5$ ;  $p>0,05$ ). Nach Injektion der zu untersuchenden VA-Derivate (3 mg/kg Körpergewicht) konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt auf die verbrachte Zeit in den OA des EPMs beobachtet werden. Jedoch zeigte sich, dass Mäuse, denen die Derivate A, B, C, D oder F (in einer Dosierung von jeweils 3 mg/kg Körpergewicht) i.p. appliziert wurden, tendenziell mehr Zeit als die Kontroll- und die VA-Verumgruppe in den OA verbrachten (A:  $56,18 \pm 10,71$  %;  $n=7$ ; B:  $53,84 \pm 13,30$  %;  $n=7$ ; C:  $58,78 \pm 9,93$  %;  $n=7$ ; D:  $45,16 \pm 10,84$  %;  $n=7$ ; F:  $46,47 \pm 12,98$  %;  $n=3$ ). Einzig Mäuse, denen Derivat E verabreicht wurde, verbrachten 15 Minuten nach i.p. Applikation tendenziell weniger Zeit in OA als Mäuse der VA- und der Kontrollgruppe ( $27,76 \pm 11,02$  %;  $n=6$ ).



**Abb. 30:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 15 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse in Zentimetern (± SEM; siehe Tabelle 1).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

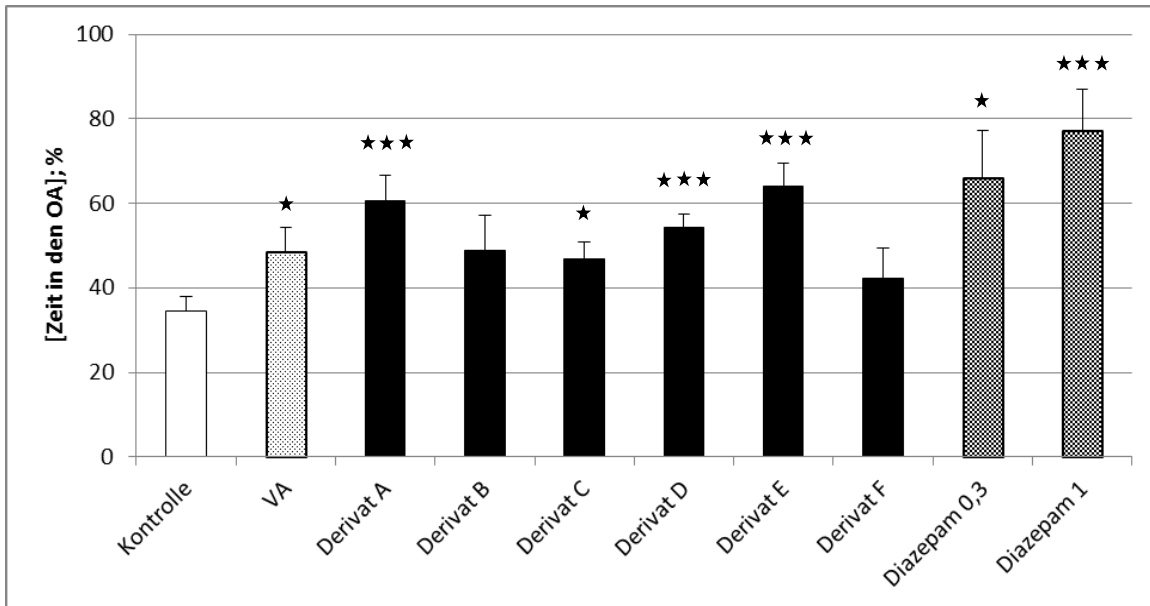
Wie in Abb. 30 zu sehen ist, legten Mäuse der Kontrollgruppe 15 Minuten nach i.p. Applikation der Kontrolllösung durchschnittlich  $1153,54 \pm 86,39$  cm zurück ( $n=12$ ). Demgegenüber legten Mäuse, denen VA (3 mg/kg Körpergewicht) injiziert wurde, tendenziell etwas weniger Strecke zurück ( $1008,74 \pm 99,46$  cm;  $n=5$ ). Sowohl Derivat D als auch Derivat F bewirkten eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der zurückgelegten Gesamtwegstrecke im Vergleich zur Kontrollgruppe (D:  $722,98 \pm 123,78$  cm;  $n=7$ ; F:  $838,97 \pm 67,08$  cm;  $n=3$ ). Mäuse, denen Derivat B verabreicht wurde, legten im Gegensatz dazu nur tendenziell kürzere Strecken als VA- und Kontrolltiere zurück ( $856,63 \pm 124,59$  cm;  $n=7$ ). Injektion von Derivat E ( $1006,19 \pm 91,58$  cm;  $n=6$ ) führte tendenziell zu einer ähnlich ausgeprägten Reduktion der Gesamtstrecke wie der Naturstoff VA. Mäuse, denen Derivat A ( $1126,7 \pm 120,72$  cm;  $n=7$ ) verabreicht wurde, legten tendenziell vergleichbar lange Strecken wie Kontrolltiere zurück. Einzig die i.p. Injektion von Derivat C bewirkte eine tendenzielle Zunahme der zurückgelegten Gesamtstrecke ( $1244,87 \pm 106,88$  cm;  $n=7$ ) im Vergleich zur Kontrolllösung.

### 6.1.2 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 30 Minuten nach i.p. Applikation

Analog zu dem oben beschriebenen Versuch wurde der Effekt derselben 6 Derivate (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen auch 30 Minuten nach i.p. Applikation im EPM untersucht und mit dem Verhalten der Kontroll- und dem der VA-Verumgruppe (3 mg/kg Körpergewicht) verglichen. Zusätzlich wurde als weitere Positivkontrolle Diazepam in zwei Dosierungen (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) getestet (siehe Tabelle 2 sowie Abb. 31 und 32).

	EPM 30 min		
	Zeit in den OA (%)	Gesamtstrecke (cm)	Versuchstiere (n)
<b>Kontrolle</b>	34,37 ± 3,63	1294,88 ± 34,18	12
<b>VA</b>	48,52 ± 5,68	1317,85 ± 68,41	9
<b>Derivat A</b>	60,64 ± 5,95	1310,40 ± 69,12	14
<b>Derivat B</b>	48,79 ± 8,49	1238,80 ± 56,11	7
<b>Derivat C</b>	46,79 ± 4,02	1342,36 ± 54,05	13
<b>Derivat D</b>	54,15 ± 3,39	1378,71 ± 48,85	16
<b>Derivat E</b>	64,16 ± 5,43	1244,65 ± 72,47	16
<b>Derivat F</b>	42,35 ± 6,97	1323,01 ± 51,71	8
<b>Diazepam 0,3</b>	66,02 ± 11,10	1074,98 ± 132,08	8
<b>Diazepam 1</b>	77,12 ± 9,91	858,00 ± 97,98	13

**Tabelle 2:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM 30 min nach i.p. Applikation. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten ± SEM angegeben.



**Abb. 31:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht), Diazepam (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den offenen Armen in Prozent ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 2).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

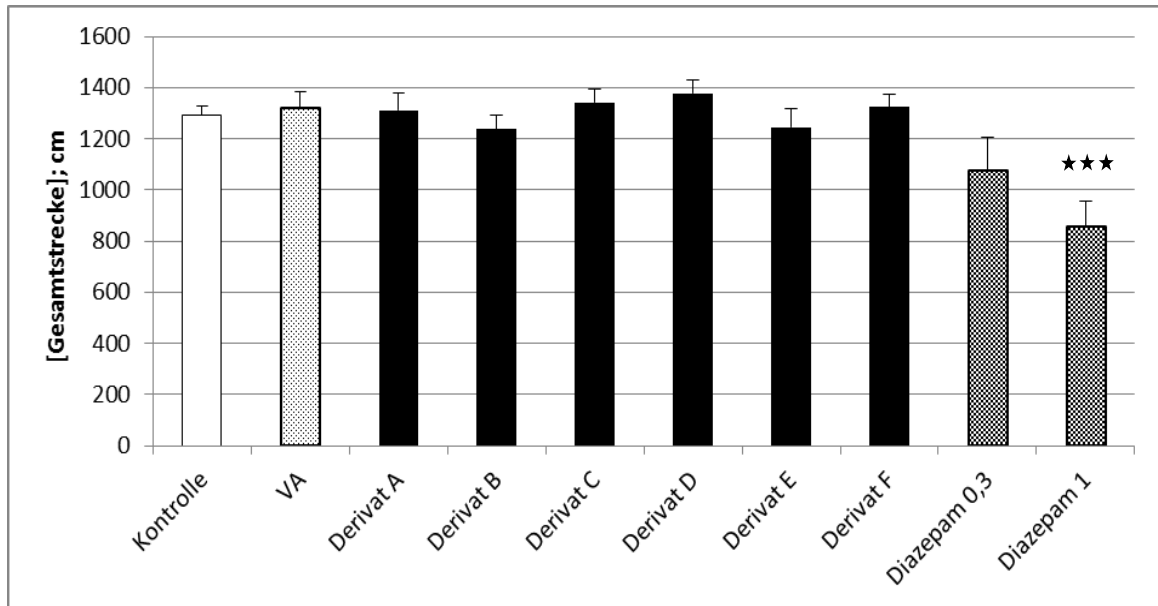
Wie in Abb. 31 gezeigt, verbrachten Mäuse nach i.p. Applikation von VA (3 mg/kg Körpergewicht) signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Zeit in den OA im Vergleich zur Kontrollgruppe (VA:  $48,52 \pm 5,68$  %;  $n=9$ ; Kontrolle:  $34,37 \pm 3,6$  %;  $n=12$ ).

Vier der sechs untersuchten VA-Derivate (A, C, D und E) bewirkten ebenfalls eine signifikant verlängerte Aufenthaltszeit der Versuchstiere in den OA des EPMs (A:  $60,64 \pm 5,95$  %;  $n=14$ ;  $p < 0,001$ ; C:  $46,79 \pm 4,02$  %;  $n=13$ ;  $p < 0,05$ ; D:  $54,15 \pm 3,39$  %;  $n=16$ ;  $p < 0,001$ ; E:  $64,16 \pm 5,43$  %;  $n=16$ ;  $p < 0,001$ ). Der beobachtete Effekt der Derivate A, D und E auf das Verhalten der c57Bl/6N Mäuse war nicht nur stärker als jener der Kontrolllösung, sondern auch stärker als jener, der für VA gemessen wurde.

Auch Mäuse, denen die Positivkontrolle Diazepam i.p. appliziert wurde, hielten sich signifikant länger in den OA auf (0,3 mg/kg:  $66,02 \pm 11,1$  %;  $n=8$ ;  $p < 0,05$ ; 1 mg/kg:  $77,12 \pm 9,91$  %;  $n=13$ ;  $p < 0,001$ ).

Demgegenüber bewirkten die Derivate B ( $48,79 \pm 8,49$  %;  $n=7$ ) und F ( $42,35 \pm 6,97$  %;  $n=8$ ) 30 min nach i.p. Applikation nur eine trendmäßige Zunahme der verbrachten Zeit in den OA des EPMs.

## Ergebnisse



**Abb. 32:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht), Diazepam (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse in Zentimetern ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 2).

\*\*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

Die Laufstrecke der Mäuse nach i.p. Applikation von 3 mg/kg Körpergewicht der untersuchten VA-Derivate unterschied sich nicht signifikant von jenen der Kontrollgruppe (siehe Abb. 32; VA:  $1317,85 \pm 68,41$  cm;  $n=9$ ; A:  $1310,40 \pm 69,12$  cm;  $n=14$ ; B:  $1238,80 \pm 56,11$  cm;  $n=7$ ; C:  $1342,36 \pm 54,05$  cm;  $n=13$ ; D:  $1378,71 \pm 48,85$  cm;  $n=16$ ; E:  $1244,65 \pm 72,47$  cm;  $n=16$ ; F:  $1323,01 \pm 51,71$  cm;  $n=8$ ). Auch unter Diazepam in einer Dosierung von 0,3 mg/kg Körpergewicht konnte keine signifikante Veränderung dieses Parameters beobachtet werden (Diazepam 0,3:  $1074,98 \pm 132,08$  cm;  $n=8$ ).

Einzig Mäuse, denen 1 mg/kg Körpergewicht Diazepam i.p. verabreicht wurde, legten eine signifikant kürzere Strecke als Kontrolltiere zurück ( $858,00 \pm 97,98$  cm;  $n=13$ ;  $p < 0,001$ ).

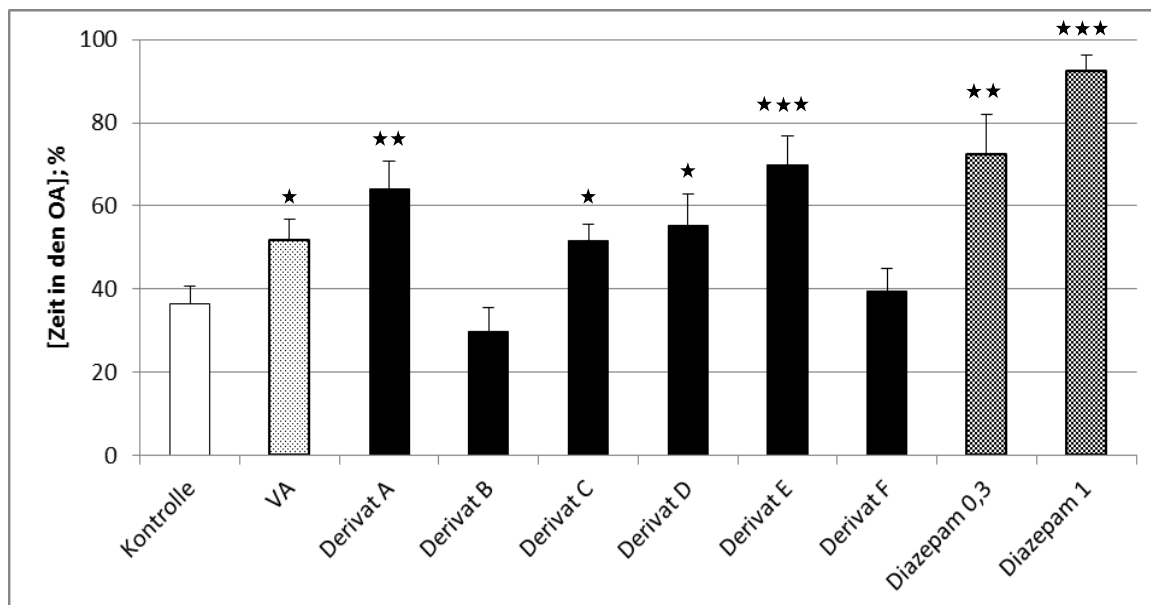
### 6.1.3 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 60 Minuten nach i.p. Applikation

In analoger Weise wurden anschließend alle 6 Derivate (3 mg/kg Körpergewicht) zusätzlich 60 Minuten nach i.p. Applikation untersucht und mit VA (3 mg/kg Körpergewicht), Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung) und Diazepam (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) verglichen (siehe Tabelle 3 sowie Abb. 33 und 34).

	EPM 60 min		
	Zeit in den OA (%)	Gesamtstrecke (cm)	Versuchstiere (n)
<b>Kontrolle</b>	36,37 ± 4,22	1358,97 ± 51,73	12
<b>VA</b>	51,62 ± 5,21	1372,16 ± 113,97	4
<b>Derivat A</b>	64,03 ± 6,59	1135,08 ± 64,16	13
<b>Derivat B</b>	29,80 ± 5,67	1265,95 ± 27,09	5
<b>Derivat C</b>	51,54 ± 4,08	1222,85 ± 61,95	16
<b>Derivat D</b>	55,24 ± 7,47	1192,86 ± 61,83	11
<b>Derivat E</b>	69,92 ± 7,00	996,40 ± 92,02	10
<b>Derivat F</b>	39,44 ± 5,46	1358,52 ± 31,63	8
<b>Diazepam 0,3</b>	72,3 ± 9,59	1310,09 ± 126,61	7
<b>Diazepam 1</b>	92,55 ± 3,57	978,94 ± 94,13	8

**Tabelle 3:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM 60 min nach i.p. Applikation. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten ± SEM angegeben.





**Abb. 33:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 60 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht), Diazepam (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

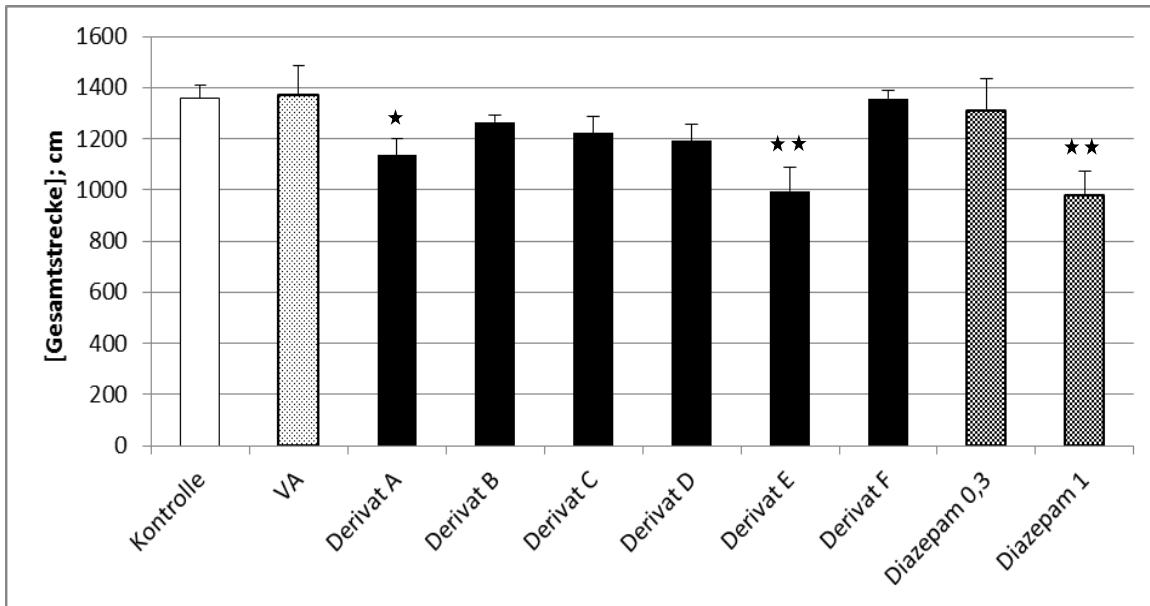
Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den offenen Armen in Prozent ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 3).

\*=statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*=statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ); \*\*\*=statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

Wie in Abb. 33 sichtbar ist, hielten sich Mäuse, die VA (3 mg/kg Körpergewicht) erhalten hatten, gegenüber Kontrolltieren 60 min nach i.p. Applikation signifikant ( $p < 0,05$ ) länger in den OA auf (VA:  $51,62 \pm 5,21$  %;  $n=4$ ; Kontrolle:  $36,37 \pm 4,22$  %;  $n=12$ ). Ebenso kam es nach i.p. Injektion von Derivat A, C, D und E (3 mg/kg Körpergewicht) zu einer signifikanten Zunahme der verbrachten Zeit in den OA des EPMS, wobei dieser Effekt bei den Derivaten A ( $64,03 \pm 6,59$  %;  $n=13$ ;  $p < 0,005$ ) und E ( $69,92 \pm 7,00$  %;  $n=10$ ;  $p < 0,001$ ) besonders stark ausgeprägt war.

Die i.p. Applikation von Derivat B und Derivat F (3 mg/kg Körpergewicht) zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Verhalten der Tiere. Tendenziell hielten sich Mäuse, denen Derivat B verabreicht wurde, kürzer als Kontrolltiere in den OA auf ( $29,80 \pm 5,67$  %;  $n=5$ ).

Mäuse, denen Diazepam verabreicht wurde, hielten sich am längsten in den OA des EPMS auf. Der stärkste Effekt wurde für Diazepam in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht beobachtet ( $92,55 \pm 3,57$  %;  $n=8$ ;  $p < 0,001$ ). Mäuse, denen 0,3 mg/kg Körpergewicht Diazepam injiziert wurde, verbrachten ebenfalls signifikant mehr Zeit in den OA ( $72,3 \pm 9,59$  %;  $n=7$ ;  $p < 0,005$ ) und verweilten hier ähnlich lange wie Mäuse, die Derivat A oder E erhielten.



**Abb. 34:** Effekt der Derivate A - F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im EPM 60 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht), Diazepam (0,3 und 1 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse in Zentimetern ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 3)

\*=statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,005$ )

Wie in Abb. 34 zu sehen ist, legten Mäuse, die VA (3 mg/kg Körpergewicht) erhielten, 60 min nach i.p. Applikation verglichen mit Kontrolltieren eine ähnlich lange Gesamtstrecken zurück (VA:  $1372,16 \pm 113,97$  cm;  $n=4$ ; Kontrolle:  $1358,97 \pm 51,73$  cm;  $n=12$ ). Auch Mäuse, denen Derivat F ( $1358,52 \pm 31,63$  cm;  $n=8$ ) oder 0,3 mg/kg Körpergewicht Diazepam ( $1310,09 \pm 126,61$  cm;  $n=7$ ) injiziert wurde, bewegten sich ähnlich viel.

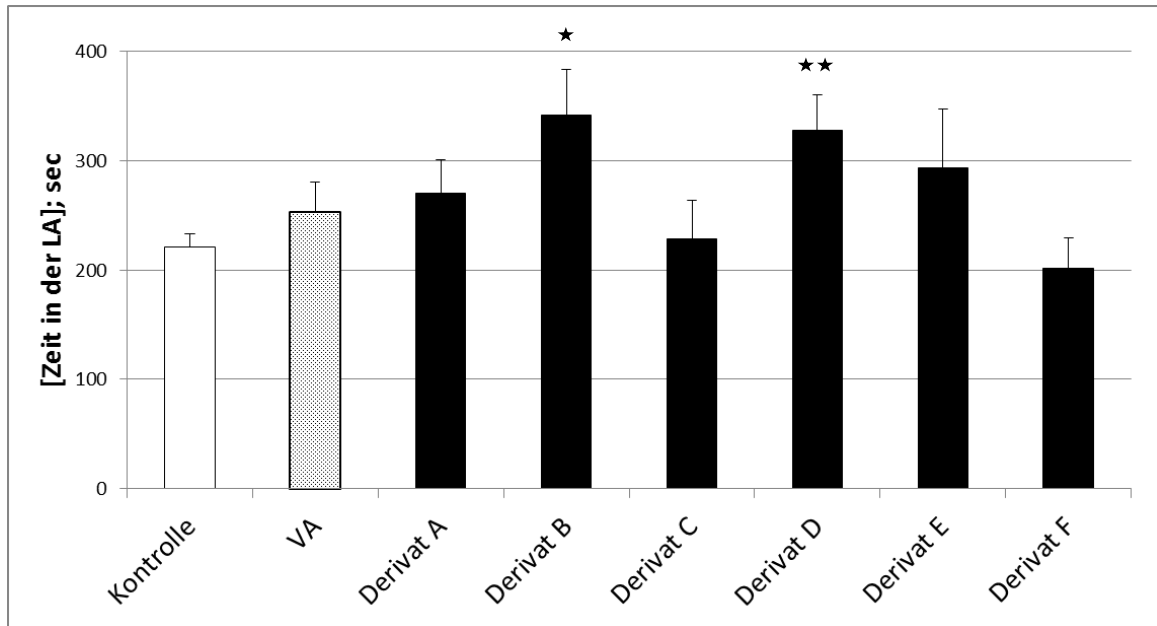
Eine signifikante Reduktion der zurückgelegten Gesamtstrecke konnte bei Mäusen beobachtet werden, denen Derivat E ( $996,40 \pm 92,02$  cm;  $n=10$ ;  $p < 0,005$ ), Derivat A ( $1135,08 \pm 64,16$  cm;  $n=13$ ;  $p < 0,05$ ) oder Diazepam in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht ( $978,94 \pm 94,13$  cm;  $n=8$ ;  $p < 0,005$ ) i.p. appliziert wurde. Die Derivate B, C, D bewirkten eine tendenzielle Reduktion der zurückgelegten Strecke, die jedoch nicht signifikant ist (B:  $1265,95 \pm 27,09$  cm;  $n=5$ ; C:  $1222,85 \pm 61,95$  cm;  $n=16$ ; D:  $1192,86 \pm 61,83$  cm;  $n=11$ ).

## 6.2 Effekt der VA-Derivate auf das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 Minuten nach i.p. Applikation

Nach der Untersuchung der Derivate im EPM wurden die Substanzen zusätzlich im LDT 30 min nach i.p. Applikation getestet (3 mg/kg Körpergewicht). Für die Auswertung wurde sowohl die verbrachte Zeit im hellen Areal (light area, LA) in Sekunden als auch die zurückgelegte Strecke im hellen Areal in Zentimetern, die zurückgelegte Gesamtstrecke in Zentimetern und die Anzahl der Besuche des hellen Areals herangezogen (siehe Tabelle 4 sowie Abb. 35 – 38).

	LDT 30 min				
	Besuche der LA	Zeit in der LA (sec)	Strecke in der LA (cm)	Gesamtstrecke (cm)	Versuchstiere (n)
<b>Kontrolle</b>	38,04 ± 6,89	220,90 ± 11,89	3238,56 ± 170,91	7098,93 ± 225,54	24
<b>VA</b>	35,06 ± 4,66	253,66 ± 26,32	3917,30 ± 287,98	7953,16 ± 298,48	17
<b>Derivat A</b>	27,41 ± 1,93	269,88 ± 31,13	3726,34 ± 336,33	7414,32 ± 346,35	17
<b>Derivat B</b>	53,88 ± 16,58	341,49 ± 41,55	5071,76 ± 785,80	8124,82 ± 593,01	8
<b>Derivat C</b>	31,38 ± 2,46	228,48 ± 34,83	2830,36 ± 290,22	6801,44 ± 380,13	8
<b>Derivat D</b>	42,79 ± 9,18	327,20 ± 32,80	4570,53 ± 608,54	7871,25 ± 539,95	19
<b>Derivat E</b>	36,43 ± 7,93	292,93 ± 53,75	4417,26 ± 812,33	7854,58 ± 377,90	7
<b>Derivat F</b>	62,75 ± 21,43	201,04 ± 28,65	3749,59 ± 493,93	8373,14 ± 866,56	8

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) im LDT 30 min nach i.p. Applikation. Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten ± SEM angegeben.



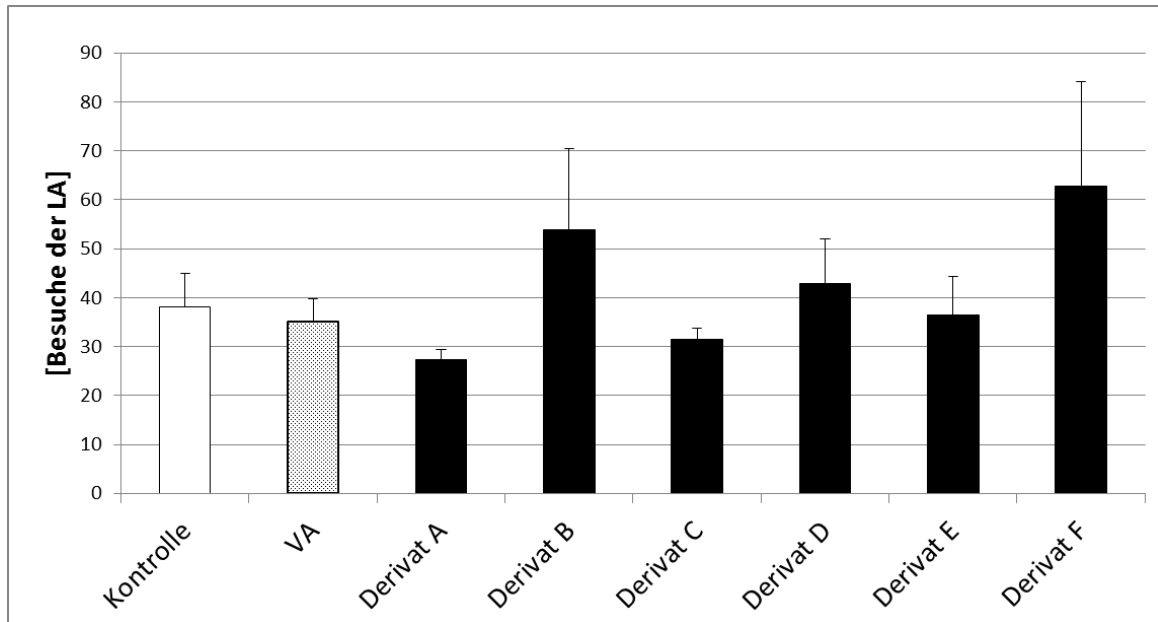
**Abb. 35:** Effekt der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltszeit der Mäuse im hellen Areal in Sekunden ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 4).

\*=statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,005$ )

Wie aus Abb. 35 ersichtlich ist, konnte im LDT 30 min nach i.p. Applikation eine signifikant verlängerte Aufenthaltszeit in der LA von Mäusen, die Derivat B ( $341,49 \pm 41,55$  sec;  $n=8$ ;  $p < 0,05$ ) oder D ( $327,2 \pm 32,8$  sec;  $n=19$ ;  $p < 0,005$ ) erhalten hatten, beobachtet werden. Mäuse, denen VA, Derivat A oder Derivat E verabreicht wurde, hielten sich tendenziell länger als Kontrolltiere in der LA auf (VA:  $253,66 \pm 26,32$  sec;  $n=17$ ; A:  $269,88 \pm 31,13$  sec;  $n=17$ ; E:  $292,93 \pm 53,75$  sec;  $n=7$ ). Im Gegensatz dazu hielten sich Mäuse, denen Derivat C injiziert wurde, im Vergleich zu Mäusen der Kontrollgruppe ähnlich lange in der LA auf (C:  $228,48 \pm 34,83$  sec;  $n=8$ ; Kontrolle:  $220,90 \pm 11,89$  sec;  $n=24$ ), wohingegen Mäuse, die unter dem Einfluß von Derivat F standen, hier tendenziell weniger Zeit ( $201,04 \pm 28,65$  sec;  $n=8$ ) verbrachten.

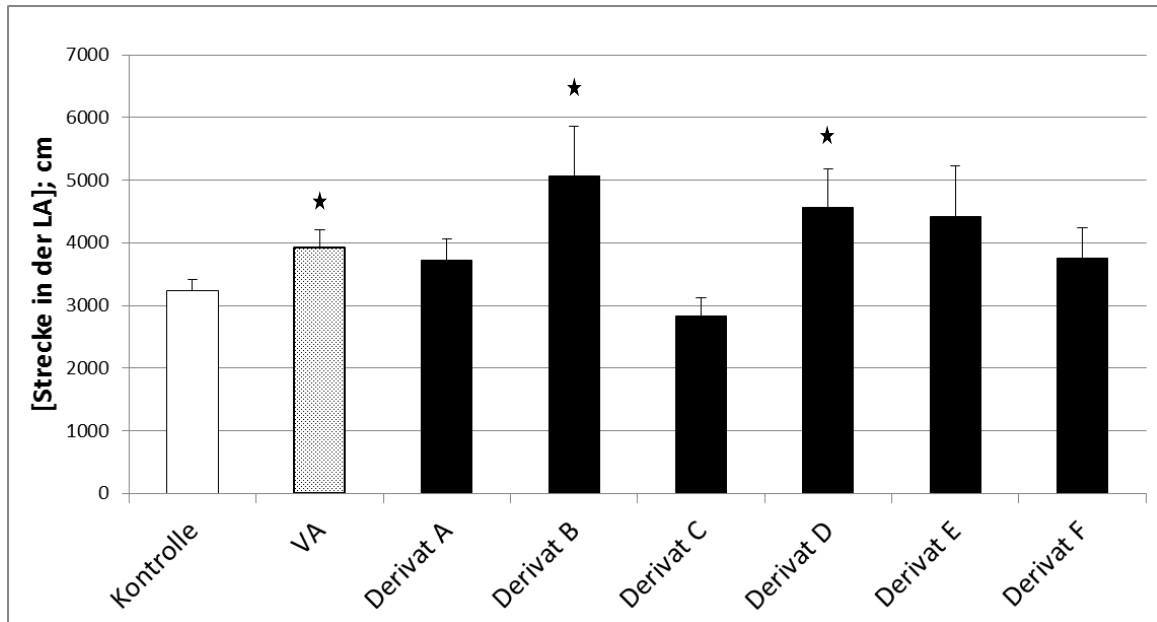
## Ergebnisse



**Abb. 36:** Effekt der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Eintritte der Mäuse in das helle Areal ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 4).

Bezogen auf die Anzahl der Besuche des hellen Areals (LA) konnte für die untersuchten Substanzen (3 mg/kg Körpergewicht) im Vergleich zur Kontrolllösung keine signifikante Veränderung dieses Parameters beobachtet werden (siehe Abb. 36).



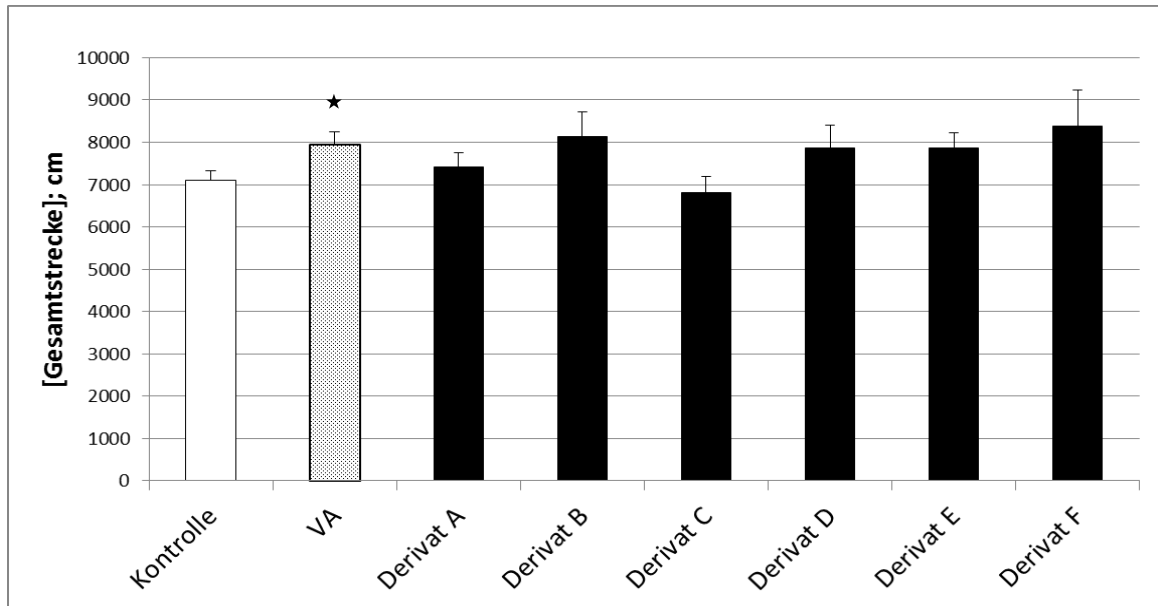
**Abb. 37:** Effekt der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9% NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse im hellen Areal in Zentimetern ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $3238,56 \pm 170,91$  cm;  $n=24$ ) legten sowohl VA-Mäuse ( $3917,3 \pm 287,98$  cm;  $n=17$ ) als auch Mäuse, denen Derivat B ( $5071,76 \pm 785,8$  cm;  $n=8$ ) oder Derivat D ( $4570,53 \pm 608,54$  cm;  $n=19$ ) verabreicht wurde, eine signifikant ( $p < 0,05$ ) längere Strecke in der LA zurück (siehe Abb. 37). Auch Derivat E bewirkte eine trendmäßige Steigerung der zurückgelegten Wegstrecke in der LA, der gemessene Effekt ist jedoch nicht signifikant ( $4417,26 \pm 812,33$  cm;  $n=7$ ;  $p > 0,05$ ). Mäuse, denen Derivat A ( $3726,34 \pm 336,33$  cm;  $n=17$ ) oder F ( $3749,59 \pm 493,93$  cm;  $n=8$ ) i.p appliziert wurde, bewegten sich in der LA geringfügig weniger als VA-, aber mehr als Kontrollmäuse. Weiters konnte beobachtet werden, dass die i.p. Applikation von Derivat C unter den untersuchten Substanzen die tendenziell stärkste Abnahme der in der LA zurückgelegten Strecke zur Folge hatte ( $2830,36 \pm 290,22$  cm;  $n=8$ ).

## Ergebnisse



**Abb. 38:** Effekt der Derivate A – F (3 mg/kg Körpergewicht) auf das Verhalten von c57Bl/6N Mäusen im LDT 30 min nach i.p. Applikation im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % NaCl-Lösung)

Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse in Zentimetern ( $\pm$  SEM; siehe Tabelle 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

Wie in Abb. 38 gezeigt, legten VA-Mäuse (3 mg/kg Körpergewicht) mit durchschnittlich  $7953,16 \pm 298,48$  cm ( $n=17$ ) eine signifikant ( $p < 0,05$ ) längere Gesamtstrecke als Kontrolltiere zurück ( $7098,93 \pm 225,54$  cm;  $n=24$ ). Für alle anderen untersuchten Substanzen (3 mg/kg Körpergewicht) konnte keine signifikante Veränderung dieses Parameters beobachtet werden. Tendenziell legten Mäuse, denen Derivat B, D, E oder F verabreicht wurde, ähnlich lange Strecken wie VA-Mäuse zurück (B:  $8124,82 \pm 593,01$  cm;  $n=8$ ; D:  $7871,25 \pm 539,95$  cm;  $n=19$ ; E:  $7854,58 \pm 377,9$  cm;  $n=7$ ; F:  $8373,14 \pm 866,56$  cm;  $n=8$ ). Mäuse, denen Derivat A verabreicht wurde, bewegten sich tendenziell etwas mehr als Mäuse der Kontroll- aber weniger als jene der VA-Verumgruppe (A:  $7414,32 \pm 346,35$  cm;  $n=17$ ). Demgegenüber legten Mäuse nach i.p. Applikation von Derivat C tendenziell mit durchschnittlich  $6801,44 \pm 380,13$  cm ( $n=8$ ) die kürzesten Strecken zurück und bewegten sich damit tendenziell auch weniger als die Tiere der Kontrollgruppe.



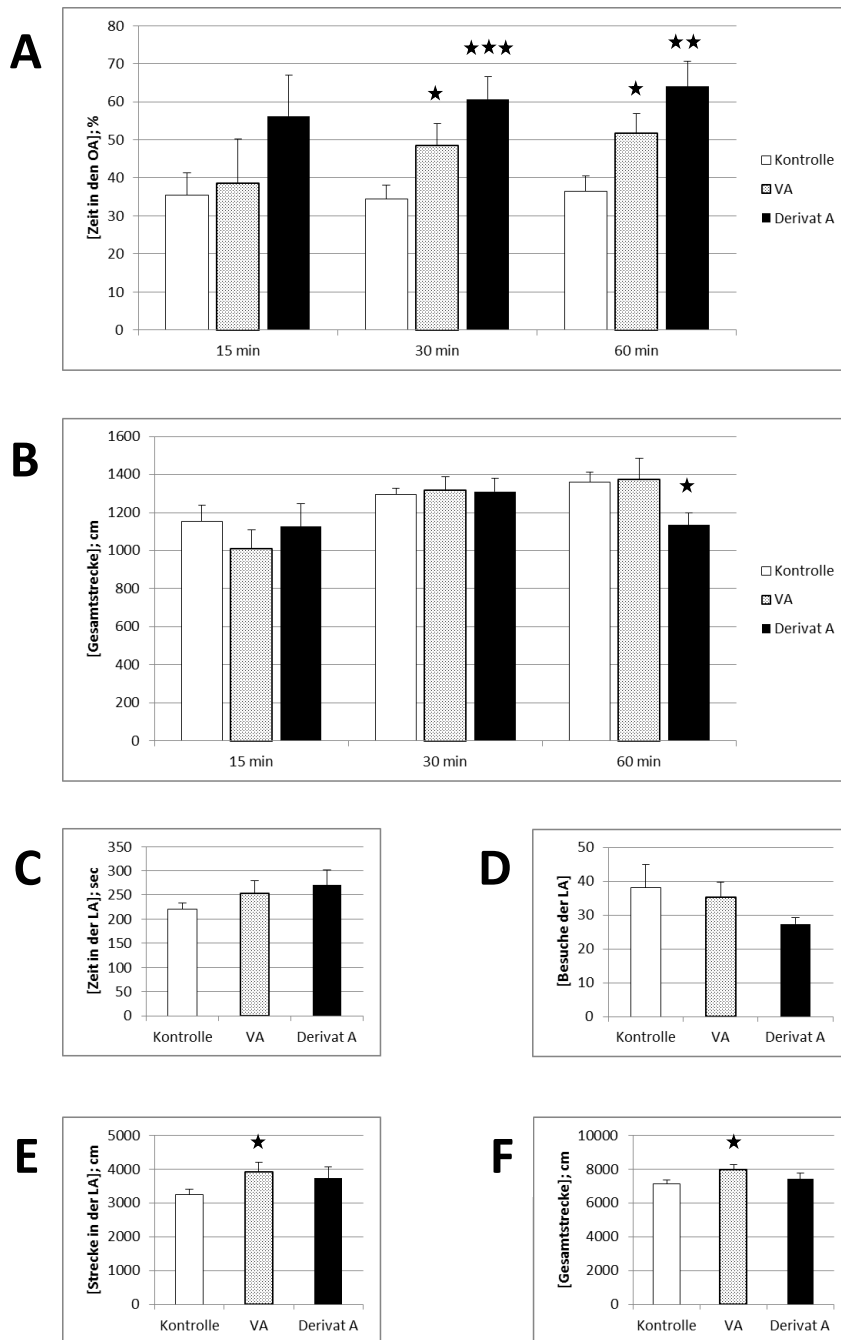


## 7 Diskussion

GABA hat als wichtigster inhibitorischer Neurotransmitter eine besondere Bedeutung für die Balance zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Prozessen im Gehirn von Säugetieren (Richter et al., 2012; Rudolph und Knoflach, 2011). Zahlreiche Krankheitsbilder, wie beispielsweise Epilepsie (Pavlov und Walker, 2012), Schlafstörungen (Sakurai, 2007) oder Angststörungen (Tasan et al., 2011), werden maßgeblich mit einer Störung der GABAergen Neurotransmission in Zusammenhang gebracht. Daher haben sich GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulatoren als interessante Targets zur Behandlung derartiger Erkrankungen herausgestellt (Olsen und Sieghart, 2008).

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollten die *in vivo* Effekte von 6 verschiedenen Derivaten eines Naturstoffs (VA) untersucht werden, welcher am Department für Pharmakologie und Toxikologie (Universität Wien, Prof. Hering) bereits als  $\beta_{2/3}$ -selektiver GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulator mit anxiolytischer Wirkung identifiziert wurde.

Die untersuchten Substanzen zeigten unterschiedliche Effekte am Tiermodell:



**Abb. 39:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat A (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ); \*\*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

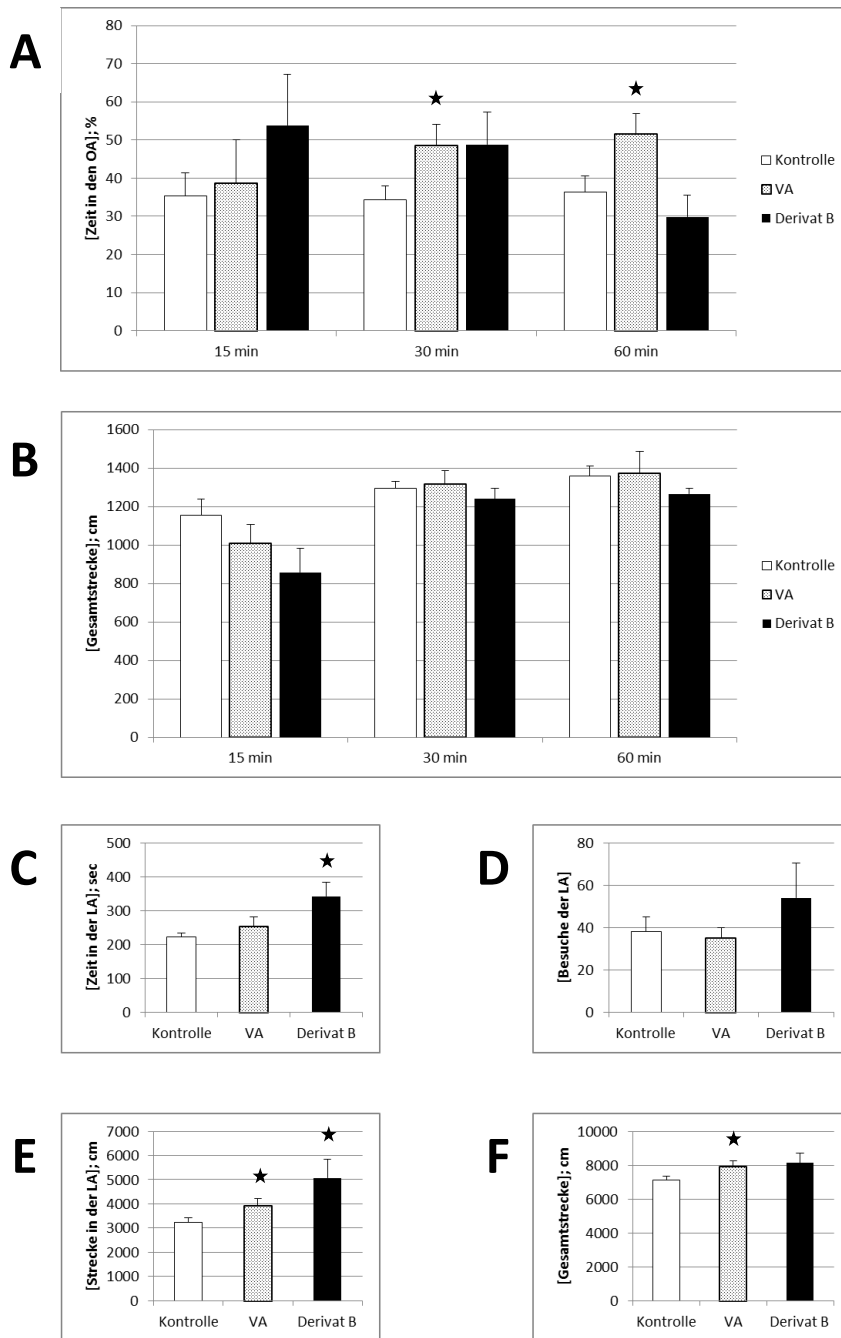
**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.

Während sich die Aufenthaltsdauer der Kontrolltiere in den OA des EPM 15, 30 und 60 min nach i.p. Applikation der Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung) nicht nennenswert veränderte, hielten sich sowohl VA-Mäuse als auch Mäuse, denen Derivat A verabreicht wurde (jeweils 3 mg/kg Körpergewicht), länger in den OA auf, je mehr Zeit nach Injektion der Substanz verstrichen war (siehe Abb. 39). Sowohl VA als auch Derivat A bewirkte im EPM nach 30 und 60 Minuten eine signifikante Steigerung der in den OA des EPMs verbrachten Zeit der Versuchstiere im Vergleich zu Kontrollmäusen. Der gemessene Effekt für Derivat A lag zu allen drei untersuchten Zeitpunkten auch deutlich über jenem Effekt, der für VA beobachtet wurde. So hielten sich Mäuse, die Derivat A erhalten hatten, 30 min nach i.p. Applikation etwa 60 % und 60 min nach i.p. Applikation rund 64 % der Zeit in den OA auf und verbrachten daher dort etwa ein Viertel mehr Zeit als VA-Mäuse und rund drei Viertel mehr Zeit als Kontrolltiere.

Im LDT konnte für Derivat A keine signifikante Veränderung der Parameter beobachtet werden. Es zeigte sich, dass Mäuse, denen Derivat A injiziert wurde, 30 min nach i.p. Applikation der Substanz tendenziell seltener als VA- und Kontrollmäuse vom dunklen in das helle Areal wechselten, dort jedoch trendmäßig mehr Zeit als die beiden Vergleichsgruppen verbrachten. Bezogen auf die zurückgelegte Gesamtstrecke zeigte sich im LDT sowie im EPM 15 und 30 Minuten nach i.p. Applikation keine signifikante Veränderung dieses Parameters. 60 min nach i.p. Applikation legten Mäuse, denen Derivat A verabreicht wurde, im EPM jedoch signifikant ( $p < 0,05$ ) kürzere Strecken als Mäuse der Kontrollgruppe zurück.

Die Ergebnisse des EPM deuten darauf hin, dass Mäuse, denen dieses Derivat verabreicht wurde, weniger Scheu vor offenen Flächen hatten und diese stärker explorierten, was darauf schließen lässt, dass Derivat A anxiolytisches Potential besitzt und auch stärker anxiolytisch als VA wirkt. Auch im LDT zeigte sich für Derivat A eine geringfügige Steigerung der Aufenthaltsdauer im hellen Areal, die jedoch nicht signifikant war. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Mäuse zum Zeitpunkt des LDT möglicherweise bereits zu alt waren oder durch den mehrere Wochen zuvor durchgeführten EPM-Test beeinflusst waren.

Da bezüglich der zurückgelegten Strecke im EPM 60 min nach i.p. Applikation eine signifikante Reduktion der Laufstrecke beobachtet werden konnte, wäre es möglich, dass Derivat A auch sedierende Eigenschaften besitzt. Da jedoch in keinem anderen Versuch eine Sedierung der Tiere beobachtet werden konnte, sollten weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Da im Rahmen dieser Versuche ein sedierender Effekt erst 60 min nach i.p. Applikation sichtbar war, wäre es sinnvoll, das Verhalten der Mäuse mehrere Stunden nach Applikation der Substanz zu untersuchen, da die sedierende Wirkung eventuell erst verzögert eintritt.



**Abb. 40:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat B (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

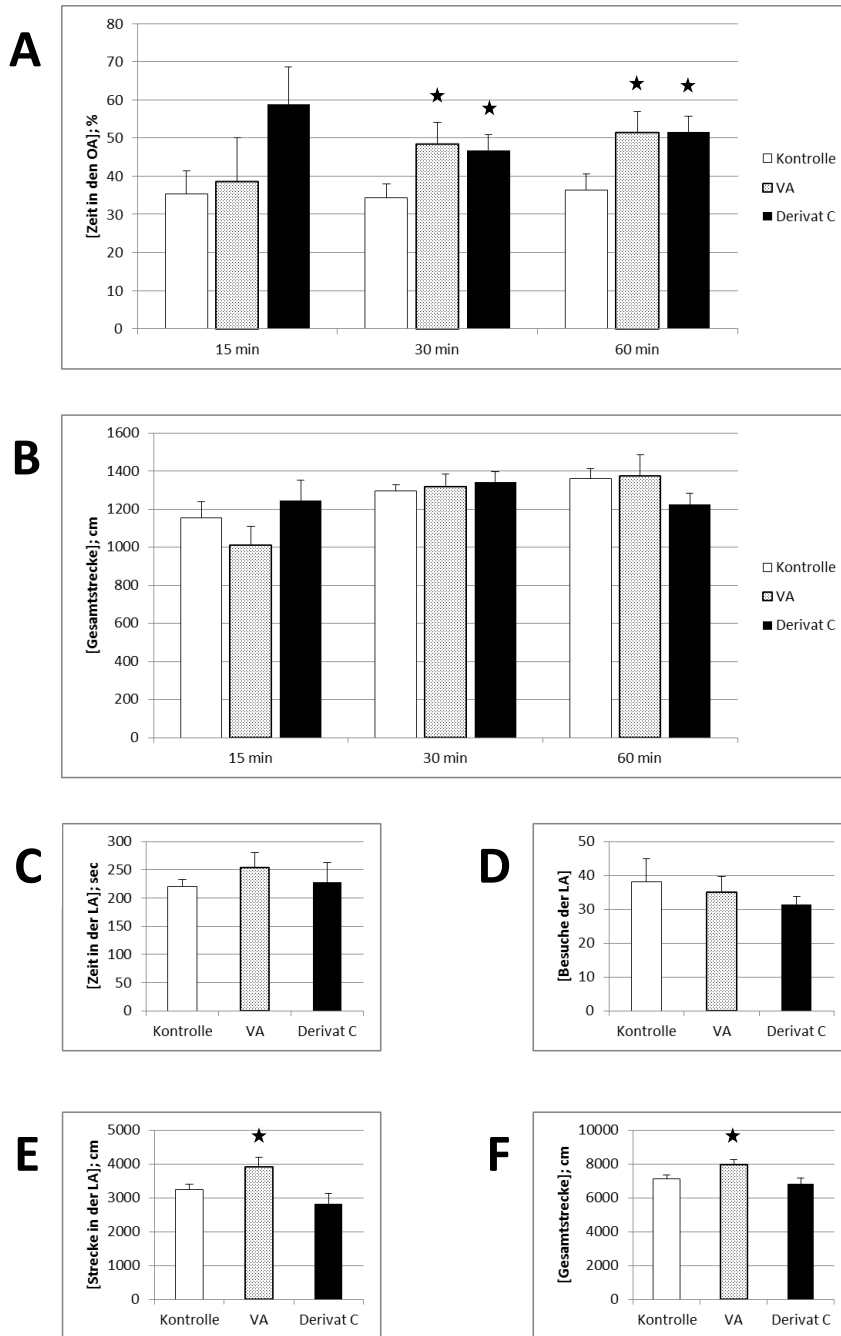
**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.

Wie in Abb. 40 erkennbar ist, bewirkte Derivat B (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM 15, 30 und 60 min nach i.p. Applikation keine signifikant verlängerte Aufenthaltszeit der Mäuse in den offenen Armen verglichen mit Kontrolltieren. Tendenziell verbrachten Mäuse, denen dieses Derivat verabreicht wurde, 15 min nach Injektion noch rund 50 % mehr Zeit in OA als Kontroll- und 40 % mehr als VA-Tieren, 60 min nach Applikation jedoch trendmäßig deutlich weniger (rund 20 % weniger als Kontroll- und 40 % weniger als VA-Mäuse). Bezogen auf die im EPM zurückgelegte Gesamtstrecke konnte für Derivat B ebenfalls keine signifikante Veränderung beobachtet werden. Tendenziell legten Mäuse, denen Derivat B verabreicht wurden, im EPM 15, 30 und 60 min nach i.p. Applikation geringfügig kürzere Strecken als Mäuse der beiden Vergleichsgruppen zurück.

Im LDT konnte hingegen gezeigt werden, dass Mäuse, denen Derivat B verabreicht wurde, nicht nur tendenziell öfter als Kontrolltiere in die LA eintraten sondern dort auch signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Zeit verbrachten und signifikant ( $p < 0,05$ ) längere Strecken in der LA zurücklegten. In Bezug auf die im LDT zurückgelegte Gesamtstrecke konnte für Derivat B keine signifikante Veränderung des Parameters festgestellt werden, der gemessene Effekt war aber vergleichbar mit jenem von VA.

Die Untersuchungen lieferten kontroverse Ergebnisse: Im LDT bewirkte Derivat B eine signifikant verlängerte Aufenthaltszeit der Mäuse im hellen Areal gegenüber Mäusen der Kontrollgruppe, die jedoch im EPM nicht beobachtet werden konnte. Da sich Mäuse, denen Derivat B verabreicht wurde, auch im EPM 15 und 30 min nach i.p. Applikation trendmäßig länger als Kontrolltiere in den OA aufhielten, diese Tendenz nach 60 min jedoch nicht mehr sichtbar war, wäre es möglich, dass die anxiolytische Wirkung von Derivat B nur kurz andauert. Da die Anzahl der Versuchstiere im EPM in diesem Fall gering war ( $n=5-8$ , je nach untersuchtem Zeitpunkt), sind hier weitere Untersuchungen – auch mehrere Stunden nach i.p. Applikation – wünschenswert, um genauere Aussagen über eine eventuelle anxiolytische Wirkung von Derivat B treffen zu können.

Weder im EPM noch im LDT konnten Hinweise auf eine sedierende Wirkung von Derivat B beobachtet werden. Im LDT bewegten sich Mäuse, denen dieses Derivat verabreicht wurde, in der LA sogar signifikant mehr als Kontrollmäuse, jedoch hielten sie sich auch signifikant länger in diesem Areal auf (jeweils  $p < 0,05$ ). Es ist daher unwahrscheinlich, dass Derivat B sedierende Eigenschaften besitzt.



**Abb. 41:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat C (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ )

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

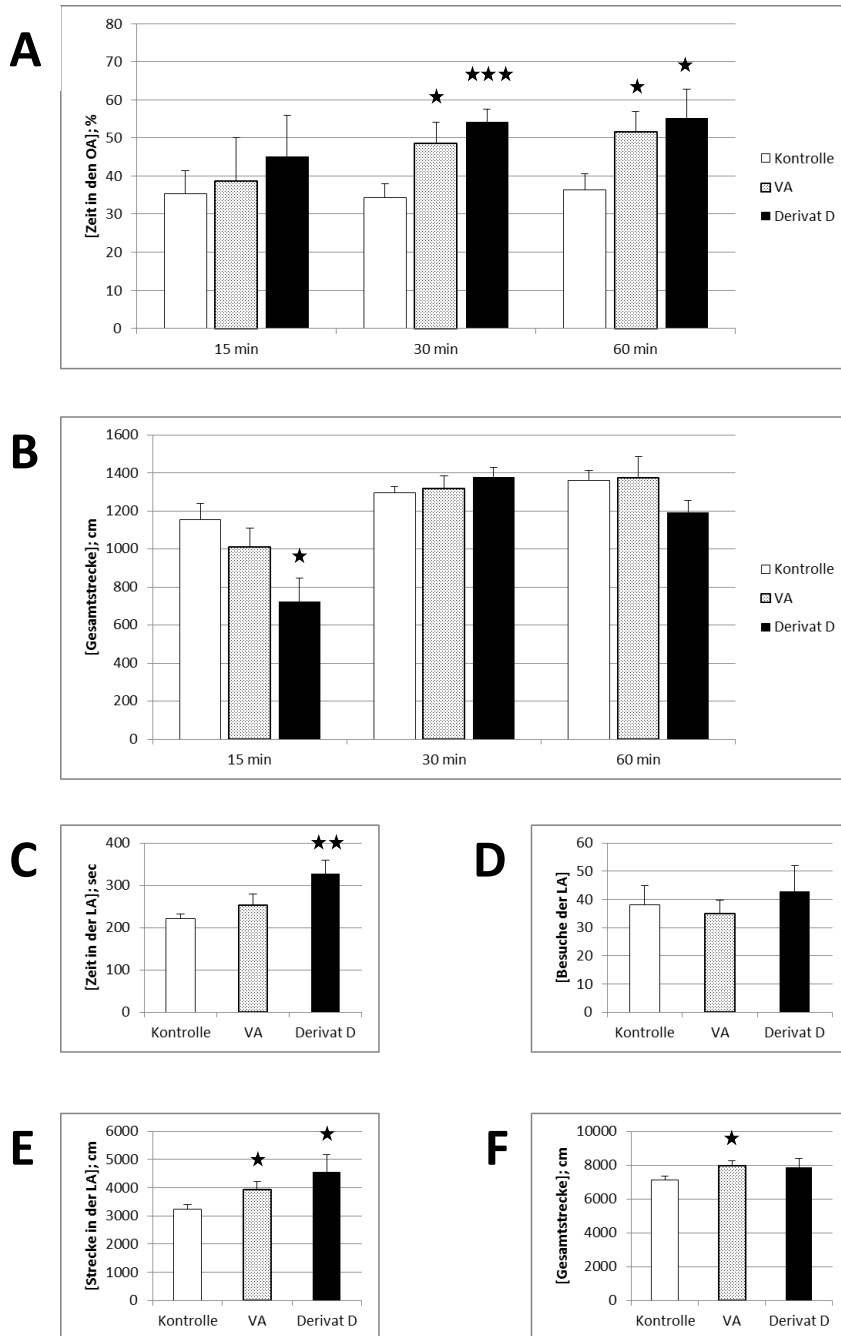
**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse in der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.

Wie in Abb. 41 dargestellt, bewirkte Derivat C (3 mg/kg Körpergewicht) bei c57Bl/6N Mäusen im EPM 30 und 60 Minuten nach i.p. Applikation verglichen mit Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung) eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Steigerung der in OA verbrachten Zeit. Mäuse, denen Derivat C verabreicht wurde, verbrachten im EPM nach 30 und 60 Minuten rund ein Drittel mehr Zeit in offenen Armen als Kontrolltiere und hielten sich hier ähnlich lange wie VA-Mäuse (3 mg/kg Körpergewicht) auf. Diese Ergebnisse deuten daher darauf hin, dass Derivat B ähnlich stark anxiolytisch wie der Naturstoff VA wirkt.

Diese signifikante Anxiolyse konnte im LDT jedoch nicht beobachtet werden, hier bewirkte Derivat C nur eine trendmäßige Zunahme der Aufenthaltszeit in der LA. Das könnte einerseits am Alter der Tiere, andererseits an der geringen Anzahl an Versuchstieren im LDT ( $n=8$ ) liegen, weshalb hier weitere Untersuchungen nötig wären, um die im EPM beobachtete anxiolytische Wirkung zu bestätigen. Bezogen auf die zurückgelegte Strecke konnte weder im EPM noch im LDT eine signifikante Veränderung der Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Mäuse, denen Derivat C i.p. appliziert wurde, legten im EPM nach 15 und 30 Minuten tendenziell längere Strecken, im EPM nach 60 Minuten sowie im LDT jedoch trendmäßig kürzere Strecken als Kontrolltiere zurück. Da jedoch keiner dieser gemessenen Effekte signifikant war, ist unwahrscheinlich ist, dass Derivat C sedierend wirkt.



**Abb. 42:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat D (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,005$ ); \*\*\*= statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

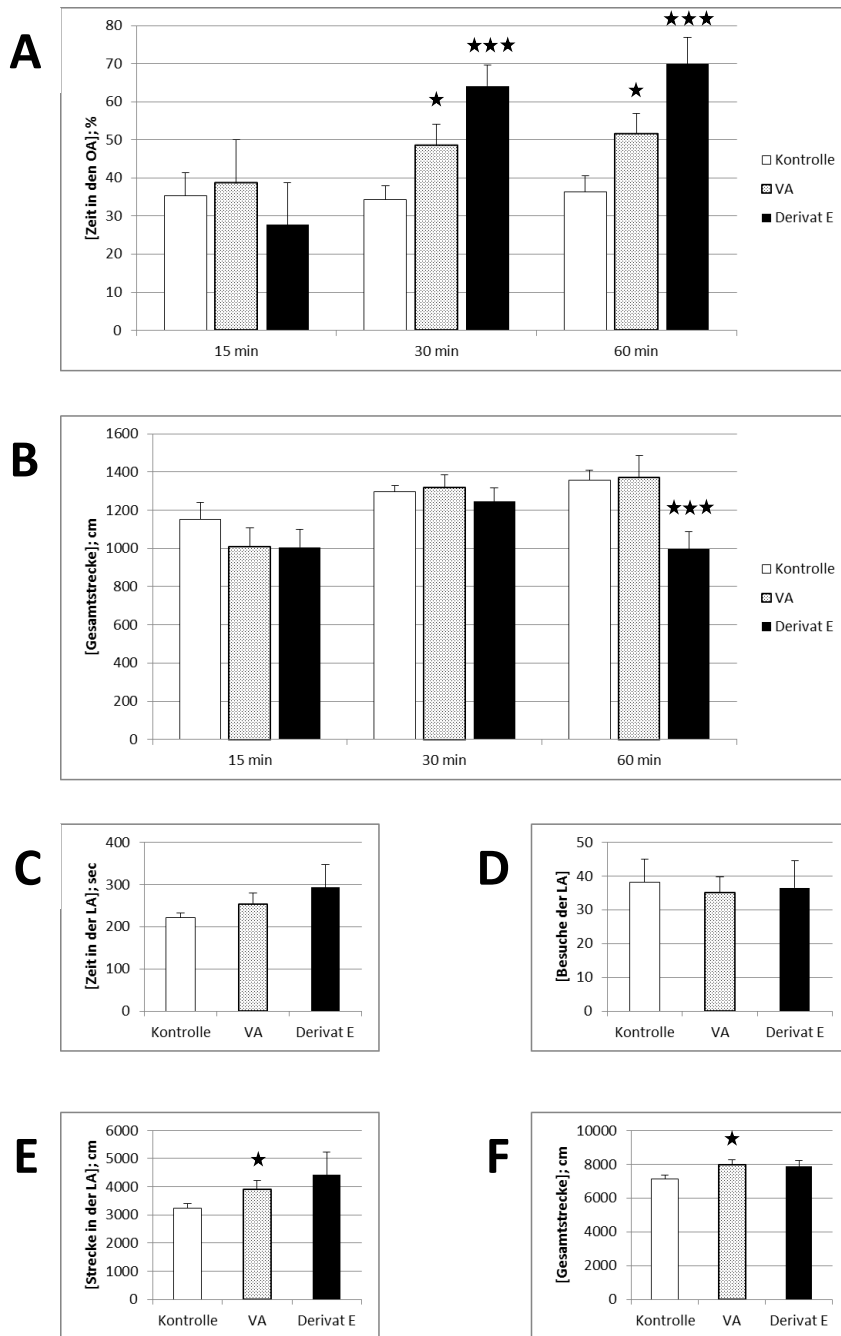
**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.



Derivat D (3 mg/kg Körpergewicht) bewirkte im EPM sowohl 30 als auch 60 Minuten nach i.p. Applikation eine signifikant gesteigerte Aufenthaltszeit der Mäuse in OA verglichen mit Kontrolltieren (siehe Abb. 42). Der gemessene Effekt war auch stärker als jener nach Injektion von VA, was darauf schließen lässt, dass Derivat D stärker anxiolytisch wirkt als der Naturstoff selbst.

Diese Vermutung bestätigte sich auch im LDT, wo Mäuse, denen dieses Derivat verabreicht wurde, nicht nur tendenziell öfter die LA besuchten sondern dort auch signifikant ( $p < 0,005$ ) mehr Zeit verbrachten und signifikant ( $p < 0,05$ ) mehr Strecke als Kontrolltiere in der LA zurücklegten.

Bezogen auf die zurückgelegte Gesamtstrecke wurde im EPM 15 min nach i.p. Applikation des Derivats interessanterweise eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion der Totallaufstrecke beobachtet. Diese Reduktion der Laufstrecke kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht interpretiert werden, da die Anzahl der Versuchstiere, die im EPM 15 min nach i.p. Applikation untersucht wurden, gering war ( $n=7$ ). Dementsprechend sollten hier weiterführende Tests mit einem größeren Kollektiv an Versuchstieren durchgeführt werden.



**Abb. 43:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat E (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ); \*\*\*=statistisch signifikant ( $p < 0,001$ )

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

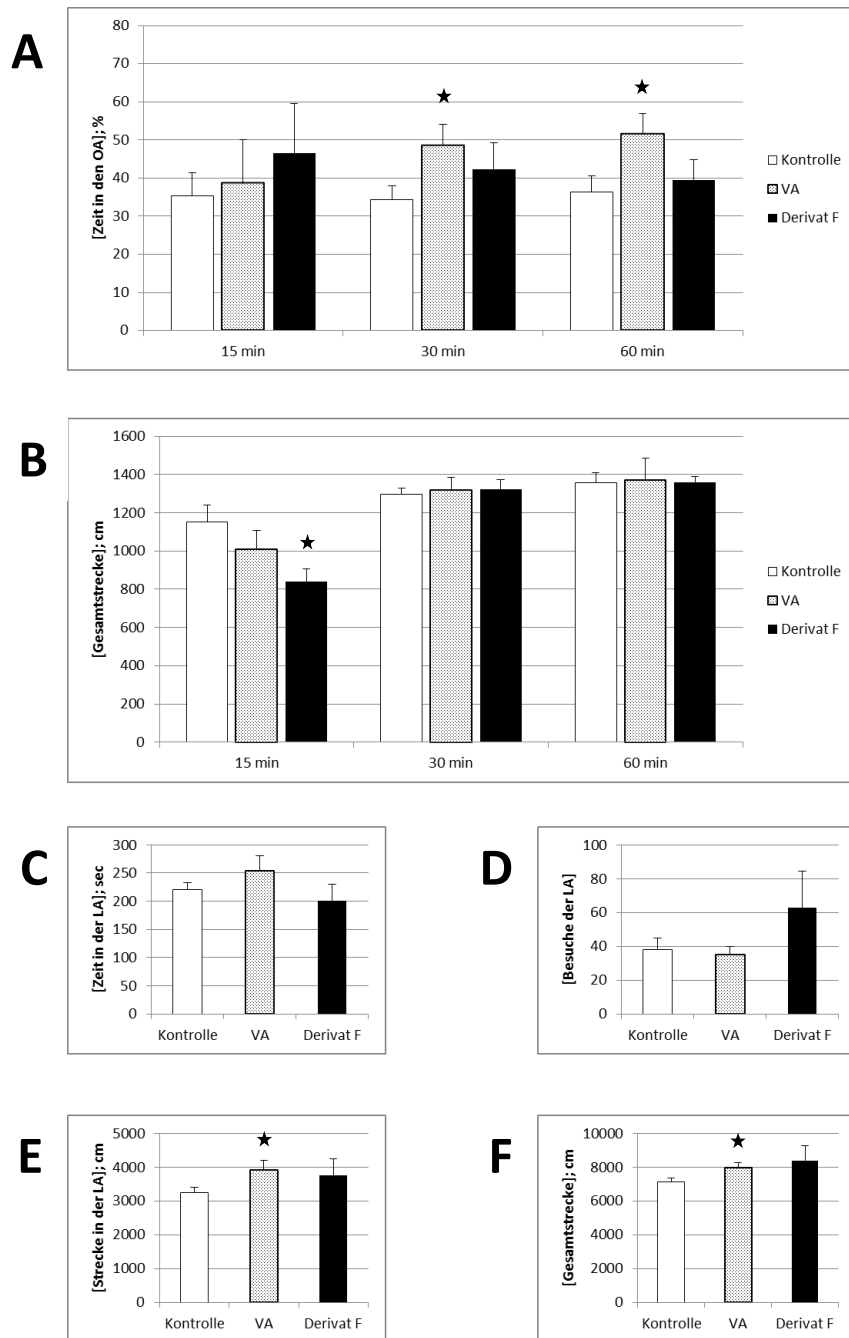
**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.

Auch Mäuse, denen Derivat E (3 mg/kg Körpergewicht) i.p. appliziert wurde, verbrachten im EPM 30 und 60 Minuten nach Injektion signifikant ( $p < 0,001$ ) mehr Zeit in den OA als Mäuse, denen 0,9 % Kochsalzlösung (Kontrolle) verabreicht wurde. Diese Mäuse hielten sich rund 87 % (EPM 30 min) beziehungsweise rund 92 % (EPM 60 min) länger als Kontrolltiere in OA auf und verbrachten dort auch etwa ein Drittel mehr Zeit als Mäuse der VA-Verumgruppe (3 mg/kg Körpergewicht), was darauf schließen lässt, dass Derivat D stärkeres anxiolytisches Potenzial als VA besitzt. Diese deutliche Anxiolyse konnte im LDT nicht beobachtet werden, hier hielten sich Mäuse, denen Derivat E verabreicht wurde, nur geringfügig länger als VA- und Kontroll-Mäuse in der LA auf, dieser Effekt war jedoch statistisch nicht signifikant. Möglicherweise beruht dieser Befund darauf, dass die Mäuse zu diesem Zeitpunkt schon zu alt waren. Eine zu geringe Anzahl an Versuchstieren ( $n=7$ ) und eine Streuung der gemessenen Effekte ( $292,93 \pm 53,75$  sec) im LDT könnten ebenfalls für die unterschiedlichen Effekte im EPM und LDT verantwortlich sein. Hier wären weitere Untersuchungen mit einem größeren Kollektiv an Versuchstieren nötig, um auch im LDT eine signifikante Anxiolyse messen zu können.

Interessanterweise bewirkte Derivat E weiters eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Reduktion der zurückgelegten Gesamtstrecke im EPM 60 Minuten nach i.p. Applikation des Derivats. Mäuse, denen dieses Derivat verabreicht wurde, legten hier mit durchschnittlich  $996,40 \pm 92,02$  cm ( $n=10$ ) vergleichbar kurze Strecken wie Mäuse, die 1 mg/kg Körpergewicht Diazepam erhalten hatten ( $978,94 \pm 94,13$  cm;  $n=8$ ), zurück. Das könnte ein Indiz für eine sedierende Wirkung sein. Überraschend ist hierbei, dass bei keinem anderen Versuch eine Reduktion der Aktivität zu beobachten war, im LDT bewirkte Derivat E sogar sowohl eine trendmäßige Steigerung der zurückgelegten Strecke in der LA sowie eine tendenzielle Zunahme der Gesamtstrecke.



**Abb. 44:** Darstellung der Ergebnisse von Derivat F (3 mg/kg Körpergewicht) im EPM und LDT im Vergleich mit VA (3 mg/kg Körpergewicht) und Kontrolllösung (0,9 % Kochsalzlösung)

Die erfassten Parameter sind in Mittelwerten  $\pm$  SEM angegeben (siehe Tabellen 1, 2, 3 und 4).

\*= statistisch signifikant ( $p < 0,05$ );

**A:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in den OA des EPMs in Prozent.

**B:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im EPM in Zentimetern.

**C:** Die Balken zeigen die mittlere Aufenthaltsdauer der Mäuse in der LA des LDT in Sekunden.

**D:** Die Balken zeigen die mittlere Anzahl der Besuche der Mäuse der LA des LDT.

**E:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Strecke der Mäuse in der LA des LDT in Zentimetern.

**F:** Die Balken zeigen die mittlere zurückgelegte Gesamtstrecke der Mäuse im LDT in Zentimetern.

Wie in Abb. 44 sichtbar ist, konnte eine i.p. Applikation von Derivat F (3 mg/kg Körpergewicht) in keiner der durchgeführten Versuchsanordnungen mit einer Anxiolyse der Versuchstiere in Zusammenhang gebracht werden: Im EPM konnte keine signifikant verlängerte Aufenthaltszeit der Mäuse in den OA beobachtet werden, im LDT verbrachten sie sogar tendenziell weniger Zeit im hellen Areal als die Kontrollgruppe. 15 Minuten nach i.p. Applikation verbrachten Mäuse, denen Derivat F verabreicht wurde, zwar tendenziell mehr Zeit in den OA des EPMs als Kontrolltiere, jedoch war die Anzahl der untersuchten Tiere hier deutlich zu niedrig ( $n=3$ ) und die Streuung daher sehr hoch ( $46,47 \pm 12,98 \%$ ).

Weiters wurde beobachtet, dass Mäuse, denen Derivat F verabreicht wurde, 15 min nach i.p. Applikation signifikant ( $p<0,05$ ) kürzere Strecken als Kontrolltiere zurücklegten. Daher wären weitere Tests wünschenswert, um genauere Aussagen treffen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein erster Schritt zur Erforschung der *in vivo* Wirkung dieser 6 neu synthetisierten VA-Derivate getan. Es konnte gezeigt werden, dass Derivate des Naturstoffs VA anxiolytisches Potential besitzen und darin dem Naturstoff teilweise überlegen sind. Es sind jedoch noch weitere Untersuchungen nötig, um zahlreiche offene Fragen zu klären:

Da die Derivate i.p. injiziert wurden, muss getestet werden, wie die Wirkung nach peroraler Gabe ausfällt. Wie aus der Literatur bekannt ist, spielt bei peroraler Gabe im Gegensatz zur Injektion der First-Pass-Effekt in der Leber eine entscheidende Rolle für die Pharmakokinetik des Arzneistoffs, weswegen aufgrund hepatischer Metabolisierung möglicherweise die Bioverfügbarkeit und damit auch die Wirkung verringert sein könnte. In weiterer Folge sollte untersucht werden, inwieweit die Substanzen imstande sind die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und in welcher Konzentration sie schließlich am Wirkort vorliegen.

Zusätzlich wären Daten vonnöten, die Aufschluss darüber geben, ob diese Substanzen ähnlich wie Benzodiazepine bei langfristiger Einnahme zur Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit führen.

Weiters ist zu klären, ob diese Substanzen selektiv auf das GABAerge System wirken oder ob es eventuell zu einer Interaktion auf mehreren Ebenen, beispielsweise durch Bindung weiterer Rezeptoren, kommt.

Zusammengefasst konnten in dieser Arbeit 3 VA-Derivate (A, D und E) identifiziert werden, die ein höheres anxiolytisches Potential als VA selbst besitzen.



## 8 Zusammenfassung

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) stellt den wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS) von Säugetieren dar. Zahlreiche Krankheitsbilder, beispielsweise Epilepsie, Schlaf- oder Angststörungen, basieren auf einer Störung der GABAergen Neurotransmission. GABA Typ A ( $GABA_A$ ) Rezeptor-Modulatoren, allen voran Benzodiazepine, sind aufgrund guter anxiolytischer, hypnotischer und antiepileptischer Wirksamkeit zur Behandlung derartiger Erkrankungen geeignet. Benzodiazepine sind jedoch für eine langfristige Behandlung ungeeignet, da sie unerwünschte ZNS-Wirkungen hervorrufen und sich nach einiger Zeit eine Toleranz und Abhängigkeit entwickeln kann, weswegen schon seit längerem nach Alternativen gesucht wird.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden sechs verschiedene Derivate eines anxiolytisch wirksamen Naturstoffs (VA), der kürzlich als  $\beta_{2/3}$ -selektiver  $GABA_A$ -Rezeptor-Modulator identifiziert wurde, auf ihre anxiolytische und sedierende Wirkung im Tiermodell getestet. Dazu wurde das Angstverhalten von c57Bl/6N Mäusen unter dem Einfluss der jeweiligen Derivate (jeweils 3 mg/kg Körpergewicht) mithilfe zweier verhaltenspharmakologischer Tests (Elevated Plus-Maze (EPM) und Light/Dark-Choice Test (LDT)) und einem automatischen Trackingsystem (VideoMot2 und ActiMot2) untersucht. Ziel der Arbeit war es, Derivate zu identifizieren, die sich vom Naturstoff VA durch eine noch bessere Wirkung unterscheiden. Drei der sechs Derivate (A, D, E) wirkten im EPM stärker anxiolytisch als VA. Derivat B wirkte nur im LDT stärker anxiolytisch als VA, dieser Effekt konnte im EPM jedoch nicht beobachtet werden. Derivat C bewirkte eine Anxiolyse im EPM, die mit jener des Naturstoffs vergleichbar ist. Einzig für Derivat F konnte im Rahmen der durchgeführten Arbeit keine anxiolytische Wirkung festgestellt werden.

Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Derivate des Naturstoffs VA anxiolytisch wirken und interessante Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe darstellen könnten. Zahlreiche weitere Untersuchungen werden zeigen, ob sie letztlich auch für die Therapie von Angststörungen beim Menschen geeignet sind.





## 9 Abstract

$\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) is the most important inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). Numerous clinical conditions, such as epilepsy, sleeping or anxiety disorders, are due to a disturbance of the GABAergic neurotransmission. GABA type A ( $GABA_A$ ) receptor modulators, especially benzodiazepines, display anxiolytic, sedative-hypnotic and antiepileptic effects and are therefore widely used in the treatment of these illnesses. Nevertheless benzodiazepines are not recommended for a long-term treatment, because they cause undesirable CNS side effects and additionally tolerance and dependency can occur. Due to these facts, much effort is put in the research for adequate alternatives.

Within the scope of this thesis six derivatives of an anxiolytic natural compound (VA) which was recently identified as a  $\beta_{2/3}$ -selective  $GABA_A$  receptor modulator were examined for their anxiolytic and sedative effects in an animal model. Therefore, the anxiety-related behavior of c57Bl/6N mice after application of the respective derivatives (3 mg/kg bodyweight) was analysed in 2 behavioral tests (Elevated Plus-Maze (EPM) and Light/Dark-Choice Test (LDT)) by means of an automated tracking system (VideoMot2 and ActiMot2).

The aim of this work was to identify derivatives which display stronger anxiolytic effects than the natural compound.

Three of six derivatives (A, D, E) showed stronger anxiolytic properties than VA itself. Derivative B displayed a more pronounced anxiolytic effect compared to VA in the LDT, which could not be confirmed in the EPM test. Derivative C caused anxiolysis which is comparable to VA. Only derivative F did not induce anxiolytic effects.

These results suggest that derivatives of the natural compound VA have anxiolytic properties and might represent interesting lead structures for novel drug development. Numerous further investigations will show whether they are suitable for the therapy of anxiety disorders in humans at the end.



## 10 Literaturverzeichnis

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

**American Psychiatric Association** 2000. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders 4th edn. Text-Revision. American Psychiatric Press, Washington, DC.

**Awapara, J., Landua, A. J., Fuerst, R., and Seale, B.** (1950). Free gamma-aminobutyric acid in brain. *J. Biol. Chem.* 187:35-39

**Bäckström, T., Wahlström, G., Wahlström, K., Zhu, D., Wang, M. D.** (2005). Isoallopregnanolone; an antagonist to the anaesthetic effect of allopregnanolone in male rats. *Eur. J. Pharmacol.* 512(1):15-21

**Bali, M. and Akabas, M. H.** (2004). Defining the Propofol Binding Site Location on the GABAA Receptor. *Mol. Pharmacol.* 65:68–76

**Baur, R., Kaur, K. H., Sigel, E.** (2009). Structure of alpha6 beta3 delta GABA(A) receptors and their lack of ethanol sensitivity. *J. Neurochem* 111(5):1172-81

**Beleboni, R. O., Carolino, R. O., Pizzo, A. B., Castellan-Baldan, L., Coutinho, J., dos Santos, W. F., Coimbra, N. C.** (2004). Pharmacological and biochemical aspects of GABAergic neurotransmission: pathological and neuropsychobiological relationships. *Cell. Mol. Neurobol.* 24(6):707-28

**Benke, D., Zemoura, K., Maier, P. J.** (2012). Modulation of cell surface GABAB receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. *World J. Biol. Chem.* 3(4): 61-72

**Bitran, D., Shiekh, M., McLeod, M.** (1995). Anxiolytic effect of progesterone is mediated by the neurosteroid allopregnanolone at brain GABAA receptors. *J. Neuroendocrinol.* 7(3):171-7

**Bitran, D., Dugan, M., Renda, P., Ellis, R., Foley, M.** (1999). Anxiolytic effects of the neuroactive steroid pregnanolone 3a-OH-5b-pregnan-20-one after microinjection in the dorsal hippocampus and lateral septum. *Brain Research* 850:217-224

**Boileau, A. J., Newell, J. G. and Czajkowski, C.** (2002). GABA<sub>A</sub> Receptor  $\beta$ 2Tyr97 and Leu99 Line the GABA-binding Site. *J. Biol. Chem.* 277: 2931-2937

**Borghese, C. M., Werner, D. F., Topf, N., Baron, N. V., Henderson, L. A., Boehm, S. L., Blednov, Y. A., Saad, A., Dai, S., Pearce, R. A., Harris, R. A., Homanics, G. E., Harrison, N. L.** (2006). An isoflurane- and alcohol-insensitive mutant GABA(A) receptor alpha(1) subunit with near-normal apparent affinity for GABA: characterization in heterologous systems and production of knockin mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319(1):208-18

**Bormann, J.** (1988). Electrophysiology of GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptor subtypes. *Trends Neurosci.* 11:112-116

**Bormann, J., and Feigenspan, A.** (1995). GABAC receptors. *Trends Neurosci.* 18:515-519

- Bormann, J.** (2000). The 'ABC' GABA receptors. *Trends. Pharmacol. Sci.* 21:16-19
- Botta, P., Mameli, M., Floyd, K. L., Radcliffe, R. A., Valenzuela, C. F.** (2007). Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the alpha6 GABAA receptor subunit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 323(2):684-91
- Bourin, M., Hascoët, M.** (2003). The mouse light/dark box test. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3):55-65
- Bowery, N. G., Enna, S. J.** (2000). gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 292:2-7
- Bradford, H. F.** (1995). Glutamate, GABA and Epilepsy. *Prog. in Neurobiol.* 47:477-511
- Berezhnoy, D., Gibbs, T. T., Farb, D. H.** (2009). Docking of 1,4-benzodiazepines in the alpha1/gamma2 GABA(A) receptor modulator site. *Mol. Pharmacol.* 76(2):440-50
- Carta, M., Mameli, M., Valenzuela, C. F.** (2004). Alcohol Enhances GABAergic Transmission to Cerebellar Granule Cells via an Increase in Golgi Cell Excitability. *The Journal of Neuroscience* 24(15):3746-3751
- Chang, Y., Wang, R., Barot, S., Weiss, D. S.,** (1996). Stoichiometry of a recombinant GABA<sub>A</sub> – receptor. *J. Neurosci.* 16(17):5415-24
- Chapman, E. R.** (2008). How does Synaptotagmin trigger neurotransmitter release? *Annu. Rev. Biochem.* 77:615–41
- Chen, X., de Haas, S., de Kam, M., van Gerven, J.** (2012). An Overview of the CNS-Pharmacodynamic Profiles of Nonselective and Selective GABA Agonists. *Adv. Pharmacol. Sci.* 2012:134523
- Chisari, M., Eisenman, L. N., Covey, D. F., Mennerick, S., Zorumski, C. F.** (2010). The sticky issue of neurosteroids and GABA(A) receptors. *Trends Neurosci.* 33(7):299-306
- Connolly, C. N., Wafford, K. A.** (2004). The Cys-loop superfamily of ligand-gated ion channels: the impact of receptor structure on function. *Biochem. Soc. Trans.* 32(3):529-34
- Cryan, J. F., Sweeney, F. F.** (2011). The age of anxiety: role of animal models of anxiolytic action in drug discovery. *British J. of Pharm.* 164:1129–1161
- Cutting, G. R., Lu, L., O'Hara, B., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R., and Kazazian, H. H.** (1991). Cloning of the GABA[roh]1 cDNA: A novel GABA subunit highly expressed in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:2673-2677
- Czuczwar, S. J., Patsalos, P. N.** (2001). The New Generation of GABA Enhancers: Potential in the Treatment of Epilepsy. *CNS Drugs.* 15(5):339-350
- Dell'osso, B., Lader, M.** (2012). Do benzodiazepines still deserve a major role in the treatment of psychiatric disorders? A critical reappraisal. *European Psychiatry.* doi:10.1016/j.eurpsy.2011.11.003

**Dibbens**, L. M., Feng, H. J., Richards, M. C., Harkin, L. A., Hodgson, B. L., Scott, D., Jenkins, M., Petrou, S., Sutherland, G. R., Scheffer, I. E., Berkovic, S. F., Macdonald, R. L., Mulley, J. C. (2004). GABRD encoding a protein for extra- or peri-synaptic GABAA receptors is a susceptibility locus for generalized epilepsies. *Hum. Mol. Genet.* 13(13):1315-9

**Doble**, A., Martin I. L. (1992). Multiple benzodiazepine receptors: no reason for anxiety. *Trends Pharmacol. Sci.* 13(2):76-81

**van Dort**, C. J., Baghdoyan, H. A. and Lydic, R. (2008). Neurochemical Modulators of Sleep and Anesthetic States. *Int. Anesthesiol. Clin.* 46(3):75-104

**During**, M. J., Ryder, K. M., Spencer, D. D. (1995). Hippocampal GABA transporter function in temporal-lobe epilepsy. *Nature.* 376(6536):174-7

**Fernández-San-Martín**, M. I., Masa-Font, R., Palacios-Soler, L., Sancho-Gómez, P., Calbó-Caldentey, C., Flores-Mateo, G. (2010). Effectiveness of Valerian on insomnia: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Sleep Med.* 11(6):505-11

**File**, S. E. (2001). Factors controlling measures of anxiety and responses to novelty in the mouse. *Behav. Brain Res.* 125(1–2):151–157

**Follesa**, P., Biggio, F., Talani, G., Murru, L., Serra, M., Sanna, E., Biggio, G. (2006). Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence. *Psychopharm.* 186:267-280

**Forman**, S. A. (2011). Clinical and Molecular Pharmacology of Etomidate. *Anaesth.* 114(3): 695-707

**Forman**, S. A., Miller, K. W. (2011). Anesthetic sites and allosteric mechanisms of action on Cys-loop ligand-gated ion channels. *Can. J. Anaesth.* 58(2):191-205

**Foster**, R. G., Wulff, K. (2005). The rhythm of rest and excess. *Nat. Rev. Neurosci.* 6(5):407-14

**Franks**, N. P and Lieb, W. R. (1994). Molecular and cellular mechanisms of general anaesthesia. *Nature* 367:607-614

**Frye**, C. A., Walf, A. A., Rhodes, M. E., Harney, J. P. (2004) Progesterone enhances motor, anxiolytic, analgesic, and antidepressive behavior of wild-type mice, but not those deficient in type 15 aldehyde reductase. *Brain Res.* 1004:116–124

**Gadad**, B. S., Daher, J. P. L., Hutchinson, E. K., Brayton, C. F., Dawson, T. M., Pletnikov, M. V., Watson, J. (2010). Effect of Fenbendazole on Three Behavioral Tests in Male C57BL/6N Mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 49(6): 821-825

**Garret**, M., Bascles, L., Boue-Grabot, E., Sartor, P., Charron, G., Bloch, B., Margolskee, R. F. (1997). An mRNA encoding a putative GABA-gated chloride channel is expressed in the human cardiac conduction system. *J. Neurochem.* 68:1382-1389

**Gasior**, M., Carter, R. B., Witkin, J. M. (1999). Neuroactive steroids: potential therapeutic use in neurological and psychiatric disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* 20(3):107-12

**Glykys**, J., Peng, Z., Chandr, D., Homanics, G. E., Houser, C. R., Mody, I. (2007). A new naturally occurring GABA(A) receptor subunit partnership with high sensitivity to ethanol. *Nat. Neurosci.* 10(1):40-8

- Goetz, T., Arslan, A., Wisden, W., Wulff, P. (2007).** GABA(A) receptor: structure and function in the basal ganglia. *Prog. Brain. Res.* 160:21-41
- Groves, J. O., Guscott, M. R., Hallett, D. J., Rosahl, T. J., Pike, A., Davies, A., Wafford, K. A. Reynolds, D. S. (2006).** The role of GABAA b2 subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. *Europ. J. Neurosci.* 24:167-174
- Gulinello, M., Gong, Q. H., Li, X., Smith, S. S. (2001).** Short-term exposure to a neuroactive steroid increases  $\alpha 4$  GABA<sub>A</sub> receptor subunit levels in association with increased anxiety in the female rat. *Brain Res.* 910:55-66
- Gvilia, I. (2010).** Underlying brain mechanisms that regulate sleep-wakefulness cycles. *Int. Rev. Neurobiol.* 93:1-21
- Hanchar, H.J., Dodson, P.D., Olsen, R. W., Otis, T.S., Wallner, M. (2005).** Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABA(A) receptor activity. *Nat. Neurosci.* 8(3):339-45
- Heberlein, A., Bleich, S., Kornhuber J., Hillemacher T. (2009).** Benzodiazepine Dependence: Causalities and Treatment options. *Fortschr. Neurol. Psychiatr.* 77(1):7-15
- Heinrichs, S. C., De Souza, E. B., Schulteis, G., Lapsansky, J. L., Grigoriadis, D. E. (2002).** Brain penetrance, receptor occupancy and antistress in vivo efficacy of a small molecule corticotropin releasing factor type I receptor selective antagonist. *Neuropsychopharm.* 27(2):194-202
- Hendry, S. H., Schwark, H. D., Jones, E. G., and Yan, J. (1987).** Numbers and proportions of GABA-immunoreactive neurons in different areas of monkey cerebral cortex. *J. Neurosci.* 7:1503-1519
- Hettema, J. M., Neale, M. C., Kendler, K. S (2001).** A Review and Meta-Analysis of the Genetic Epidemiology of Anxiety Disorders. *Future Neurol.* 6(4): 531-571
- Hill, D. R., and Bowery, N. G. (1981).** 3H-baclofen and 3H-GABA bind to bicuculline-insensitive GABAB sites in rat brain. *Nature* 290:149-152
- Hill-Venning, C., Bellelli, D., Peters, J. A. and Lambert, J.J. (1997).** Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the g-aminobutyric acid type A receptor. *British J. Pharmacol.* 120:749-756
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., da Silva, H. M., Smart, T. G. (2006).** Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors through two discrete transmembrane sites. *Nature.* 444(7118):486-9
- Hosie, A. M., Wilkins, M. E., Smart, T. G. (2007).** Neurosteroid binding sites on GABA<sub>A</sub> receptors. *Pharmacology & Therapeutics.* 16(1):7-19
- Hosie, A. M., Clarke, L., da Silva, H., Smart, T. G. (2009).** Conserved site for neurosteroid modulation of GABA A receptors. *Neuropharmacol.* 56(1):149-54
- Huh, J., Goebert, D., Takeshita, J., Lu, B. Y. and Kang, M. (2011).** Treatment of Generalized Anxiety Disorder: A Comprehensive Review of the Literature for Psychopharmacologic Alternatives to Newer Antidepressants and Benzodiazepines. *Prim Care Companion CNS Disord.* 13(2):PCC.08r00709

- Ito, T., Suzuki, T., Wellman, S. E., Ho, I. K. (1996).** Pharmacology of barbiturate tolerance/dependence: GABA<sub>A</sub> receptors and molecular aspects. *Life Sci.* 59(3):169-95
- Jacob, T. C., Moss, S. J., Jurd, R. (2008).** GABA(A) receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition. *Nat. Rev. Neurosci.* 9(5):331-43
- Jacobson-Pick S. et al. (2012).** Stressor exposure of male and female juvenile mice influences later responses to stressors: Modulation of GABAA receptor subunit mRNA expression. *Neuroscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.04.038>
- Jones, K. A., Tamm, J. A., Craig, D. A., Yao, W. J., Panico, R. (2000).** Signal transduction by GABA<sub>B</sub> receptor heterodimers. *Neuropsychopharmacol.* 23:41-49
- Jones-Davis, D. M., and Macdonald, R. L. (2003).** GABA<sub>A</sub> receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:12-18
- Johnston, G. A., (1996).** GABA<sub>C</sub> receptors: relatively simple transmittergated ion channels? *Trends Pharmacol. Sci.* 17:319-323
- Jorgensen, E.M. (2005).** GABA. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.14.1
- Joshi, S., Rajasekaran, K., Kapur J. (2011).** GABAergic transmission in temporal lobe epilepsy: The role of neurosteroids. *Exp. Neurol.* 2011 Nov 4. [Epub ahead of print]
- Jung, M. J., Lippert, B., Metcalf, B. W., Bohlen, P., and Schechter, P. J. (1977).** Gamma-vinyl GABA (4-amino-hex-5-enoic acid), a new selective irreversible inhibitor of GABA-T: Effects on brain GABA metabolism in mice. *J. Neurochem.* 29:797-802
- Kash, S. F., Tecott, L. H., Hodge, C., Baekkeskov, S. (1999).** Increased anxiety and altered responses to anxiolytics in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96(4):1698-703
- Kessler, R. C., Berglund, P., Demler, O., Jin, R., Merikangas, K. R., Walters, E. E. (2005).** Lifetime prevalence and age-of-onset distributions of DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication. *Arch. Gen. Psychiatry.* 62(6):593-602
- Kochubey, O., Lou, X., Schneggenburger, R. (2011).** Regulation of transmitter release by Ca<sup>2+</sup> and synaptotagmin: insights from a large CNS synapse. *Trends in Neurosci.* 34(5):237-246
- Kodish, I., Rockhill, C., Varley, C. (2011).** Pharmacotherapy for anxiety disorders in children and adolescents. *Dial. Clin. Neurosci.* 13(4):439-452
- Koen, N., Stein, D. J. (2011).** Pharmacotherapy of anxiety disorders: a critical review. *Dial. Clin. Neurosci.* 13(4):423-437
- Korpi, E. R., Gründer, G., Lüddens, H. (2002).** Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Prog. Neurobiol.* 67:113-159
- Korpi, E. R., Debus, F., Linden, A.-M., Malecot, C., Leppä, E., Vekovischeva, O., Rabe, H., Böhme, I., Aller, M. I., Wisden, W., Lüddens, H. (2007).** Does ethanol act preferentially via selected brain GABA<sub>A</sub> receptor subtypes? the current evidence is ambiguous. *Alcohol.* 41(3):163-76

**Korte, S. M., De Boer, S. F. (2003).** A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. *Eur. J. Pharmacol.* 463(1-3):163-75

**Kudo, T., Wada, J. A. (1990).** The effect of unilateral claustral lesion on intermittent light stimulation induced seizure in D, L-allylglycine treated cats. *Jpn. J. Psychiatry Neurol.* 44:436-437

**Kumar, S., Porcu, P., Werner, D. F., Matthews, D. M., Diaz-Granados, J. L., Helfand, R. S., Morrow, A. L. (2009).** The role of GABA<sub>A</sub> receptors in the acute and chronic effects of ethanol: a decade of progress. *Psychopharmacol.* 205:529-564

**Kurata, Y., Marszalec, W., Hamilton, B. J., Carter, D. B., Narahashi, T. (1993).** Alcohol modulation of cloned GABA<sub>A</sub> receptor-channel complex expressed in human kidney cell lines. *Brain Res.* 631(1):143-6

**Lalive, A. L., Rudolph, U., Lüscher, C., Tan, K. T. (2011).** Is there a way to curb benzodiazepine addiction? *Swiss Med. Wkly.* 141:w13277

**Li, G., Chiara, D. C., Cohen, J. B., Olsen, R. W. (2009).** Neurosteroids Allosterically Modulate Binding of the Anesthetic Etomidate to  $\gamma$ -Aminobutyric Acid Type A Receptors. *Journ. Biol. Chem.* 284:11771-11775

**López-Muñoz, F., Ucha-Udabe, R., Alamo, C. (2005).** The history of barbiturates a century after their clinical introduction. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 1(4):329-43

**Lundgren, P., Strömberg, J., Bäckström, T., Wang, M. (2003).** Allopregnanolone-stimulated GABA-mediated chloride ion flux is inhibited by 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -pregnan-20-one (isoallopregnanolone). *Brain Res.* 982(1):45-53

**Luscher, B., Fuchs, T., Kilpatrick, C. L. (2011).** GABA<sub>A</sub> receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron.* 70(3):385-409

**Luszczki, J. J., Ratnaraj, N., Patsalos, P. N., Czuczwar, S. J. (2005).** Pharmacodynamic and pharmacokinetic interaction studies of loreclezole with felbamate, lamotrigine, topiramate, and oxcarbazepine in the mouse maximal electroshock seizure model. *Epilepsia.* 46(3):344-55

**Macdonald, R. L. und Olsen, R. W. (1994).** GABA<sub>A</sub> receptor channels. *Annu. Rev. Neurosci.* 17:569-602

**McKernan, R. M., Rosahl, T. W., Reynolds, D. S., Sur, C., Wafford, K. A., Atack, J. R., Farrar, S., Myers, J., Cook, G., Ferris, P., Garrett, L., Bristow, L., Marshall, G., Macaulay, A., Brown, N., Howell, O., Moore, K. W., Carling, R. W., Street, L. J., Castro, J. L., Ragan, C. I., Dawson, G. R. and Whiting, P. J. (2000).** Sedative but not anxiolytic properties of benzodiazepines are mediated by the GABA<sub>A</sub> receptor  $\alpha$ 1 subtype. *Nature Neurosci.* 3(6):587-592

**Melcangi, R. C., Panzica, G. and Garcia-Segura, L. M. (2011).** Neuroactive Steroids: Focus on human brain. *Neurosci.* 191:1–5

**Meldrun, B. S., Menini, C., Naquet, R., Laurent, H., and Stutzmann, J.M. (1979).** Proconvulsant, convulsant and other actions of the D- and L-stereoisomers of allylglycine in the photosensitive baboon, *Papio papio*. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 47:383-395

**Mehta, A. K., Ticku, M. K. (1999).** An update on GABA receptors A. *Brain Res. Rev.* 29:196–217



- Morin, C. M., LeBlanc, M., Daley, M., Gregoire, J. P., Merette, C. (2006).** Epidemiology of insomnia: Prevalence, self-help treatments, consultations, and determinants of help-seeking behaviors. *Sleep Med.* 7:123-130
- Morin, C. M., Benca, R. (2012).** Chronic insomnia. *Lancet* 379:1129-41
- Mtchedlishvili, Z., Bertram, E. H., Kapur, J. (2001).** Diminished allopregnanolone enhancement of GABAA receptor currents in a rat model of chronic temporal lobe epilepsy. *J. Physiol.* 537(2):453-465
- Newell, J. G. and Czajkowski, C. (2003).** The GABA<sub>A</sub> Receptor 1 Subunit Pro174–Asp191 Segment is involved in GABA Binding and Channel Gating. *J. Biol. Chem.* 278(15):13166–13172
- Nusser, Z., Hájos, N., Somogyi, P., Mody, I. (1998).** Increased number of synaptic GABA(A) receptors underlies potentiation at hippocampal inhibitory synapses. *Nature* 395(6698):172-177
- Oakley, S., Vedula, S. L., Bu, W., Meng, Q. C., Xi, J., Liu, R., Eckenhoff R. G., Loll, P. J. (2012).** Recognition of Anesthetic Barbiturates by a Protein Binding Site: A High Resolution Structural Analysis. *PLoS One.* 7(2):e32070
- Ohayon, M. M. (2002).** Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. *Sleep Med. Rev.* 6(2):97-111
- Olsen, R. W., Sieghart, W. (2008).** 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(3):243-60
- Olsen, R. W., Li, G. D. (2011).** GABA(A) receptors as molecular targets of general anesthetics: identification of binding sites provides clues to allosteric modulation. *Can. J. Anaesth.* 58(2):206-15
- Otis, T. S. (2008).** Comments on "Ethanol sensitivity of GABAergic currents in cerebellar granule neurons is not increased by a single amino acid change (R100Q) in the alpha6 GABA(A) receptor subunit". *J. Pharmacol. Exp Ther.* 324(1):399-400; author reply 401-3.
- Padgett, C. L., Hanek, A. P., Lester, H. A., Dougherty, D. A., and Lummis, S. C. R. (2007).** Unnatural Amino Acid Mutagenesis of the GABA<sub>A</sub> Receptor Binding Site Residues Reveals a Novel Cation- $\pi$  Interaction between GABA and  $\beta$ 2Tyr97. *J. Neurosci.* 27(4):886-892
- Pavlov, I., Walker, M. C. (2012).** Tonic GABA<sub>A</sub> receptor mediated signalling in temporal lobe epilepsy. *Neuropharmacol.* doi:10.1016/j.neuropharm.2012.04.003
- Pearson, N. J., Johnson, L. L., Nahin, R. L. (2006).** Insomnia, trouble sleeping, and complementary and alternative medicine: analysis of the 2002 national health interview survey data. *Arch. Intern. Med.* 166:1775-82
- Pesold, C., Caruncho, H. J., Impagnatiello, F., Berg, M. J., Fritschy, J. M., Guidotti, A., Costa, E. (1997).** Tolerance to diazepam and changes in GABA(A) receptor subunit expression in rat neocortical areas. *Neurosci.* 79(2):477-87
- Piqueras, L., Martinez, V. (2004).** Peripheral GABA<sub>B</sub> agonists stimulate gastric acid secretion in mice. *Br. J. Pharmacol.* 142:1038-1048
- Prajapati, P., Sheikh, M. I., Brahmabhatt, J. (2009).** Barbiturate overdose: a case report. *J. Indian Med. Assoc.* 107(12):897-900
- Pym, L. J., Cook, S. M., Rosahl, T., McKernan, R. M., Atack, J. R. (2005).** Selective labelling of diazepam-insensitive GABAA receptors in vivo using [3H]Ro 15-4513. *Br. J. Pharmacol.* 146(6):817-25.

**Qume, M., and Fowler, L. J.** (1997). Effect of chronic treatment with the GABA transaminase inhibitors gamma-vinyl GABA and ethanolamine O-sulphate on the in vitro GABA release from rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 122:539-545

**Raj, D., Gulati, S., Lodha, R.** (2011). Status epilepticus. *Indian J. Pediatr.* 78(2):219-26

**Rang, H. P., Dale, M. M.** (2007). *Rang & Dale's pharmacology*. Elsevier Ltd, Oxford; Auflage: 6th ed.

**Reddy, D. S., Kulkarni, S. K.** (1997). Differential anxiolytic effects of neurosteroids in the mirrored chamber behavior test in mice. *Brain Res.* 752(1-2):61-71

**Reddy, D. S.** (2011). Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front Endocrinol. (Lausanne)* 2:38. Epub 2011 Oct 5.

**Richardson, G. S., Roehrs, T. A., Rosenthal, L., Koshorek, G., Roth, T.** (2002). Tolerance to daytime sedative effects of H1 antihistamines. *J. Clin. Psychopharmacol.* 22(5):511-5

**Richter, L., de Graaf, C., Sieghart, W., Varagic, Z., Mörzinger, M., de Esch, I. J. P., Ecker, G. F., Ernst, M.** (2012). Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nature Chem. Biol.* 8:455-464

**van Rijnsoever, C. et al.** (2004). Requirement of  $\alpha 5$ -GABA<sub>A</sub> receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *J. Neurosci.* 24, 6785-6790

**Roberts, E., Frankel, S.** (1950). Gamma-aminobutyric acid in brain: Its formation from glutamic acid. *J. Biol. Chem.* 187:55-63

**Rodrigues, S. M., LeDoux, J. E., Sapolsky, R. M.** (2009). The Influence of Stress Hormones on Fear Circuitry. *Annu. Rev. Neurosci.* 32:289-313

**Roth, F. C., Draguhn, A.** (2012). GABA Metabolism and Transport: Effects on Synaptic Efficacy. *Neural. Plast.* 2012:805830. Epub 2012 Feb 23

**Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J. A., Fritschy, J. M., Martin, J. R., Bluethmann, H., Möhler, H.** (1999). Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature.* 401(6755):796-800

**Rudolph, U., Knoflach, F.** (2011). Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABA<sub>A</sub> receptor subtypes. *Nature* 10:685-697

**Rupprecht, R.** (2002). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological properties. *Psychoneuroendocrin.* 28(2):139-168

**Rupprecht, R., Holsboer, F.** (1999). Neuroactive steroids: mechanisms of action and neuropsychopharmacological perspectives. *Trends Neurosci.* 22:410-416

**Rüsch, D., Zhong, H., Forman, S. A.** (2004). Gating Allosterism at a Single Class of Etomidate Sites on  $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$  GABA<sub>A</sub> Receptors Accounts for Both Direct Activation and Agonist Modulation. *Jorn. Biol. Chem.* 279(20):20982-20992

**Sakurai, T.** (2007). The neural circuit of orexin (hypocretin): maintaining sleep and wakefulness. *Nature Rev. Neurosci.* 8:171-181

- Salter S, Brownie S. (2010).** Treating primary insomnia - the efficacy of valerian and hops. *Aust. Fam. Physician.* 39(6):433-7
- Saper, C. B., Scammell, T. E., Lu, J. (2005).** Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature* 437(27) doi:10.1038/nature04284
- Sartori, S. B., Landgraf, R., Singewald, N. (2011).** The clinical implications of mouse models of enhanced anxiety. *Future Neurol.* 6(4):531-571
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, N., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A. (1987).** Sequence and functional expression of the GABA<sub>A</sub> receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature* 328:221-227
- Schüle, C., Eser, D., Baghai, T. C., Nothdurfter, C., Kessler, J. S., Rupprecht, R. (2011).** Neuroactive steroids in affective disorders: target for novel antidepressant or anxiolytic drugs? *Neurosci.* 191:55-77
- Schuler, V., Luscher, C., Blanchet, C., Klix, N., Sansig, G., Klebs, K., Schmutz, M., Heid, J., Gentry, C., Urban, L., Fox, A., Spooren, W., Jatou, A. L., Vigouret, J., Pozza, M., Kelly, P. H., Mosbacher, J., Froestl, W., Kaslin, E., Korn, R., Bischoff, S., Kaupmann, K., van der Putten, H., and Bettler, B. (2001).** Epilepsy, hyperalgesia, impaired memory, and loss of pre- and postsynaptic GABA<sub>B(1)</sub> responses in mice lacking GABA<sub>B(1)</sub>. *Neuron.* 31:47-58
- Schuske, K., Beg, A. A., Jorgensen, E.M. (2004).** The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci.* 27:407-414
- Shen, H., Gong, Q. H., Aoki, C., Yuan, M., Ruderman, Y., Dattilo, M., Williams, K., Smith, S.S. (2007).** Reversal of neurosteroid effects at alpha4 beta2 delta GABA<sub>A</sub> receptors triggers anxiety at puberty. *Nat. Neurosci.* 10:469-477
- Sherif, F., Harro, J., El-Hwuegi, A., and Orelund, L. (1994a).** Anxiolytic-like effect of the GABA-transaminase inhibitor vigabatrin (gamma-vinyl GABA) on rat exploratory activity. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 49:801-805
- Sherif, F., Wahlstrom, G., and Orelund, L. (1994b).** Increase in the brain GABA-transaminase activity after chronic ethanol treatment in rats. *J. Neural. Transm. Gen. Sect.* 98:69-79
- Shin, L. M. and Liberzon, I. (2010).** The Neurocircuitry of Fear, Stress, and Anxiety Disorders. *Neuropsychopharmacol.* 35(1):169-191
- Sieghart, W. (1994).** Pharmacology of Benzodiazepine receptors: An update. *J. Psychiatr. Neurosci.* 19(1):24-29
- Sieghart, W., Ramerstorfer, J., Sarto-Jackson, I., Varagic, Z., Ernst, M. (2012).** A novel GABA(A) receptor pharmacology: drugs interacting with the alpha(+) beta(-) interface. *Br. J. Pharmacol.* 166(2):476-85
- Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Möhler, H., Malherbe, P. (1990).** The effect of subunit composition of rat brain GABA<sub>A</sub> receptors on channel function. *Neuron.* 5:703-711
- Sigel, E., Baur, R., Kellenberger, S., Malherbe, P. (1992).** Point mutations affecting antagonist affinity and agonist depending gating of GABA<sub>A</sub> receptor channels. *EMBO J.* 11:2017-2023
- Sigel, E., Baur, R., Malherbe, P. (1993).** Recombinant GABA<sub>A</sub> receptor function and ethanol. *FEBS Lett.* 324(2):140-2

- Sills, G. J.** (2003). Pre-clinical studies with the GABAergic compounds vigabatrin and tiagabin. *Epileptic disord.* 5:51-56
- Sivilotti, L., Nistri, A.** (1991). GABA receptor mechanisms in the central nervous system. *Prog. Neurobiol.* 36:35-62
- Smith, M. C., Riskin, B. J.** (1991). The clinical use of barbiturates in neurological disorders. *Drugs* 42:365-378
- Smith, G. B., Olsen, R. W.** (1995). Functional domains of GABA<sub>A</sub> receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 16:162-168
- Smith, K. S. et al.** (2012). Benzodiazepine-induced anxiolysis and reduction of conditioned fear are mediated by distinct GABA<sub>A</sub> receptor subtypes in mice. *Neuropharmacol.* doi:10.1016/j.neuropharm.2012.03.001
- Suzdak, P. D., Jansen, J. A.** (1995). A review of the preclinical pharmacology of tiagabine: a potent and selective anticonvulsant GABA uptake inhibitor. *Epilepsia* 36(6):612-26
- Tan, K. R., Brown, M., Labouèbe, G., Yvon, C., Creton, C., Fritschy, J. M., Rudolph, U., Lüscher, C.** (2010). Neural bases for addictive properties benzodiazepines. *Nature* 463:769-774
- Tasan, R. O., Bukovac, A., Peterschmitt, Y. N., Sartori, S. B., Landgraf, R., Singewald, N., and Sperk, G.** (2011). Altered GABA transmission in a mouse model of increased trait anxiety. *Neurosci.* 183(7):71-80
- Thomet, U., Baur, R., Dodd, R. H., Sigel, E.** (2000). Loreclezole as a simple functional marker for homomeric rho type GABAC receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 408(2):R1-2
- Thompson, S. A., Whiting, P. J., Wafford, K. A.** (1996). Barbiturate interactions at the human GABA<sub>A</sub> receptor: dependence on receptor subunit combination. *Br. J. Pharmacol.* 117:521-527
- Tian, N., Petersen, C., Kash, S., Baekkeskov, S., Copenhagen, D., and Nicoll, R.** (1999). The role of the synthetic enzyme GAD65 in the control of neuronal gamma aminobutyric acid release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:12911-12916
- Treiman, D. M.** (2001). GABAergic Mechanisms in Epilepsy. *Epilepsia*, 42(3):8-12,
- Tucker, W. C., Chapman, E. R.** (2002). Role of synaptotagmin in Ca<sup>2+</sup>-triggered exocytosis. *Biochem. J.* 366:1-13
- Ulloor, J., Mavanji, V., Saha, S., Siwek, D., F., Datta, S.** (2004). Spontaneous REM sleep is modulated by the activation of the pedunculopontine tegmental GABA<sub>B</sub> receptors in the freely moving rat. *J. Neurophysiol.* 9:1822-1831
- Uusi-Oukari, M., Korpi E. S.** (2010). Regulation of GABA<sub>A</sub> Receptor Subunit Expression by Pharmacological Agents. *Pharmacol. Rev.* 62:97-135
- Vinkers, C. H., Olivier, B.** (2012). Mechanisms Underlying Tolerance after Long-Term Benzodiazepine Use: A Future for Subtype-Selective GABA<sub>A</sub> Receptor Modulators? *Adv. Pharmacol. Sci.* Article ID 416864
- Volz, H.P.** (2001). Phytochemicals as means to induce sleep. *Z. Arztl. Fortbild. Qualitatssich.* 95(1):33-4
- Wafford, K. A., Whiting, P. J.** (1992). Ethanol potentiation of GABA<sub>A</sub> receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the gamma 2 subunit. *FEBS Lett.* 313(2):113-7

**Wafford, K. A.** (2005). GABA<sub>A</sub> receptor subtypes: any clues to the mechanism of benzodiazepine dependence? *Curr. Opin. Pharmacol.* 5(1):47-52

**Walf, A. A., Frye, C. A.** (2007). The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat. Protoc.* 2(2):322-8

**Wallner, M., Olsen, R. W.** (2008). Physiology and pharmacology of alcohol: the imidazobenzodiazepine alcohol antagonist site on subtypes of GABAA receptors as an opportunity for drug development? *Br. J. Pharmacol.* 154(2):288-98. Epub 2008 Feb 18.

**Wang, M.** (2011). Neurosteroids and GABAA-Receptor function. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 2(44):1-23

**Wheatley, D.** (2005). Medicinal plants for insomnia: a review of their pharmacology, efficacy and tolerability. *J. Psychopharmacol.* 19(4):414-21

**Wieland, H. A., Lüddens, H., Seeburg, P. H.** (1992). A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J. Biol. Chem.* 267(3):1426-9

**Wingrove, P. B., Wafford, K. A., Bain, C., Whiting, P. J.** (1994). 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. USA.* 91(10):4569-4573

**Yang, Z., Cromer, B. A., Harvey, R. J., Parker, M. W., Lynch, J. W.** (2007). A proposed structural basis for picrotoxinin and picrotin binding in the glycine receptor pore. *J. Neurochem.* 103(2):580-9



# 11 Lebenslauf

<b>Name</b>	Denise Luger	
<b>Adresse</b>	Max-Winter Platz 9/12 1020 Wien	
<b>Geburtsdatum</b>	06. 09. 1985	
<b>Gerburtsort</b>	3240 Mank	
<b>Nationalität</b>	Österreich	
<b>Ausbildung</b>	2005 - 2012	Studium der Pharmazie Universität Wien
	2004 - 2005	Studium der Technischen Mathematik Technische Universität Wien
	06/2004	Reifeprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg
	1996 - 2004	Gymnasium der Englischen Fräulein, 3100 St. Pölten
	1993 - 1996	Daniel Gran Volksschule, 3100 St. Pölten
	1993 - 1992	Volksschule Kirnberg, 3241 Kirnberg/Mank
<b>Ausbildungsrelevante Berufserfahrung</b>	seit 06/2011	beschäftigt bei Allerheiligen-Apotheke Herbert Baldia KG, 1200 Wien
<b>Sprachkenntnisse</b>	Englisch	fließend
	Französisch	Grundkenntnisse
	Latein	Grundkenntnisse