



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchungen zur Wirkung von pflanzlichen Extrakten und eines ausgewählten Naturstoffes auf GABA_A Rezeptoren

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Maria Novak
Matrikel-Nummer:	0204776
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	A474/Ernährungswissenschaften
Betreuerin:	(ao.) Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Wien, März 2010

Inhaltsverzeichnis

1.	DANKSAGUNG.....	III
2.	ZUSAMMENFASSUNG.....	1
2.1.	Zusammenfassung.....	1
2.2	Abstract.....	2
3.	EINLEITUNG.....	3
3.1	Ruhe- und Aktionspotential.....	3
3.2	Synaptische Neurotransmission.....	4
3.2.1	Exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP).....	6
3.2.2	Inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP).....	6
3.2.3	Präsynaptischer feedback Mechanismus.....	6
3.3	GABA.....	7
3.4	Klassifizierung von GABA aktivierten Rezeptoren:.....	7
3.4.1	GABA _A Rezeptor.....	8
3.4.2	GABA _B Rezeptor.....	10
3.4.3	GABA _C Rezeptor.....	11
3.5	GABA-Bindungsstelle.....	13
3.6	Gating.....	12
3.7	Modulatoren an GABA _A Rezeptoren.....	15
3.7.1	Benzodiazepine.....	15
3.7.2	Barbiturate.....	19
3.7.3	Neurosteroide.....	20
3.7.4	Anästhetika.....	22
3.7.5	Ethanol.....	23
3.7.6	Loreclezol.....	25
3.7.7	Kationen.....	25

3.7.8	Naturstoffe als Modulatoren von GABA _A Rezeptoren.....	27
3.8	Physiologische Rolle der Rezeptoren	29
3.8.1	Angststörungen	29
3.8.2	Epilepsie.....	31
3.8.3	Schlafstörungen.....	32
3.8.4	Schizophrenie.....	34
4.	PROBLEMSTELLUNG.....	36
5.	METHODEN.....	37
5.1	Oozytenpräparation.....	37
5.2	cRNA-Vorbereitung.....	38
5.3	Injektion von cRNA	39
5.4	Arbeitsablauf zur Herstellung von Messlösungen	39
5.5	2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.....	40
5.6	Perfusionssystem.....	41
6.	ERGEBNISSE.....	42
6.1.	Erstellung von GABA-Dosis-Wirkungskurven	42
6.2	Modulation von I _{GABA} durch 13 Pflanzenextrakte	43
6.3	Modulation von α ₁ β ₂ γ _{2S} Rezeptoren durch einen Naturstoff (ZFP).....	46
6.4	Untersuchung des Effektes von ZFP an α ₁ β ₁ Rezeptoren.....	48
7.	DISKUSSION.....	49
8.	QUELLENVERZEICHNIS.....	51
9.	LEBENS LAUF.....	64

1. DANKSAGUNG

Herrn Univ. Prof. Dr. Steffen Hering und Frau (ao.) Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber danke ich zuallererst für die Bereitstellung des Themas, die hervorragende Betreuung und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Sophia Khom bedanken, für die vielen motivierenden Gespräche, für ihre große Hilfsbereitschaft und die viele Zeit, die sie für mich aufopferte.

Des Weiteren danke ich Dr. Igor Baburin, der mich stets geduldig unterstützt hat und mir eine große Hilfe bei technischen Problemen aller Art war.

Vielen Dank auch an Dr. Annette Hohaus und Mag. Christine Weisz für die Herstellung der cRNA.

Ebenso möchte ich mich bei meiner Studienkollegin Simone Christlbauer für die gute Zusammenarbeit und den regelmäßigen Informationsaustausch bedanken.

Bedanken möchte ich mich zudem bei meinen Kollegen vom Department für Pharmakologie und Toxikologie, meinen Freunden und Studienkollegen.

Schlussendlich bedanke ich mich bei meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums. Ihre liebevolle und große Unterstützung haben entscheidend zur Entstehung dieser Diplomarbeit beigetragen.

Für meine Eltern

2. ZUSAMMENFASSUNG

2.1. Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS). GABA_A Rezeptoren sind Chlorid-Ionenkanäle, die aus 5 Proteinuntereinheiten bestehen (Heteropentamer). Der größte Teil aller GABA_A Rezeptoren des ZNS setzt sich aus $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Untereinheiten zusammen. Bindung von GABA an den Rezeptor führt zu Membran-Hyperpolarisation und dadurch zu verminderter neuronaler Erregbarkeit. GABA_A Rezeptoren sind molekularer Angriffspunkt für verschiedene klinisch relevante Pharmaka (wie beispielsweise den Benzodiazepinen, Barbituraten und Anästhetika). Zudem können auch einige Naturstoffe als Modulatoren von GABA_A Rezeptoren fungieren.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde die Wirkung von 13 Pflanzenextrakten auf GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}) durch GABA_A Rezeptoren untersucht. Es wurden $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ GABA_A Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} mithilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Kein Extrakt potenzierte GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}) durch $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Rezeptoren. 3 Extrakte führten zu einer signifikanten Reduktion von I_{GABA} . Die restlichen Extrakte zeigten entweder keinen oder einen schwach inhibierenden Effekt.

Des Weiteren wurde die Reinsubstanz ZFP zuerst an $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Rezeptoren untersucht. Es zeigte sich eine positive, konzentrationsabhängige Modulation von I_{GABA} (maximale Stimulation von $I_{GABA} = 629,8 \pm 104,5$ %; $EC_{50} = 12,2 \pm 3,2$ μ M). ZFP zeigte eine deutlich reduzierte Stimulation an Rezeptoren, die nur aus $\alpha_1\beta_2$ Untereinheiten bestanden (maximale Stimulation von $I_{GABA} = 318,4 \pm 35,0$ %; $EC_{50} = 9,9 \pm 2,7$ μ M). Der schwächste Effekt wurde an $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren beobachtet (maximale Stimulation von $I_{GABA} = 113,3 \pm 70,5$ %). Die EC_{50} lag bei $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren bei $9,4 \pm 7,8$ μ M.

Daher kann zusammenfassend gesagt werden, dass ein neuer Ligand von GABA_A Rezeptoren identifiziert wurde, dessen Modulation sowohl von γ , als auch von $\beta_{2/3}$ Untereinheiten abhängt.

2.2 Abstract

γ -aminobutyric acid (GABA) is the major inhibitory neurotransmitter in the mammalian central nervous system (CNS). GABA_A receptors belong to the family of ligand-gated ion channels. GABA_A receptors are composed of 5 subunits (heteromeric pentamers). The majority of GABA_A receptors in the CNS consists of $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ subunits. Binding of GABA to the receptor causes a membrane-hyperpolarization which results in decreased neuronal excitability. GABA_A receptors are the molecular target for several clinically relevant drugs (such as benzodiazepines, barbiturates and anaesthetics). Furthermore, some natural products have been shown to enhance GABAergic neurotransmission.

During my diploma thesis, the modulation of GABA-induced chloride currents (I_{GABA}) by 13 plant extracts was analysed by means of the two-microelectrode voltage-clamp-technique. For this purpose, GABA_A receptors composed of $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ subunits were expressed in *Xenopus* oocytes.

None of the extracts potentiated I_{GABA} through $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ receptors. 3 extracts significantly reduced I_{GABA} . The other extracts did not show any effect or only a slight inhibitory effect.

Furthermore the effect of compound ZFP on GABA_A was analysed. First, the modulation of I_{GABA} through $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ receptors was studied. ZFP dose-dependently modulated I_{GABA} with a maximal enhancement of $629,8 \pm 104,5$ %. The EC_{50} on $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ receptors was $12,2 \pm 3,2$ μ M.

ZFP showed a significantly reduced stimulation on $\alpha_1\beta_2$ receptors (maximal potentiation of $I_{GABA} = 318,4 \pm 35,0$ %; $EC_{50} = 9,9 \pm 2,7$ μ M).

The weakest effect was observed for $\alpha_1\beta_1$ receptors (maximal potentiation of $I_{GABA} = 113,3 \pm 70,5$ %). In this case, the EC_{50} was $9,4 \pm 7,8$ μ M.

Taken together, a new GABA_A receptor ligand was identified, whose modulation depends on both γ and $\beta_{2/3}$ subunits.

3. EINLEITUNG

Unter Erregbarkeit versteht man die Fähigkeit bestimmter Zellen auf einen physikalischen oder chemischen Reiz mit einer spezifischen Reaktion (= Erregung) zu reagieren, sie fortzuleiten und somit Organfunktionen zu steuern (Mutschler et al., 2008).

3.1 Ruhe- und Aktionspotential

Erregungsentstehung und Erregungsfortleitung beruhen auf ionalen Prozessen, die sich an der Zellmembran abspielen. Die Lipid-Proteinmembran stellt eine osmotische Barriere zwischen dem intra- und extrazellulären Raum dar. Durch unterschiedliche Ladungsverteilung wird an der Membran ein Potenzial aufgebaut.

Bedingt durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen kommt es zu einer Negativität des Zellinneren gegenüber der Umgebung. Beim Ruhepotential weist die Membran ein negatives Potential von -60 bis -100mV auf. Zur Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials dient die Na^+/K^+ -ATPase.

K^+ -Ionen haben aufgrund der Konzentrationsdifferenz das Bestreben durch offene Kaliumkanäle nach außen zu diffundieren. Gegenionen hingegen, wie die Protein-Anionen, können die Membran nicht passieren. Durch den Ausstrom einiger positiver Ladungen wird ein elektrisches Membranpotential aufgebaut. Dieses verhindert eine weitere K^+ -Abdiffusion. Keinen Einfluss auf das Ruhepotential haben hingegen Na^+ -Ionen. Für sie ist die nicht erregte Membran impermeabel. Infolgedessen kann man das Ruhemembranpotential auch als K^+ -Diffusionspotential bezeichnen.

Kommt es nun zu einer Depolarisation, d.h. das Membranpotential wird durch chemische oder physikalische Reize zu positiveren Werten verändert, und wird dabei eine bestimmte Schwelle überschritten, nimmt es rasch weiter ab. Dadurch kommt es zwischendurch zu einer Ladungsverschiebung und das Nerveninnere wird gegenüber dem Nervenäußeren positiv geladen. Darauf folgt die Repolarisation, wobei das

ursprüngliche Membranpotential wieder aufgebaut wird. Diese Vorgänge bezeichnet man als Aktionspotential, das auf einer plötzlichen Veränderung der Membraneigenschaften beruht: Natriumionen können passiv, durch Öffnung der Natriumkanäle der Membran, in das Axoplasma einströmen. Dadurch kommt es zur Umkehr der Polarisation. Das Ruhepotential stellt sich durch eine rasche Abnahme der Natrium-Permeabilität und durch einen langsamen Anstieg der Kalium-Permeabilität wieder ein (Mutschler et al., 2008).

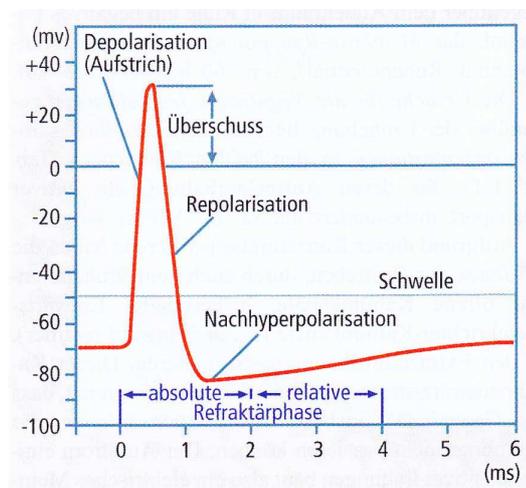


Abb.1: Ablauf eines Aktionspotentials (Mutschler et al., 2008).

3.2 Synaptische Neurotransmission

Unter einer Synapse versteht man den Ort, an dem die Erregungsübertragung von einem Axon auf eine Zelle stattfindet. Sie besitzt neben einer Ventilfunktion, einer Lern- und Gedächtnisfunktion, auch eine Bahnungs- und Hemmungsfunktion.

Man unterscheidet mehrere Synapsenarten:

1. Unterscheidung nach der Lage der Synapsen:

- Axo-somatische Synapsen: verbinden das Ende einer Nervenfasern mit einem Zellkörper
- Axo-dendritische Synapsen: Ende ist mit soma-nahem Anteil des Dendriten verbunden
- Axo-axonische Synapsen: Endigung am Neuritenende

2. Unterscheidung nach der Funktion:

- Erregende Synapse (exzitatorisch): fördert die Auslösung eines Aktionspotentials
- Hemmende Synapse (inhibitorisch): wirkt der Auslösung eines Aktionspotentials entgegen

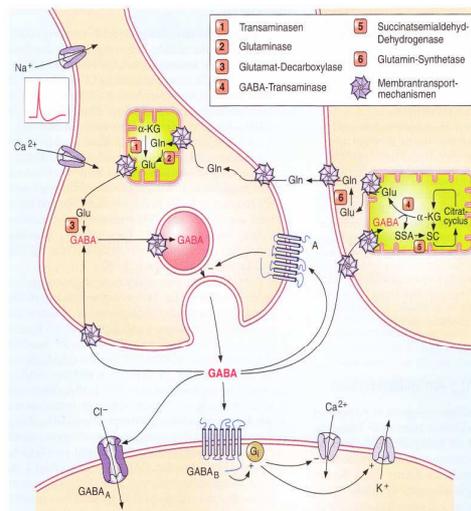


Abb. 2 Aufbau einer Synapse (Aktories et al., 2005)

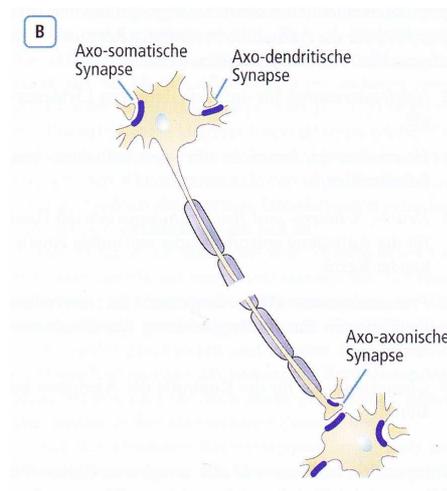


Abb. 3: Klassifikation von Synapsen aufgrund ihrer Lokalisation (Mutschler et al., 2008)

3.2.1 Exzitatorisches postsynaptisches Potential (EPSP)

Sobald eine über das Axon geleitete Erregung an die präsynaptische Endigung gelangt, kommt es zur Freisetzung eines Transmitters aus den Vesikeln. Die freigesetzte Überträgersubstanz diffundiert durch den synaptischen Spalt zur postsynaptischen Membran. Dort reagiert sie mit Rezeptoren, es kommt zur Depolarisation der postsynaptischen Membran. Diesen Vorgang bezeichnet man als exzitatorisches postsynaptisches Potential.

3.2.2 Inhibitorisches postsynaptisches Potential (IPSP)

Darunter versteht man eine dem EPSP entgegengesetzte Änderung des Membranpotentials. Es kommt zu einer Hyperpolarisation, einer kurzzeitigen Erhöhung des Membranpotentials durch den freigesetzten Neurotransmitter. Der Transmitter erhöht die K^+ - und Cl^- -Permeabilität - somit wird v. a. durch einen verstärkten Cl^- -Einstrom das IPSP erzeugt.

3.2.3 Präsynaptischer feedback Mechanismus

Rezeptoren für Neurotransmitter kommen sowohl an der postsynaptischen, als auch an der präsynaptischen Membran vor. Man unterscheidet bei präsynaptischen Rezeptoren zwischen Autorezeptoren, an denen die an der entsprechenden Synapse freigesetzten Transmitter angreifen und Heterorezeptoren, die von anderen Neurotransmittern erregt werden. Die Autorezeptoren-Erregung führt dann entweder zu einer Hemmung oder zu einer Steigerung der Neurotransmitter-Freisetzung. Je nachdem spricht man von einem negativen oder positiven Feedback. Eine Heterorezeptoren-Erregung führt ebenfalls je nach Rezeptortyp zu einer Hemmung oder Steigerung der Neurotransmitter-Freisetzung.

3.3 GABA

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) der Säugetiere (Sieghart, 1995; Baur et al., 2005; Sieghart, 2006; Möhler, 2006; Enna und McCarson, 2006). Sie wird aus Glutamat unter Katalyse der Glutamat-Decarboxylase (GAD) synthetisiert. Die Glutamat-Decarboxylase wird im ZNS in GABAergen Neuronen exprimiert (Erlander et al., 1991; Owens und Kriegstein, 2002; Enna und McCarson, 2006).

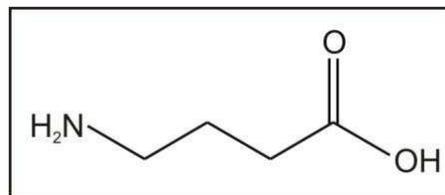


Abb. 4: GABA

Wird das GABAerge System beispielsweise durch Blockade der GABA-Synthese unterdrückt, kann es zu Krampfanfällen kommen (Forth et al., 2001). Daneben spielt GABA auch eine wichtige Rolle bei der Proliferation, Migration, Differenzierung, Synapsenreifung und Apoptose (Gascon et al., 2007). Der Gegenspieler des hemmenden Transmitters GABA ist der erregende Transmitter Glutamat (Forth et al., 2001).

3.4 Klassifizierung von GABA aktivierten Rezeptoren:

1) Einteilung in ionotrope und metabotrope Rezeptoren:

Ionotrope Rezeptoren: GABA_A und GABA_C

Metabotrope Rezeptoren: GABA_B (Bormann, 2000)

2) Einteilung nach pharmakologischen Gesichtspunkten:
 aufgrund der Sensitivität hinsichtlich Bicucullin und Baclofen
 (Johnston, 1996; Mutschler et al., 2008)

	GABA _A	GABA _B	GABA _C
Bicucullin	Kompetitiver Antagonist/sensitiv	Inaktiv/insensitiv	Inaktiv/insensitiv
Baclofen	Inaktiv/insensitiv	Agonist/sensitiv	Inaktiv/insensitiv

Tabelle 1: Einteilung aufgrund der Sensitivität hinsichtlich Bicucullin und Baclofen (Mutschler et al., 2008)

3.4.1 GABA_A Rezeptor

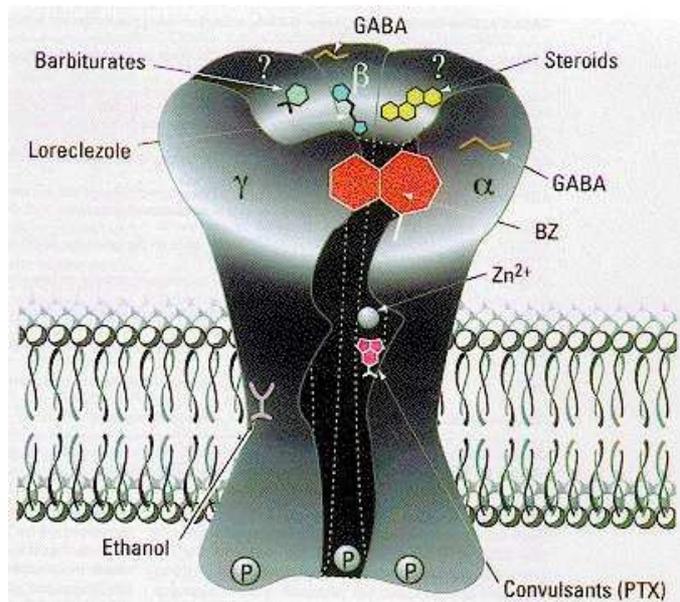


Abb. 5: zeigt den schematischen Aufbau eines GABA_A Rezeptors (<http://huguenard-lab.stanford.edu/beta3/gaba.jpg>; 20.10.09)

GABA_A Rezeptoren gehören zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle wie auch nikotinische Acetylcholin-, Glycin- oder Serotonin Subtyp 3 (5-HT₃) Rezeptoren (Olsen und Sieghart, 2008). Sie sind im ZNS ubiquitär verteilt. Dies weist darauf hin, dass sie bei der Kontrolle der Erregbarkeit des ZNS eine entscheidende Rolle spielen. Neben der Modulation von Angstzuständen sind sie auch an der Modulation des Ess- und Trinkverhaltens beteiligt. Zudem wird ein Zusammenhang zwischen dem GABA_A Rezeptor und dem Denk- und Erinnerungsvermögen diskutiert (Sieghart und Sperk, 2002; Bannai et al., 2009). GABA_A Rezeptoren sind von großer pharmakologischer Bedeutung, da über sie viele psychoaktive Substanzen wirken (Hevers und Lüddens, 1998; Sieghart und Sperk; 2002). Sie werden durch GABA, Isoguvacin und Muscimol stimuliert und durch Bicucullin und Picrotoxin blockiert (Sieghart, 1995; Barnard et al., 1998; Olsen und Sieghart, 2008). Neuropsychiatrische Erkrankungen wie Angststörungen, Schlaflosigkeit und Epilepsie gehen mit einer Dysfunktion des GABAergen Systems einher, worauf im Kapitel 3.6. noch näher eingegangen wird (Hevers und Lüddens, 1998).

GABA_A Rezeptoren setzen sich aus 5 Proteinuntereinheiten (Heteropentamer) zusammen (Olsen und Sieghart, 2008). Heute sind bei Säugetieren 19 in ihrer Aminosäure-Sequenz verschiedene Untereinheiten des GABA_A Rezeptors bekannt (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π , ρ_{1-3}) (Simon et al., 2004; Kanematsu et al., 2007). Zu 9 dieser Untereinheiten gibt es unterschiedliche Splice-Varianten. Aus dieser Zahl ergeben sich verschiedene Untereinheiten-Kombinationsmöglichkeiten, wodurch Rezeptoren mit unterschiedlichen pharmakologischen und elektrophysiologischen Eigenschaften entstehen (Sieghart 1995). Jedoch machen nur etwa 20 Untereinheiten-Kombinationen 99 % aller GABA_A Rezeptoren aus (Richardson et al., 2007).

Innerhalb einer Klasse weisen die Untereinheiten eine Ähnlichkeit in ihrer Sequenz von 70 % und zwischen den einzelnen Klassen von 30 % auf (Korpi et al., 2002). Die am häufigsten exprimierten GABA_A Rezeptoren bestehen aus α_1 , β_2 und γ_2 Untereinheiten (Baur et al, 2005; Sieghart, 2006).

Die α_1 Untereinheit ist die am häufigsten verbreitete Untereinheit im ZNS (70-90 %). Sie ist in fast allen Regionen zu finden. α_2 und α_3 Untereinheiten hingegen findet man in α_1 Untereinheiten-armen Regionen (McKernan und Whiting, 1996).

β Untereinheiten kommen im Vergleich zu den α Untereinheiten einheitlicher im ZNS vor (Benke et al., 2004).

γ_1 sind im Gegensatz zu γ_2 und γ_3 Untereinheiten in nur wenigen Regionen zu finden (Sieghart und Sperk, 2002).

δ Untereinheiten kommen in Kombination mit α_4 und α_6 Untereinheiten vor (Sieghart und Sperk, 2002). Sie scheinen häufig die γ Untereinheiten zu ersetzen (Sieghart 1995).

π Untereinheiten bilden zusammen mit α , β und γ Untereinheiten Benzodiazepin-insensitive Rezeptoren (Korpi et al., 2002).

θ Untereinheiten findet man in Kombination mit α , β oder γ Untereinheiten in verschiedenen Gehirnregionen (Sieghart und Sperk, 2002).

ρ Untereinheiten bilden den GABA_C Rezeptor, der aber laut IUPHAR (International Union of Pharmacology) als GABA_A Rezeptor-Subtyp zu bezeichnen ist (Barnard et al., 1998). Auf diesen Subtyp wird im Kapitel 3.2.3. näher eingegangen.

3.4.2 GABA_B Rezeptor

GABA_B Rezeptoren gehören zur Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren. GABA_B Rezeptoren koppeln über G Proteine an Ca²⁺- und K⁺-Kanäle (Ulrich und Bettler, 2007). Sie bestehen aus sieben transmembranären Domänen. Sie wurden in inhibitorischen und exzitatorischen Neuronen gefunden, wo sie als Auto- und Heterorezeptoren wirken. Durch Aktivierung von präsynaptischen GABA_B Rezeptoren wird durch die Inhibition von spannungsgesteuerten Ca²⁺-Kanälen die Neurotransmitterfreisetzung unterdrückt (Mintz und Bean, 1993; Poncer et al., 1997). Postsynaptische GABA_B Rezeptoren induzieren durch Aktivierung von Kir3-K⁺-Kanälen langsame, inhibitorische, postsynaptische Ströme, welche eine Hyperpolarisation der Membran induzieren (Luscher et al., 1997). GABA_B Rezeptoren werden durch GABA und Baclofen aktiviert und durch Phaclofen gehemmt (Sieghart, 1995; Aktories et al, 2005).

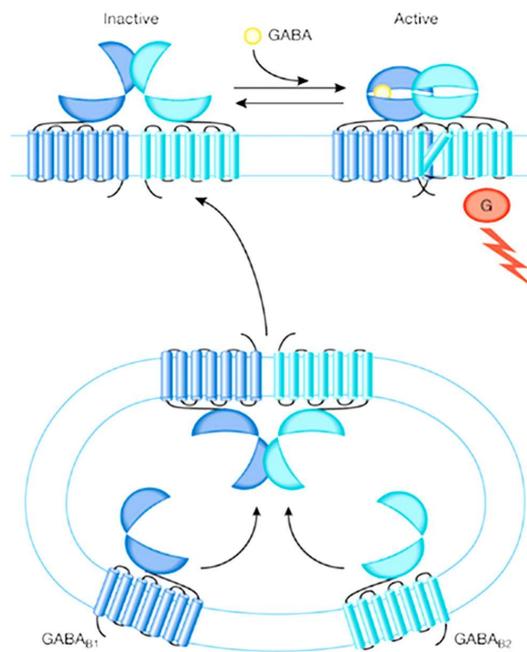


Abb. 6: zeigt den schematischen Aufbau eines GABA_B Rezeptors
 (http://www.nature.com/embor/journal/v4/n3/fig_tab/embor777_f2.html; 20.08.09)

3.4.3 GABA_C Rezeptor

GABA_C Rezeptoren, welche aus ρ Untereinheiten zusammengesetzt sind, wurden erstmals in der Retina von Wirbeltieren gefunden (Bormann, 2000; Zhu et al, 2007). Sie gehören wie auch die GABA_A Rezeptoren zur Familie der ligandengesteuerten Ionenkanäle. Ionotrope GABA_C Rezeptoren werden durch GABA und GABA-Analoga wie die cis-4-Aminocrotonsäure (CACA) geöffnet (Sieghart, 1995).

Sie unterscheiden sich jedoch pharmakologisch deutlich von GABA_A und GABA_B Rezeptoren. Während diese entsprechend ihrer Sensitivität für Bicucullin und Baclofen definiert werden, sprechen GABA_C Rezeptoren auf keine dieser Substanzen an (Bormann, 2000; Li et al, 2007).

GABA_C Rezeptoren unterscheiden sich auch hinsichtlich ihrer Struktur von GABA_A Rezeptoren. Während GABA_A Rezeptoren Heterooligomere (vor allem aus α_1 , β_2 und γ_2 Untereinheiten) darstellen, können GABA_C Rezeptoren auch Homooligomere sein (Bormann, 2000). Verglichen mit GABA_A Rezeptoren, weisen GABA_C Rezeptoren

außerdem eine höhere GABA Sensitivität auf. Die Amplituden ihrer Ströme sind kleiner und die Ströme desensibilisieren nicht (Enz und Cutting, 1997). Am „single-channel level“ sind diese Rezeptoren durch eine längere mittlere Öffnungsdauer und eine geringere Chlorid-Leitfähigkeit charakterisiert (Feigenspan et al., 1993).

Wie bereits erwähnt schlug die IUPHAR trotz dieser Unterschiede in Pharmakologie und Struktur vor, den Begriff GABA_C Rezeptoren nicht zu verwenden und sie stattdessen als einen GABA_A Rezeptor-Subtyp zu betrachten (Barnard et al., 1998; Bormann, 2000).

3.5 GABA-Bindungsstelle

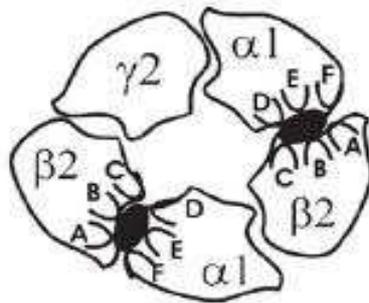


Abb. 7: GABA-Bindungsstelle (Kash et al., 2004)

GABA_A Rezeptoren besitzen zwei ähnliche Bindungsstellen zwischen den α und β Untereinheiten (Kash et al, 2004).

Beide Untereinheiten stellen für die Bildung der Bindungstasche Gruppen von Aminosäuren (AS) zur Verfügung, die sich auf verschiedenen Loops, die willkürlich als Loops A-F bezeichnet werden, befinden. Loop A, B und C bildende AS-Reste werden von der β_2 Untereinheit und Loop D, E und F bildende AS-Reste werden von der α_1 Untereinheit zur Verfügung gestellt (Boileau et al., 2002).

Loop A beinhaltet die AS Trp 92 - Asp 101, wobei aus dieser Region die AS Leu 99 und Tyr 97 Teil der GABA-Bindungsstelle sind. Asp 95 ist für die Unterscheidung Agonist/Antagonist von Bedeutung (Boileau et al., 2002).

Loop B umfasst die AS Ile 154 - Asp 163 – mit den AS Thr 160 und Asp 163 als Teil der GABA-Bindung (Newell et al., 2004).

Loop C beinhalten die AS Val 199 – Ser 209, wobei aus dieser Region die AS Ser 204, Tyr 205, Arg 207 und Ser 209 als Teil der GABA-Bindungsstelle identifiziert wurden (Wagner und Czajkowski, 2001).

Loop D umfasst die AS Try 59 – Lys 79 – mit den AS Phe 64, Arg 66 und Ser 68 als Teil der GABA-Bindung (Boileau et al., 1999).

Loop E beinhaltet die AS Met 113 – Leu 132, wovon die AS Asn 115, Leu 117, Thr 129 und Arg 131 Teil der Agonisten-Bindungsstelle sind (Kloda und Czajkowsky, 2007).

Loop F umfasst die AS Pro 174 – Asp 191, wobei Val 178, Val 180 und Asp 183 an der GABA-Bindung beteiligt sind (Newell und Czajkowsi, 2002).

3.6 Gating

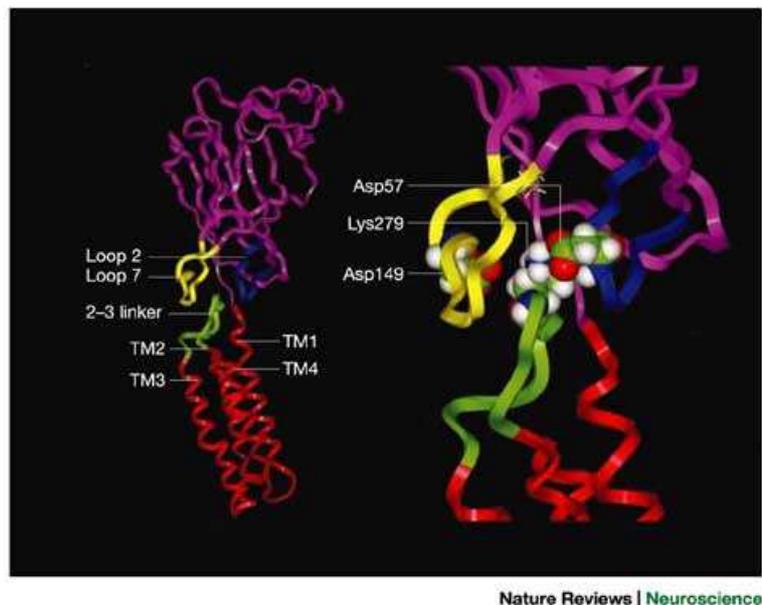


Abb. 8: Modell der α_1 Untereinheit von GABA_A Rezeptoren (Kash et al., 2003)

Neurotransmitter wie Acetylcholin und GABA führen durch eine Aktivierung von ligandengesteuerten Ionenkanälen zu schneller, synaptischer Neurotransmission (Kash et al., 2003). Diese Ionenkanäle wandeln chemische Signale in elektrische Signale um. Dies geschieht durch Bindung eines Transmitters. Es kommt zu einer Konformationsänderung des Proteins, die schließlich in der Öffnung des Ionenkanals resultiert. Dieser schnelle und reversible Prozess wird auch als „gating“ bezeichnet (Kash et al., 2004). Die dabei involvierten Regionen des GABA_A Rezeptors sind noch nicht vollständig bekannt (Dougherty et al., 2001). Von großer Bedeutung für das „gating“ des GABA_A Rezeptors sind elektrostatische Interaktionen zwischen dem negativ geladenen Asp 57 und Asp 149 (Asparaginresten) in den extrazellulären loops 2 und 7 und den positiv geladenen Lys 279 (Lysinrest) in der transmembranären 2-3 Linker Region der α_1 Untereinheit (Kash et al., 2003).

Mercado und Czajkowski (2006) konnten zeigen, dass auch die β_2 Untereinheit eine Schlüsselrolle im Coupling spielt. Durch Substitution von Arginin (β_2 Arg 216) in der preM1-Region durch Cystein wurde das Gating von GABA aufgehoben ohne jedoch die Bindung des GABA-Agonisten [3H]Muscimol zu beeinträchtigen (Mercado und Czajkowski, 2006).

3.7 Modulatoren an GABA_A Rezeptoren

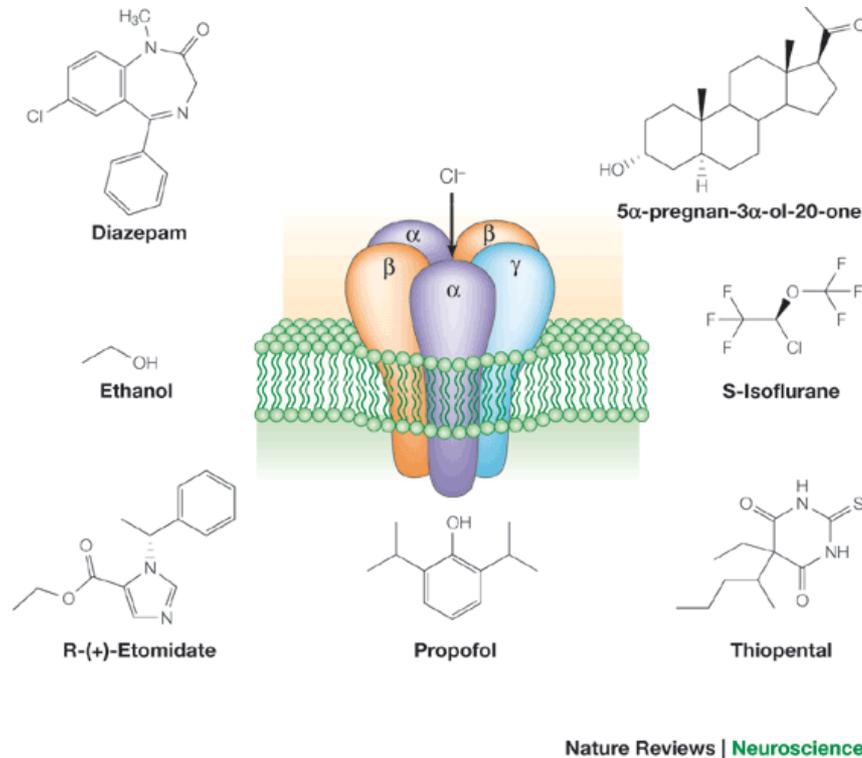


Abb. 9: chemische Strukturen unterschiedlicher Modulatoren
(Belelli und Lambert, 2005)

3.7.1 Benzodiazepine

Benzodiazepine gehören zu den am besten untersuchten Modulatoren des GABA_A Rezeptors. Sie werden vor allem als Tranquillantien, Antiepileptika, Schlafmittel und als zentrale Muskelrelaxantien verwendet. Chemisch gesehen ist ihre Wirkung an einen Siebenring gebunden. Sie besitzen eine Lactam-Struktur und einen elektronenziehenden Substituenten am Bicyclus. Sie leiten sich vor allem von dem 1,4-Benzodiazepin Diazepam und dessen Metaboliten ab (Mutschler et al., 2008).

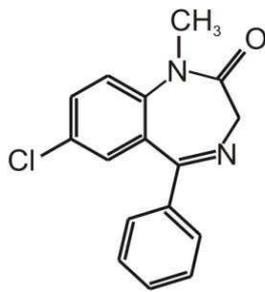


Abb. 10: Diazepam

Benzodiazepine sind seit 1960 auf dem Markt. Wie bereits erwähnt wirken Benzodiazepine anxiolytisch, sedativ/hypnotisch, antikonvulsiv, zentral muskelrelaxierend und amnestisch (Nutt und Malizia, 2001; Rudolph und Möhler, 2006; Olsen und Sieghart, 2008). Durch längere Anwendung führen sie nicht selten zu Toleranzentwicklung und Abhängigkeit (Heberlein et al., 2009; Ipser et al., 2009). Daneben können sie zu Benommenheit, Müdigkeit, Verwirrtheit, Muskelschwäche und Koordinationsstörungen führen (Daiello LA, 2007).

Die relativ sicheren Benzodiazepinen können in Kombination mit Alkohol, Barbituraten und Opioiden zum Tod führen. Beispielsweise kommt es durch Mischkonsum von Ethanol und Benzodiazepinen, zu einer schnelleren Resorption des Alkohols. Zudem kann auch der Alkohol in seiner Wirksamkeit verstärkt und seine Elimination gehemmt werden (Darke et al. 2009).

Benzodiazepine wirken durch Modulation auf die Bindungsstelle der GABA am GABA_A Rezeptor und verstärken dadurch die Wirksamkeit von GABA.

Die Affinität von GABA zu ihrer Bindungsstelle wird durch Benzodiazepine erhöht. Die Öffnungswahrscheinlichkeit wird erhöht und somit können mehr Chloridionen in die Zelle gelangen. Daraus resultieren eine Hyperpolarisation und eine verminderte Erregbarkeit (Mutschler et al., 2008).

Benzodiazepine sind in Abwesenheit von GABA wirkungslos und haben bei einer Sättigungskonzentration von GABA keinen modulierenden Effekt. Die Konzentrations-Wirkungskurve wird demnach in Richtung geringerer GABA-Konzentrationen

verschoben, was von großer klinischer Bedeutung ist, da es dadurch zu keiner möglichen Überdosierung kommen kann. Umgekehrt wird die Affinität der Benzodiazepine für Agonisten durch GABA verstärkt. Die Bindung von inversen Agonisten nimmt jedoch ab (Hevers u. Lüddens, 1998).

Die einzelnen Benzodiazepine unterscheiden sich vor allem in ihrer Pharmakokinetik, welche durch ihre Lipophilie bestimmt wird. Benzodiazepine werden resorbiert und ihre Bioverfügbarkeit beträgt über 80 %. Eine große Rolle für die Elimination der Benzodiazepine spielt die Metabolisierung. Daher kann man diese bezüglich ihres Metabolismus in 4 Hauptgruppen unterteilen:

- 1) Diazepamtyp: Diazepam ist als einziger der 4 Gruppen durch die Entstehung langlebiger pharmakologisch wirksamer Metabolite gekennzeichnet. Es wird zu Nordiazepam desalkyliert und anschliessend am C-Atom 3 zu Oxazepam hydroxyliert.
- 2) Oxazepamtyp: Der Oxazepamtyp ist wie auch der Nitrazepamtyp und der tetrazyklische Benzodiazepintyp dadurch gekennzeichnet, dass keine langlebigen Metabolite gebildet werden. Oxazepam, Temazepam und andere Verbindungen haben am C-Atom 3 bereits eine OH-Gruppe. Der Metabolismus besteht in der Konjugation mit Glucuronsäure.
- 3) Nitrazepamtyp: Zu seinen Vertretern zählen das Nitrazepam und das Flunitrazepam. Die Benzodiazepine dieses Types haben am C-Atom 7 eine Nitrogruppe, welche zur Aminogruppe reduziert wird und welche dann für eine Acetylierungsreaktion zur Verfügung steht.
- 4) Tetrazyklischer Benzodiazepintyp: Dazu gehören das Triazolam und das Midazolam, welche an der Methylgruppe des anellierten Triazol- oder Imidazolrings sowie am C-Atom 3 des Diazepin-Grundgerüsts hydroxyliert werden. Es stehen demnach zwei OH-Gruppen für die Konjugation mit

Glucuronsäure bereit. Die Elimination dieses Typs erfolgt besonders schnell (Aktories et al., 2005).

Untereinheitenspezifität von Benzodiazepinen:

Die Bindungsstelle der Benzodiazepine befindet sich zwischen der α und γ Untereinheit (Sigel und Buhr, 1997). Benzodiazepine modulieren nur GABA_A Rezeptoren, die eine α_1 , α_2 , α_3 oder α_5 Untereinheit enthalten (Nutt und Malizia, 2001). Rezeptoren mit α_4 und α_6 Untereinheiten werden als Benzodiazepin-insensitiv bezeichnet (Smith TA, 2001). Die unterschiedlichen Effekte der Benzodiazepine werden durch verschiedene α Untereinheiten vermittelt (Rudolph et al., 1999; Löw et al., 2000). Neben der α Untereinheit ist auch die γ Untereinheit von großer Bedeutung, insbesondere die γ_2 Untereinheit (Wafford et al., 1993). Es wurden bereits einige Aminosäurereste, welche für die Bindung von großer Bedeutung sind, identifiziert: α_1 H101, α_1 Y159, α_1 T206, α_1 Y209, γ_2 F77 und γ_2 M130 (Wieland et al., 1992; Sigel und Buhr, 1997; Wingrove et al., 1997; Van Rinjnsoeveret al., 2004).

Rezeptoren, welche α_1 - Untereinheiten beinhalten, vermitteln Sedierung und dienen demnach als Targets für Sedativa und Hypnotika.

Selektive Agonisten für GABA_A Rezeptoren, welche die α_2 und/oder die α_3 Untereinheit beinhalten, wirken anxiolytisch ohne Sedierung in präklinischen Untersuchungen. α_3 enthaltende Rezeptoren scheinen bei Schizophrenie eine Rolle zu spielen (Rudolph und Möhler, 2006).

Untereinheit	Pharmakologischer Effekt
α_1	sedativ/hypnotisch
α_2	anxiolytisch/muskelrelaxierend
α_3	muskelrelaxierend
α_5	amnestisch

Tabelle 2: zeigt die verschiedenen pharmakologischen Benzodiazepineffekte in Abhängigkeit der α Untereinheiten (Löw et al., 2000; Sieghart und Sperk, 2002).

Es muss erwähnt werden, dass auch Pharmaka die keine Benzodiazepinstruktur aufweisen, mit hoher Affinität an die Benzodiazepin-Bindungsstelle binden (u.a. β -Carboline, Imidazolpyridine, Triazolopyridazine oder Cyclopyrrolone) (Sigel und Buhr, 1997; Hevers und Lüddens, 1998). Der Austausch von Methionin 130 durch Leucin führt zu einer Reduktion der Wirksamkeit von Zolpidem. Flumazenil bindet unverändert weiter und die Bindungsfähigkeit von Diazepam wird nur gering vermindert (Sigel und Buhr, 1997).

3.7.2 Barbiturate

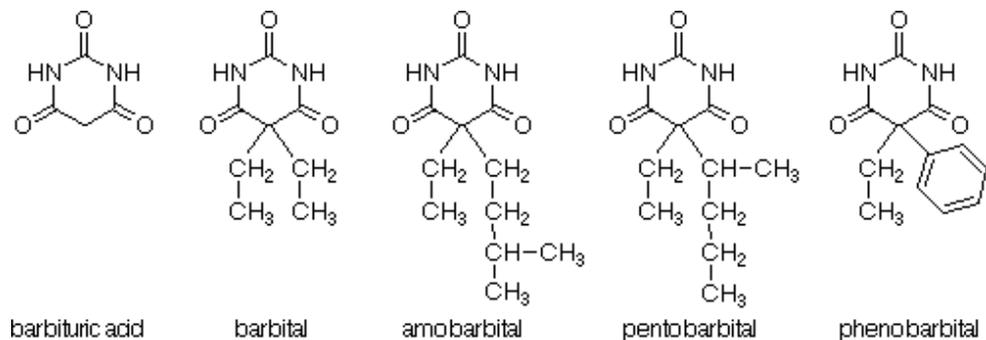


Abb. 11: Chemische Strukturen einiger Barbiturate

(<http://www2.ulg.ac.be/lcfi/licence/interros/interro05.html>; 21.08.09)

Barbiturate werden heute aufgrund ihrer geringeren therapeutischen Breite, im Gegensatz zu den Benzodiazepinen, nur noch selten verwendet. Die Induktion von CYP-Isoenzymen und konjugierenden Enzymen sind weitere Nachteile der Barbiturate. Phenobarbital wird noch als Antikonvulsivum eingesetzt, da es die Intensität und die Dauer von epileptischen Anfällen reduzieren kann (Rang et al., 2003). Zu den ebenso noch therapeutisch angewendeten Barbituraten zählen Methohexital und Thiopental. Sie zeigen nach Einnahme vor allem sedative, hypnotische, antikonvulsive und anästhetische Effekte (Charney et al., 2001).

Barbiturate greifen neben GABA_A Rezeptoren auch an anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen wie Na⁺- und Ca²⁺-Kanälen an (Czapinski et al., 2005). Anders als die Benzodiazepine verlängern Barbiturate die Öffnungsdauer der Kanäle. Auch hier kommt es dadurch zu einem verstärkten Einstrom von Chloridionen und damit zu einer Hyperpolarisation von Nervenzellen (D'Hulst et al, 2009).

Die genaue Bindungsstelle der Barbiturate am GABA_A Rezeptor ist nicht bekannt, da alle GABA_A Rezeptor Subtypen inklusive homooligomeren β Rezeptoren moduliert werden (Brandon und Janet, 2006).

Pentobarbital verstärkt bereits in sehr geringen Konzentrationen GABA-induzierte Ströme (Korpi et al., 2002). Bei höheren Konzentrationen kommt es zu einer direkten Öffnung des Chlorid-Ionenkanals (Belelli et al., 1999; Brandon und Janet, 2006). Pentobarbital wirkt unselektiv, da es bereits homooligomere Rezeptoren modulieren kann (Hevers und Lüddens, 1998). In milimolaren Konzentrationen wirken Barbiturate inhibierend auf GABA_A Rezeptoren (Brandon und Janet, 2006).

3.7.3 Neurosteroide

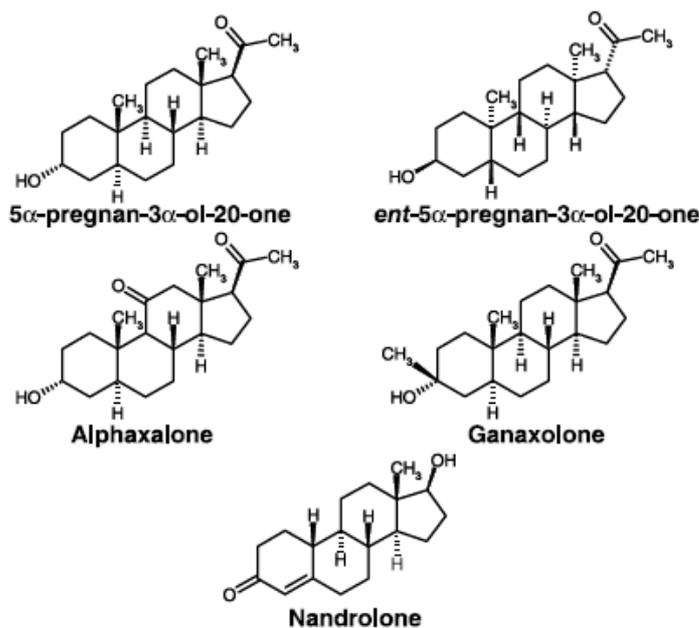


Abb. 12: Chemische Strukturen einiger Neurosteroide (Lambert et al., 2003)

Obwohl sich die Neurosteroiden von Progesteron und Deoxycorticosteron ableiten, unterscheiden sie sich von den klassischen Hormonen. Zu ihren wichtigsten Vertretern zählen Pregnanolon, Allopregnanolon (THP) und Tetrahydrodeoxycorticosteron (THDOC) (Leinmüller, 1996). Wie die klassischen Hormone entfalten sie ihre regulatorische Wirkung nicht über die Bindung an bestimmte Strukturen im Nucleus bzw. binden an nukleäre Rezeptoren (NR) und lösen so „genomische“ Prozesse aus wie beispielsweise die DNA-Transkription, sondern greifen direkt an Ionenkanälen an (Lambert et al., 2003).

Sie spielen eine wichtige physiologische Rolle im ZNS. Ein synthetisches Neurosteroid ist Alphaxolon, das als Anästhetikum entwickelt wurde (Rang et al., 2003). Allopregnanolon, ein Metabolit von Progesteron, kann den Abfall eines GABA-induzierten Stromes (IPSC) an hypothalamischen Neuronen hinauszögern (Fancsik et al., 2000).

Neurosteroiden können sowohl als positive als auch als negative Modulatoren von GABA-aktivierten Cl^- -Kanälen fungieren (Korpi et al., 2002). Sie wirken relativ unspezifisch an verschiedenen Rezeptorisoformen (Belelli und Herd, 2003). Steroidkonzentrationen können sich sehr rasch durch Veränderungen wie Stress oder Schwangerschaft verändern. Die Sensitivität der $GABA_A$ Rezeptoren verhält sich gegenüber den Neurosteroiden dynamisch. Aufgrund der Enantioselektivität kann auf eine spezifische Bindungsstelle für Neurosteroiden am Rezeptor geschlossen werden (Lambert et al., 2003).

Potenzierung der GABA-induzierten Chloridströme (I_{GABA}) hängt nicht von der Anwesenheit einer γ Untereinheit ab, jedoch muss eine β Untereinheit exprimiert sein (Puia et al., 1990; Hadingham et al., 1993). Durch Expression der δ Untereinheit in rekombinanten Rezeptoren, gemeinsam mit $\alpha_{1/6}, \beta_3$ oder $\alpha_{1/6}, \beta_3, \gamma_2$ Untereinheiten, konnte eine reduzierte Potenzierung GABA-aktivierter Ströme gezeigt werden, obwohl δ Untereinheiten beinhaltende Rezeptoren direkt durch Neurosteroiden aktiviert werden können (Zhu et al., 1996).

Möglicherweise verändern Neurosteroide zusätzlich auch den intrazellulären Metabolismus durch verschiedene Kinasen, was GABA_A Rezeptoren beeinflussen kann (Korpi et al., 2002).

3.7.4 Anästhetika

Anästhetika werden in Inhalationsanästhetika wie Enfluran, Sevofluran (Sevorane®), Sevoflurane Baxter®), Isofluran (Forene®, Isofluran Baxter®), Desfluran (Suprane®) und in Injektionsanästhetika wie Etomidat (Etomidat-Lipuro®), Propofol, Ketamin (Ketalar®), Thiopental (Pentothal®) unterteilt (Mutschler, 2008).

Der genaue Wirkmechanismus blieb lange Zeit unbekannt. Früher ging man von einer unspezifischen Interaktion der Moleküle mit der Membran und einer daraus resultierenden Beeinflussung ihrer Fluidität aus (Campagna-Slater und Weaver, 2007). Wie man mittlerweile weiß, wirken die meisten Anästhetika über GABA_A Rezeptoren als allosterische Modulatoren (Franks und Lieb, 1994).

Anästhetika, die in der Praxis in pharmakologisch relevanten Konzentrationen eingesetzt werden, können GABA-induzierte Chloridströme potenzieren. In höheren Konzentrationen angewendet können Anästhetika den Kanal-Rezeptor-Komplex aktivieren, d.h. sie wirken GABA-mimetisch (Franks und Lieb, 1994).

Demnach geht man von einer „high-affinity“ Bindungsstelle für den GABA-modulatorischen Effekt und einer „low-affinity“ Bindungsstelle für den GABA-mimetischen Effekt (Belelli et al, 1999) aus.

Es konnten einige Aminosäuren in der transmembranären Domäne (TMD) der α und β Untereinheit des GABA_A Rezeptors als Teil der Anästhetika-Bindungsstelle identifiziert werden. Inhalationsanästhetika dürften demnach mit der α Untereinheit und Injektionsanästhetika mit der β Untereinheit interagieren (Mihic et al., 1997; Belelli et al., 1999). Zu diesen AS zählen Leu 232 (TM1), Ser 270 (TM2), Ala 291 (TM3), Tyr 411, Thr 414 und Tyr 415 (TM4) der α_1 Untereinheit. Durch Ersetzen einer dieser AS

durch beispielsweise Tryptophan verlieren Anästhetika wie beispielsweise Halothan ihre verstärkende Wirkung auf den GABA-Effekt (Richardson et al., 2007).

Bei Inhalationsanästhetika wie Isofluran oder Desfluran konnte keine β -Abhängigkeit festgestellt werden (Korpi et al., 2002).

Die Interaktion von Etomidat mit GABA_A Rezeptoren wird durch eine AS in Position 289 (Asparagin) beeinflusst. Die Mutation von Asp 289 (TM2) der β_3 Untereinheit unterdrückt sowohl den GABA-modulatorischen, als auch den GABA-mimetischen Effekt von Etomidat. Es bleibt jedoch unklar, ob Asparagin direkt in die Bindung involviert ist oder an der allosterischen Kopplung (Campagna-Slater und Weaver, 2007).

3.7.5 Ethanol

Ethanol übt eine dämpfende Wirkung auf das ZNS aus (Charness et al., 1989; Davies, 2003). Alkoholmissbrauch kann unter anderem zu frühzeitigem Tod, schweren Erkrankungen und fetalem Alkoholsyndrom führen (Davies et al., 2003). Nach Langzeitkonsum kommt es zu adaptiven Veränderungen im Expressionsmuster von GABA_A Rezeptoren.

Ethanol wirkt, wie auch die Benzodiazepine, anxiolytisch, antikonvulsiv und sedativ (Sieghart, 1995). Flumazenil, ein Benzodiazepin-Antagonist, hebt die zentral-dämpfende Wirkung von Ethanol auf (Lister und Nutt, 1987).

Früher ging man von der Annahme aus, dass Alkohole über eine Veränderung der Lipid-Doppelschicht Struktur wirken.

Heute weiß man, dass Ethanol hauptsächlich über die Steigerung der GABA-induzierten Inhibition, durch die Inhibition des Ca²⁺-Einstroms durch spannungsgesteuerte Kalziumkanäle und durch Hemmung der NMDA Rezeptor-Funktion wirkt (Little, 1991; Tabakoff und Hoffman, 1996; Lovinger, 1997; Davies, 2003).

Die Potenzierung GABA-induzierter Chlorid-Ströme geht auf eine Zunahme der Häufigkeit der Kanalöffnungen und auf eine verlängerte Öffnungsdauer zurück (Davies et al., 2003).

Der modulierende Effekt der Alkohole auf GABA_A Rezeptoren scheint mit der Kettenlänge im Zusammenhang zu stehen. Dildy-Mayfield et al. fanden heraus, dass dieser mit zunehmenden Polymerisationsgrad zunimmt. Da es jedoch ab einer Kettenlänge über 12 C-Atomen (Dodecanol) zu keinem modulierenden Effekt mehr kommt, wird angenommen, dass es eine Bindetasche für Alkohole mit maximal 12 C-Atomen am GABA_A Rezeptor gibt (Davies, 2003).

Eine weitere Theorie bezüglich des Wirkmechanismus geht auf Wafford und Whiting (1992) zurück. Sie konnten einen Zusammenhang zwischen dem modulatorischen Effekt von Alkohol und dem Vorhandensein der Splice Variante der γ_2 Untereinheit, die sich aus einer aus acht AS unterscheidender Sequenz in der intrazellulären Schleife zwischen TM3 und TM4 besteht, aufzeigen. Diese dient als Phosphorylierungsstelle für die Proteinkinase C. Es werden nur GABA_A Rezeptoren mit γ_{2L} Untereinheiten und nicht solche mit γ_{2S} Untereinheiten moduliert (Wafford und Whiting, 1992). Jedoch konnte dies bei anderen Studien nicht mehr bestätigt werden (Davies et al., 2003).

Wallner et al. konnten zeigen, dass GABA_A Rezeptoren, die aus $\alpha_4\beta_3\delta$ und $\alpha_6\beta_3\delta$ Untereinheiten bestehen, bereits durch geringe Ethanolkonzentrationen moduliert werden und dass für diesen Effekt die β_3 Untereinheit eine große Rolle spielt. Es kann daraus geschlossen werden, dass extrasynaptische Rezeptoren die primären Angriffsziele von Ethanol darstellen (Wallner et al, 2004). Rezeptoren mit einer β_3 Untereinheit sind 10mal sensitiver als Rezeptoren mit einer β_2 Untereinheit. Die β_3 Untereinheit spielt zudem bei der Entwicklung einer Toleranz gegenüber Alkohol und beim Alkoholentzug eine Rolle (Segura, 2007).

3.7.6 Loreclezol

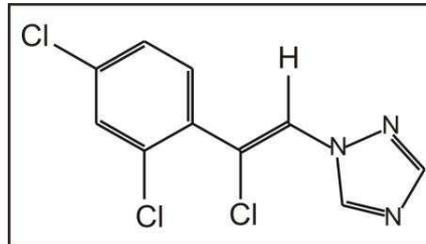


Abb. 13: Strukturformel Loreclezol

Loreclezol, das zur Gruppe der Antikonvulsiva gezählt wird, greift an einer neuen, unterschiedlichen Bindungsstelle an.

Die Wirkung von Loreclezol ist ausschließlich von der β Untereinheit abhängig (Fisher et al., 2000). Loreclezol besitzt zu Rezeptoren, welche eine β_2 oder eine β_3 Untereinheit beinhalten, eine 300-fach stärkere Affinität als zu β_1 enthaltende Rezeptoren (Wingrove et al., 1994). Es hat im Gegensatz zu anderen Antikonvulsiva keine hypnotische Wirkkomponente (Sanna et al., 1996).

Loreclezol übt zwei verschiedene Wirkungen auf GABA_A Rezeptoren aus: es besitzt eine GABA-modulatorische Wirkung und eine GABA-mimetische Wirkung. Es konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation β_{3N289S} in GABA_A Rezeptoren, die Wirkung von Loreclezol drastisch reduziert (Wingrove et al., 1994).

3.7.7 Kationen

Auch Schwermetalle wie Quecksilber, Zink, Kupfer und Lanthan greifen am GABAergen System an.

Narahashi et al. (1994) zeigten, dass *Quecksilber* GABA-induzierte Ströme bis 115 % (0,1 μM HgCl) bzw. bis 270 % (100 μM HgCl) potenzieren kann. Zudem kann es die

sich langsam entwickelnde Einwärts-Ströme erzeugen. Im Gegensatz dazu kann Methylquecksilber GABA-induzierte Ströme hemmen. Die starke Stimulation des GABAergen Systems durch Quecksilberchlorid spielt bei Quecksilbervergiftungen eine Rolle.

Kupfer und *Zink* können GABA-induzierte Ströme inhibieren (Narahashi et al., 1994). Hierbei liegt die IC_{50} bei 16 μM (Kupfer) und 19 μM (Zink). Chlorid-Ströme durch $\alpha_6\beta_3\delta$ GABA_A Rezeptoren reagieren am sensitivsten auf Inhibition durch *Zink*. Sowohl der Ersatz der δ Untereinheit durch die γ Untereinheit, als auch der Ersatz der α_6 Untereinheit durch die α_1 Untereinheit kann die Sensitivität der GABA_A Rezeptoren für Zink reduzieren. Die Potenz in α_1 GABA_A Rezeptoren nimmt dabei in folgender Reihenfolge ab: $\alpha_1\beta_1\delta > \alpha_1\beta_1\gamma_2L\delta > \alpha_1\beta_1\gamma_2L$ (Saxena und MacDonald, 1996).

Die Zinkinhibition wird durch eine Mutation in der M2-Domäne (H292A) in homomeren β_3 und heteromeren $\alpha_1\beta_3$ Rezeptoren reduziert. Daraus lässt sich die Bedeutung dieses Aminosäure-Restes als wichtige Determinante für die Zink-Bindungsstelle erkennen (Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002).

Lanthan hingegen kann GABA-induzierte Ströme potenzieren. Dies geschieht durch Erhöhung der Affinität des Rezeptors für GABA. Die EC_{50} liegt in diesem Fall bei 230 μM . Im Gegensatz zu GABA, Barbituraten, Benzodiazepinen, Picrotoxin, Kupfer und Zink bindet Lanthan an einer Stelle, die auf bzw. in der Nähe der externalen Oberfläche des GABA_A Rezeptor-Kanals ist. Sechs weitere Lanthanoide mit ähnlicher Atomzahl scheinen denselben stimulierenden Effekt zu haben, der sich mit steigender Atomzahl erhöht. In Einzelkanaluntersuchungen konnte gezeigt werden, dass vor allem 3 Effekte zu einer Verstärkung der Ströme durch Terbium, einem Lanthanoid, beitragen: Die Steigerung der Gesamtöffnungszeit, die Abnahme der gesamten Zeit im geschlossenen Zustand und die Steigerung der gesamten bursts (Narahashi et al., 1994).

3.7.8 Naturstoffe als Modulatoren von GABA_A Rezeptoren

Neben den bereits erwähnten synthetischen Modulatoren von GABA_A Rezeptoren konnten auch zahlreiche Naturstoffe als Modulatoren von GABA_A Rezeptoren identifiziert werden:

Baldrian wird häufig zur Behandlung von Angst- und Schlafstörungen verwendet. Valerensäure, eine Komponente des Baldrians, stimuliert Untereinheiten-spezifisch GABA-induzierte Ströme. Khom et al. (2007) konnten zeigen, dass diese an β_2 und β_3 beinhaltenen GABA_A Rezeptoren eine positive allosterische Modulation bewirkt. Durch Ersatz von β_2 und β_3 durch β_1 kam es zu einer drastischen Reduzierung der Sensitivität der resultierenden Rezeptoren (Khom et al., 2007).



Abb. 14: *Valeriana officinalis*

(http://www.ethnopharmacologia.org/phototheque/Valeriana_officinalis.jpg; 30. 09. 2009)

Kavvadias et al. konnten zeigen, dass das Flavonoid Hispidulin, als Benzodiazepin Rezeptor Ligand mit positiven allosterischen Eigenschaften, die Blut-Hirnschranke durchquert und eine antikonvulsive Wirkung besitzt. Im Gegensatz zu Diazepam moduliert Hispidulin $\alpha_6\beta_2\gamma_{2s}$ GABA_A Rezeptoren (Kavvadias et al., 2004).



Sowohl das Sesquiterpen-Trilakton Bilobalid als auch das Diterpen-Trilakton Ginkgolid sind Bestandteile von *Ginkgo biloba* Extrakten. Sie werden zur symptomatischen Behandlung von leichten bis mittelschweren Formen der Demenz eingesetzt. Beide führen zu einer Inhibition des GABA_A Rezeptors. Bilobalid konnte als direkter Antagonist an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ GABA_A Rezeptoren identifiziert werden (Ivics et al., 2003; Huang et al., 2004).

Abb. 15: *Ginkgo biloba*

(<http://nmpb.nic.in/WriteReadData/photogallery/2815354730Ginkgo%20biloba.jpg>; 30.09.09)

(+)-Borneol, ein Monoterpen, ist Bestandteil vieler ätherischer Öle. Die traditionelle chinesische Medizin (TCM) verwendet (+)-Borneol in der Anaesthetie und Analgesie. Es moduliert GABA_A Rezeptoren und kann die Wirkung von GABA 1000-fach verstärken (Granger et al., 2005).

Thymol, ein weiteres Monoterpen, bildet die Hauptkomponente des ätherischen Öls *Thymus vulgaris*. Es potenziert konzentrationsabhängig die Wirkung von GABA an $\alpha_1\beta_3\gamma_2\delta$, $\alpha_6\beta_3\gamma_2\delta$ und $\alpha_1\beta_1\gamma_2\delta$ GABA_A Rezeptoren. Demnach dürfte Thymol keine Selektivität für bestimmte Rezeptor-Subtypen aufweisen und greift daher an einer neuen Bindungsstelle am GABA_A Rezeptor an (Priestly et al., 2003).



Abb. 16: *Thymus vulgaris*

(<http://www.botanik.de/mendel/bild-thymus-vulgaris-echter-thymian.html>; 30.09.09)



Häberlein et al. (1996) konnten zeigen, dass es bei ethanolischen Extrakten von *Chelidonium majus* zu einer positiven allosterischen Modulation am GABA_A Rezeptor kommt. Dieser Effekt soll auf das im Kraut enthaltene Alkaloid Protopin zurückgehen (Häberlein et al., 1996).

Abb. 17: *Chelidonium majus L*

(http://www.ruhr-uni-bochum.de/boga/html/Chelidonium_majus_Foto.htm; 30.09.09)

3.8 Physiologische Rolle der Rezeptoren

Normale Gehirnfunktionen basieren auf einer Balance zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission. Dabei sind GABAerge Neuronen für die inhibitorische Kontrolle von großer Bedeutung. Durch Aktivitätsverminderung des GABAergen Systems kann es zu Angststörungen, Epilepsie und Schizophrenie kommen. Zudem gibt es einen genetischen Zusammenhang zwischen GABA_A Rezeptor Defiziten und klinischen Manifestationen von zahlreichen Erkrankungen wie die bereits erwähnten und weiters Schlafstörungen, Depression, Stimmungsstörungen und Alkoholismus (Möhler, 2006).

3.8.1 Angststörungen

Angststörungen haben mit etwa 15 % eine hohe Lebenszeitprävalenz (Somers et al., 2006). GABAerge Dysfunktionen sind unter anderem für das Auftreten von Angststörungen verantwortlich. Zum Beispiel wirkt Pentylentetrazol, indem es den GABA_A Rezeptor blockiert, so können extreme Angstzustände und traumatische Erinnerungen ausgelöst werden. Anxiolytische Effekte können durch eine Verstärkung der GABAergen Transmission durch Benzodiazepine entstehen (Möhler, 2006).

Es werden verschiedene Formen von Angststörungen unterschieden wie: Generalisiertes Angstsyndrom (GAD), Paniksyndrom (Panikstörungen, Panikattacken), Phobien und posttraumatische Belastungsstörung (Rudolph et al., 1999).

Diagnostische Klassifikation nach ICD-10
F 40 Phobische Störung F40.0 Agoraphobie .00 ohne Panikstörung .01 mit Panikstörung F40.1 soziale Phobie F40.2 spezifische (isolierte) Phobien

<p>F41 Andere Angststörung F41.0 Panikstörung F41.1 generalisierte Angststörung F41.2 Angst und depressive Stimmung, gemischt</p>
<p>F42 Zwangsstörung F42.0 vorwiegend Zwangsgedanken oder Grübelzwang F42.1 vorwiegend Zwangshandlungen (Zwangsrituale) F42.2 Zwangsgedanken und -handlungen, gemischt</p>
<p>F43 Reaktionen auf schwere Belastungen und Anpassungsstörungen F43.0 akute Belastungsreaktion F43.1 posttraumatische Belastungsstörung F43.2 Anpassungsstörungen .20 kurze depressive Reaktion .21 längere depressive Reaktion .22 Angst und depressive Reaktion, gemischt .23 mit vorwiegender Beeinträchtigung von anderen Gefühlen .24 mit vorwiegender Störung des Sozialverhaltens</p>

Tab. 3: Klassifikation der Angststörungen nach ICD10 (http://www.medizin-medien.at/mm/mm011/KONSensus_5_04_Angst.PDF; 15. 10. 2009)

In Verhaltensstudien konnte gezeigt werden, dass bei Mäusen mit α_2 (H101R) Punktmutation die anxiolytische Wirkung von Diazepam im Vergleich zu Mäusen mit α_3 (H126R) Punktmutation fehlte. Diese Entdeckung deutet darauf hin, dass anxiolytische Effekte der Benzodiazepine von α_2 GABA_A Rezeptoren, die im limbischen System exprimiert werden, herbeigeführt werden, nicht jedoch von α_3 GABA_A Rezeptoren ausgelöst werden (Löw et al., 2000). Das limbische System ist für den Hormonhaushalt und für die Steuerung des Nervensystems von großer Bedeutung. Zudem wird vermutet, dass es auch einen Einfluss auf Gefühle hat.

Daher ist es gewünscht, in Zukunft Wirkstoffe zu entwickeln, die selektiv an diesen Subtyp binden. Durch die Entwicklung untereinheitenspezifischer Wirkstoffe könnten

Nebenwirkungen von Anxiolytika deutlich verringert werden (Sieghart und Sperk, 2002).

3.8.2 Epilepsie

Weltweit sind rund ein Prozent der Bevölkerung von Epilepsie betroffen. Charakteristisch für Epilepsie sind sporadisch auftretende spontane Krämpfe, die wie bereits erwähnt auf eine Imbalance zwischen exzitatorischen (glutamatergen) und inhibitorischen (GABAergen) neuronalen Erregungen zurückzuführen sind. Dabei kommt es zu einer erhöhten Aktivität exzitatorischer Aminosäuretransmitter wie Glutamat oder zu einer verminderten Aktivität inhibitorischer Transmitter, wie GABA (Baulac et al. 2001; Möhler 2006).

Gewisse Anfallsformen wie die Absence Epilepsie können durch eine starke Inhibition ausgelöst werden (Leroy et al., 2004).

Eine K289M Mutation im extrazellulären Loop der γ_2 führt zu generalisierter Epilepsie, welche durch Fieberkrämpfe charakterisiert ist. Eine weitere Mutation in der γ_2 Untereinheit des GABA_A Rezeptors steht mit der Absence-Epilepsie des Kindesalters und Fieberkrämpfen im Zusammenhang (Möhler, 2006).

Aufgrund dieser Mutation kommt es zu verminderter GABA_A Rezeptor Deaktivierung und verstärkter Desensibilisierung. Dies führt während hoher neuronaler Aktivität zu einer verminderten Inhibition und dadurch zu einer Förderung epileptischer Anfälle (Bowser et al., 2002).

Weiters kommt es durch Austausch eines einzigen Nukleotids an der Splice-Donator-Stelle des Intron 6 der γ_2 Untereinheit zu funktionsuntauglichen Proteinen. Dies kann mit der Absence-Epilepsie des Kindesalters assoziiert werden (Möhler, 2006; Kananura et al., 2002).

Zudem wurde ein Funktionsverlust in der Mutation des α_1 GABA_A Rezeptors (A322D) bei einer Familie mit der autosomal dominanten Form der juvenilen myoklonischen Epilepsie festgestellt (Möhler, 2006).

Die idiopathische generalisierte Epilepsie (IGE) geht mit Absence, myoklonischen und/oder primär generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen einher. Erst kürzlich wurden kausative Gene identifiziert. Durch Mutation von Gln 351 X im intrazellulären

Loop zwischen M3 und M4 der γ_2 Untereinheit entsteht ein „Stopp Codon“ an Gln 351. Daraus resultieren GABA_A Rezeptoren, die nicht mehr funktionieren, und wiederum eine generalisierte Epilepsie mit Fieberkrämpfen (GEFS+) (Macdonald, 2004).

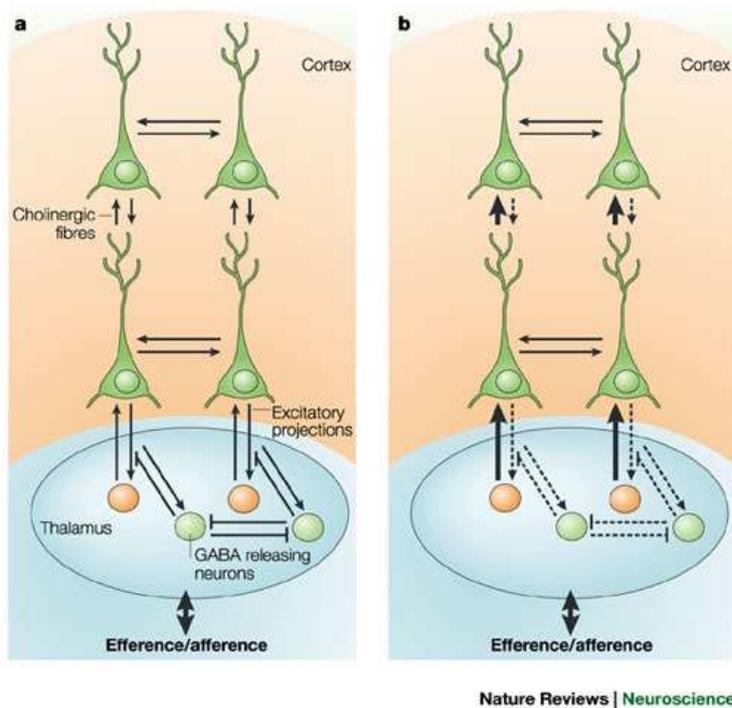


Abb. 18: zeigt schematisch die Interaktion zwischen Thalamus und kortikalen pyrimidalen Zellen (Steinlein OK, 2004)

3.8.3 Schlafstörungen

Die Prävalenz von Schlafstörungen, von denen vor allem die ältere Bevölkerung betroffen ist, liegt bei 20-50 % (McCrae et al., 2007).

Einteilung:

- Insomnien: darunter versteht man einen mangelhaften bzw. ungenügend erholsamen Schlaf.

- Hypersomnien: sind durch ein anhaltendes, abnorm hohes Schlafbedürfnis gekennzeichnet.
- Störungen des Schlaf-Wach-Rhythmus: darunter versteht man einen Mangel an Synchronizität zwischen dem individuellem Schlaf-Wach-Rhythmus und dem Schlaf-Wach-Rhythmus der Umgebung.
- Schlafapnoe: ist gekennzeichnet durch episodisch auftretende Atemstillstandphasen von über 10 Sekunden Dauer während des Schlafes.

Insomnien können auch nach ihrer Genese unterschieden werden:

- Psychophysiologische Insomnie: als Folge einer Stress-Reaktion auf emotionale Belastungen.
- Situative Insomnie: wird durch Umgebungsreize hervorgerufen wie Lärm oder Wetterveränderung.
- Symptomatische Insomnie: aufgrund einer somatischen oder psychischen Erkrankung als Folge- oder Begleitsymptom.
- Pharmakogene oder toxische Insomnie: durch Einnahme von zentral erregenden Substanzen wie Koffein oder Weckaminen aufgrund einer Stimulation hervorgerufen.
- Idiopathische Insomnie: es sind keine auslösenden Faktoren feststellbar. Vermutlich auf einer genetischen Disposition beruhend (Mutschler et al., 2001) .

Für die Induktion des physiologischen Schlafes ist die Verstärkung der GABAergen Transmission im thalamokortikalen Kreislauf von großer Bedeutung. Bei einem an chronischer Schlaflosigkeit leidenden Patienten konnte eine Mutation in der β_3 GABA_A Rezeptor Untereinheit festgestellt werden (Buhr et al., 2002).

Untersuchungen an $\alpha_1\beta_3(R192H)\gamma_{2s}$ GABA_A Rezeptoren zeigten im Vergleich zu $\alpha_1\beta_3\gamma_{2s}$ GABA_A Rezeptoren eine langsamere Desensibilisierungsphase auf. Zudem kam es bei mutierten Rezeptoren zu einer schnelleren Deaktivierung. Daraus kann

geschlossen werden, dass eine verminderte GABAerge Inhibition zur Schlaflosigkeit beiträgt.

Zusätzlich unterstützt der häufige Gebrauch von positiven allosterischen Modulatoren von GABA_A Rezeptoren den engen Zusammenhang zwischen GABAerger Inhibition und Schlaf (Möhler, 2006).

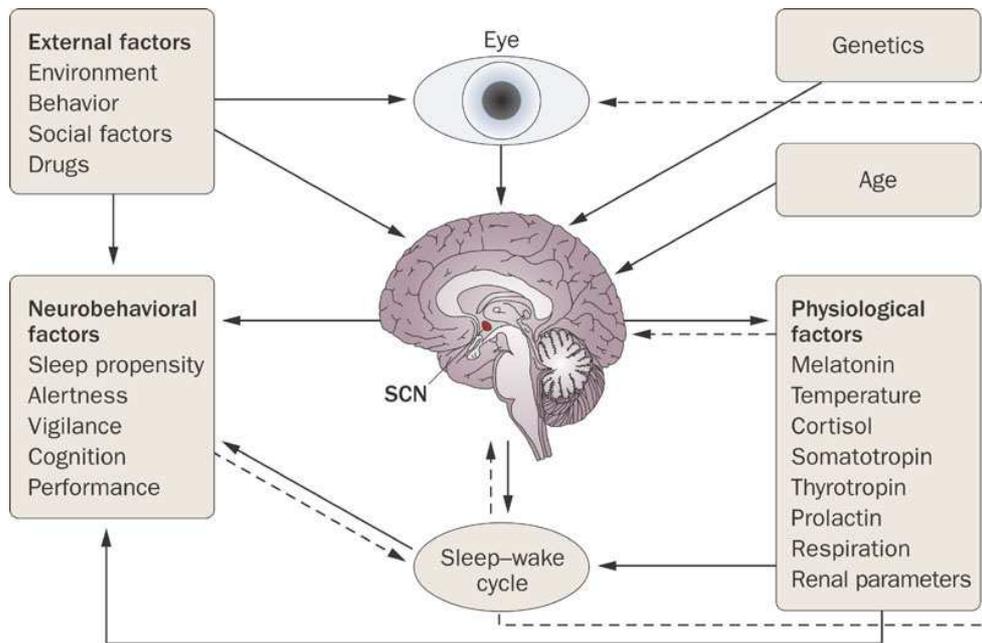


Abb. 19: zeigt die Faktoren und ihre Zusammenhänge untereinander die zur Entstehung von Schlaflosigkeit beitragen (Koch et al., 2009)

3.8.4 Schizophrenie

Ein zentraler Faktor bei der Entwicklung und Symptomatik einer Schizophrenie ist neben einer Änderung der glutamatergen und serotonergen Erregungsübertragung vor allem eine überschießende Stimulation des dopaminergen Systems. Dieses System steht durch α_3 beinhalten GABA_A Rezeptoren unter GABAerger Kontrolle (Möhler, 2006).

Man fand heraus, dass GABAerge Neurone besonders sensitiv gegenüber Glucocorticoid-Hormonen und gegenüber glutamaterger Exzitotoxizität sind. Dies erklärt auch die erhöhte Zahl bestimmter glutamaterger Neuronen im Gyrus cingulate (GC) von Schizophrenie-Patienten. Demzufolge trägt ein Defizit von GABAerger Inhibitionskontrolle auch zur Symptomatik der Schizophrenie bei. Die GABAerge Dysfunktion resultiert in langanhaltenden und möglicherweise lebenslangen Änderungen der GABA-Sensitivität (Yee et al., 2005; Möhler, 2006).

Es konnte auch ein Zusammenhang zwischen α_5 GABA_A Rezeptoren und der Entwicklung einer Schizophrenie beobachtet werden. Im Hippocampus wurde eine strukturelle Abnormität mit Verlusten von α_5 GABA_A Rezeptoren festgestellt. Aufgrund von Punktmutationen in α_5 GABA_A Rezeptoren kam es im Tiermodell zu Defiziten der „prepulse“-Inhibition.

Demzufolge könnten Agonisten an α_3 und α_5 GABA_A Rezeptoren zur Therapie bei Schizophrenie beitragen (Möhler, 2006).

4. PROBLEMSTELLUNG

GABA ist der wichtigste Neurotransmitter an inhibitorischen Neuronen und wird durch Decarboxylierung von Glutaminsäure gebildet. Benzodiazepine und ähnliche Arzneistoffe verstärken die inhibitorische Wirkung der GABA, indem sie ihre hemmende Wirkung auf GABAerge Neuronen verstärken. Sie besitzen ein großes Potential als Anxiolytika, Sedativa, Antikonvulsiva, Anästhetika und Myorelaxantien. Die Verwendung von Pharmaka geht jedoch häufig mit unerwünschten Nebenwirkungen einher, wie beispielsweise bei Benzodiazepinen, aufgrund derer bei regelmäßiger Einnahme ein erhöhtes Gewöhnungs- und Abhängigkeitsrisiko besteht. Um diese Gefahren zu reduzieren, wird bereits nach Alternativen mit verbesserten Wirkprofilen geforscht. Besondere Bedeutung kommt dabei den einzelnen Rezeptor-Untereinheiten zu, die für die Vermittlung bestimmter Effekte und somit für die Therapie neuropsychiatrischer Erkrankungen von großer Bedeutung sind.

Das Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien erforscht seit einiger Zeit Interaktionen von Naturstoffen mit GABA_A Rezeptoren. Diese werden mittels Screeningmethoden untersucht. Für ausgewählte Liganden wird ein Subtypenspezifisches Profil erstellt.

Im Rahmen meiner Diplomarbeit wurde eine „Bibliothek von pflanzlichen Extrakten“ auf ihre Interaktion mit GABA_A Kanälen, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden, mit der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht. Es wurde dabei wie folgt vorgegangen:

1. Zuerst wurden diese Extrakte in einem Screening auf eine Modulation von GABA-induzierten Strömen (I_{GABA}) untersucht. Die Screeningkonzentration an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ Rezeptoren betrug 100 $\mu\text{M}/\text{ml}$.
2. Danach sollte der Effekt eines isolierten Naturstoffs (ZFP) auf GABA_A Rezeptoren untersucht und Dosis-Wirkungskurven an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ GABA_A

Rezeptoren erstellt werden. Dadurch konnten EC₅₀-Werte (= mittlere effektive Konzentration) und maximale Effekte ermittelt werden.

3. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob diese Effekte über die Benzodiazepin-Bindungsstelle vermittelt werden.
4. Schlussendlich wurde noch auf eine mögliche β -Abhängigkeit untersucht.

5. METHODEN

Zur Untersuchung elektrischer Membranvorgänge werden in der Elektrophysiologie verschiedene Messtechniken angewendet. Für diese Arbeit wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt. Durch diese Technik ist es möglich transmembranäre Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen. Dadurch wurden zuerst rekombinante GABA_A Rezeptortypen in unterschiedlichen Untereinheiten-Kombinationen in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, welche ein Standardobjekt für die Expression und funktionelle Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren darstellen (Sigel 1987; Crawley et al., 2007).

Bereits 1971 entdeckte Gurdon et al. die Fähigkeit funktioneller Expression exogener Protein-Spezies durch Injektion der mRNA in das Zytoplasma der Froschoozyten (Gurdon et al., 1971).

5.1 Oozytenpräparation

Zur Anästhesierung wurden die weiblichen *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) 15-30 min. lang einer 0,2 prozentigen Lösung von Tricain (= Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; MS-222) ausgesetzt. Daraufhin wurden die Frösche operiert und mit einer Pinzette vorsichtig Follikelgewebe entnommen. Nachdem das Follikelgewebe in eine Petrischale übergeführt wurde, wurde es mechanisch zerkleinert. Die Petrischale war mit OR2-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ · 6H₂O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) befüllt. Um nun das Bindegewebe und die

Follikelzellen zu entfernen, wurde es 90 min. lang in Collagenase-Lösung inkubiert (2 mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2) (Boyle et al., 1991; Goldin 1993). Dadurch wird eine rasche Präparation einer großen Anzahl einzelner Oozyten ermöglicht. Sowohl vor, als auch nach der Collagenase-Behandlung, wurden die Oozyten gründlich mit OR2-Lösung gewaschen, da ansonsten Calcium durch die Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt (Goldin 1993). Daraufhin wurden sie in ND96-Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂· 6H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)) transferiert und die am besten zur Injektion geeigneten Oozyten (Stadium V-VI) mit einem Durchmesser von 1000-1200 µM, konnten nach weiterer Inkubationszeit (von mehreren Stunden) ausgewählt werden (Goldin, 1993).



Abb. 20: Krallenfrosch *Xenopus laevis* (<http://www.mcdb.lsa.umich.edu/research.php?&sidonavInfo=research§ionOne=areasoffocus§ionTwo=neurobiology>; 15. 10. 2009)

5.2 cRNA-Vorbereitung

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

5.3 Injektion von cRNA

Damit die Oozyten nicht verletzt werden, musste man bei der Injektion von cRNA in den Oozyten auf ausreichende mechanische Stabilität achten.

Vor der Injektion mischte man die für die verschiedenen Untereinheiten kodierenden einzelnen cRNAs im Verhältnis 1:1:10 ($\alpha_1\beta_2\gamma_2s$), 1:1 ($\alpha_1\beta_2$) bzw. 3:1 ($\alpha_1\beta_1$). Mit Hilfe eines pneumatischen Injektionsgeräts wurden etwa 10 bis 50 nl dieser Lösung in die Oozyten injiziert. Dies war an einer deutlichen Zunahme an Größe des Oozyten zu sehen.

Nach der Injektion wurden die Oozyten in ND96 (100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin) inkubiert (für 24 Stunden bei 18° C). Daraufhin konnten sie für die Messungen verwendet werden (Boileau et al., 2002).



Abb. 21: Eier des Krallenfrosches *Xenopus laevis*
(<http://www.xenopus.com/links.htm>; 15. 10. 2009)

5.4 Arbeitsablauf zur Herstellung der Messlösungen

Die Stammlösungen der Extrakte hatten eine Konzentration von 20 mg/ml. Die Extrakte wurden bei einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ getestet. Es wurde eine Stammlösung von der zu untersuchenden Substanz ZFP (100 mM) in 100 % DMSO hergestellt und anschließend wurde diese mit ND96 verdünnt, um Konzentrationen von 0,1 μM bis 100

μM (0,1 μM , 1 μM , 10 μM , 30 μM und 100 μM) zu erhalten. Bei den Testlösungen musste man beachten, dass die DMSO-Konzentration 0,3 % nicht überstieg (Bianchi et al., 2006). Die GABA-Testlösungen wurden mit ND 96 auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Sowohl GABA-Testlösung (Konzentration 1 mM; 5,15 mg GABA in 50 ml ND 96) als auch Messlösungen mussten jeden Tag frisch hergestellt werden.

5.5 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Abb. 20 zeigt schematisch den Versuchsaufbau für die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik von *Xenopus laevis* Oozyten. Die Versuchsanordnung setzt sich zusammen aus:

- einer intrazellulären Elektrode (V) zur Messung der transmembranären Potentials,
- einem die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (Haltepotential) messenden Rückkopplungsverstärker
- und einer zweiten, intrazellulären Elektrode (I), die den Strom in den Oozyten injiziert, der nötig ist, um das Haltepotential zu erlangen bzw. konstant zu halten.

Man spricht dabei von „voltage clamp“-Prinzip. Der Verstärker arbeitet nach dem Prinzip der negativen Rückkoppelung. Der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom fließt mit umgekehrten Vorzeichen zum von der Zellmembran generierten Aktionsstrom (Hille, 1992).

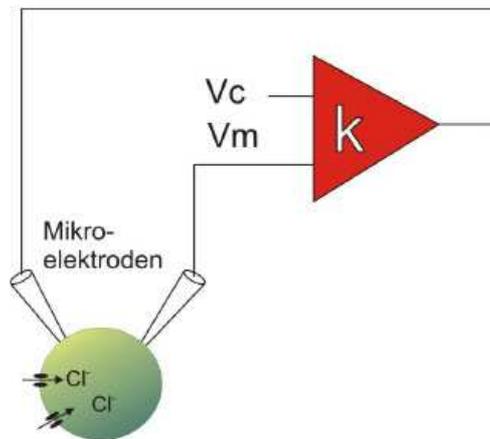


Abb. 22: schematische Darstellung des Versuchsaufbaues der 2- Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik mit *Xenopus laevis* Oozyten (Baburin et al., 2006)

5.6 Perfusionssystem

Abb. 23 zeigt den Querschnitt einer modifizierten Messkammer eines schnellen Perfusionssystems (Khom et al., 2006; Baburin et al., 2006). Zwei Mikroelektroden (M1 und M2) wurden durch Öffnungen (MAH- microelectrode access holes) in einer Glasplatte (glass plate) in den Oozyten (oocyte) eingeführt. Die Perfusionskammer (perfusion chamber) war dauerhaft von ND96-Lösung umgeben. Ein Tecan Miniprep 60 Pipettierroboter (AT-application tube) wurde verwendet, um die verschiedenen Lösungen durch einen Quarztrichter (funnel) auf den Oozyten zu applizieren und wieder durch Abflüsse (funnel outlet) auszuwaschen. Die Perfusion wurde durch die Pumpe (pump) unter dem Oozyten-Halter erst möglich (Khom et al., 2006).

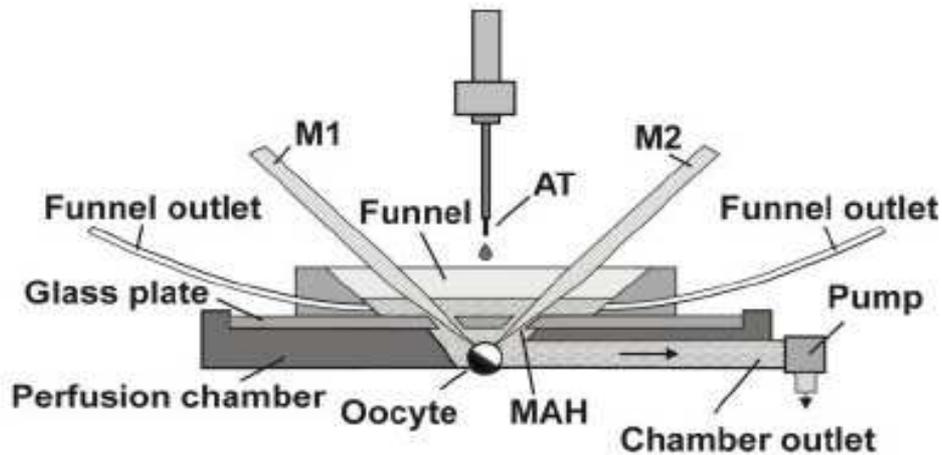


Abb. 23: schematischer Aufbau einer Messkammer (Khom et al., 2006)

6. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Wirkung von 13 verschiedenen Pflanzenextrakten und einem Naturstoff auf GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}) durch $GABA_A$ Rezeptoren untersucht werden. Die Substanzen waren mit Codes versehen (Extrakt Nr. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, ZFP), da das Screening und die begonnene Untereinheiten-spezifische Charakterisierung als vorläufige Voruntersuchung diente und die Daten noch publiziert werden sollen.

Es wurden $GABA_A$ Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} mithilfe der 2-Mikroelektroden spannungsklemmtechnik untersucht.

6.1. Erstellung von GABA-Dosis-Wirkungskurven

Da die Modulation von I_{GABA} bei einer GABA (EC_{5-10}) Konzentration zu untersuchen war, musste im Vorfeld dieser Konzentrationsbereich ermittelt werden. Dafür wurden verschiedene GABA Konzentrationen (1, 10, 30, 100 und 1000 μM) appliziert. Die Amplituden wurden auf den Maximalstrom normiert und in ein Koordinatensystem (x-

Achse: Konzentration von GABA; y-Achse: normierter Effekt) eingetragen. Nachdem durch die Datenpunkte eine Kurve (nach der sog. Hill-Gleichung) gelegt wurde, konnten nun folgende Parameter abgelesen werden: Die EC_{50} lag bei $35,5 \pm 8,9 \mu\text{M}$ und die EC_{5-10} , jener Konzentrationsbereich, in dem von nun an alle Experimente durchgeführt werden sollten, lag bei $1-2,5 \mu\text{M}$ (siehe Abb. 22).

6.2 Modulation von I_{GABA} durch 13 Pflanzenextrakte

Um den Effekt der Pflanzenextrakte auf I_{GABA} zu untersuchen, wurden $\alpha_1\beta\gamma_{2S}$ Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten exprimiert. Die Wirkung der Extrakte wurde bei einer Konzentration von $100 \mu\text{g/ml}$ bei einer GABA EC_{5-10} untersucht. Wie in **Abb. 23** zu sehen, potenzierte keiner der untersuchten Extrakte I_{GABA} . Extrakte 2, 4 und 6 führten zu einer signifikanten Inhibition von I_{GABA} . Der stärkste Effekt wurde für Substanz 2 gemessen (Inhibition von $I_{\text{GABA}} = 81,8 \pm 8,2 \%$). Die restlichen Extrakte zeigten entweder schwach ausgeprägte Inhibition (10, 14, 16, 18, 20, 22, 24) oder waren inaktiv (8, 12, 26).

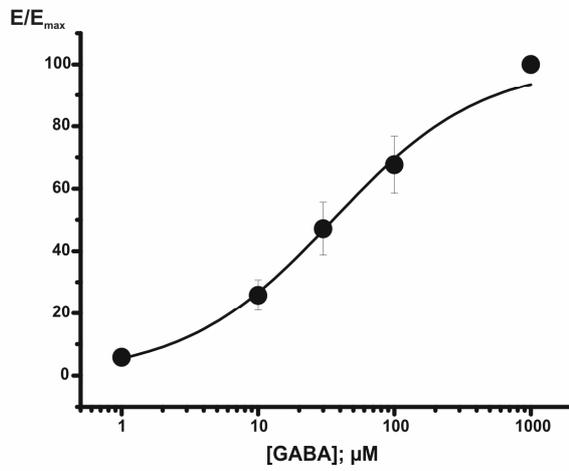
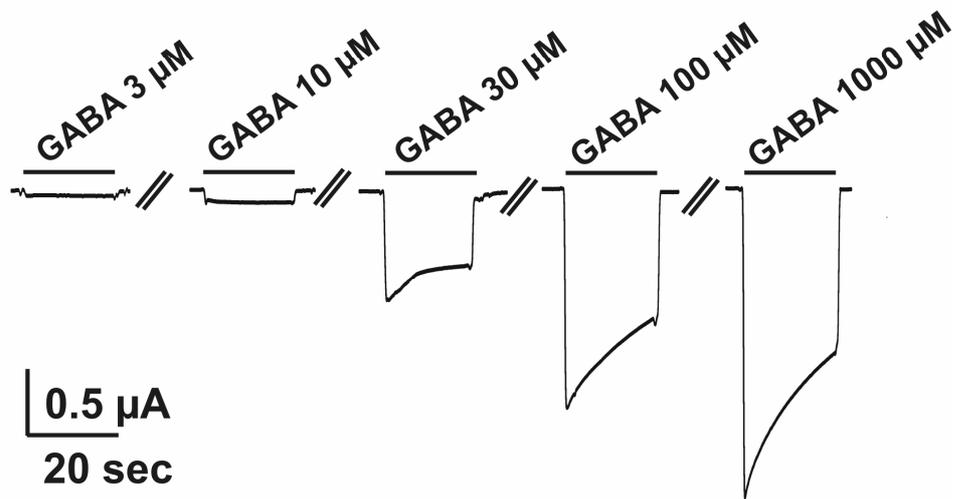
A**B**

Abb. 24 (A): GABA-Dosis-Wirkungskurve von $\alpha_1\beta_2\gamma_2\delta$ Rezeptoren

Abb. 24 (B): Typische Chloridströme durch unterschiedliche GABA Konzentrationen induziert

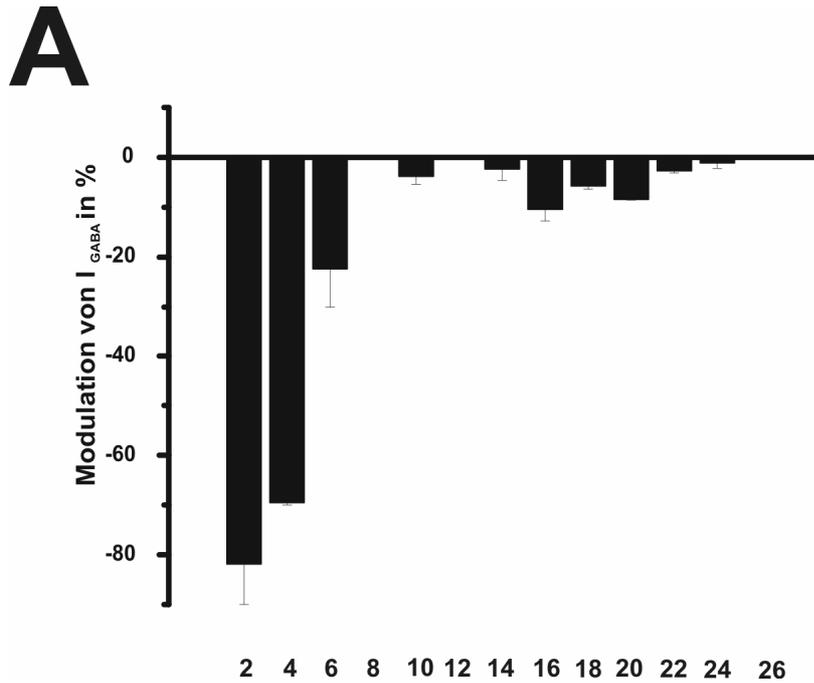


Abb. 25: Screening: Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ Rezeptoren durch 13 Pflanzenextrakte

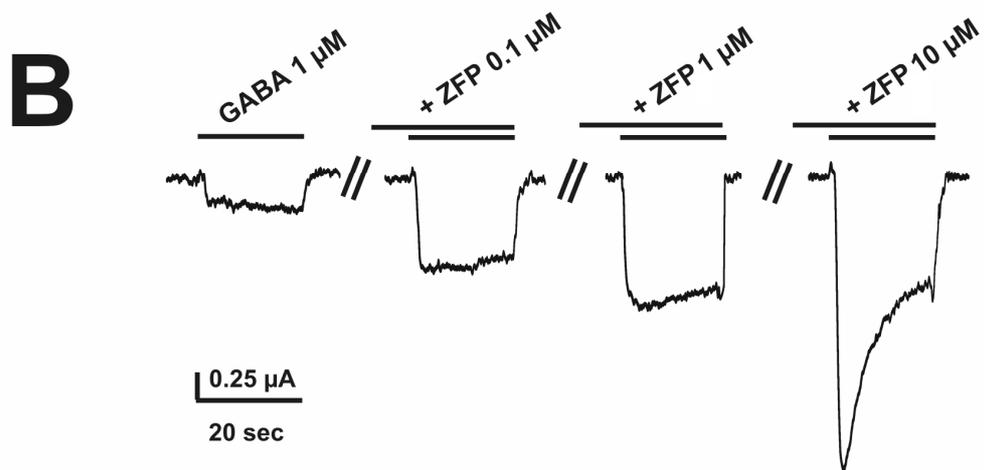
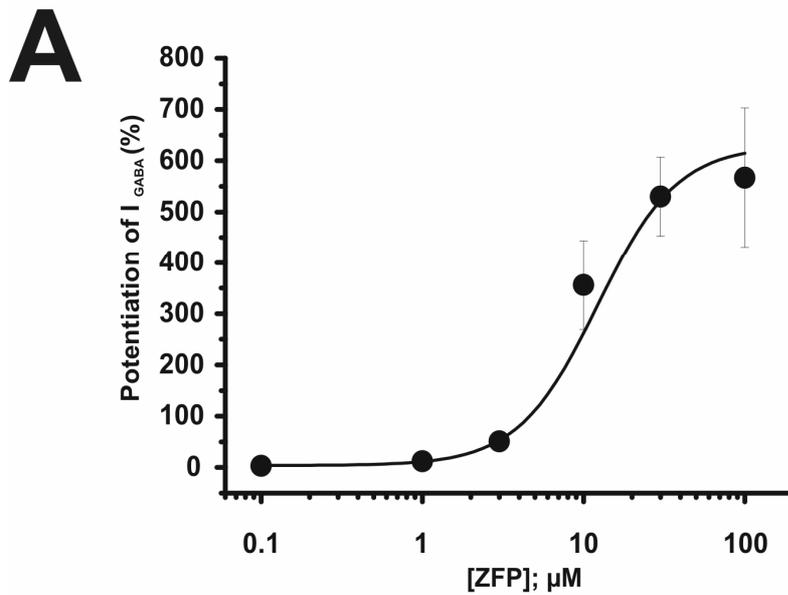
Extrakt	Maximale Stimulation von I _{GABA} in %	Anzahl der Experimente (n)
2	-81,84 ± 8,16	2
4	-69,52 ± 0,48	2
6	-22,33 ± 7,67	2
8	0 ± 0	2
10	-3,79 ± 1,62	2
12	0 ± 0	2
14	-2,33 ± 2,33	2
16	-10,40 ± 2,40	2
18	-5,73 ± 0,68	2
20	-8,45 ± 0,12	2
22	-2,67 ± 0,45	2
24	-1,11 ± 1,11	2
26	0 ± 0	2

Tabelle 4: Zusammenfassung der jeweiligen Screeningergebnisse

6.3 Modulation von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch einen Naturstoff (ZFP)

Im weiteren Verlauf sollte nun die Modulation von I_{GABA} durch ZFP untersucht werden. Dafür wurden wiederum $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} bei einer GABA Konzentration (EC_{5-10}) durch unterschiedliche Konzentrationen des Naturstoffes untersucht.

Abb. 26 zeigt die Modulation von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren durch ansteigende ZFP Konzentrationen (0,1 μ M- 100 μ M). Dabei ist eine dosisabhängige, positive Modulation von I_{GABA} durch ZFP zu erkennen. Der erste signifikante Effekt trat bei 3 μ M ZFP auf. Eine Sättigung war ab 30 μ M zu erkennen. Die EC_{50} betrug an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren $12,2 \pm 3,2 \mu$ M und die maximale Stimulation von I_{GABA} $629,8 \pm 104,5 \%$.



Doppelbalken entspricht einer Co-Applikation von GABA + ZFP

Abb. 26 (A): ZFP Dosis-Wirkungskurve von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren

Abb. 26 (B): typische Chloridströme mit jeweils 0,1 μM , 1 μM , 10 μM ZFP und einer GABA-Konzentration von EC_{5-10} appliziert; Anzahl der Experimente (n): 3

6.4 Untersuchung des Effektes von ZFP an $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren

$\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren wurden in *Xenopus* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} untersucht.

Abb. 27 zeigt die Dosis-Wirkungskurve von ZFP an $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren. Der erste signifikante Effekt trat bei 3 μM auf und Sättigung war ab 100 μM zu erkennen. Die EC_{50} betrug an $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren $9,4 \pm 7,8 \mu\text{M}$ und die maximale Stimulation von I_{GABA} $113,3 \pm 70,5 \%$.

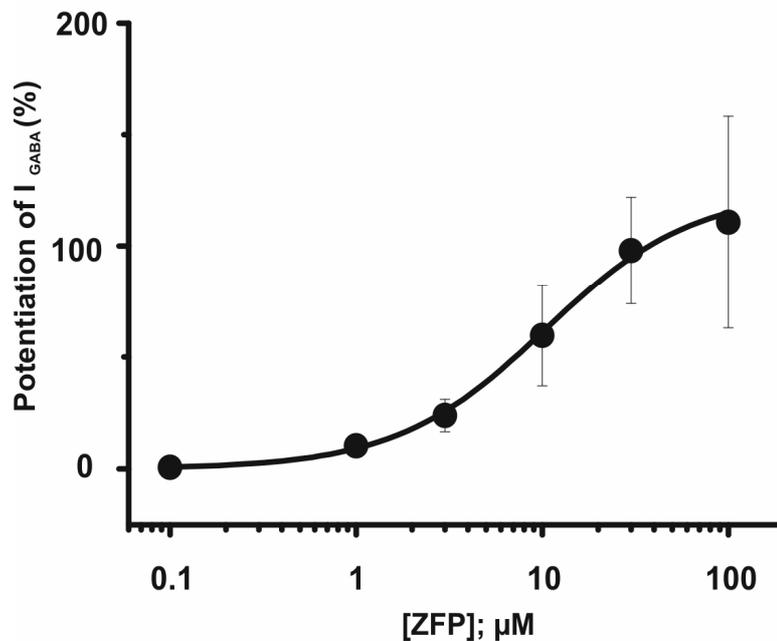


Abb. 27: GABA Dosis-Wirkungskurve von $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren durch ZFP;
Anzahl der Experimente (n):3

7. DISKUSSION

Im Rahmen meiner Diplomarbeit sollte die Modulation von I_{GABA} durch Naturstoffe, sowohl in Form von Extrakten als auch eines Reinstoffs, untersucht werden.

Kein Pflanzenextrakt potenzierte I_{GABA} , für die meisten wurde sogar ein inhibierender Effekt beobachtet. Welcher der Inhaltsstoffe dieser Extrakte für diese Effekte verantwortlich wäre, ist momentan noch nicht bekannt. Auch Substanzen, die die GABAerge Neurotransmission inhibieren sind von Interesse, da diese *in vivo* krampfauslösend wirken können.

In weiterer Folge wurde die Reinsubstanz (ZFP) an $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Rezeptoren untersucht. Es zeigte sich ein positiv modulatorischer, konzentrationsabhängiger Effekt ($629,8 \pm 104,5$ %). An $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren war dieser Effekt deutlich geringer ($318,4 \pm 35,0$ %). Der schwächste Effekt war an $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren ($113,3 \pm 70,5$ %) zu beobachten. Da die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$ Rezeptoren signifikant stärker war als die durch $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren, kann eine mögliche Interaktion von ZFP mit der Benzodiazepin Bindungsstelle vermutet werden. Interessanterweise wirkt sich die Inkorporation von γ Untereinheiten vor allem auf die Potenzierung von I_{GABA} aus, während die Wirkung (EC_{50}) der Substanz unverändert bleibt. Um weitere Hinweise auf eine mögliche Bindungsstelle zu erhalten, wurde in weiterer Folge die Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2$ und $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren verglichen. Obwohl EC_{50} -Werte ($\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren: $9,4 \pm 7,8$ μM ; $\alpha_1\beta_2$ Rezeptoren: $9,9 \pm 2,7$) beinahe identisch waren, war die Potenzierung von der β Untereinheit abhängig. Diese β -abhängige Modulation (starke Effekte an $\beta_{2/3}$ enthaltenden Rezeptoren und schwache bis gar keine Effekte an β_1 enthaltenden Rezeptoren) ist aus der Literatur für verschiedene Modulatoren wie z.B. Loreclezol, Propofol oder Etomidat bekannt (Wingrove et al., 1994; Campagna-Slater et al., 2007).

Die genaue Lokalisation der Bindungsstelle könnte in weiterführenden Experimenten gezeigt werden. Es wäre von großem Interesse zu sehen, ob auch eine direkte Aktivierung in Abwesenheit des Agonisten GABA auftritt. Diese Eigenschaft findet sich vor allem bei Loreclezol, Etomidat und Propofol, nicht jedoch bei Benzodiazepinen (Feng et al., 2004). Zudem könnte man noch untersuchen, ob sich die modulatorische

Wirkung bei verschiedenen GABA-Konzentrationen ändert, wie es bei den Benzodiazepinen der Fall ist oder wie bei Barbituraten oder Neurosteroiden, wo die Modulation über einen breiten GABA Konzentrationsbereich konstant bleibt. Diese Experimente könnten Hinweise auf den Wirkmechanismus der ZFP-induzierten Modulation von I_{GABA} liefern.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Diplomarbeit ein weiterer interessanter Modulator von $GABA_A$ Rezeptoren charakterisiert wurde, dessen Wirkung sowohl von der Anwesenheit von γ_2 Untereinheiten, als auch der β -Isoform abhängt.

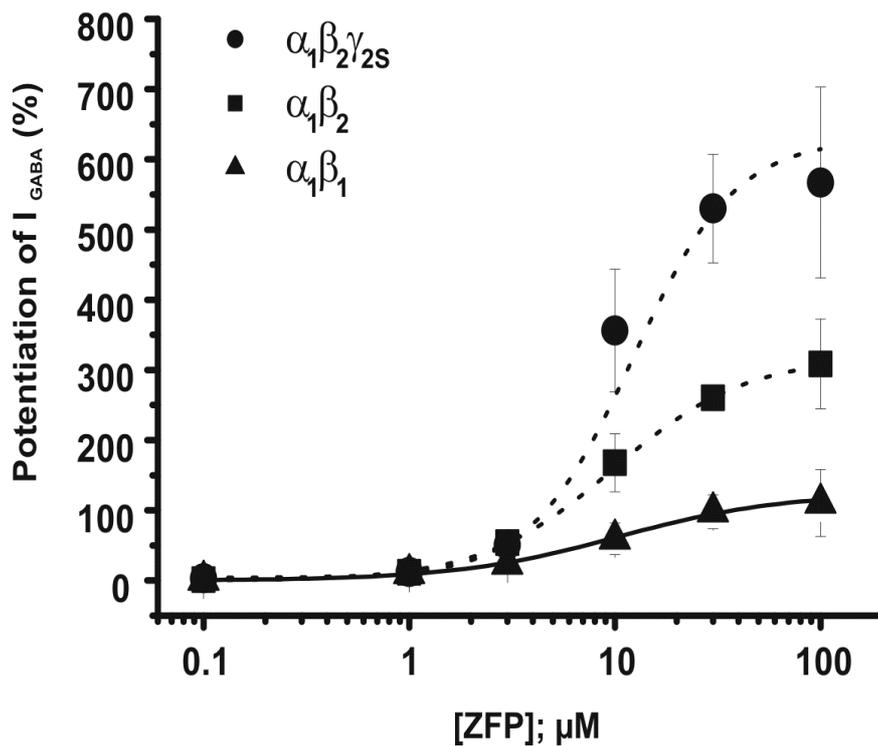


Abb. 28: zeigt zusammenfassend konzentrationsabhängige, potenzierende Effekte von ZFP an $\alpha_1\beta_2\gamma_2s$, $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_1\beta_1$ Rezeptoren Anzahl der Experimente (n): 3

8. QUELLENVERZEICHNIS

Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Forth W: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Urban und Fischer, 9. Auflage 2005.

Baburin I, Beyl S, Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* 453:117-123.

Bannai H, Lèvi S, Schweizer C, Inoue T, Launey T, Racine V, Sibarita JB, Mikoshiba K, Triller A: Activity-dependent tuning of inhibitory neurotransmission based on GABAAR diffusion dynamics. *Neuron*. 2009 Jun 11; 62(5):670-82.

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

Baulac S, Huberfeld G, Gourfinkel-An I, Mitropoulou G, Beranger A, Prud'home JF, Baulac M, Brice A, Bruzzone R, LeGuern E: First genetic evidence of GABA(A) receptor dysfunction in epilepsy: a mutation in the gamma2-subunit gene. *Nat Genet*. 2001 May; 28(1):46-8.

Baur R, Simmen U, Senn M, Sèquin U, Sigel E: Novel Plant Substances Acting as β Subunit Isoform-Selective Positive Allosteric Modulators of GABA_A Receptors; *Mol Pharmacol* 2005; 68:787-792.

Belelli D, Pau D, Cabras G, Peters JA, Lambert JJ: A single amino acid confers barbiturate sensitivity upon the GABA p1 receptor. *Br. J. Pharmacol*. 1999; 127: 601-604.

Belelli D, Herd MB: The contraceptive agent Provera enhances GABA(A) receptor-mediated inhibitory neurotransmission in the rat hippocampus: evidence for endogenous neurosteroids? *J Neurosci* 2003 Nov 5; 23(31):10013-20.

Bianchi L, Driscoll M: Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *Worm Book*: 1-16, 2006.

Boileau AJ, Evers AR, Davies AF, Czajkowski C: Mapping the agonist binding site of the GABAA receptor: evidence for a beta-strand. *J Neurosci*. 1999 Jun 15; 19(12):4847-54.

Boileau AJ, Baur R, Sharkey LM, Sigel E, Czajkowski C: The relative amount of cRNA coding for $\gamma 2$ subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuropharmacology* 2002; 43: 695-700.

Boileau AJ, Newell JG, Czajkowski C: GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem* 2002; 277:2931-2937.

Bormann J: The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. 2000 Jan; 21(1):16-9.

Bowser DN, Wagner DA, Czajkowski C, Cromer BA, Parker MW, Wallace RH, Harkin LA, Mulley JC, Marini C, Berkovic SF, Williams DA, Jones MV, Petrou S: Altered kinetics and benzodiazepine sensitivity of a GABAA receptor subunit mutation [$\gamma 2$ (R43Q)] found in human epilepsy. *Proc Natl Acad Sci U SA* 2002; 99:15170-15175.

Brandon CD, Janet LF: Identification of structures within gabaa receptor alpha subunits that regulate the agonist action of pentobarbital. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics Fast Forward* 2006 Sep; 318(3):1094-101.

Buhr A, Bianchi MT, Baur R, Courtet P, Pignay V, Boulenger JP, Gallati S, Hinkle DJ, Macdonald RL, Sigel E: Functional characterization of the new human GABA_A receptor mutation β 3(R192H). *Hum. Genet.* 2002 Jul 16; 111(2):154-60.

Campagna-Slater V, Weaver DF: Anaesthetic binding site for etomidate and propofol on a GABA_A receptor model. *Neuroscience Letters* 2007; 418:28-33.

Czapinski P, Blaszczyk B, Czuczwar SJ: Mechanism of action of antiepileptic drugs. *Curr Top Med Chem.* 2005; 5(1):3-14.

Charness ME, Simon RP, Greenberg DA: Ethanol and the nervous system. *N Engl J Med* 1989; 321:442-454.

Charney, DS, Mihic, SJ, Harris, RA: Hypnotics and sedatives In: Goodman & Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics, Hardman, JG, L.E., L (eds) 2002; 10:399-427.

Crawley JN, Gerfen CR, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P, Wray S: Short protocols in neuroscience. Systems and behavioural methods. A compendium of methods from current protocols in neuroscience. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2007.

D'Hulst C, Atack JR, Kooy RF: The complexity of the GABA(A) receptor shape unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today.* 2009 Jul 2; 14(17-18):866-75.

Daiello LA: Atypical antipsychotics for the treatment of dementia-related behaviors: an update. *Med Health RI.* 2007 Jun; 90(6):191-4.

Darke S, Duflou J, Torok M: Drugs and violent death: comparative toxicology of homicide and non-substance toxicity suicide victims. *Addiction* 2009 Jun; 104(6):1000-5.

Davies M: The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci* Jul. 2003; 28(4):263-74.

Dougherty DA, Lester HA: Neurobiology. Snails, synapses and smokers. *Nature* 2001; 411:252-253.

Enna SJ, McCarson KE: The role of GABA in the mediation and perception of pain. *Adv Pharmacol* 2006; 54:1-27.

Enz R, Cutting GR: Molecular composition of GABA C receptors. *Vision Research* 1998; 38: 1431-1441.

Erlander MG, Tillakaratne NJ, Feldblum S, Patel N and Tobin AJ: Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* 1991; 7:91-100.

Feigenspan A, Wässle H, Bormann J: Pharmacology of GABA receptor Cl⁻ channels in rat retinal bipolar cells. *Nature* 1993; 361:159-62.

Feng HJ, Bianchi MT, Macdonald: Pentobarbital differentially modulates alpha1beta3delta and alpha1beta3gamma2L GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol*. 2004 Oct; 66(4):988-1003.

Fisher JL, Hinkle DJ, Macdonald RL: Loreclezole inhibition of recombinant alpha1beta1gamma2L GABA(A) receptor single channel currents. *Neuropharmacology* Jan. 2000; 39(2):235-45.

Fancsik A, Linn DM, Tasker JG: Neurosteroid modulation of GABA IPSCs is phosphorylation dependent. *J Neurosci*. 2000 May 1; 20(9):3067-75.

Franks NP, Lieb WR: Molecular and cellular mechanism of general anaesthesia. *Nature* 1994; 367:607-14.

Gascon E, Klauser P, Kiss JZ, Vutskits L: Potentially toxic effects of anaesthetics on the developing central nervous system. *Eur J Anaesthesiol.* 2007; 24(3):213-24.

Granger RE, Campbell EL, Johnston GA: (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors. *Biochem. Pharmacol.* 2005 Apr 1; 69(7):1101-11.

Gurdon JB, Lane CD, Woodland HR, Marbaix G.: Use of frog eggs and oocytes for the study of messenger RNA and its translation in living cells. *Nature* 1971 Sep 17; 233(5316):177-82.

Häberlein H, Tschiersch KP, Boonen G, Hiller KO: Chelidonium majus L.: components with in vitro affinity for the GABA_A receptor. Positive cooperation of alkaloids, *Planta Med.* 1996 Jun; 62(3): 227-31.

Hadingham KL, Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Kemp JA, Palmer KJ, Wilson AW, Wilcox AS, Sikela JM, Ragan CI et al. Role of β subunit in determining the pharmacology of human γ -aminobutyric acid type A receptors. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44:1211-1218.

Heberlein A, Bleich S, Kornhuber J, Hillemacher T: Benzodiazepin dependence: causalities and treatment options. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2009 Jan; 77(1):7-15.

Hevers W, Luddens H: The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes. *Mol Neurobiol* 1998; 18:35-86.

Hille, 1992 Hille, B. Ionic channels in excitable membranes. 2nd ed. Sunderland, Mass. Sinauer Associates, Inc. 1992.

Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA: Ginkgolides, diterpene trilactones of *Ginkgo biloba*, as antagonists at recombinant

alpha1beta2gamma2L GABAA receptors. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jun 28; 494(2-3):131-8.

Ipser JC, Stein DJ, Hawkrigde S, Hoppe L: Pharmacotherapy for anxiety disorders in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009 Jul 8; (3):CD005170.

Ivics L, Sands TTJ, Fishkin N, Nakanishi K, Kriegstein AR, Stromgaard K: Terpene trilactones from *Ginkgo biloba* are antagonists of cortical glycine and GABA(A) receptors. *J. Biol. Chem.* Dec 2003; Vol. 278, Issue 49, 49279-49285.

Johnston GA: GABA_c receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci.* 1996 Sep; 17(9):319-23.

Kananura C, Haug K, Sander T, Runge U, Gu W, Hallmann K, Rebstock J, Heils A, Steinlein OK: A splice-site mutation in *GABRG2* associated with childhood absence epilepsy and febrile convulsions. *Arch Neurol* 2002, 59:1137-1141.

Kanematsu T, Mizokami A, Watanabe K, Hirata M: Regulation of GABA(A)-receptor surface expression with special reference to the involvement of GABARAP (GABA(A) receptor-associated protein) and PRIP (phospholipase C-related, but catalytically inactive protein). *J Pharmacol Sci.* 2007 Aug; 104(4):285-92.

Kash TL, Jenkins A, Kelley JC, Trudell JR, Harrison NL: Coupling of agonist binding to channel gating in the GABA A receptor. *Nature Publishing Group* 2003 Jan16; 421(6920):272-5.

Kash TL, Trudell JR, Harrison NL: Structural elements involved in activation of the gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor. *Bioch Soc Trans* 2004;32:540-6.

Kavvadias D, Sand P, Youdim KA, Oaiser MZ, Rice-Evans C, Baur R, Sigel E, Rausch WD, Riederer P, Schreier P: The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand

with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects. *Br. J. Pharmacol.* Jul 2004; 142(5):811-20.

Kloda JH, Czajkowski C: Agonist-, antagonist-, and benzodiazepine-induced structural changes in the alpha1 Met113-Leu132 region of the GABAA receptor. *Mol Pharmacol.* 2007 Feb; 71(2):483-93.

Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Sieghart W, Hering S: Pharmacological properties of gaba a receptors containing gamma1 subunits. *Mol. Pharmacol.* 2006 Feb; 69(2):640-9.

Khom S, Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S: Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*; 2007 Jul; 53:178-187.

Koch BC, Nagtegaal E, Kewrkhof GA, Wee PM: Circadian sleep-wake rhythm disturbances in end-stage renal disease. *Nat. Rev. Nephrol.* 2009 Jul; 5:407-416.

Korpi ER, Gründer G, Lüddens H: Drug interactions at GABA_A receptors. *Prog Neurobiol.* 2002 Jun;67(2):113-59.

Lambert JJ, Belelli D, Peden DR, Vardy AW, Peters JA: Neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *Prog Neurobiol Sep.* 2003; 71(1): 67-80.

Leinmüller: Steroidhormone im Zentralnervensystem: Auf der Suche nach verträglichen Anxiolytika. *Dtsch. Aerzteblatt* 1996; 93:28-29.

Leroy C, Poisbeau P, Keller AF, Nehlig A: Pharmacological plasticity of GABA(A) receptors at dentate gyrus synapses in a rat model of temporal lobe epilepsy. *J Physiol.* 2004 Jun. 1; 557(2): 473-87.

Li W, Jin X, Covey DF, Steinbach JH: Neuroactive steroids and human recombinant rho1 GABAC receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Oct; 323(1):236-47.

Lister RG, Nutt DJ: Is Ro 15-4513 a specific alcohol antagonist? Trends Neurosci 1987; 6:223-225.

Little HJ: Mechanism that may underlie the behavioural effects of ethanol. Prog Neurobiol 1991; 36:171-194.

Lovinger DM: Alcohols and neurotransmitter-gated ion channels: past present and future. Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol 1997; 356:267-282.

Löw K, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U: Molecular and Neuronal Substrate for the Selective Attenuation of Anxiety. Science 2000 Oct 6; 290(5489):131-4.

Luscher C, Jan LY, Stoffel M, Malenka RC, Nicoll RA: G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. Neuron 1997 Sep;19(3):687-95.

Macdonald RL, Gallagher MJ, Feng HJ, Kang J: GABA(A) receptor epilepsy mutations. Biochem. Pharmacol. 2004 Oct 15; 68(8):1497-506.

McCrae CS, Ross A, Stripling A, Dautovich ND: Eszopiclone for late-life insomnia. Clin Interv Aging. 2007; 2(3):313-26.

Mercado J, Czajkowski C: Charged residues in the alpha1 and beta2 pre-M1 regions involved in GABAA receptor activation. J Neurosci 2006; 26:2031-2040.

Mihic SJ, Harris RA: GABA and the GABAA receptor. Alcohol Health Res World 1997; 21:127-131.

Mintz, Bean BP: GABAB receptor inhibition of P-type Ca²⁺ channels in central neurons. Neuron 1993 May;10(5):889-98.

Möhler H: GABAA receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* 2006 May; 326:505-516.

Möhler H: GABAA receptors in central nervous system disease: anxiety, epilepsy, and insomnia. *J Recept Signal Transduct Res* 2006; 26:731-740.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 8. Auflage 2001.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Ruth P, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 9. Auflage 2008.

Narahashi T, Ma JY, Arakawa O, Reuveny E, Nakahiro M: GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol.* Dec 1994; 14(6):599-621.

Nemeroff CB: The role of GABA in the pathophysiology and treatment of anxiety disorders. *Psychopharmacol Bull* 2003; 37:133-146.

Newell JG, Czajkowski C: The GABAA receptor alpha 1 subunit Pro174-Asp191 segment is involved in GABA binding and channel gating. *J Biol Chem.* 2003 Apr 11; 278(15):13166-72.

Nutt DJ, Malizia AL: New insights into the role of GABA A-benzodiazepine receptor in psychiatric disorder. *British Journal of Psychiatry* 2001; 179:390-396.

Olsen RW, Sieghart W: GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* 2009 Jan; 56(1):141-8.

Olsen RW, Sieghart W: International Union of Pharmacology.LXX.Subtypes of γ -Aminobutyric Acid A Receptors: Classification on the Basis of Subunit Composition, Pharmacology, and Function. Update. *Pharmacol Rev.* 2008 Sep; 60(3):243-60

Owens DF, Kriegstein AR: Is there more to gaba than to synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci.* 2002 Sep3 (9):715-27.

Poncer JC, Mc Kinney RA, Gähwiler BH, Thompson SM: Either N- or P-type calcium channels mediate GABA release at distinct hippocampal inhibitory synapses. *Neuron* 1997 Mar;18(3):463-72.

Priestley CM, Williamson EM, Wafford KA, Sattelle DB: Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABA(A) receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from *Drosophila melanogaster*. *Br. J. Pharmacol.* 2003 Dec; 140(8):1363-72.

Puia MR, Santi S, Vicini S, Pritchett DB, Purdy RH, Paul SM, Seeburg PH, Costa E: Neurosteroids act on recombinant human GABA_A receptors. *Neuron.* 1990; 4: 759-765.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: *Pharmacology.* Churchill Livingstone, 5. Auflage 2003.

Richardson JE, Garcia PS, O'Toole KK, Derry JM, Bell SV, Jenkins A: A conserved tyrosine in the beta2 subunit M4 segment is a determinant of gamma-aminobutyric acid type A receptor sensitivity to propofol. *Anesthesiology* 2007; 107:412-418.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy J-M, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H: Benzodiazepin actions mediated by specific gamma-aminobutyric acidA receptor subtypes. *Nature* 1999; 401:796-800.

Rudolph U, Möhler H: GABA-based therapeutic approaches: GABA A receptor subtype functions. *Curr Opin Pharmacol.* 2006 Feb;6(1):18-23.

Sanna E, Murgia A, Casula A, Usala M, Maciocco E, Tuligi G, Biggio G: Direct activation of GABAA receptors by loreclezole, an anticonvulsant drug with selectivity for the beta-subunit. *Neuropharmacology* 1996; 35:1753-1760.

Saxena NC, MavDonald RL: Properties of putative cerebellar gamma-aminobutyric acid A receptor isoforms. *Mol Pharmacol.* 1996 Mar; 49(3):567-79.

Segura A: Preventing dependency. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 2007 Dec. 15; 42(2):7-11.

Sieghart W, Sperk G: Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem* 2002 Aug.; 2(8):795-816.

Sieghart W: Structure and pharmacology of gaba-aminobutyric acid A receptor subtypes. *Pharmacol Rev.* 1995 Jun; 47(2):181-234.

Sieghart W: Structure, pharmacology and function of GABAA receptor subtypes. *Adv Pharmacol* 2006; 54:231-63.

Sigel E: Properties of single sodium channels translated by xenopus oocytes after injection with messenger ribonucleic acid. *J Physiol.* 1987; 386:73-90.

Simon J, Wakimoto H, Fujita N, Lalande M, Barnard EA: Analysis of the set of GABA(A) receptor genes in the human genome. *J Biol Chem* 2004; 279:41422-41435.

Smith TA: Type A gamma-aminobutyric acid (GABAA) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment. *Br J Biomed Sci.* 2001; 58(2):111-21.

Somers JM, Goldner EM, Waraich P, et al.: Prevalence and incidence studies of anxiety disorders: A systematic review of the literature. *Can J Psychiatry* 2006; 51:100-3.

Steinlein OK: Genetic mechanisms that underlie epilepsy. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004 May; 5:400-408.

Tabakoff B, Hoffman PL: Alcohol addiction: an enigma among us. *Neuron* 1996; 16:909-912.

Ulrich D, Bettler B: GABA(B) receptors: synaptic functions and mechanisms of diversity. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2007 Jun; 17(3):298-303.

Van Rinjsoever C, Täuber M, Choulli MK, Keist R, Rudolph U, Mohler H, Fritschy JM, Crestani F: Requirement of alpha5-GABAA receptors for the development of tolerance to the sedative action of diazepam in mice. *J Neurosci.* 2004 Jul 28. 24(30):6785-90.

Wafford KA, Bain CJ, Whiting PJ, Kemp JA: Functional comparison of the role of gamma subunits in recombinant human gamma-aminobutyric acidA/benzodiazepine receptors. *Mol Pharmacol.* 1993 Aug; 44(2):473-42.

Wafford KA, Whiting PJ (1992) Ethanol potentiation of GABAA receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the gamma 2 subunit. *FEBS Lett* 313:113-117.

Wafford KA, Macaulay AJ, Fradley R, O'Meara GF, Reynolds DS, Rosahl TW: Differentiating the role of gamma-aminobutyric acid type A (GABAA) receptor subtypes. *Biochem Soc Trans.* 2004 Jun; 32(3):553-6.

Wagner DA, Czajkowski C: Structure and dynamics of the GABA binding pocket: A narrowing cleft that constricts during activation. *J Neurosci* 2001; 21:67-74.

Wallner M, Hanchar HJ, Olsen RW: Ethanol enhances alpha 4 beta 3 delta and alpha 6 beta 3 delta gamma-aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 Jan 6; 101(1):2-3.

Wieland HA, Luddens H, Seeburg PH: A single histidine in GABAA receptors is essential for benzodiazepine agonist binding. *J Biol Chem* 1992; 267:1426-1429.

Wingrove PB, Wafford KA, Bain C, Whiting PJ: 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* 10 May 1994; 91(10):4569-73.

Wingrove PB, Thompson SA, Wafford KA, Whiting PJ: Key amino acids in the gamma subunit of the gamma-aminobutyric acidA receptor that determine ligand binding and modulation at the benzodiazepine site. *Mol Pharmacol* 1997; 52:874-881.

Yee BK, Keist R, von Boehmer L, Studer R, Benke D, Hagenbuch N, Dong Y, Malenka RC, Fritschy JM, Bluethmann H, Feldon J, Mohler H, Rudolph U: A schizophrenia-related sensorimotor deficit links alpha 3-containing GABAA receptors to a dopamine hyperfunction. *Proc Natl Acad Sci* 2005; 102:17154-17159.

Zhu WJ, Wang JF, Krueger KE, Vicini S: δ Subunit inhibits neurosteroid modulation of GABA_A receptors. *J. Neurosci.* 1996; 16:6648-6656.

Zhu Y, Ripps H, Oian H: A single amino acid in the second transmembrane domain of GABA rho receptors regulates channel conductance. *Neurosci Lett.* 2007 May 17; 418(2):205-9.

9. LEBENSLAUF

Angaben zur Person

Nachname/ Vorname **NOVAK Maria**
Staatsangehörigkeit Österreich
Geburtsdatum 03.03.1982
Familienstand ledig
Geburtsort Schwarzach im Pongau
Hauptwohnsitz Bahnhofstraße 10, 5500 Bischofshofen

Berufserfahrung

Daten	Juni 2008 – Juli 2008 Praktikum am Institut für Ernährungswissenschaften
Beruf und Funktion	Mitarbeit am österr. Ernährungsbericht 2008
Wichtige Tätigkeiten und Zuständigkeiten	Literaturrecherchen und Verarbeitung von Daten aus Verzehrerhebungen mittels Access-Nährwertdatenbank auf Basis des Bundeslebensmittelschlüssels
Name und Adresse des Arbeitgebers	IfEW-Institut für Ernährungswissenschaften, Althanstraße 14, 1090

Daten	Mai 2006 - August 2007 Praktikum bei ÖTI
Beruf oder Funktion	Mitarbeiter der Abteilung Chemie
Wichtigste Tätigkeiten und Zuständigkeiten	pH-Messungen, Formaldehyd-Nachweis(qualit. und quant.), Echtheitsbestimmungen, Asche, Farbmessungen,...
Name und Adresse des Arbeitgebers	ÖTI-Institut für Ökologie, Technik und Innovation, Spengergasse 20, 1050 Wien

Schul- und Berufsbildung

Daten	Seit SS 2003 Studium der Ernährungswissenschaften an der Uni Wien 2002-2003 Studium der Psychologie an der Uni Wien 1997-2002 HBLA Elisabethinum in St. Johann/Pg. 1994-1997 Gymnasium in St. Johann/Pg. 1992-1994 Hauptschule in Bischofshofen 1988-1992 Volksschule in Bischofshofen
Bezeichnung der erworbenen Qualifikation	2003 Ausbildung zum Ernährungstrainer an der Vitalakademie (Modul 1) 2002 Matura 2001 Diplom zur bestandenen Servier- und Kochprüfung 2001 ECDL Führerschein

Persönliche Fähigkeiten und Kompetenzen

Muttersprache(n)	Deutsch
Sonstige Sprache(n)	Englisch (in Wort und Schrift), Italienisch und Französisch (Grundkenntnisse)
Führerschein(e)	B
