



universität
wien

DIPLOMARBEIT / DIPLOMA THESIS

Titel der Diplomarbeit / Title of the Diploma Thesis

„Pharmakologische Charakterisierung von ausgewählten
Pflanzenextrakten und Dehydroabietinsäure-Derivaten an
GABA_A-Rezeptoren und GLIC“

verfasst von / submitted by

Verena Eber

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2018 / Vienna, 2018

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von / Supervisor:

Univ. Prof. Dr. Steffen Hering

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	5
1. Einleitung.....	9
1.1. Pentamere Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (pLGIC)	9
1.1.1. Bedeutung	9
1.1.2. Aufbau und Struktur	10
1.1.3. Mechanismus der Aktivierung	11
1.2. γ -Aminobuttersäure (GABA)	13
1.2.1. Bedeutung	13
1.2.2. Biosynthese.....	14
1.2.3. Anwendungsgebiete.....	16
1.3. Der GABA _A -Rezeptor und ausgewählte pLGICs	16
1.3.1. GABA _A -Rezeptor.....	16
1.3.2. Homooligomere GABA _A -Rezeptoren	19
1.3.2.1. GABA _A β_1 - und β_3 -Homopentamere	19
1.3.2.2. GABA _A ρ -Homopentamere	21
1.3.3. <i>Gloeobacter violaceus</i> Liganden-gesteuerter Ionenkanal (GLIC).....	21
1.3.4. <i>Erwinia chrysanthemi</i> Liganden-gesteuerter Ionenkanal (ELIC)	22
1.3.5. Glutamat-aktivierter Chloridionenkanal (GluCl)	22
1.4. Ausgewählte Liganden am GABA _A -Rezeptor	23
1.4.1. Benzodiazepine.....	23
1.4.2. Anästhetika.....	26
1.4.3. Barbiturate.....	27
1.4.4. Z-Drugs	29
1.4.5. Ethanol	29
1.4.6. Picrotoxin.....	31
1.4.7. Bicucullin	32
1.4.8. Valerensäure	32
1.4.9. Dehydroabietinsäure	33
2. Zielstellungen	34
3. Material und Methoden	36
3.1. Oozytenpräparation.....	36
3.2. Vorbereitung der cRNA.....	37
3.3. Injektion der vorbereiteten cRNA	37
3.4. Probenvorbereitung.....	38
3.5. Elektrophysiologische Experimente	38
3.6. Perfusionssystem	40

3.7.	Auswertung der Ergebnisse	41
3.8.	Statistik	42
4.	Ergebnisse.....	43
4.1.	GABA-Sensitivität von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	43
4.2.	Modulation von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch ausgewählte Pflanzenfraktionen	46
4.3.	Untereinheiten-spezifische Modulation von GABA _A -Rezeptoren durch Dehydroabietinsäure-derivate	48
4.3.1.	DHAA	49
4.3.2.	DH12-3	50
4.3.3.	DH20-1	51
4.3.4.	DH13-1	52
4.4.	Aktivität von DHAA an homooligomeren GABA _A - β_3 -Rezeptoren	53
4.5.	GLIC	55
5.	Diskussion	57
5.1.	Wirkung von Fraktionen einer traditionell verwendeten südafrikanischen Pflanze auf GABA _A -Rezeptoren	57
5.2.	Wirkung von DHAA und Derivaten auf GABA _A -Rezeptoren	59
5.2.1.	DHAA	59
5.2.2.	DHAA-Derivate	59
5.3.	Untersuchungen am homooligomeren GABA _A - β_3 -Rezeptor und GLIC.....	60
5.3.1.	Homooligomerer GABA _A - β_3 -Rezeptor	61
5.3.2.	GLIC	61
5.4.	Schlussfolgerung	62
6.	Danksagung	63
	Abbildungsverzeichnis.....	64
	Tabellenverzeichnis.....	67
	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

BZD	Benzodiazepine
cRNA	Copy-RNA
DEPCS	Diethylpyrocarbonat
DHAA	Dehydroabietinsäure
DH12-3	12-Hydroxy-Dehydroabietinsäure
DH13-1	18-Hydroxy-Ferruginol
DH20-1	12-Carboxy-Sugiol
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECD	Extrazelluläre Domäne
EC _{max}	maximaler GABA-Effekt
EC ₃₋₇	GABA-Konzentration, die 3-7% des maximalen GABA-Effekts auslöst
EC ₅₀	GABA-Konzentration, die 50% des maximalen GABA-Effekts auslöst
ELIC	<i>Erwinia chrysanthemi</i> Liganden-gesteuerter Ionenkanal
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GABA	γ-Aminobuttersäure
GABA _A -R	γ-Aminobuttersäure-Rezeptor Typ A
GABA _B -R	γ-Aminobuttersäure-Rezeptor Typ B
GABA-T	GABA-Transaminase
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAT	GABA-Transporter
GLIC	<i>Gloeobacter violaceus</i> Liganden-gesteuerter Ionenkanal
Glu-Cl	Glutamat-aktivierter Chloridionenkanal
Gly-R	Glycinrezeptor
HWZ	Halbwertszeit
I _{GABA}	GABA-induzierter Chloridstrom
n	Anzahl der Messungen
n _H	Hill-Koeffizient

nACh-R	nikotinischer Acetylcholinreceptor
pLGIC	Pentamerer Liganden-gesteuerter Ionenkanal
PTX	Picrotoxin
SEM	Standardfehler
SSA-DH	Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase
TMD	Transmembranäre Domäne
V20-V27	Fraktionen
ZNS	Zentrales Nervensystem
5-HT ₃ -R	Serotoninrezeptor

Zusammenfassung

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, der aus fünf Untereinheiten aufgebaut ist und damit zu den pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanälen (pLGICs) zählt. Der Rezeptor wird durch GABA geöffnet und kann durch zahlreiche Liganden aus verschiedenen Strukturklassen moduliert werden, einschließlich durch pharmakologisch und klinisch wichtige Arzneimittel wie Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden, Inhalations- und intravenöse Anästhetika und Krampfmittel. Diese werden zur Behandlung zahlreicher neuropsychiatrischer Störungen wie Angst, Depression, Schizophrenie oder Epilepsie eingesetzt.

GABA_A-Untereinheiten weisen jedoch eine sehr spezifische Verteilung im Hirn und ZNS insgesamt auf verbunden mit unterschiedlichen physiologischen Funktionen der resultierenden pentameren Rezeptorsubtypen. Das führt zu zahlreichen unerwünschten Wirkungen von den bislang eingesetzten unselektiven Arzneistoffen. Es besteht deshalb ein Interesse, Rezeptorsubtyp-selektive GABA_A-Modulatoren zu entwickeln. Dabei können Naturstoffe pflanzlichen Ursprungs als Quelle neuer Grundstrukturen dienen. Die Entwicklung Subtyp-selektiver Arzneimittel kann auch durch die Identifikation der Bindungsstellen sowie das Verständnis der Mechanismen von GABA_A-Rezeptoren gefördert werden. Besondere Bedeutung erlangten hierfür der homooligomere GABA_A-β₃-Rezeptor, die prokaryotischen Rezeptoren von *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) und von *Gloeobacter violaceus* (GLIC) sowie der eukaryotische Glutamat-aktivierte pLGIC von *Caenorhabditis elegans* (Glu-Cl). Diese konnten bereits kristallisiert werden und die Strukturinformationen zur Erforschung von homologen GABA_A-Rezeptoren herangezogen werden.

Die Diplomarbeit kann in drei Teile unterteilt werden:

Teil 1

Das erste Ziel war es, sieben Fraktionen (V20-V27) einer traditionell verwendeten südafrikanischen Pflanze auf ihre GABA_A-Rezeptor-modulierenden Eigenschaften zu untersuchen. Drei dieser Fraktionen zeigten eine positive allosterische Modulation an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren und könnten somit interessante Substanzen für die Entwicklung neuer Arzneistoffe enthalten. Es sind weitere Fraktionierungen zur Identifizierung dieser potentiell aktiven Substanzen erforderlich.

Teil 2

DHAA ist ebenfalls eine Substanz pflanzlichen Ursprungs, deren positiv-modulierende Aktivität am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptor bereits festgestellt werden konnte. Um deren Subtyp-selektive Eigenschaften beurteilen zu können, wurde sie im Rahmen dieser Diplomarbeit an unterschiedlichen Rezeptor-Subtypen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) getestet. Des Weiteren wurden auch ausgewählte Derivate von DHAA an diesen Rezeptoren untersucht. Auch wenn keine Rezeptor-Selektivität von DHAA festgestellt werden konnte und auch kein Derivat eine verbesserte Wirkung im Vergleich zu DHAA zeigte, bleibt DHAA eine interessante Grundstruktur für die Entwicklung neuer GABA_A-Modulatoren.

Teil 3

Im letzten Teil der Diplomarbeit wurde DHAA an dem homooligomeren GABA_A- β_3 -Rezeptor sowie am bakteriellen Homolog GLIC getestet. DHAA aktivierte den β_3 -Rezeptor, während sie GLIC inhibierte.

Zusammenfassend hat diese Arbeit GABA_A-Rezeptor-modulierende Eigenschaften von Pflanzenextraktfraktionen einer südafrikanischen Pflanze beschrieben, welche für die weitere Fraktionsschritte interessant sein könnten. Darüber hinaus konnten wichtige Informationen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung von DHAA-Derivaten an GABA_A-Rezeptoren erhalten und inhibitorische Wirkungen von DHAA auf das bakterielle pLGIC-Mitglied GLIC festgestellt werden.

Abstract

The GABA_A receptor is a ligand-gated ion channel composed of five subunits and, thus, belongs to the superfamily of pentameric ligand-gated ion channels (pLGICs). The receptor is activated by GABA and can be modulated by numerous compounds from various structural classes, including pharmacologically and clinically important drugs such as benzodiazepines, barbiturates, neurosteroids, inhalational and intravenous anesthetics and convulsants. These drugs are used in the treatment of various neuropsychiatric disorders such as anxiety, depression, schizophrenia, or epilepsy.

Nevertheless, GABA_A subunits have a very specific regional and cellular distribution and, therefore, different physiological effects. Unselective targeting of these receptors by commonly used drugs leads to numerous undesirable effects. Thus, developing compounds with subunit-selective GABA_A modulating properties are considered to cause less side effects. Natural products of plant origin represent an unexploitable source for novel chemical scaffolds. The development of subtype-selective drugs can also be promoted by identifying binding sites as well as by understanding the exact mechanism of allosteric GABA_A receptor modulation. Homooligomeric GABA_A-β₃-receptors, prokaryotic receptors of *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) and of *Gloeobacter violaceus* (GLIC) as well as eukaryotic glutamate-gated pLGICs of *Caenorhabditis elegans* (Glu-CI) are of particular importance for this purpose. These receptors can be expressed and crystallized more easily and are used for research because of their high sequence homology to physiological GABA_A receptors.

This thesis consists of three major parts:

Part 1

The first part focussed on the investigation of seven fractions of a plant extract (V20-V27) of a traditionally used South African plant for GABA_A receptor modulating properties. Three of these fractions showed positive allosteric modulation of GABA_A receptors potentially containing interesting ligands for the development of novel lead compounds. However, further fractionation steps are required to identify potentially active substances.

Part 2

In the second part, DHAA, a promising natural compound with a diterpenoid scaffold was investigated. Its positive I_{GABA} modulating activity of the $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ receptor was recently determined. Here, DHAA was tested on different receptor subtypes ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) in order to study potential subunit-selective properties. In addition, selected derivatives of DHAA were studied on these receptors in order to gain important structure-activity information. Introduction of hydrophilic residues on different positions of the ring scaffold reduced the I_{GABA}-modulatory effect suggesting that mainly hydrophobic effects contribute to I_{GABA}-potentiation of DHAA.

Part 3

In the last part of this thesis, DHAA was tested on homooligomeric pLGICs GABA_A- β_3 -receptor as well as on the bacterial member GLIC. DHAA showed activation on the β_3 -receptor, but inhibited proton-induced activation of the GLIC channel.

In summary, the work has determined plant extract fractions with activity on GABA_A receptors that might be interesting for further fractionation steps. In addition, information on structural requirements for activity on different GABA_A receptors was provided and inhibitory effects of DHAA on the bacterial pLGIC member GLIC were determined.

1. Einleitung

1.1. Pentamere Liganden-gesteuerte Ionenkanäle (pLGIC)

1.1.1. Bedeutung

Die physiologische und pathophysiologische Gehirnfunktion hängt im Wesentlichen von einem Gleichgewicht zwischen Erregung und Hemmung von Neuronen ab (Gravielle, 2018). Dabei spielen die pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanäle (pLGICs) eine entscheidende Rolle, da sie durch Umwandlung chemischer Signale in eine elektrische Antwort eine schnelle synaptische Kommunikation vermitteln (daCosta and Baenziger, 2013). Ihre biologische Funktion besteht darin, einen spezifischen Neurotransmitter zu binden, der zur Öffnung eines intrinsischen Kanals führt. Dieser leitet passiv Ionen durch die Membran, wodurch eine Depolarisation bzw. Hyperpolarisation der Zelle ausgelöst wird (Nemecz et al., 2016). Diese schnelle Transduktion findet ubiquitär an nahezu allen Synapsen im zentralen und peripheren Nervensystem statt (daCosta and Baenziger, 2013). pLGICs tragen damit zu allen Funktionen des zentralen Nervensystems (ZNS) bei, wie sensorische und motorische Verarbeitung, zentrale autonome Steuerung, Gedächtnis und Aufmerksamkeit sowie Schlaf, Schmerz, Angst und Emotionen (Nemecz et al., 2016). Daher führt auch eine Dysfunktion oder Mutation dieser Rezeptoren zu zahlreichen ZNS-Störungen einschließlich Hyperplexie, Myasthenia gravis, Epilepsie, Nikotin- und Alkoholsucht, Schizophrenie sowie Alzheimer- und Parkinsonerkrankungen (Sauguet et al., 2015).

1.1.2. Aufbau und Struktur

Die Familie der pLGICs umfasst einerseits die anionischen Glycin- (GlyRs) und γ -Aminobuttersäure Typ A-Rezeptoren (GABA_A -Rs), andererseits die kationischen nikotinischen Acetylcholin- (nACh-Rs) und Serotonin-Rezeptoren (5-HT_3 -Rs; Sauguet et al., 2015). Auch in niedrigeren Organismen sind die pLGICs weit verbreitet, so wurden sie erst kürzlich in Bakterien und Archäen entdeckt (Nemecz et al., 2016). Diese konnten einfacher exprimiert und kristallisiert werden, wodurch zusätzliche Einblicke in die Struktur der pLGICs gewonnen werden konnten (daCosta and Baenziger, 2013). Besondere Wichtigkeit erlangten hierbei die Röntgenkristallstrukturen der zwei prokaryotischen Rezeptoren von *Erwinia chrysanthemi* (ELIC) und von *Gloeobacter violaceus* (GLIC) sowie des eukaryotischen Glutamat-aktivierten pLGIC von *Caenorhabditis elegans* (Glu-Cl; Sauguet et al., 2015).

Alle Mitglieder der pLGIC-Familie nehmen eine ähnliche quartäre Struktur an, die aus fünf Untereinheiten gebildet wird (daCosta and Baenziger, 2013). Die Mehrheit der Rezeptoren setzt sich aus unterschiedlichen Untereinheiten zu Heteropentameren zusammen, nur die Minderheit der Untereinheiten kann funktionelle Homopentamere bilden. Seit der ersten Isolation eines pLGICs konnten in Wirbeltieren mehr als 40 Gene identifiziert werden, die für diese Untereinheiten codieren. Dadurch kann eine große Anzahl von Rezeptoren mit unterschiedlicher Untereinheitszusammensetzung erzeugt werden. Weiters tragen Splice-Varianten verschiedener Gene zusätzlich zur Komplexität der pLGIC-Familie bei (Nemecz et al., 2016).

Jede Untereinheit der pLGICs besteht aus einer N-terminalen extrazellulären Domäne (ECD) und einer transmembranären Domäne (TMD; daCosta and Baenziger, 2013). Die ECD ist zu einem β -Sandwich gefaltet, der aus einem inneren und einem äußeren β -Sheet besteht und durch hydrophobe Reste stabilisiert wird. Die verbindenden Schleifen sind

nicht nur entscheidend für die quaternäre Struktur sondern auch für die Bindung des Agonisten und die Übertragung des Signals an die TMD (Sauguet et al., 2015). Die TMD besteht aus vier Membran-überspannenden α -Helices (M1-M4). Dabei formt die M2- α -Helix jeder Untereinheit die Ionenkanalpore, die M4- α -Helix steht der Lipid-Doppelschicht gegenüber (daCosta and Baenziger, 2013). Wie bei der ECD spielen die verbindenden Schleifen vor allem die M2-M3-Schleife, die sich aktiv an der Signaltransduktion beteiligt, eine wichtige Rolle für die Funktion des Ionenkanals. Die eukaryotischen pLGICs beinhalten zusätzlich eine intrazelluläre Domäne (Sauguet et al., 2015) und eine konservierte Schleife umgeben von zwei Cystein-Resten. Deshalb werden die eukaryotischen pLGICs auch als „Cys-loop Rezeptoren“ bezeichnet (daCosta and Baenziger, 2013).

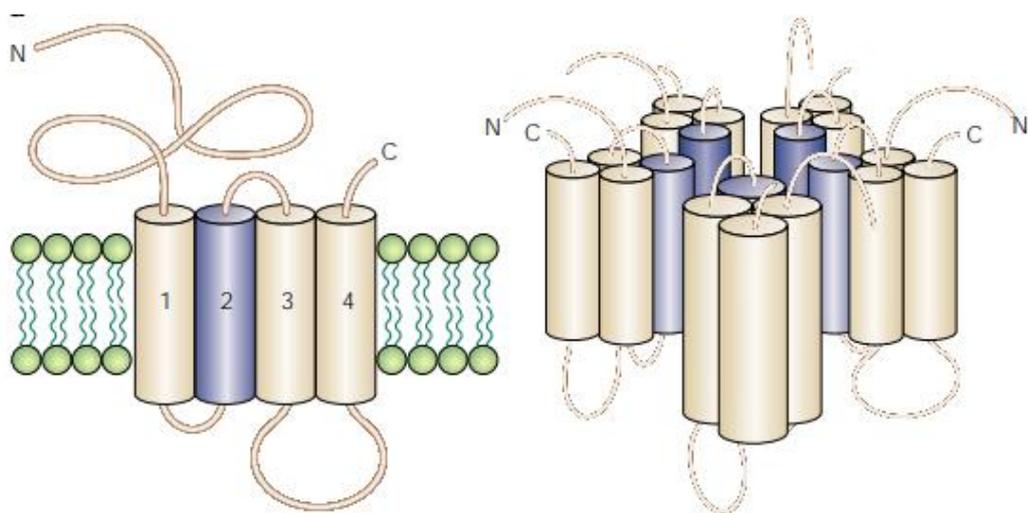


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines pentameren Ligandengesteuerten Ionenkanals (Moss and Smart, 2001)

1.1.3. Mechanismus der Aktivierung

PLGICs unterliegen Agonisten-induzierte Konformationsübergänge: von ruhender zur offenen und dann zur desensibilisierten Konformation (daCosta and Baenziger, 2013). Dieser Mechanismus wird durch eine Kopplung zwischen quartärer Verdrillung und dem Öffnen bzw. Schließen der Ionenkanalpore erreicht (Calimet et al., 2013).

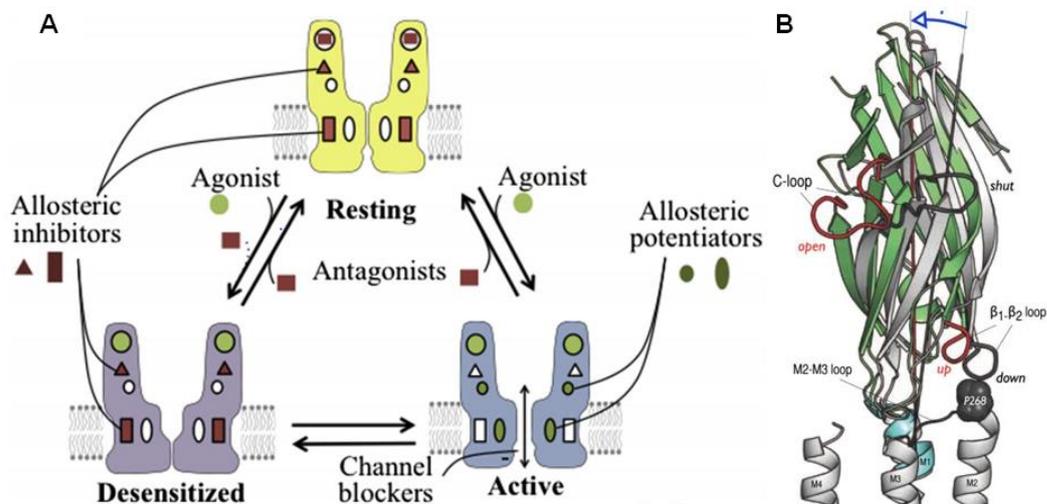


Abbildung 2: (A) Agonist-induzierte Konformationsübergänge (Sauguet et al., 2015) (B) Essentielle Strukturen für Gating-Mechanismus (Calimet et al., 2013)

Durch die Bindung bzw. Loslösung eines Agonisten kommt es zu einer Umorientierung des β -Sandwiches der ECD. Das führt im Anschluss zu einer Neupositionierung der β_1 - β_2 -Schleife in der ECD-TMD-Schnittstelle. Bei der Öffnung des Rezeptors, bewegt sich die Spitze der β_1 - β_2 -Schleife in die untere Position. Dadurch entsteht eine sterische Barriere, die hauptsächlich auf der Seitenkette von Valin in Position 45 (V45) zurückzuführen ist. Diese verhindert, dass sich die M2-M3-Schleife nach innen bewegt, wodurch der Kanal offen bleibt. Wird der Rezeptor deaktiviert, bewegt sich die Spitze der β_1 - β_2 -Schleife in die obere Position. Das erleichtert die Passage der voluminösen Seitenkette von Prolin in Position 268 (P268, an der M2-M3-Schleife) vorbei an V45 in Richtung der Ionpore. P268 vermittelt daher die einwärts-gerichtete Verschiebung der M2-M3-Schleife. Das heißt, die Umpositionierung der β_1 - β_2 -Schleife führt zu einer Bewegung der M2-M3-Schleife und damit zur Verkipfung der M2-Helix, die die Größe der Pore steuert (Calimet et al., 2013).

1.2. γ -Aminobuttersäure (GABA)

1.2.1. Bedeutung

γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde erstmals 1910 im biologischen Gewebe entdeckt. Erst 40 Jahre später konnte sie im Säugerhirn nachgewiesen werden, wodurch das Interesse an ihrer potenziellen neurochemischen Bedeutung stieg (Bowery and Smart, 2006). Seit den frühen 1970er-Jahren gilt sie als der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem, da sie eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der neuronalen Erregbarkeit spielt (Ben-Ari et al., 2012). Ihre Wirkung entfaltet GABA über zwei unterschiedliche GABA-Rezeptoren: GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren (Kalueff and Nutt, 2007).

GABA_A-Rezeptoren sind ionotrop und bilden Homo- oder Heteropentamere. Fünf Untereinheiten bilden einen Ionenkanal (Wassef et al., 2003) und können durch einen erhöhten Cl⁻-Einstrom zu einer schnellen Hyperpolarisation des Membranpotentials führen (Bowery and Smart, 2006). Im Gegensatz dazu sind GABA_B-Rezeptoren metabotrop und Heterodimere. Die zwei Untereinheiten B1 und B2 bestehen aus je sieben Membran-überspannenden Domänen (Kalueff and Nutt, 2007). Mittels second Messenger (G-Protein) ist der GABA_B-Rezeptor mit K⁺- und Ca²⁺-Kanälen gekoppelt (Wassef et al., 2003). Die K⁺-Kanäle bewirken durch einen gesteigerten K⁺-Fluss über die Neuronenmembran eine langsame Hyperpolarisation des Membranpotentials (Bowery and Smart, 2006). Hingegen wird die Ca²⁺-Freisetzung durch die Aktivierung des GABA_B-Rezeptors verringert und damit auch die GABA-Freisetzung reduziert. Das bedeutet GABA_B-Rezeptoren führen über die Ca²⁺-Kanäle zu einer negativen Rückkopplung und Autoregulation von GABA (Wassef et al., 2003).

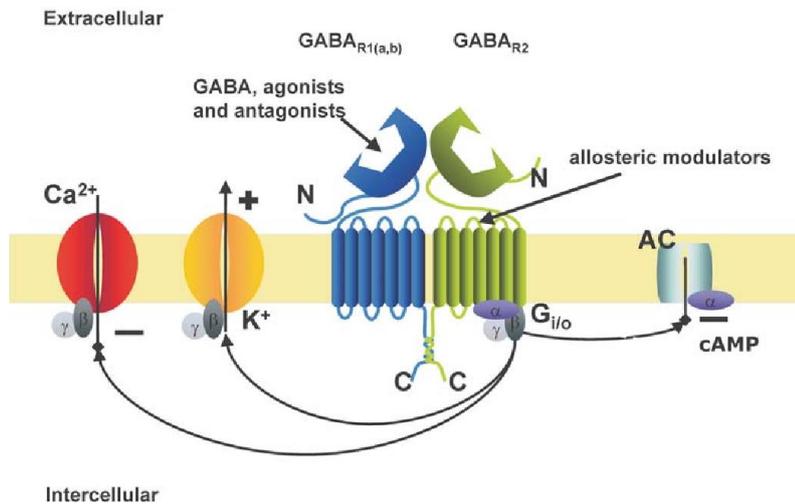


Abbildung 3: Schematische Darstellung des GABA_B-Rezeptors (Filip and Frankowska, 2008)

Sowohl GABA_A- also auch GABA_B-Rezeptoren sind damit entscheidend für eine normale Gehirnfunktion wie Schlaf, Gedächtnis und verschiedene Emotionen (Kalueff and Nutt, 2007).

1.2.2. Biosynthese

Die γ -Aminobuttersäure (GABA) wird von GABAergen Neuronen im Gehirn synthetisiert und exprimiert. Außerdem enthalten auch Astrozyten eine beachtliche Menge an GABA (Yoon et al., 2012).

GABA wird durch die Decarboxylierung aus Glutamat gebildet (Yoon et al., 2012). Diese enzymatische Reaktion wird durch das Enzym Glutamat-Decarboxylase (GAD) katalysiert (Brambilla et al., 2003). Man unterscheidet zwei Isoformen von GAD mit unterschiedlichen Molekulargewichten (65 und 67kD; Petroff, 2002). Deren Vorkommen ist abhängig von der Gehirnregion, vom Neuronentyp und vom subzellulären Kompartiment. Im Allgemeinen ist GAD67 zuständig für die generelle metabolische Aktivität, während sich GAD65 der Synthese von GABA für die synaptische Übertragung widmet (Yoon et al., 2012). GABA wird nach seiner Bildung in den synaptischen Spalt freigesetzt, wo sie als inhibitorischer Neurotransmitter an GABA_A- oder GABA_B-Rezeptoren wirkt

(Brambilla et al., 2003). Anschließend wird sie über die Na⁺- und Cl⁻-abhängigen GABA-Transporter (GAT) aus dem synaptischen Spalt in die präsynaptische Membran wieder aufgenommen. Es wird zwischen den drei unterschiedlichen GABA-Transporter unterschieden: GAT1 und GAT3, die hauptsächlich in den Astrozyten exprimiert werden, sowie GAT2, der für die Wiederaufnahme von GABA in die Neuronen zuständig ist (Yoon et al., 2012).

Nach der Aufnahme in die Astrozyten wird GABA mittels der GABA-Transaminase (GABA-T) zu Succinat-Semialdehyd metabolisiert und anschließend mit der Succinat-Semialdehyd-Dehydrogenase (SSA-DH) zu Bernsteinsäure oxidiert. Diese durchläuft den Krebs-Zyklus und wird hierbei zu Glutamat metabolisiert. Die Glutamin-Synthetase katalysiert die Bildung von Glutamin aus Glutamat, das über spezifische Transporter in die Neuronen gelangt. Dort entsteht aus Glutamin wiederum Glutamat, wodurch sich der Zyklus schließt (Brambilla et al., 2003).

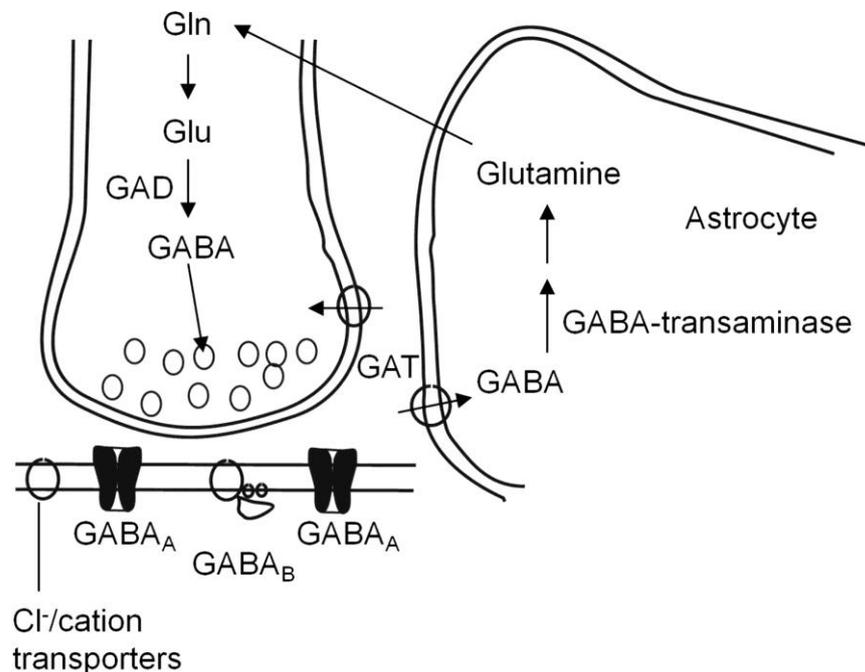


Abbildung 4: Biosynthese der γ -Aminobuttersäure (Uusi-Oukari and Korpi, 2010)

GABA kann aber auch direkt in die Neuronen aus dem synaptischen Spalt aufgenommen werden. Dort durchläuft sie entweder der gleichen Transformation wie in den Astrozyten oder kann auch direkt in Vesikel aufgenommen werden und somit unmittelbar für die synaptische Übertragung bereit stehen (Brambilla et al., 2003).

1.2.3. Anwendungsgebiete

Der γ -Aminobuttersäure (GABA) wurde 1980 erstmals eine wichtige Rolle bei Störungen der Gehirnaktivität zugeschrieben (Kalueff and Nutt, 2007). Dabei besagt die ‚GABA-Hypothese‘, dass ein Mangel an der GABAergen inhibitorischen synaptischen Übertragung zu einer synchronen Übererregbarkeit des Gehirns führt (Fritschy et al., 1999). Daher können Wirkstoffe, die an GABAergen Synapsen wirken, nützlich sein, um klinische Manifestationen von Gehirnaktivitätsstörungen wie Angst, Depressionen (Kalueff and Nutt, 2007), Schizophrenie (Wassef et al., 2003) und Epilepsie (Fritschy et al., 1999) zu lindern. Die Aktivität von GABA kann durch verschiedene Prozesse moduliert werden: Liganden können die GAD-vermittelte GABA-Synthese steigern (z.B. VPA), die Wiederaufnahme von GABA verringern (z.B. Tiagabin) sowie den Abbau von GABA durch die GABA-Transaminase verhindern (z.B. Vigabatrin; Wassef et al., 2003). Zusätzlich dienen GABA_A- und GABA_B-Rezeptoren als Angriffspunkte für eine Vielzahl von Mediatoren (Kalueff and Nutt, 2007).

1.3. Der GABA_A-Rezeptor und ausgewählte pLGICs

1.3.1. GABA_A-Rezeptor

1950 wurde der erste GABA_A-Rezeptor entdeckt und konnte seitdem in 20-50% der Synapsen im Gehirn identifiziert werden. Dessen Aufgabe ist es, in einer Millisekunde auf das Binden von GABA durch die Öffnung des transmembranären Kanals zu reagieren, wodurch die neuronale Aktivität

im adulten Hirn supprimiert wird (Zhu et al., 2018). Wie wirksam eine inhibitorische GABAerge Synapse in Hinblick auf die Verringerung der Zellanregung ist, ist stark abhängig von der Untereinheiten-zusammensetzung des Rezeptors (Mortensen et al., 2012). Im Menschen werden diese Untereinheiten durch 19 unterschiedliche Gene codiert: α_1 - α_6 , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π und ρ_{1-3} (Miller and Aricescu, 2014). Dadurch wird ein gewaltiger Spielraum für die Rezeptor-Diversität geschaffen (~500.000 Möglichkeiten). Dennoch scheinen *in vivo* nur 20-30 funktionell unterschiedliche Rezeptor-Zusammensetzungen zu existieren (Mizielinska et al., 2006), wobei die vorherrschende synaptische Isoform aus zwei α_1 -, zwei β_2 - und einer γ_2 -Untereinheit besteht (Zhu et al., 2018). Zur Begrenzung der Rezeptor-Diversität muss daher ein definierter Signalweg auf der Ebene der Rezeptorbiogenese existieren. Innerhalb des Lumens des endoplasmatischen Reticulums (ER) überwachen Chaperon-Proteine die Genauigkeit der Proteinfaltung und -anordnung. Während des Zusammenbaus wird der Rezeptor mit ER-Retentionssignalen markiert, wodurch die Genauigkeit der Zusammensetzung und Transportfähigkeit von Rezeptoren sichergestellt wird. Untereinheiten, die nicht zusammengesetzt wurden, erlangen keine Transportkompetenz und werden im ER degradiert (Mizielinska et al., 2006).

Die Mindestanforderung für die Produktion eines GABA-aktivierten Ionenkanals ist entweder eine Co-Expression von α - und β -Untereinheiten oder eine Expression von ρ -Untereinheiten (Mizielinska et al., 2006). Der Grund besteht darin, dass die Bindung von GABA an den Rezeptor nur an der Schnittstelle zwischen einer α - und einer β -Untereinheit oder an einer ρ -Untereinheit erfolgen kann (Hackam et al., 1997). Daher bestehen die meisten synaptischen Rezeptoren aus zwei α - und zwei β -Untereinheiten sowie einer zusätzlichen γ -Untereinheit, während extrasynaptische eine zusätzliche δ -Untereinheit enthalten (Mizielinska et al., 2006). Zusätzlich beinhalten extrasynaptische Rezeptoren meist spezifische α -Untereinheiten, wie zum Beispiel α_4 in Körnerzellen im Gyrus dentatus des Hippocampus oder α_6 in

Körnerzellen des Cerebellums. Das dient dazu, dass die extrasynaptischen Rezeptoren eine höhere GABA-Potenz aufweisen als die synaptischen Rezeptoren, die mit einer Untereinheitenkombination von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ die am wenigsten potenten Rezeptoren darstellen. Dadurch können sich GABA_A-Rezeptoren an Umgebungen mit unterschiedlicher GABA-Konzentration anpassen (Mortensen et al., 2012).

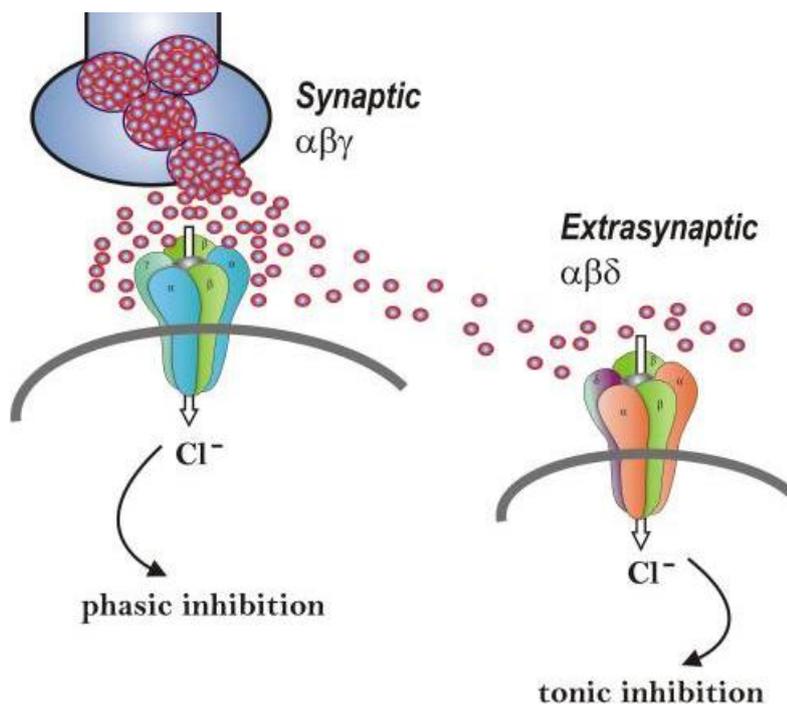


Abbildung 5: Unterschied zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren (Reddy, 2011)

Außerdem sind die Untereinheiten in verschiedenen Gehirnregionen unterschiedlich stark exprimiert, wodurch die Bindung von Modulatoren wie z.B. Benzodiazepinen unterschiedliche Effekte auslösen können (Hood et al., 2014). So kommen α_1 -Untereinheiten hoch konzentriert im Kortex, Thalamus und Kleinhirn vor (Griffin et al., 2013). Eine Bindung von Modulatoren löst demnach sedative und amnestische Effekte aus (Hood et al., 2014). Hingegen wird die α_2 -Untereinheit hauptsächlich im limbischen System, in den Motorneuronen und dem Dorsalhorn exprimiert, wodurch sowohl anxiolytische als auch muskelrelaxierende

Effekte herbeigeführt werden können (Griffin et al., 2013). GABA_A-Rezeptoren, die eine α_3 - und α_5 -Untereinheiten enthalten, tragen ebenfalls zu einer Muskelrelaxation bei, während Rezeptoren mit einer α_5 -Untereinheit auch die zeitliche und räumliche Erinnerung modulieren (Tan et al., 2011). Dementsprechend besteht ein großes Interesse darin, Rezeptorsubtyp-selektive Arzneimittel zu entwickeln, um den gewünschten klinischen Effekt ohne die unerwünschten Nebeneffekte zu erzielen (Hood et al., 2014).

1.3.2. Homooligomere GABA_A-Rezeptoren

Von allen 19 GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten können nur die drei ρ -Untereinheiten, die β_3 -Untereinheit sowie zu einem geringeren Grad die β_1 -Untereinheit homooligomere Rezeptoren bilden (Seeger et al., 2012).

1.3.2.1. GABA_A β_1 - und β_3 -Homopentamere

Die Kristallstruktur der β_3 -homomeren Rezeptoren konnte bereits aufgeklärt werden und stellen somit ideale Modelle zur Erforschung von GABA_A-Rezeptoren dar (Miller and Aricescu, 2014). So bieten sie die Möglichkeit die Spezifität von pharmakologischen Substanzen sowie die Struktur und Funktion von β -Untereinheiten zu untersuchen (Simeone et al., 2011). Im Säugerhirn konnten Sie aber wegen fehlender geeigneter Werkzeuge noch nicht identifiziert werden. Dennoch kann aufgrund ihrer einfachen Formierung *in vitro* ihre Existenz nicht ausgeschlossen werden (Seeger et al., 2012).

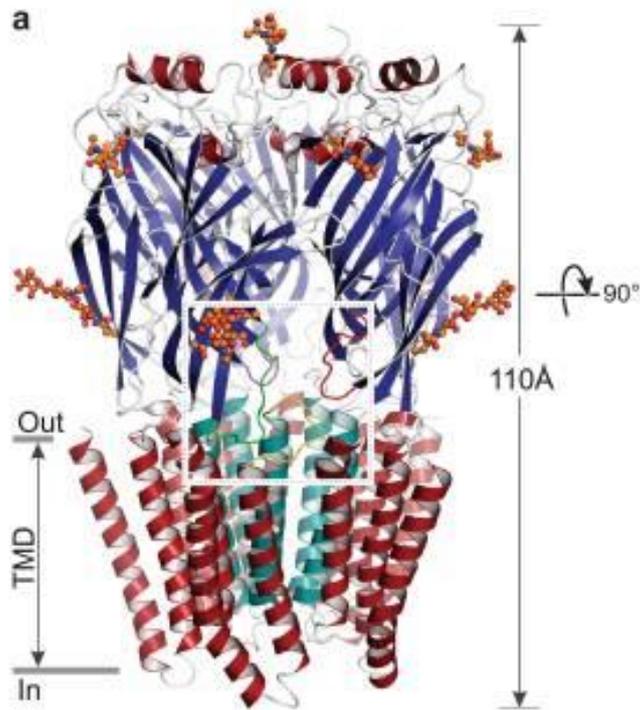


Abbildung 6: Röntgenkristallstruktur des β_3 -Homopentamers (Miller and Aricescu, 2014)

β -homomere Rezeptoren können durch GABA nicht aktiviert und durch Benzodiazepine nicht moduliert werden (Seeger et al., 2012). Zusätzlich besitzen sie ein hyperpolarisiertes Ruhepotential, verringerte Eintrittswiderstände, erhöhte Halteströme und Picrotoxin-induzierte Auswärtsströme. Weiters kann es zu einer Expression von β -Homomeren kommen, deren Kanal spontan, das heißt nicht Liganden-vermittelt, öffnet (Simeone et al., 2011). Dennoch tragen sie wie die heterooligomeren $GABA_A$ -Rezeptoren allosterische Bindungsstellen für Anästhetika, wie Etomidat und Propofol, sowie Barbituraten, wie Pentobarbital. Neben der GABAergen Pharmakologie, können β_3 -Rezeptoren auch durch Histamin aktiviert werden und durch Histamin-Rezeptor-Antagonisten wie Thioperamid blockiert werden (Seeger et al., 2012).

1.3.2.2. GABA_A ρ-Homopentamere

Die Untereinheiten ρ_1 und weniger effizient auch ρ_2 und ρ_3 haben die Fähigkeit robuste homooligomere Rezeptoren zu bilden (Sarto-Jackson and Sieghart, 2008). Sie wurden erstmals in den Interneuronen des Rückenmarks entdeckt, kommen aber in zahlreichen Regionen des Säugerhirns sowie in der Retina vor (Enz and Cutting, 1998). ρ -Homomere formen funktionelle GABA-geöffnete Cl⁻-Kanäle mit ähnlicher Aminosäuresequenz wie die heterooligomeren GABA_A-Rezeptoren (Hackam et al., 1997). Trotz dieser Homologie ist die Struktur und Pharmakologie der homomeren einfacher als die der heteromeren Rezeptoren (Naffaa et al., 2017). Jede ρ -Untereinheit des Rezeptors besitzt eine eigene GABA-Bindungsstelle, wodurch der Rezeptor sensitiver ist als heteromere Rezeptoren (Hackam et al., 1997). Allerdings ist seine Leitfähigkeit für Cl⁻-Ionen geringer und damit auch dessen Ströme kleiner. Hingegen ist die Öffnungszeit verlängert, wodurch sie langsamer desensibilisieren (Enz and Cutting, 1998). Im Gegensatz zu den heterooligomeren GABA_A-Rezeptoren sind sie außerdem nicht sensitiv für Bicucullin, Barbiturate und Benzodiazepine (Hackam et al., 1997).

1.3.3. *Gloeobacter violaceus* Liganden-gesteuerter Ionenkanal (GLIC)

Der *Gloeobacter violaceus* Liganden-gesteuerter Ionenkanal (GLIC) ist ein prokaryotischer Rezeptor, der eine hohe Ähnlichkeit zu den eukaryotischen pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanälen aufweist (Hilf and Dutzler, 2009). Er wird isoliert aus dem Cyanobakterium *Gloeobacter violaceus*, dem der Rezeptor zur Anpassung an den extrazellulären pH-Wert dient (Alqazzaz et al., 2011). Daher kann GLIC im Gegensatz zu den eukaryotischen Rezeptoren nur durch Protonen aktiviert werden. Außerdem ist GLIC ein kationischer Kanal, der nach seiner Aktivierung nicht desensibilisiert (Bocquet et al., 2009). Auch strukturell weisen die Rezeptoren Unterschiede auf: Die ausgedehnte

intrazelluläre Region zwischen der α_3 - und der α_4 -Helix im eukaryotischen Rezeptor, ist im prokaryotischen Protein durch eine kleine Schleife ersetzt (Hilf and Dutzler, 2009). Weiters fehlt GLIC die Disulfidbrücke und damit die Cys-Schleife der eukaryotischen Rezeptoren. Trotz der geringen Sequenz-Homologie von 20% sind viele funktionell wichtige strukturelle Merkmale zwischen den Proteinen ident (Alqazzaz et al., 2011).

1.3.4. *Erwinia chrysanthemi* Liganden-gesteuerter Ionenkanal (ELIC)

Der *Erwinia chrysanthemi* Liganden-gesteuerter Ionenkanal (ELIC) ist wie GLIC ein bakterielles Homolog des eukaryotischen Cys-loop ligand-gated ion channels (Thompson et al., 2012). In Bezug auf Sequenz und Länge ist er ident zum bakteriellen Ortholog GLIC und weist auch zum eukaryontischen nACh-Rezeptor eine Sequenzidentität von 16% auf (Hilf and Dutzler, 2008). Trotzdem unterscheidet sich ELIC pharmakologisch stark von GLIC und den Cys-loop-Rezeptoren. Wie GLIC fehlen auch ELIC die N-terminale α -Helix, die intrazelluläre Domäne sowie die Disulfidbrücke (Thompson et al., 2012). Er vermittelt auch Kationen-selektive Ströme, differenziert aber nicht zwischen den verschiedenen einfach-geladenen Kationen wie Na^+ , K^+ und Cs^+ (Hilf and Dutzler, 2008). Außerdem kann ELIC im Gegensatz zu GLIC durch primäre Amine einschließlich GABA aktiviert und durch Benzodiazepine moduliert werden (Spurny et al., 2012). ELIC wird durch zahlreiche nicht-kompetitive GABA_A-Antagonisten inhibiert, was vermutlich an der hohen Sequenzidentität zum eukaryotischen Rezeptor in der M2-Region (60%) der Rezeptoren liegt (Thompson et al., 2012).

1.3.5. Glutamat-aktivierter Chloridionenkanal (GluCl)

Der eukaryotische Glutamat-aktivierter Chloridionenkanal (GluCl) ist ein Ionenkanal, der aus *Caenorhabditis elegans* isoliert wurde und dessen Kristallstruktur bereits aufgeklärt wurde (Naffaa et al., 2015). Dieser

Rezeptor bildet einen zylindrischen homopentameren Kanal aus α -Untereinheiten, der selektiv für Anionen (Cl^-) ist (Hibbs and Gouaux, 2011). Bis zur Veröffentlichung der atomaren Struktur von nativen GABA_A -Rezeptoren (Zhu et al., 2018) stellte GluCl ein ideales Model zur Entschlüsselung der GABA-Bindungsstelle dar (Bergmann et al., 2013). Außerdem bietet GluCl die Möglichkeit, den Mechanismus der schnellen inhibitorischen Übertragung und allosterischen Modulation von Cys-loop Rezeptoren zu verstehen (Hibbs and Gouaux, 2011). Das wird durch die hohe Sequenzidentität zwischen GluCl und GABA_A erreicht, die in der Bindungstasche bei 48% liegt (Bergmann et al., 2013). Weiters enthält GluCl im Gegensatz zu den prokaryotischen Rezeptoren die Disulfidbrücke und damit die Cys-Schleife, die in den eukaryotischen Rezeptoren hoch konserviert ist (Hibbs and Gouaux, 2011).

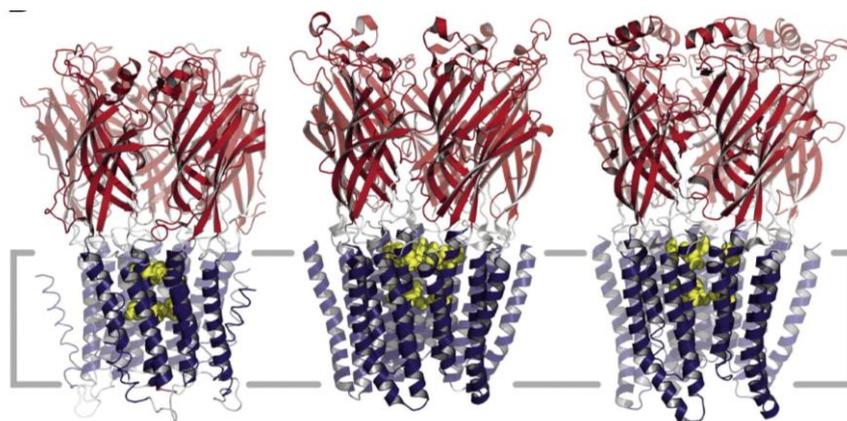


Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur von ELIC, GLIC und Glu-CI (daCosta and Baenziger, 2013)

1.4. Ausgewählte Liganden am GABA_A -Rezeptor

1.4.1. Benzodiazepine

1959 kam das erste Benzodiazepin (BZD) auf den Markt und stellte einen Meilenstein der modernen Psychopharmakologie dar. Innerhalb kürzester Zeit wurden viele weitere Benzodiazepine entwickelt und sie zählen heute

zu den am meisten verschriebenen Arzneimittel in den Vereinigten Staaten (Hood et al., 2014). Eingesetzt werden sie zur Therapie von Angst- und Schlafstörungen, zur Muskel-Relaxation sowie zur Befreiung von Spastik und bei Epilepsie. Außerdem werden sie auch aufgrund ihrer amnestischen und anxiolytischen Eigenschaften intraoperativ verwendet (Griffin et al., 2013).

Benzodiazepine sind Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren und werden grob in drei Gruppen eingeteilt: Die positiven allosterischen Modulatoren (=Agonisten), die negativ allosterischen Modulatoren (=inverse Agonisten) und die neutralen allosterischen Modulatoren (=Antagonisten) (Tan et al., 2011). Die klassischen Benzodiazepine (z.B. Diazepam) sind positive allosterische Modulatoren, die durch eine Konformationsänderung die Effekte von GABA verstärken (Hood et al., 2014). Dadurch vermitteln sie ihre charakteristische sedative, anxiolytische, muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirkung (Sigel and Lüscher, 2011). Gegenteilige Effekte werden durch die negativen allosterischen Modulatoren am GABA_A-Rezeptor (z.B. Ro15-4543) verursacht, die die Affinität von GABA verringern. Dadurch wirken sie anxiogen und prokonvulsiv. Antagonisten (Flumazenil) binden ebenfalls an den Rezeptor, aber ohne die Affinität von GABA zu verändern. Sie können aber bei Benzodiazepin-Überdosierungen verwendet werden, da sie mit allosterischen Modulatoren um die BZD-Bindungsstelle konkurrieren (Tan et al., 2011).

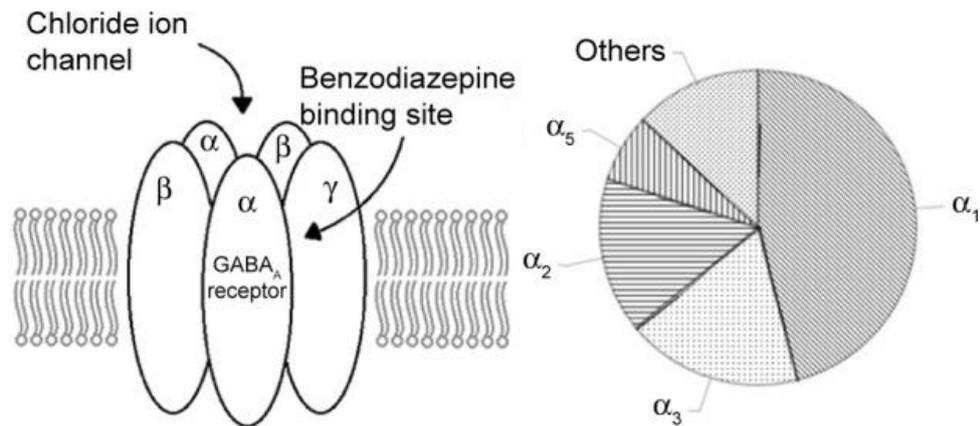


Abbildung 8: Bindungsstelle von Benzodiazepinen am GABA_A-Rezeptoren (Cheng et al., 2018)

Eine weitere Möglichkeit Benzodiazepine zu charakterisieren ist anhand ihrer Pharmakokinetik. Man unterscheidet die kurz-wirksamen BZD mit einer Halbwertszeit (HWZ) von 1-12 Stunden von den mittellang-wirksamen BZD (HWZ=12-40 Stunden) und den lang-wirksamen BZD mit einer HWZ von 40-250 Stunden (Griffin et al., 2013). Im Allgemeinen gilt eine kurzfristige Therapie mit BZD als effektiv und sicher, während eine längerfristige Therapie umstritten ist. So kann schon eine geringe Dosierungen eine anterograde Amnesie hervorrufen und sich innerhalb kürzester Zeit eine Toleranz und physische Abhängigkeit entwickeln (Tan et al., 2011). Wird die Therapie unterbrochen, äußert sich diese Abhängigkeit in moderaten bis schweren Entzugserscheinungen wie Angst oder Angst-Symptome, Wahrnehmungsverzerrungen und schweren Nebenwirkungen (z.B. Epilepsie; Hood et al., 2014).

Benzodiazepine binden in eine Bindungstasche, die aus einer α_1 -, α_2 -, α_3 - oder α_5 - und einer γ -Untereinheit gebildet wird (Hood et al., 2014). Essentiell für die Wirkung von Benzodiazepinen ist ein spezifischer Histidin-Rest (H101) in der α_1 -Untereinheit, sowie die homologen Reste innerhalb der α_2 -, α_3 - oder α_5 -Untereinheit (H101, H126 und H105). Da die α_4 - sowie die α_6 -Untereinheit an dieser kritischen Stelle einen Arginin- statt eines Histidin-Restes enthält, sind Rezeptoren mit diesen

Untereinheiten unempfindlich gegenüber Benzodiazepinen (Tan et al., 2011).

1.4.2. Anästhetika

Seit über 165 Jahren werden Allgemeinanästhetika für die Narkose bei diversen Operationen eingesetzt (Chiara et al., 2012). Ihre Pharmakologie ist einzigartig, da eine Reihe von unterschiedlichen Molekülen diese Aktivität besitzt: einfache Gase, Alkohole, Alkane, Ether, Barbiturate, Steroide und andere organische Verbindungen. Zahlreiche neuronale Ionenkanäle konnten bereits identifiziert werden, über die Allgemeinanästhetika ihre Wirkung vermitteln (Forman, 2010). Dabei hemmen sie häufig Agonist-induzierte Ströme von Kationen-leitenden pLGICs (z.B. exzitatorische nACh-Rs) und/oder potenzieren die Funktion von Anionen-leitenden pLGICs (z.B. GABA_A-Rs; Kinde et al., 2016). Anästhetika, die an einem ähnlichen Set an Ionenkanälen wirken, besitzen ähnliche klinische Eigenschaften. Zu den wichtigsten Wirkungen, die von allen Allgemeinanästhetika ausgehen, gehören Amnesie, Hypnose (Bewusstlosigkeit) und Immobilisierung. Andere Effekte, wie beispielsweise Analgesie, variieren hingegen stark unter den verschiedenen Anästhetika-Gruppen (**siehe Abbildung 9**; Forman, 2010).

	Group 1	Group 2	Group 3
Drugs	Etomidate, Propofol, Alphaxalone	Barbiturates Halogenated Alkanes & Ethers	Nitrous Oxide, Xenon, Ketamine, Cyclopropane
Ratio of MAC-Immobility : MAC-Hypnosis	4+	2-3	1.5-2
Analgesia	None	None	Yes
Organ Protection	None	Ischemic Preconditioning	Yes (xenon)
EEG effects	Reduced Frequency	Reduced Frequency	Minimal change or increased frequency
Molecular Targets	GABA _A receptors HCN1 (propofol)	GABA _A receptors, Glycine receptors Neuronal nAChRs 2PK channels Glutamate Receptors Others	Glutamate receptors Neuronal nAChRs 2PK channels Others

Abbildung 9: Korrelation zwischen klinischem Profil und molekularen Zielen von Allgemeinanästhetika (Forman, 2010)

Zu den Vertretern der GABA_A-Rezeptor-Modulatoren gehören Propofol und Etomidat. Sie sind potente intravenöse amnestische/hypnotische Drogen (Forman, 2010), die ihre Wirkung über die Potenzierung von GABA-induzierten Ströme vermitteln. In hohen Konzentrationen sind sie außerdem in der Lage, den Rezeptor auch ohne Anwesenheit von GABA direkt aktivieren (Desai et al., 2009). Ihre Bindungstasche befindet sich in der TMD an der Grenzfläche zwischen der β - und der α -Untereinheit. Zwei Aminosäurereste konnten identifiziert werden, die für die Bindung entscheidend sind: Methionin in der M1-Helix der α -Untereinheit (α Met-236) sowie Methionin in der M3-Helix der β -Untereinheit (β Met-286, Li et al., 2006). Außerdem scheint die Position 265 in der M2-Helix der β -Untereinheit entscheidend für die Sensitivität der beiden Anästhetika zu sein (Desai et al., 2009). Durch diese Aminosäure ist die Bindung der Anästhetika stark von der Untereinheitenzusammensetzung des GABA_A-Rezeptors abhängig (Chiara et al., 2012). So können GABA_A-Rezeptoren mit einer β_2 - oder β_3 -Untereinheit, die einen Asparagin-Rest an der Position 265 haben, moduliert werden. Im Gegensatz dazu hat die β_1 -Untereinheit einen Serin-Rest an der Position 265, das die stark verringerte Aktivität an β_1 -haltigen Rezeptoren erklären könnte (Desai et al., 2009).

1.4.3. Barbiturate

Barbiturate wurden in den ersten Jahrzehnten des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckt und rasch weltweit als Sedativa und allgemeine Anästhetika verwendet (Oakley et al., 2012). Ihre Wirkung üben Barbiturate über eine Vielzahl von Ionenkanälen aus (**siehe Abbildung 9**), einschließlich inhibitorische Kanäle (Forman, 2010). Unter anderem binden sie auch an GABA_A-Rezeptoren im Gehirn, dabei konnte ihre genaue Bindungsstelle jedoch noch nicht identifiziert werden (Löscher and Rogawski, 2012). Es gilt jedoch als gesichert, dass sie im Gegensatz zu den Benzodiazepinen keine spezifische Untereinheitenzusammensetzung benötigen, sondern im Wesentlichen von β -

Untereinheiten abhängig sind (Greenfield, 2013). Dabei scheinen die M2- und M3-Helix sowie der Aminosäurerest Methionin 286 der β -Untereinheit eine Rolle zu spielen (Löscher and Rogawski, 2012).

Barbiturate können drei unterschiedliche konzentrationsabhängige Wirkungen am GABA_A-Rezeptor verursachen (Löscher and Rogawski, 2012): In niedrigen Konzentrationen binden Barbiturate als allosterische Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren und potenzieren dadurch die Aktivität von GABA (Feng and Macdonald, 2010). Dies führt zur antikonvulsiven und anxiolytischen Wirkung sowie zur Sedierung, Hypnose und Anästhesie (Löscher and Rogawski, 2012). Bei höheren Konzentrationen können sie auch in Abwesenheit von GABA zu einer direkten Aktivierung von GABA_A-Rezeptoren führen (Feng and Macdonald, 2010). In noch höheren Konzentrationen wird der Ionenfluss durch den Kanal vollständig blockiert (open-channel block; Löscher and Rogawski, 2012).

Aufgrund ihrer geringeren Sicherheit (z.B. Gefahr von Tod durch Atemdepression; Löscher and Rogawski, 2012) im Gegensatz zu anderen sedativen Substanzen, wurden sie heutzutage weitgehend durch andere Arzneimittel (vorwiegend Benzodiazepine) ersetzt (Oakley et al., 2012). Im Gegensatz zu Barbituraten aktivieren Benzodiazepine GABA_A-Rezeptoren in Abwesenheit von GABA nicht. Außerdem bewirken Benzodiazepine nur einen begrenzten Anstieg des Chloridstroms, während Barbiturate den Strom um ein Vielfaches erhöhen. Weiters wirken Benzodiazepine ausschließlich an GABA_A-Rezeptoren, hingegen haben Barbiturate viele zusätzliche Angriffspunkte im Gehirn und in der Peripherie. Diese Unterschiede sind Faktoren, die die höhere Sicherheit von Benzodiazepinen im Vergleich zu Barbituraten erklären (Löscher and Rogawski, 2012).

1.4.4. Z-Drugs

Zu den Z-Drugs, oder auch Nicht-Benzodiazepine genannt, zählen Alpidem, Eszopiclon, Zaleplon, Zolpidem und Zopiclon (Kishi et al., 2017). Sie galten lange Zeit als Verbesserung der traditionell verwendeten Benzodiazepine in der Behandlung von Schlafstörungen. Ihre Wirkung entfalten Z-Drugs, wie die Benzodiazepine auch, über den GABA_A-Rezeptor (Gunja, 2013a). Dabei binden sie jedoch selektiver an die α_1 -Untereinheit und weniger selektiv an die α_2 -, α_3 - und α_5 -Untereinheit (Kishi et al., 2017). Weiters ist ihre Wirkungsdauer und Halbwertszeit kürzer, wodurch sie nicht die gesamte Schlafarchitektur stören und weniger Resteffekte während der Tageszeit verursachen. Durch diese verbesserte Pharmakokinetik und selektivere Pharmakodynamik waren sie vielversprechend in Bezug auf geringere Inzidenz von Nebenwirkungen und reduziertem Potenzial für Abhängigkeit und Missbrauch (Gunja, 2013a). Dennoch haben bizarre Verhaltenseffekte wie Schlafwandeln, Autofahren im Schlaf und Halluzinationen schnell zu Warnungen über die Verschreibung, Verbreitung und Verwendung von Z-Drugs geführt. Außerdem führen sie, ähnlich wie Benzodiazepine, zu zahlreichen Nebenwirkungen wie psychomotorischer Beeinträchtigung, Stürze, Hüftfrakturen sowie anterograder Amnesie (Gunja, 2013b).

1.4.5. Ethanol

Alkohol beeinflusst die Gehirnfunktion durch eine Interaktion mit mehreren Neurotransmitter-Systemen. So kann er unter anderem das empfindliche Gleichgewicht zwischen dem inhibitorischen Neurotransmitter GABA und dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat im zentralen Nervensystem stören (Liang and Olsen, 2014). Die Wirkung von GABA wird unter Einfluss von Alkohol verstärkt und zwar einerseits durch eine erhöhte GABA-Freisetzung an der präsynaptischen Membran (Valenzuela and Jotty, 2015), andererseits durch eine allosterische Bindung von Alkohol an den GABA_A-Rezeptor (Wallner et

al., 2014). Die Sensitivität verschiedener Neuronen auf die potenzierende Wirkung von Alkohol ist wesentlich von der Untereinheitenzusammensetzung und der Phosphorylierung des GABA_A-Rezeptors abhängig (Valenzuela and Jotty, 2015). Eine Ethanol-Bindungsstelle konnte bereits an der Schnittstelle zwischen der α - und β Untereinheit in der ECD des $\alpha_{4/6}\beta_3\delta$ -GABA_A-Rezeptors beschrieben werden (Sieghart, 2015). $\alpha_{4/6}$ -Untereinheiten enthalten die Aminosäure Arginin in Position 100 (α_6 R100), die gemeinsam mit Tyrosin in Position 66 der β_3 -Untereinheit (β_3 Y66) für das Binden von Ethanol an den Rezeptor verantwortlich ist. Da Tyrosin ausschließlich in β_3 vorkommt (β_2 A66, β_1 S66) zeigt Ethanol hohe Selektivität für diese Untereinheit (Wallner et al., 2014). Auch die Gegenwart der δ -Untereinheit innerhalb des Rezeptors dürfte für die hohe Affinität zur Bindungsstelle verantwortlich sein (Sieghart, 2015).

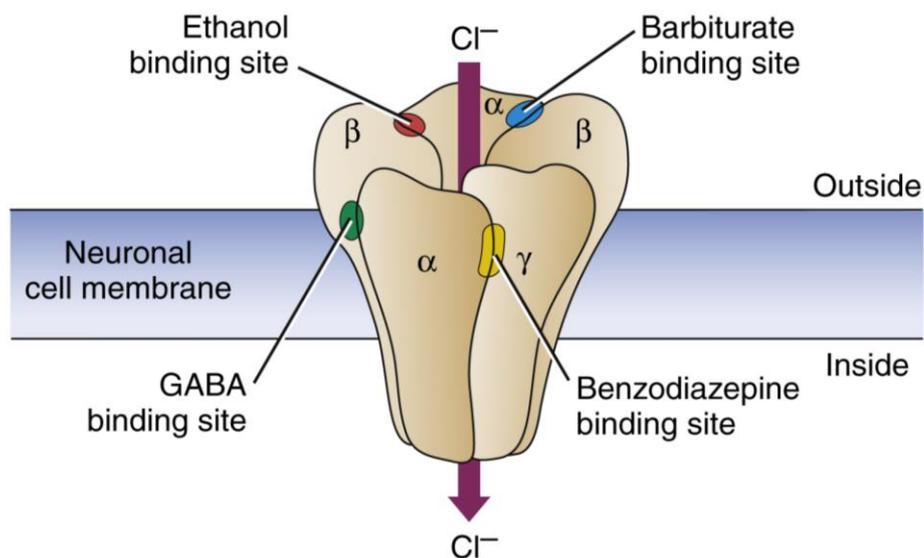


Abbildung 10: Bindungsstelle von Ethanol und Barbituraten (Themes, 2017)

Langfristige Alkoholexposition führt zu einer Verringerung der Anzahl an GABA_A-Rezeptoren in Neuronen. Diese Down-Regulation kann zu zahlreichen Alkoholentzugssymptomen wie Angst, Übererregbarkeit, Schlaflosigkeit und Krampfanfälle führen. Um diese zu mindern, können Benzodiazepine verwendet werden. Ihr Einsatz gilt aber aufgrund ihres

Suchtpotentials und ihrer mangelnden Sicherheit in Kombination mit Alkohol als problematisch (Liang and Olsen, 2014).

1.4.6. Picrotoxin

Picrotoxin (PTX) ist ein pflanzliches Toxin (Carpenter et al., 2013) bestehend aus Picrotoxinin und Picrotin. Bereits 1875 wurde ihm eine krampfauslösende Wirkung zugesagt, die hauptsächlich durch Picrotoxinin verursacht wird (50-mal potenter als Picrotin; Mehta and Ticku, 2013).

PTX bindet als nicht-kompetitiver Antagonist an den GABA_A-Rezeptor, blockiert den Kanal und stabilisiert diesen in seiner geschlossenen/desensitisierten Form (Newland and Cull-Candy, 1992). Diese Blockade des Kanals erfolgt am intrazellulären Ende des GABA_A-Rezeptors (Carpenter et al., 2013). In der M2-Helix konnten zwei Aminosäurenreste identifiziert werden, die eine wichtige Rolle für die Bindung von Picrotoxin spielen: Valin in der Position 256 der α_1 -Untereinheit sowie Leucin in der Position 253 der β_3 -Untereinheit (Buhr et al., 2001). Die β -Untereinheit ist dabei essentiell für die Selektivität von Picrotoxin (Mehta and Ticku, 2013). Bei Untersuchungen an β -Homomeren konnte am β_3 -Homomer die höchste Aktivität festgestellt werden, während die homomeren β_1 - und β_2 -GABA_A-Rezeptoren weitgehend unempfindlich gegenüber Picrotoxin waren (Carpenter et al., 2013).

Zusätzlich zur Blockade des GABA_A-Rezeptors ist Picrotoxin in der Lage Konformationsänderungen im Rezeptor auszulösen. Dies führte zur Annahme einer zweiten, allosterischen Bindungsstelle, die am extrazellulären Ende des Rezeptors liegt. Bei der Bindung von Picrotoxin geht der Kanal durch einen Knick der M2-Helices in die geschlossene Konformation über (Carpenter et al., 2013).

1.4.7. Bicucullin

Bicucullin ist ein Phthalid-Isochinolin, das erstmals 1932 aus *Dicentra cucullaria* isoliert wurde. 1970 wurde seine Wirkung als kompetitiver Antagonist am GABA_A-Rezeptor aufgeklärt (Razet et al., 2000). Das bedeutet, dass Bicucullin die Bindung von GABA an den Rezeptor vollständig hemmt und anders herum GABA die Bindung von Bicucullin vollständig hemmt. Das führt zu einer prokonvulsiven Wirkung von Bicucullin (Johnston, 2013).

Bicucullin wirkt spezifisch nur am GABA_A-Rezeptor, während GABA_B-Rezeptoren und δ -Homopentamere unempfindlich gegenüber Bicucullin sind. GABA_A-Rezeptoren, die eine α_6 -Untereinheit enthalten sind ebenfalls weniger sensitiv. Außerdem zeigten Mutationen in der ECD der α_1 -Untereinheit des $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptors (Leucin statt Phenylalanin in Position 64) eine Verringerung der Affinität von Bicucullin. Somit liegt eine funktionelle und strukturelle Assoziation der α -Untereinheit mit der Antagonistenbindungsstelle nahe (Johnston, 2013).

1.4.8. Valerensäure

Die Wurzel des Baldrians (*Valeriana officinalis*) ist eine traditionell verwendete pflanzliche Arzneidroge, die aufgrund ihrer beruhigenden und dämpfenden Wirkung auf das zentrale Nervensystem eingesetzt wird (Trauner et al., 2008).

Einen Hauptinhaltsstoff des Baldrians stellt die Sesquiterpensäure Valerensäure dar (Benke et al., 2009). Apolare Extrakte, die eine hohe Konzentration an Valerensäure aufweisen, zeigen eine starke Aktivität am GABA_A-Rezeptor (Trauner et al., 2008). Durch positive allosterische Modulation kann die Valerensäure die GABA-Sensitivität am Rezeptor erhöhen und damit sedative Effekte auslösen (Khom et al., 2007). Mittels *in vivo*-Experimenten an Mäusen konnte der Valerensäure eine lindernde

Wirkung auf Unruhe und Angstzustände zugeschrieben werden (Benke et al., 2009).

Die Valerensäure wirkt Untereinheiten-spezifisch, das bedeutet, ausschließlich an Rezeptoren, die eine β_2 oder β_3 -Untereinheit beinhalten (Khom et al., 2010). Beim Austausch der β_2 bzw. β_3 -Untereinheit durch β_1 geht der stimulierende Effekt vollständig verloren (Trauner et al., 2008). In Konzentrationen $>30 \mu\text{M}$ kann die Valerensäure den GABA_A -Rezeptor auch direkt aktivieren. Zusätzlich wurde beschrieben, dass sie in noch höheren Konzentrationen einen open-channel-Block induzieren kann (Khom et al., 2007).

1.4.9. Dehydroabietinsäure

Die Dehydroabietinsäure (DHAA) ist eine natürlich vorkommende tricyclische Diterpenmonocarbonsäure, die gemeinsam mit einer Vielzahl von anderen strukturell verwandten Verbindungen in Harzextrakten von Kiefergewächsen (*Pinaceae*) vorkommt. In hohen Konzentrationen ist sie in der Rinde enthalten, wo sie der Verteidigung gegen holzbohrende Insekten dient (Nicholson, 1994). Zusammen mit Gold und Elfenbein zählte das Harz in der Antike zu den wertvollsten Handelsgütern und wurde als Weihrauch in religiösen und kulturellen Zeremonien verwendet. Auch heute noch ist das Harz in der Chinesischen Medizin wegen seiner entzündungshemmenden, antiseptischen, wundheilenden und sedierenden Eigenschaften bekannt. An GABA_A -Rezeptoren zeigte die DHAA eine positiv modulierende Aktivität sowie eine direkte Aktivierung des Rezeptors in hohen Konzentrationen (Rueda et al., 2014).

2. Zielstellungen

γ -Aminobuttersäure (GABA) spielt eine Schlüsselrolle in der Regulation der neuronalen Übertragung im Säugerhirn und beeinflusst damit zahlreiche physiologische und psychologische Prozesse (Jembrek and Vlainic, 2015). Ein gestörtes Gleichgewicht aus exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission führt zu einer Entwicklung zahlreicher neuropsychiatrischer Störungen wie Angst, Depressionen (Kalueff and Nutt, 2007), Schizophrenie (Wassef et al., 2003) und Epilepsie (Fritschy et al., 1999; Jembrek and Vlainic, 2015). Deshalb sind GABA_A-Rezeptoren Angriffspunkte einer Vielzahl pharmakologisch und klinisch bedeutsamer Arzneimittel wie Benzodiazepine, Barbiturate, Neurosteroiden, Inhalations- und intravenöse Anästhetika und Krampfmittel (Sieghart, 2015). Eine Reihe von Verbindungen pflanzlichen Ursprungs sind ebenfalls dafür bekannt, die Funktion des ZNS zu beeinflussen. So konnten bereits Terpenoide, Polyacetylenalkohole sowie Flavonoide aus diversen Pflanzen isoliert werden, die an GABA_A-Rezeptoren binden und diese modulieren können (Johnston et al., 2006; Nilsson and Sterner, 2011).

Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb verschiedene Extrakt-Fractionen (V20, V21, V22, V23, V24, V25, V26, V27) einer ausgewählten Pflanzendroge auf ihre modulierende Aktivität am GABA_A-Rezeptor zu untersuchen, um so potenziell interessante Naturstoffe für die Entwicklung neuer Therapeutika zu entdecken. Diese Untersuchungen wurden an der Untereinheitenkombination $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ durchgeführt, da diese den häufigsten Rezeptorsubtyp im ZNS darstellt (Sieghart et al., 2012).

Ein weiteres Ziel war die Charakterisierung von DHAA, einer Substanz pflanzlichen Ursprungs aus dem Harz von *Boswellia thurifera*. Ihre positiv-modulierende Aktivität am GABA_A-Rezeptor konnte bereits festgestellt werden. Allerdings wurden die Tests nur an der Untereinheitenkombination von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ durchgeführt. Ziel dieser Arbeit

war es somit, DHAA sowie ausgewählte Derivate (12-Hydroxy-Dehydroabietinsäure, 18-Hydroxy-Ferruginol, 12-Carboxy-Sugiol) an unterschiedlichen Untereinheitenzusammensetzungen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) zu testen, um deren potentiell selektive Effekte beurteilen zu können.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war, die modulierende Aktivität von DHAA am $\text{GABA}_A\text{-}\beta_3$ -Homopentamer sowie an GLIC-Kanälen zu untersuchen.

3. Material und Methoden

Für diese Diplomarbeit wurden Oozyten des afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) als heterologes Expressionssystem verwendet. Hierbei wurde die gewünschte exogene cRNA (copy-RNA) in die intakten Oozyten injiziert und anschließend für 24-72h inkubiert. Nach erfolgreicher Expression der Membrankanalproteine wurde die Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik verwendet, um die Ionenströme bei konstant gehaltenem Membranpotential zu messen. Alle Lösungen und Substanzen (Ausnahmen sind dezidiert beschrieben) wurden von Sigma-Aldrich (Wien) bezogen.

3.1. Oozytenpräparation

Zur Gewinnung der Eizellen (Oozyten) wurde ein operativer Eingriff am adulten *Xenopus laevis*-Weibchen vorgenommen. Hierfür wurden die Frösche 20-25min in eine 0,2% Tricain-Lösung (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters, MS-222) gelegt und anästhetisiert. Anschließend wurde die Bauchdecke durch einen kleinen Schnitt geöffnet, das Follikelgewebe mit einer Pinzette entnommen und mit einer OR2-Lösung (82,5mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl₂ und 5mM HEPES in Wasser) gewaschen. Damit die Eizellen einzeln vorliegen, wurde zunächst eine mechanische Zerkleinerung, danach ein enzymatischer Verdau durchgeführt. Dazu wurden die Oozyten mit einer Lösung aus 2,2mg/ml Kollagenase in OR2 versetzt und 60 bis 90min lang inkubiert. Dabei war es wichtig, alle vorangegangenen Waschschrte sowie den Verdau mit der Ca²⁺-freien OR2-Lösung durchzuführen, um eine unspezifische Aktivierung der Kollagenase zu verhindern. Im Anschluss an den Verdau wurden die Oozyten mit der Ca²⁺-haltigen ND96-Lösung (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, und 5mM HEPES in Wasser) mehrmals gewaschen und bei 18-20 °C gelagert. Danach wurden geeignete Phase V-IV Oozyten selektiert, die für die bevorstehende Mikroinjektion benötigt wurden.

3.2. Vorbereitung der cRNA

Poly(A+)cRNA-Transkriptase von linearisierter cDNA wurden in einem pCMV Vektor kloniert. Die cRNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodieren, wurden in Diethylpyrocarbonat (DEPC) -behandeltem destillierten Wasser verdünnt.

3.3. Injektion der vorbereiteten cRNA

Nach der Selektion der Oozyten erfolgte die Mikroinjektion der vorbereiteten cRNA. Hierfür wurden die benötigten cRNAs, die für die gewünschten Untereinheiten kodieren, in unterschiedlichen Verhältnissen gemischt.

Für die Expression von Rezeptoren mit der Untereinheitenkombination $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ sowie $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ wurde ein Verhältnis von 1:1:10 verwendet. Für die Rezeptoren mit der Kombination $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ wurden die cRNAs in einem Verhältnis von 3:1:10 gemischt. Dadurch sollte die unerwünschte Ausbildung von homooligomeren β_1 -Rezeptoren vermieden werden (Krishek et al., 1996).

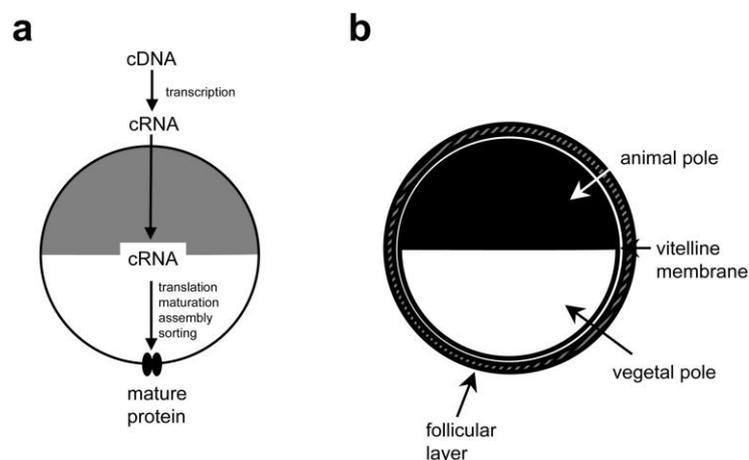


Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsprozesses eines exogenen Proteins in den Oozyten (Bianchi and Driscoll, 2006)

Anschließend wurde circa 10-50nl Nuklease-freies Wasser, die die gewünschte cRNA beziehungsweise cRNA-Mischung enthielt, in den Oozyten injiziert. Die erfolgreiche Injektion konnte durch eine geringe Größenzunahme der Oozyten kontrolliert werden. Nach der Mikroinjektion wurden die Eizellen bei 18°C in antibiotischer ND96-Lösung (1% 100U/ml Penicillin und 100ug/ml Streptomycin) für zumindest 24 Stunden inkubiert, bevor sie auf ihre Expression getestet wurden.

3.4. Probenvorbereitung

Die GABA-Kontrolllösung (1-1000µM), mit der die EC₅ der jeweiligen Untereinheitenkombination ermittelt wurde, wurde jede Woche frisch hergestellt. Hingegen wurden die zu untersuchenden Testlösungen jeden Tag frisch zubereitet.

Die Fraktionen (V20-V27) mussten zuerst für etwa 30 Minuten in einem Ultraschallbad in DMSO gelöst werden, um eine einheitliche Konzentration von 20mg/ml zu erreichen. Für die Experimente wurden die Lösungen durch Zusetzen von ND96 auf 100µg/ml verdünnt und mit einer GABA-Konzentration, die 3-7% des Maximaleffekts hervorruft (EC₃₋₇), co-appliziert.

Die DHAA und deren Derivate wurden ebenfalls mit der ND96-Lösung auf die gewünschte Konzentration verdünnt. Es wurden hierfür aufsteigende Konzentrationen von 1µM, 3µM, 10µM, 30µM, 100µM, 300µM und 1000µM hergestellt und auf ihre GABA_A-Rezeptor modulierende Aktivität getestet (EC₃₋₇).

3.5. Elektrophysiologische Experimente

Elektrophysiologische Experimente wurden mit der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik durchgeführt. Dies ist eine Methode, die es ermöglicht, Ionenströme bei einem konstanten Potential von -70mV

(Membranpotential) zu messen. Eine schematische Abbildung der Messkammer und der Position der Elektroden ist in **Abbildung 12** dargestellt:

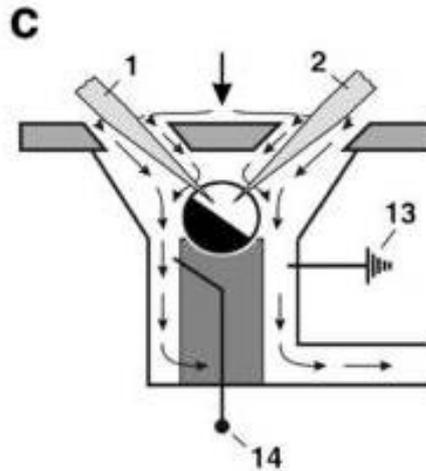


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Baburin et al., 2006)

- Spannungselektrode (2): Mit dieser Mikroelektrode wurde der Strom in den Oozyten injiziert, um das Membranpotential konstant zu halten.
- Potentialelektrode (1): Mit dieser Mikroelektrode wurden Potentialänderungen gemessen.

Die Elektroden wurden mit einer 3M KCl-Lösung gefüllt und wiesen einen elektrischen Widerstand von 1-3 M Ω auf. Sie enthielten einen Silberdraht, überzogen mit einer dünnen Schicht von AgCl₂, der eine Transmission der Signale zu einem Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC amplifier; NPI Electronics) ermöglichte. Mittels dieses Amplifiers konnte die Abweichung des tatsächlichen Potentials vom Membranpotential gemessen werden. Die erhaltenen analogen Signale wurden mittels Digitalisierer (Axon Digidata 144A interface; Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) in digitale Signale umgewandelt, die mit Hilfe der Software pCLAMP v.9.2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) erfasst und analysiert wurden.

3.6. Perfusionssystem

Die Messungen wurden unter Verwendung eines schnellen Perfusionssystems mit halbautomatischer Substanzapplikation durchgeführt (Baburin et al., 2006). Eine schematische Darstellung dieser Mikroperfusionsskammer ist in **Abbildung 13** dargestellt:

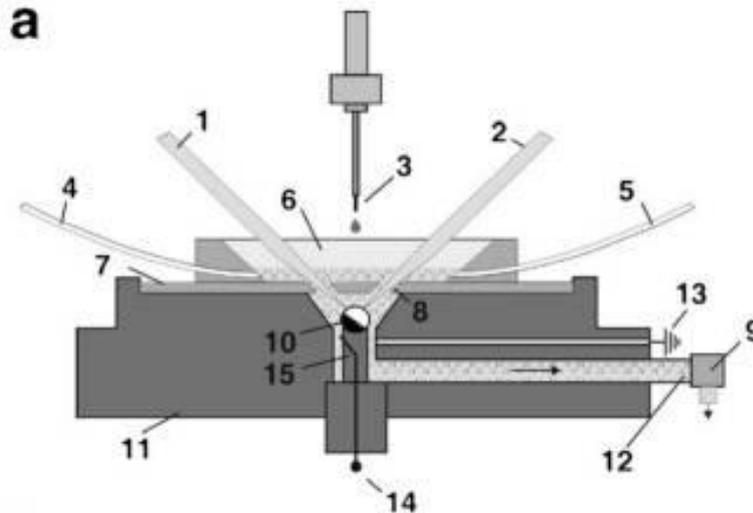


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Mikroperfusionsskammer (Baburin et al., 2006)

Die Messkammer umfasste ein Füllvolumen von 15µl und enthielt eine zylindrische Haltevorrichtung (15), in der der Oozyt (10) platziert wurde. Bedeckt wurde diese Teflonkammer durch eine Glasplatte (7), die zwei schräge Einlässe (8) für die beiden Mikroelektroden enthielt. Diese zwei Elektroden (1 und 2) wurden durch die Öffnungen seitlich in den Oozyten eingeführt und führten dadurch zusätzlich zu einer Stabilisierung des Oozyten.

Das Auftragen der vorbereiteten Proben erfolgte mit Hilfe eines automatischen Pipettierroboters (3) (TECAN Miniprep 60), der über das Programm Robosoft gesteuert wurde. Damit wurden 150µl der vorbereiteten Lösung in einen trichterförmigen Behälter (6) oberhalb der Glasplatte aufgetragen und anschließend über die Elektrodenöffnungen

(9) abgesaugt. Nach erfolgter Applikation mussten Waschperioden eingehalten werden, um eine vollständige Desensibilisierung der Membrankanalproteine zu gewährleisten. Die Länge dieser Perioden richtete sich dabei nach der Höhe der GABA- bzw. Substanz-Konzentration z.B. 1min (GABA EC₃₋₇) bis 1,5min (Co-Applikation von GABA EC₃₋₇ mit 0,1-1µM Testlösung;) bis 2,5 min (GABA EC₃₋₇ mit 3-10µM Testlösung) bis 5 min (GABA EC₃₋₇ mit 30-100µM Testlösung) bis 15 min (GABA EC₃₋₇ mit 300µM Testlösung).

3.7. Auswertung der Ergebnisse

Alle Experimente an den GABA-Kanälen mussten zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse bei einer konstanten GABA-Konzentration (EC₅₋₇) durchgeführt werden. Daher wurden zuerst GABA-Dosis-Wirkungskurven erstellt und die Parameter EC₅ und EC₅₀ ermittelt. Es handelt sich hierbei um jene Konzentrationen, bei der 5% bzw. 50% des maximalen GABA-Effekts ausgelöst werden.

Zunächst wurden Ionenströme bei aufsteigenden Konzentrationen (1-1000µM) mittels der Software Clampfit 9.2 analysiert und die Effekte mit Hilfe von Origin 7.0 analysiert. Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurve wurde folgende Formel verwendet:

$$E(\%) = \frac{I_{GABA}}{I_{max}}$$

I_{max}.....Maximalstrom hervorgerufen durch 1mM GABA (100%)

Die ermittelten Werte wurden in ein Koordinatensystem übertragen und eine sigmoidale Kurve durch die Datenpunkte erstellt. Daraus konnte die EC₅, EC₅₀ sowie der Hill-Koeffizient (n_H) ermittelt werden.

Die Modulation der Extrakte, der DHAA sowie deren Derivate wurde bei einer GABA-EC₃₋₇ untersucht. Die Verstärkung bzw. Reduktion der GABA-induzierten Chloridströme (I_{GABA}) in Prozent wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\text{Modulation } I_{GABA} (\%) = \left(\frac{I_{GABA+COMP}}{I_{GABA}} - 1 \right) * 100$$

$I_{GABA+COMP}$Substanz-induzierter Chloridstrom

I_{GABA}GABA-Kontrollstrom

Mit diesen ermittelten Werten wurden für DHAA und deren Derivate mit Hilfe von Origin 7.0 Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt und die EC₅₀ sowie der Hill-Koeffizient berechnet.

3.8. Statistik

Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit der Software GraphPad (La Jolla, USA) mittels One-way ANOVA mit Tukey's post hoc Test ermittelt. Für die Fraktionen sowie für die Ergebnisse an GLIC und am β_3 -Homomer wurden die statistischen Unterschiede mittels student's t-Test bestimmt. Alle Messergebnisse mit einem p-Wert <0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1. GABA-Sensitivität von $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$

Zur Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden alle Experimente bei einer GABA-Konzentration, die 3-7% des maximalen GABA-Effekts (EC_{3-7}) auslöst, durchgeführt. Da die verwendeten $GABA_A$ -Rezeptoren eine unterschiedliche Untereinheitenzusammensetzung und damit unterschiedliche Sensitivität aufweisen, musste dieser Wert individuell für jeden Rezeptorsubtyp ermittelt werden.

Zur Bestimmung der Sensitivität wurden GABA-Dosis-Wirkungskurven erstellt, wie in **Abbildung 15** dargestellt. Hierfür wurde GABA in aufsteigenden Konzentrationen von 0,1 bis 1000 μ M appliziert und die ausgelösten Chloridströme aufgezeichnet. Diese konnten bereits ab einer GABA-Konzentration von $\leq 1\mu$ M gemessen werden, wobei deren Amplitude mit aufsteigender GABA-Konzentration zunahm. Die Ströme erreichten an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -Rezeptoren ab einer Konzentration von etwa 100 μ M bzw. an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ - und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ - $GABA_A$ -Rezeptoren bei einer Konzentration von 300-1000 μ M ihr Maximum. Die aufgezeichneten Ströme an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sind in **Abbildung 14** dargestellt.

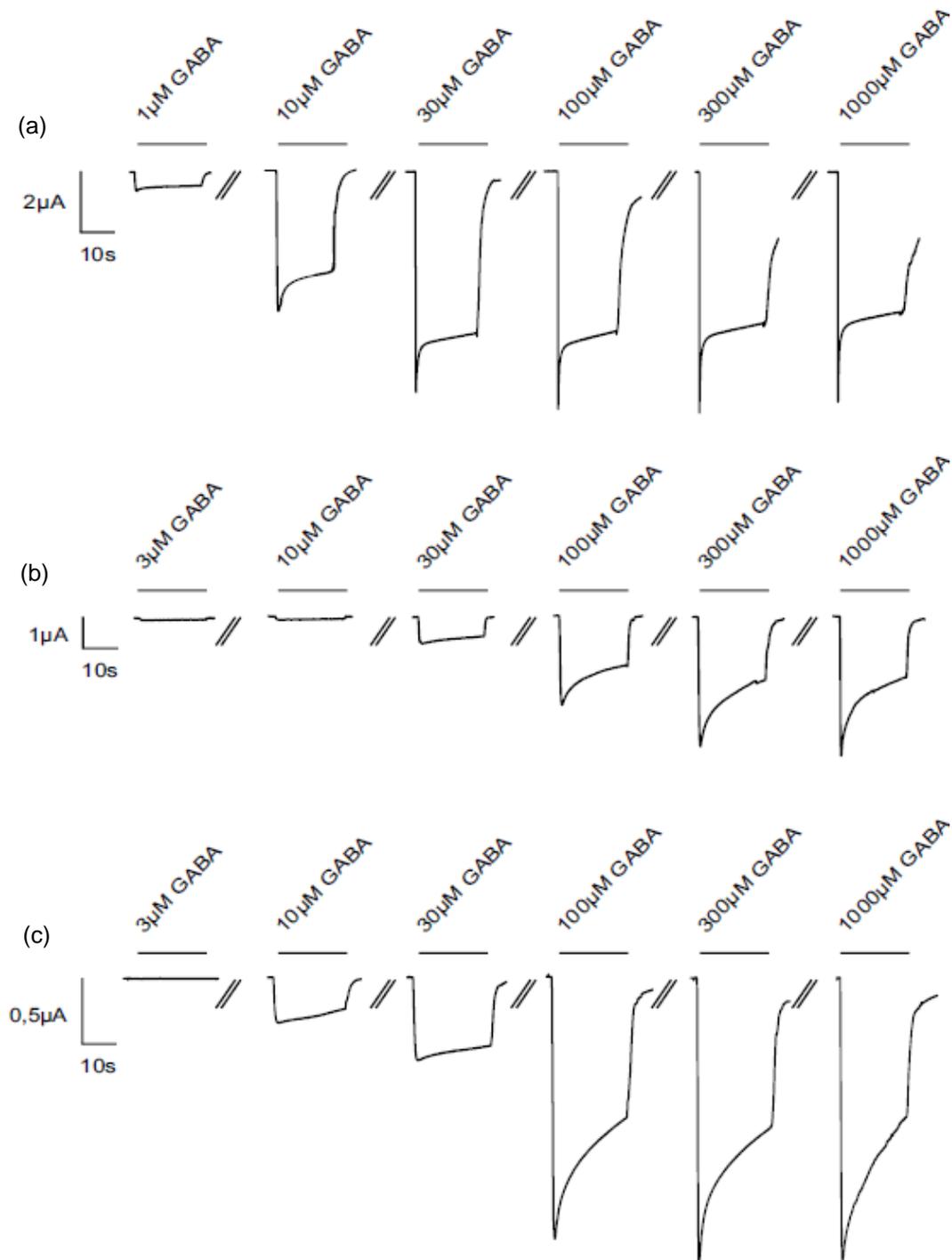


Abbildung 14: GABA-induzierte Chloridströme an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ - bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren

Nach der Normierung der jeweiligen Ströme auf den Maximalstrom, wurden die Werte in ein Koordinatensystem übertragen und eine sigmoidale Kurve erstellt (siehe 3.7). Dadurch konnten die GABA-EC₅₀ sowie der Hill-Koeffizient ermittelt werden. Die EC₅₀ betrug an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -

GABA_A-Rezeptoren $9,8 \pm 1,0 \mu\text{M}$, an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren $70,2 \pm 3,4 \mu\text{M}$ und an $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren $55,4 \pm 2,5 \mu\text{M}$. Die EC₅₀-Werte von β_2 - und β_3 -haltigen Rezeptoren waren signifikant höher als von β_1 -haltigen GABA_A-Rezeptoren (für Details siehe **Tabelle 1**).

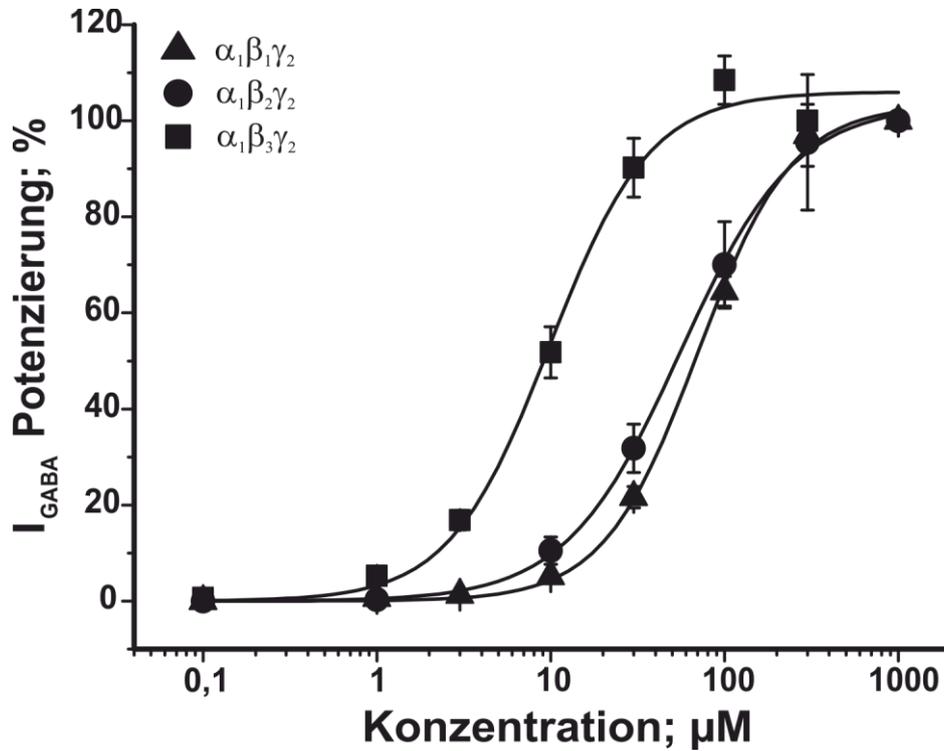


Abbildung 15: GABA-Dosis-Wirkungskurven an den angegebenen Rezeptorsubtypen

Subtyp	EC ₅₀ ; μM	Hill-Koeffizient
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	$9,8 \pm 1,0$	$1,5 \pm 0,2$
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$70,2 \pm 3,4$	$1,6 \pm 0,1$
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	$55,4 \pm 2,5$	$1,3 \pm 0,1$
Tukey's Multiple Comparison Test EC ₅₀		Signifikanz
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$		***
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$		***
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$		ns

Tabelle 1: Ermittelte Werte EC₅, EC₅₀ und Hill-Koeffizient an den angegebenen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den ermittelten EC₅₀-Werten

4.2. Modulation von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch ausgewählte Pflanzenfraktionen

Durch frühere Untersuchungen an GABA_A-Rezeptoren konnte ein GABA-modulierender Extrakt einer potentiell medizinischen Heilpflanze entdeckt werden. Durch Fraktionierung dieses Extraktes wurden sieben Fraktionen (V20-V27) gewonnen, die im Rahmen dieser Diplomarbeit getestet wurden.

Jede dieser Fraktionen wurde mindestens drei Mal auf ihre GABA-modulierende Aktivität an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren getestet (n). Anschließend wurden der jeweilige Mittelwert sowie der dazugehörige Standardfehler (SEM) berechnet. Die Ergebnisse wurden in Prozent ihrer jeweiligen Potenzierung von I_{GABA} in der **Tabelle 2** vermerkt. Statistisch signifikante Werte sind mit Sternen (*: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001) gekennzeichnet.

Die Fraktionen V23, V24 und V25 zeigten eine signifikante Modulation von I_{GABA} (V23: 67,2 ± 1,4%, n = 3; V24: 190,3 ± 14,8%, n = 3; V25: 126,4 ± 11,0%, n = 3). V24 zeigte demnach die stärkste Potenzierung am GABA_A-Rezeptor, während die übrigen Fraktionen keine signifikante Verstärkung von I_{GABA} zeigten.

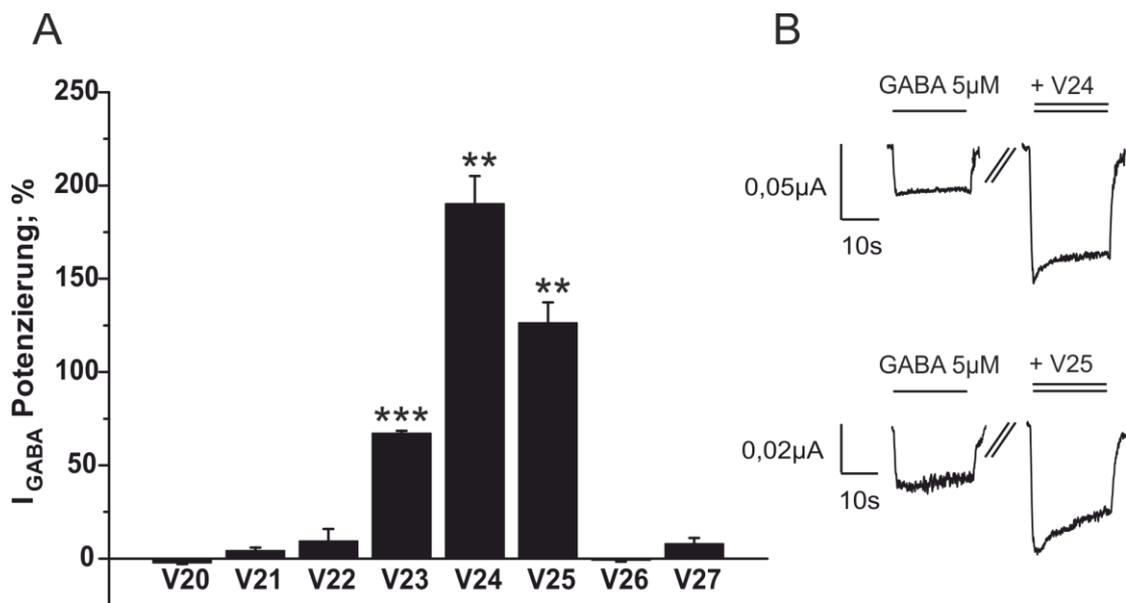


Abbildung 16: (A) I_{GABA}-Potenzierung der Fraktionen V20-V27 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren **(B)** Abbildungen der signifikanten Ströme (V24 und V25)

Code	I _{GABA} Modulation; %	SEM	n
V20	-2,3	0,6	3
V21	4,3	1,6	3
V22	9,5	6,3	3
V23	67,2 ***	1,4	3
V24	190,3 **	14,8	3
V25	126,4 **	11,0	3
V26	-0,9	0,9	4
V27	8,0	3,0	3

Tabelle 2: I_{GABA}-Modulation der Fraktionen (V20-V27) an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren

4.3. Untereinheiten-spezifische Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch Dehydroabietinsäure-derivate

Die DHAA ist eine in Kiefer-Harzextrakten natürlich vorkommende tricyclische Diterpenmonocarbonsäure. Sie wurde bereits an GABA_A-Rezeptoren mit einer Untereinheitenzusammensetzung von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ getestet, an denen sie eine positiv modulierende Aktivität sowie in hohen Konzentrationen eine direkte Aktivierung des Rezeptors zeigte (Rueda et al., 2014). Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Aktivität von DHAA an weiteren Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) untersucht. Des Weiteren wurden auch Derivate dieser natürlichen Substanz (12-Hydroxy-Dehydroabietinsäure, 18-Hydroxy-Ferruginol sowie 12-Carboxy-Sugiol) an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen getestet.

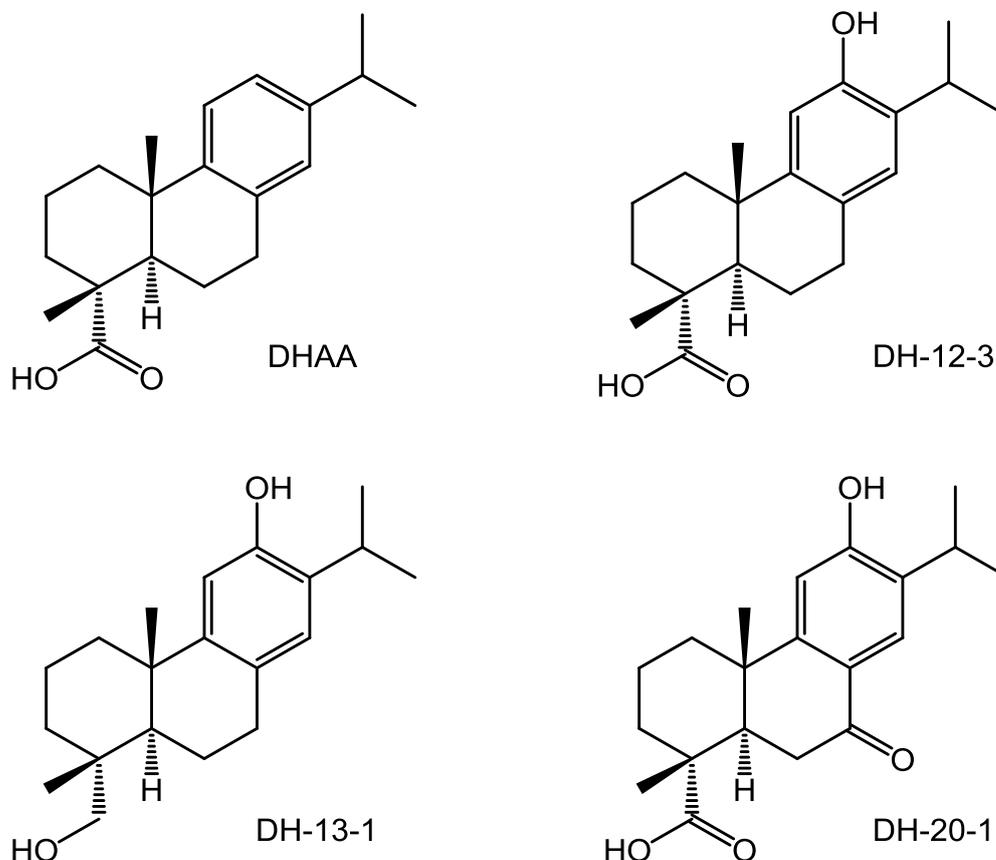


Abbildung 17: Strukturformel der DHAA und deren Derivate

4.3.1. DHAA

DHAA wurde an $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -, $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ - und $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren getestet. An allen GABA_A-Rezeptoren zeigte DHAA eine positiv modulierende Aktivität. Beim Vergleich zwischen den einzelnen Rezeptorsubtypen konnte festgestellt werden, dass die EC₅₀ an $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren ($25,7 \pm 6,0\mu\text{M}$) niedriger war als an den anderen Rezeptoren ($\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -EC₅₀: $48,4 \pm 8,3\mu\text{M}$; $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -EC₅₀: $54,4 \pm 11,0\mu\text{M}$). Dennoch war der Unterschied in Bezug auf die EC₅₀ nicht signifikant. Auch die Unterschiede zwischen den Maximaleffekten (E_{max}) des $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ - ($E_{\text{max}}=850,2 \pm 60,2\%$), des $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ - ($E_{\text{max}}=770,6 \pm 80,2\%$) und des $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptors ($E_{\text{max}}=548,1 \pm 61,4\%$) erwiesen sich als nicht signifikant ($p>0,05$).

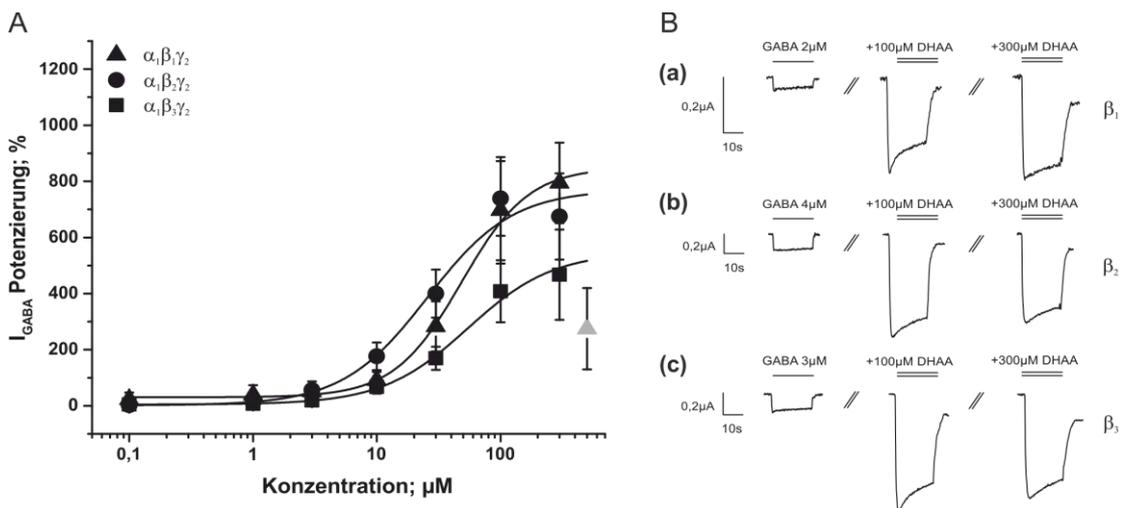


Abbildung 18: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA} -Modulation von DHAA an den angegebenen Rezeptorsubtypen **(B)** Abbildungen der Chloridströme bei unterschiedlichen DHAA-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ - bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ ; μM	E _{max} ; %	n	Hill-Koeffizient
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$	48,4 \pm 8,3	850,2 \pm 60,2	4	1,6 \pm 0,2
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	25,7 \pm 6,0	770,6 \pm 80,2	8	1,3 \pm 0,1
$\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$	54,4 \pm 11,0	548,1 \pm 61,4	7	1,3 \pm 0,1
Tukey's Multiple Comparison Test EC ₅₀			Signifikanz	
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$			ns	
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$			ns	
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$			ns	
Tukey's Multiple Comparison Test EC _{max}			Signifikanz	
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$			ns	
$\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$			ns	
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$			ns	

Tabelle 3: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA}-Modulation durch DHAA an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten

4.3.2. DH12-3

Das DHAA-Derivat 12-Hydroxydehydroabietinsäure (DH12-3) wurde ebenfalls an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ sowie $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ getestet und die modulierende Aktivität untereinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass DH12-3 nur am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptor eine positiv modulierende Aktivität besitzt. An den anderen Rezeptoren zeigte DH12-3 sich hingegen eine schwache Inhibition von GABA-induzierten Strömen. Die EC₅₀ unterscheidet sich nicht signifikant zwischen den Rezeptorsubtypen, während die E_{max} signifikante Unterschiede zwischen $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ (****; $p < 0,0001$) sowie $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ (***; $p < 0,001$) aufwies. Die E_{max} lag bei $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren bei 109,1 \pm 23,3%, bei $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ -Rezeptoren bei -44,9 \pm 11,8% und bei $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptoren bei -19,5 \pm 1,5%. Ein signifikanter Unterschied der E_{max} zwischen $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ - und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -Rezeptoren konnte somit nicht festgestellt werden ($p > 0,05$).

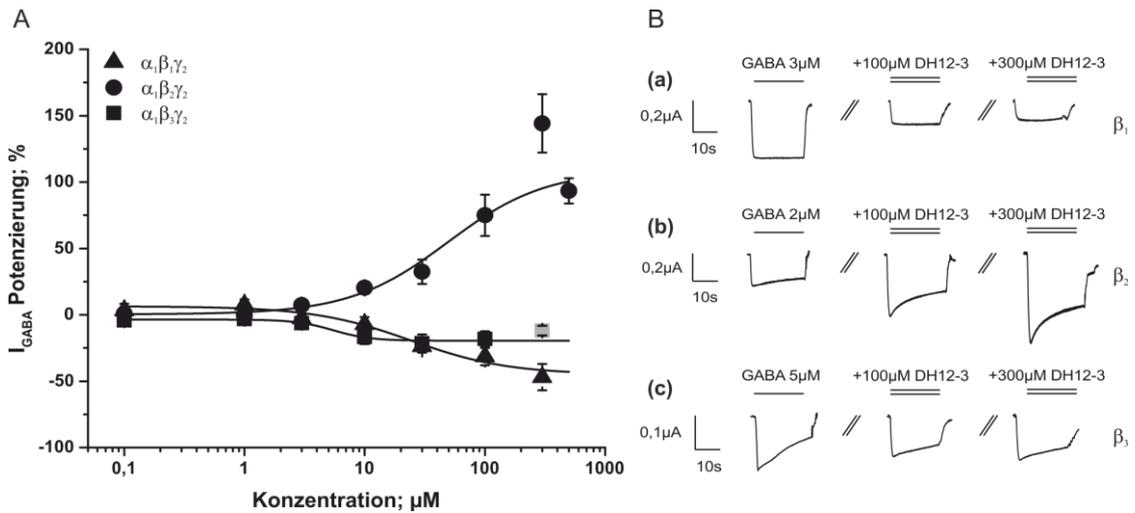


Abbildung 19: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA}-Modulation von DH12-3 an den angegebenen Rezeptorsubtypen **(B)** Abbildungen der Chloridströme bei unterschiedlichen DH12-3-Konzentrationen an (a) α₁β₁γ₂S-, (b) α₁β₂γ₂S- bzw. (c) α₁β₃γ₂S-GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ ; μM	E _{max} ; %	n	Hill-Koeffizient
α ₁ β ₁ γ ₂ S	24,1 ± 12,9	-44,9 ± 11,8	5	1,1 ± 0,5
α ₁ β ₂ γ ₂ S	49,1 ± 36,2	109,1 ± 23,3	5	1,1 ± 0,4
α ₁ β ₃ γ ₂ S	5,4 ± 1,2	-19,5 ± 1,5	5	2,8 ± 1,0
Tukey's Multiple Comparison Test EC ₅₀			Signifikanz	
α ₁ β ₁ γ ₂ S vs. α ₁ β ₂ γ ₂ S			ns	
α ₁ β ₁ γ ₂ S vs. α ₁ β ₃ γ ₂ S			ns	
α ₁ β ₂ γ ₂ S vs. α ₁ β ₃ γ ₂ S			ns	
Tukey's Multiple Comparison Test EC _{max}			Signifikanz	
α ₁ β ₁ γ ₂ S vs. α ₁ β ₂ γ ₂ S			****	
α ₁ β ₁ γ ₂ S vs. α ₁ β ₃ γ ₂ S			ns	
α ₁ β ₂ γ ₂ S vs. α ₁ β ₃ γ ₂ S			***	

Tabelle 4: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA}-Modulation durch DH12-3 an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten

4.3.3. DH20-1

Ein weiteres Derivat, das an den verschiedenen Rezeptorsubtypen getestet wurde, war 12-Carboxy-Sugiol (DH20-1). Die Aktivität an den ausgewählten Rezeptorsubtypen war sehr gering (siehe **Abbildung 19A**).

Aufgrund der hohen Lipophilie und somit schlechter Löslichkeit dieser Substanz war die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven nicht möglich. Dadurch konnte auch kein Vergleich zwischen den verschiedenen Rezeptoren gezogen werden.

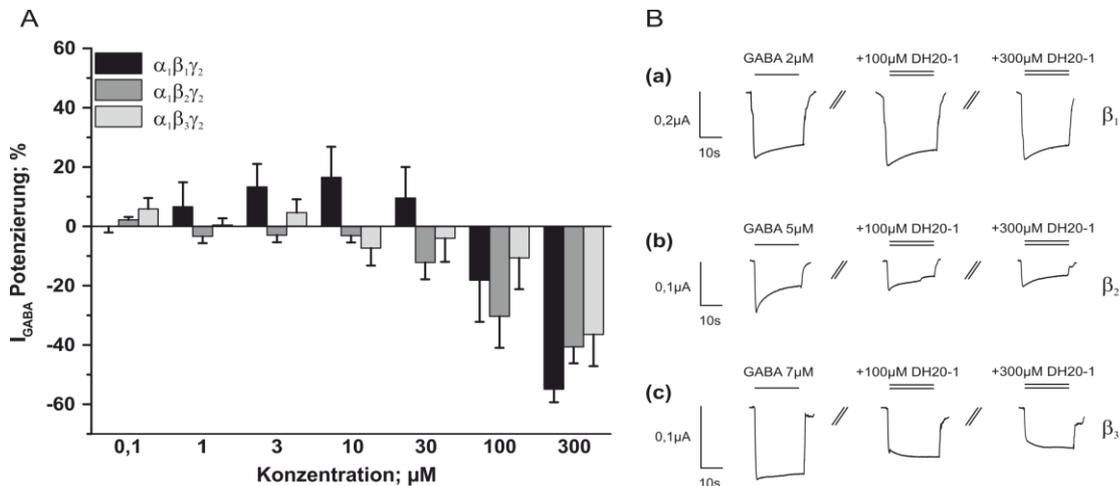


Abbildung 20: (A) I_{GABA}-Modulation von DH20-1 an den angegebenen Rezeptorsubtypen **(B)** Abbildungen von ausgewählten Chloridströmen bei unterschiedlichen DH20-1-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_2\text{-GABA}_A$ - (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_2\text{-GABA}_A$ - bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_2\text{-GABA}_A$ -Rezeptoren

4.3.4. DH13-1

Das DHAA-Derivat 18-Hydroxy-Ferruginol (DH13-1) wurde ebenfalls an den Rezeptorsubtypen $\alpha_1\beta_1\gamma_2\text{S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_2\text{S}$ sowie $\alpha_1\beta_3\gamma_2\text{S}$ getestet. Ein Fit der Kurve des $\alpha_1\beta_1\gamma_2\text{S-GABA}_A$ -Rezeptors war jedoch nicht möglich, wodurch auch keine Berechnung der statistischen Signifikanz mittels one-way ANOVA durchgeführt werden konnte. Daher wurde der statistische Unterschied zwischen dem $\alpha_1\beta_2\gamma_2\text{S}$ und dem $\alpha_1\beta_3\gamma_2\text{S-GABA}_A$ -Rezeptor mittels student's t-Test bestimmt. Dieser erwies sich sowohl in Bezug auf die EC₅₀ ($42,4 \pm 28,3\mu\text{M}$ vs. $25,6 \pm 11,4\mu\text{M}$) als auch auf E_{max} ($192,8 \pm 48,8\%$ vs. $146,3 \pm 20,6\%$) als nicht signifikant ($p > 0,05$).

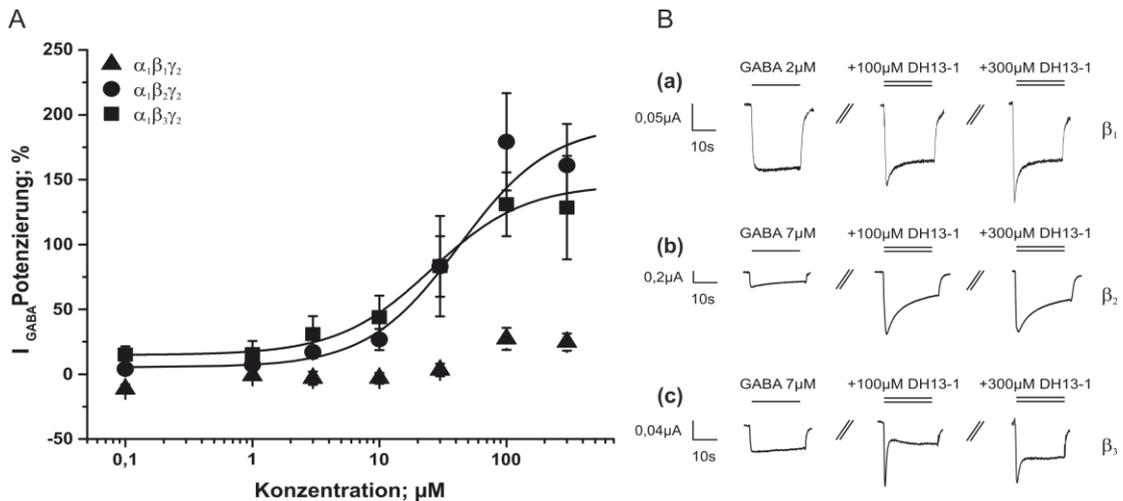


Abbildung 21: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA} -Modulation von DH13-1 an den angegebenen Rezeptorsubtypen **(B)** Abbildungen der Chloridströme bei unterschiedlichen DH13-1-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_2$ -, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ - bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren

Subtyp	EC ₅₀ ; μM	E _{max} ; %	n	Hill-Koeffizient
$\alpha_1\beta_1\gamma_2$	n.b.	n.b.	5	n.b.
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$	42,4 ± 28,3	192,8 ± 48,8	7	1,2 ± 0,4
$\alpha_1\beta_3\gamma_2$	25,6 ± 11,4	146,3 ± 20,6	5	1,2 ± 0,3
Student's t-Test EC₅₀			Signifikanz	
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_2$			ns	
Student's t-Test E_{max}			Signifikanz	
$\alpha_1\beta_2\gamma_2$ vs. $\alpha_1\beta_3\gamma_2$			ns	

Tabelle 5: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA} -Modulation durch DH13-1 an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten

4.4. Aktivität von DHAA an homooligomeren GABA_A- β_3 -Rezeptoren

Homooligomere GABA_A- β_3 -Rezeptoren waren die ersten GABA_A-Rezeptoren deren atomare Struktur aufgeklärt werden konnte und sind damit ideale Modelle zur Erforschung funktioneller Mechanismen von GABA_A-Rezeptoren (Miller and Aricescu, 2014). Im Gegensatz zu den

heterooligomeren GABA_A-Rezeptoren sind sie jedoch nicht mehr GABA-sensitiv, das heißt, sie können nicht mehr durch GABA aktiviert werden. Dennoch besitzen sie allosterische Bindungsstellen für Anästhetika, wie Etomidat und Propofol, sowie Barbituraten, wie Pentobarbital, durch die die Rezeptoren direkt aktiviert werden (Seeger et al., 2012).

Im Rahmen der Diplomarbeit wurde untersucht, ob sich homooligomere GABA_A-β₃-Rezeptoren auch durch DHAA aktivieren lassen. DHAA-induzierte Ströme wurden mit jenen von Pentobarbital und Bicucullin verglichen. Dabei wurde der Pentobarbital-induzierte Strom als Maximalstrom (100%) festgelegt. Im Vergleich zu Pentobarbital aktivierte DHAA den homooligomeren GABA_A-β₃-Rezeptor stärker (263,2 ± 37,5%), während Bicucullin eine schwächere Aktivität zeigte (26,6 ± 1,7%).

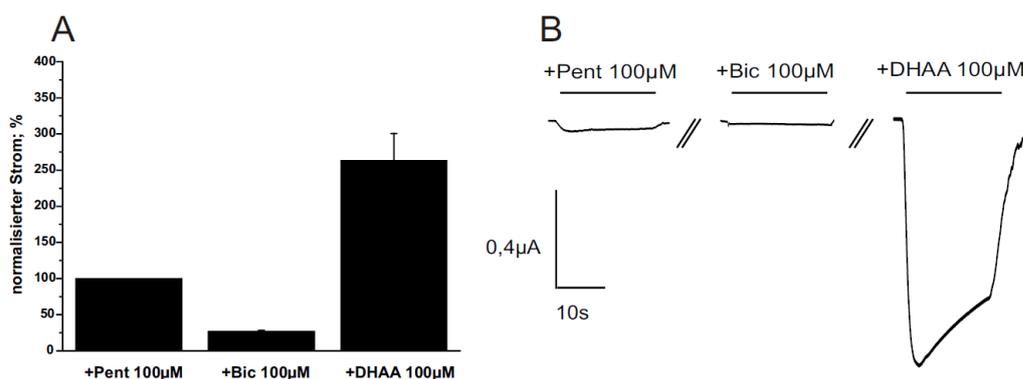


Abbildung 22: (A) Vergleich der Modulation von Pentobarbital, Bicucullin und DHAA am β₃-Homomer (B) Abbildung der Ströme

Substanz	Normalisierter Strom; %	SEM	n
Pentobarbital	100	0	9
Bicucullin	26,6	1,7	8
DHAA	263,2	37,5	9
Student's t-Test	Signifikanz		
DHAA vs. Bicucullin	****		
DHAA vs. Pentobarbital	**		

Tabelle 6: Ausmaß der Aktivierung sowie statistische Signifikanz zwischen DHAA und Bicucullin bzw. Pentobarbital

4.5. GLIC

Ein weiterer Rezeptor, an dem die DHAA getestet wurde, ist der prokaryotische *Gloeobacter violaceus* Liganden-gesteuerte Ionenkanal (GLIC), dessen Kristallstruktur ebenfalls schon aufgeklärt werden konnte (Bocquet et al., 2009; Hilf and Dutzler, 2009). Im Gegensatz zum GABA_A-Rezeptor wird GLIC jedoch nur durch Protonen aktiviert und leitet unselektiv Kalium und Calcium (Bocquet et al., 2009).

Experimente an diesem Rezeptor zeigten, dass DHAA den Rezeptor nicht aktiviert, sondern inhibiert. So reduziert 100µM DHAA den protoneninduzierten Strom signifikant ($p < 0,001$) auf $82,0 \pm 3,0\%$ des Ausgangswertes.

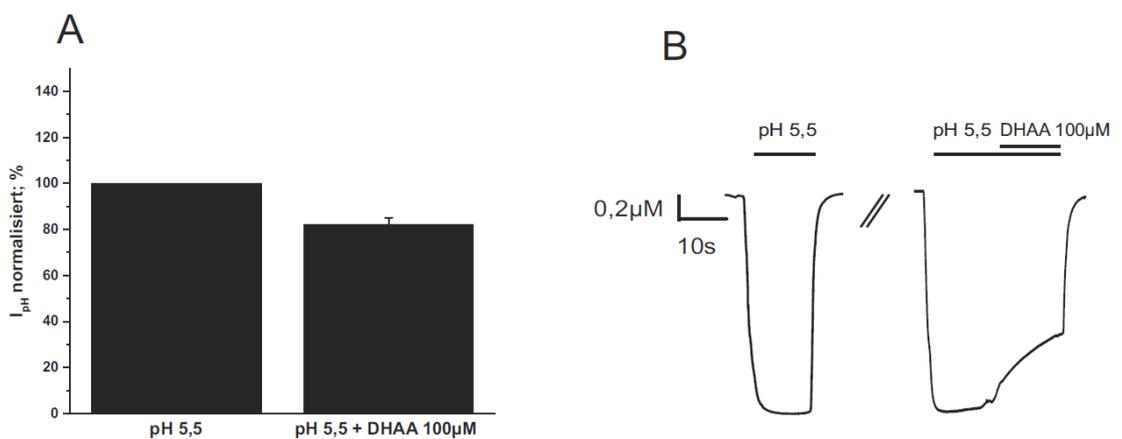


Abbildung 23: Effekt von DHAA auf protoneninduzierte Ströme am GLIC-Kanal **(A)** Das Säulendiagramm zeigt den inhibierenden Effekt von DHAA auf Ströme induziert bei pH 5,5. Die Werte sind normalisiert auf pH 5,5. **(B)** Repräsentative Ströme induziert durch pH 5,5 (links) und DHAA + pH 5,5. Die schwarzen Balken zeigen die Anwesenheit von pH 5,5 (ein Balken) oder DHAA + pH 5,5 (zwei Balken) an.

Substanz	Normalisierter Strom; %	SEM	n
pH 5,5 + DHAA	82,0	3,0	7
Student's t-Test	Signifikanz		
DHAA	***		

Tabelle 7: Hemmung des protoneninduzierten Stroms an GLIC Kanälen durch DHAA.

5. Diskussion

Der GABA_A-Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter Ionenkanal, der durch GABA geöffnet und durch pharmakologisch und klinisch wichtige Arzneimittel moduliert werden kann. Im Laufe der Zeit wurden zahlreiche Verbindungen aus verschiedenen Strukturklassen entdeckt, die GABA_A-Rezeptoren modulieren, direkt aktivieren oder inhibieren können (Sieghart, 2015). Dabei stellen besonders Naturstoffe, isoliert aus verschiedenen pflanzlichen Extrakten, eine unerschöpfliche Quelle für die Entdeckung und Entwicklung neuer Therapeutika dar (Johnston et al., 2006; Nilsson and Sterner, 2011). Ziel dieser Diplomarbeit war es somit ausgewählte Pflanzenextrakte auf ihre Aktivität am GABA_A-Rezeptor zu testen. Des Weiteren wurden Derivate der Dehydroabietinsäure (DHAA) untersucht, ein Naturstoff, bei dem bereits eine positiv modulierende Wirkung am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptor festgestellt werden konnte. Zusätzlich zu diesem Rezeptorsubtyp wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit DHAA sowie deren Derivate auch an $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$ - und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren getestet, um ihre Rezeptor-Selektivität beurteilen zu können. Weitere pharmakologische Einblicke wurden durch Experimente von DHAA an homooligomeren GABA_A- β_3 -Rezeptoren sowie an GLIC gewonnen.

5.1. Wirkung von Fraktionen einer traditionell verwendeten südafrikanischen Pflanze auf GABA_A-Rezeptoren

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden 7 Fraktionen (V20-V27) eines Extraktes einer traditionell verwendeten südafrikanischen Pflanze hinsichtlich ihrer Modulation des GABA-induzierten Chloridstroms (I_{GABA}) untersucht. Hierfür wurden GABA_A-Rezeptoren in *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert und I_{GABA} sowie dessen Modulation mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik analysiert. Für die Fraktionen

wurde eine Untereinheitenzusammensetzung von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ gewählt, da diese den häufigsten Rezeptorsubtyp im ZNS darstellt (Sieghart et al., 2012).

Drei der 7 Fraktionen zeigten eine signifikante Potenzierung von I_{GABA} . V23 potenzierte I_{GABA} um $67,2 \pm 1,4\%$, V24 um $190,3 \pm 14,8\%$ und V25 um $126,4 \pm 11,0\%$. Diese gewonnenen Daten weisen darauf hin, dass die Fraktionen V23-V25 potenziell interessante Substanzen für die Entwicklung eines neuen $GABA_A$ -Rezeptor-modulierenden Arzneistoffs enthalten könnten.

Das Screening von Fraktionen stellt eine sehr effiziente Möglichkeit zur Feststellung von biologischer Aktivität dar. $GABA_A$ -Rezeptoren bestehen aus fünf Untereinheiten und zahlreichen Taschen und Spalten, die als potentielle Bindungsstellen fungieren können. Da Extrakte sehr heterogene Substanzgemische und die enthaltenen Substanzen weitgehend unbekannt sind, ist es möglich, dass mehrere Substanzen an unterschiedlichen Stellen des $GABA_A$ -Rezeptors binden. Das könnte dazu führen, dass sich die Effekte dieser Substanzen addieren bzw. potenzieren oder auch abschwächen. Des Weiteren bedeutet eine fehlende Modulation der übrigen Fraktionen nicht zwangsläufig, dass eine Fraktion keine aktiven Substanzen enthält. So könnten möglicherweise auch Substanzen enthalten sein, die gegensätzliche Wirkungen hervorrufen, wodurch ihre Wirkung gegenseitig aufgehoben wird. Demnach sind weitere Fraktionierungen unbedingt erforderlich. Nur so kann bestimmt werden, ob eine Aktivität einer Fraktion auf eine einzelne Verbindung zurückzuführen ist oder ob sich die Inhaltsstoffe gegenseitig beeinflussen.

5.2. Wirkung von DHAA und Derivaten auf GABA_A-Rezeptoren

5.2.1. DHAA

Dehydroabietinsäure (DHAA) ist eine in Harzextrakten von Kiefergewächsen (*Pinaceae*) natürlich vorkommende tricyclische Diterpenmonocarbonsäure, die wegen ihrer entzündungshemmenden, antiseptischen, wundheilenden und sedierenden Eigenschaften traditionell eingesetzt wird. Bei Untersuchungen am $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA_A-Rezeptor konnte bereits eine positiv modulierende Aktivität sowie in hohen Konzentrationen auch eine direkte Aktivierung des Rezeptors festgestellt werden (Rueda et al., 2014). Aufgrund des großen Interesses Subtyp-selektive GABA_A-Rezeptor Modulatoren zu entwickeln (Atack, 2011; Rudolph and Knoflach, 2011; Hood et al., 2014; Chua and Chebib, 2017), sind weitere Untersuchungen zur Untereinheiten-Selektivität von DHAA unbedingt erforderlich (Rueda et al., 2014).

Ziel dieser Diplomarbeit war somit, die modulierende Wirkung von DHAA an weiteren Rezeptorsubtypen ($\alpha_1\beta_1\gamma_{2S}$, $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ und $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S}$) zu untersuchen. An allen drei Rezeptorsubtypen zeigte DHAA eine positiv modulierende Aktivität mit vergleichbarer Affinität (EC_{50}) und Maximaleffekten (E_{max}). Diese Daten lassen darauf schließen, dass das Ausmaß der Aktivität von DHAA nicht wesentlich von der β -Untereinheit beeinflusst wird. Die Bindungsstelle befindet sich somit gegebenenfalls an einer Stelle, die in allen drei Rezeptorsubtypen konserviert ist bzw. enthält sie Bindungsdeterminanten, die sich nicht voneinander unterscheiden.

5.2.2. DHAA-Derivate

Weiters wurden im Zuge dieser Diplomarbeit auch ausgewählte Derivate der natürlichen vorkommenden DHAA (12-Hydroxy-Dehydroabietinsäure, 18-Hydroxy-Ferruginol sowie 12-Carboxy-Sugiol) an den unterschiedlichen

Rezeptorsubtypen getestet. Ziel war es, Struktur-Aktivitäts-Information zu erhalten und eine Substanz zu finden, die eine erhöhte und/oder Subtyp-selektive Aktivität am GABA_A-Rezeptor zeigt. Bei allen Derivaten konnte zwar eine Modulation des Rezeptors festgestellt werden, jedoch führten die ausschließlich hydrophilen Reste am lipophilen DHAA-Grundgerüst zu einer wesentlichen Verringerung der Aktivität. Der Grund dafür könnte sein, dass vorwiegend lipophile Interaktionen zur Bindung bzw. Aktivität beitragen und somit kein hydrophiler Rest in der Bindungstasche vertragen wird. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass die Bindungstasche aufgrund von sterischen Hinderungen keine Erweiterungen des DHAA-Ringgerüsts erlaubt. Somit könnte eine Substitution weiterer Reste sowohl hydrophiler als auch lipophiler Natur zu einer Verringerung der Aktivität führen. Zukünftige Untersuchungen könnten sich dementsprechend darauf richten, einerseits lipophile Reste zu substituieren sowie andererseits Derivatisierungen an anderen Positionen des DHAA-Grundgerüsts vorzunehmen.

5.3. Untersuchungen am homooligomeren GABA_A-β₃-Rezeptor und GLIC

Nachdem kein Derivat an den gewählten Rezeptorsubtypen stärkere Aktivität als DHAA aufwies, wurde im Anschluss nur noch mehr mit DHAA weitergearbeitet. Diese wurde an weiteren pentameren Ligandengesteuerten Kanälen untersucht; dabei wurde sie im Rahmen dieser Diplomarbeit zum ersten Mal am homooligomeren GABA_A-β₃-Rezeptor sowie am bakteriellen Homolog *Gloeobacter violaceus* Ligandengesteuerten Ionenkanal (GLIC) getestet. Diese Rezeptoren können einfach exprimiert und kristallisiert werden und dienen dazu, zusätzliche Einblicke in die Bindungseigenschaften der Substanzen zu erhalten (daCosta and Baenziger, 2013).

5.3.1. Homooligomerer GABA_A-β₃-Rezeptor

Der homooligomere GABA_A-β₃-Rezeptor ist nicht mehr GABA-sensitiv, das heißt, er kann im Gegensatz zu den heterooligomeren GABA_A-Rezeptoren nicht mehr durch GABA aktiviert werden. Dennoch besitzt er allosterische Bindungsstellen für Anästhetika, wie Etomidat und Propofol, sowie Barbituraten, wie Pentobarbital, durch die der Rezeptor direkt aktiviert wird (Seeger et al., 2012). Ziel dieser Untersuchung war es somit nicht die modulierende Aktivität, sondern die agonistische Aktivität von DHAA am GABA_A-β₃-Rezeptor zu testen. Zum Vergleich der Aktivität wurden zuerst Pentobarbital sowie Bicucullin in derselben Konzentration wie DHAA (100µM) appliziert. Dabei zeigte DHAA dreifach größere Ströme als Pentobarbital und zehnfach größere Ströme als Bicucullin. DHAA ist somit ein besonders effizienter Aktivator von homooligomeren GABA_A-β₃-Rezeptoren. Bisher konnten GABA_A-β₃-Rezeptoren im ZNS nicht nachgewiesen werden. Aufgrund der weitreichenden Expression der β₃-Untereinheit und der hohen Tendenz *in vitro* funktionelle Kanäle zu bilden, kann deren Existenz jedoch nicht ausgeschlossen werden. Mangels selektiver Substanzen ist ein Nachweis auf pharmakologischem Weg momentan nicht möglich. DHAA könnte somit als Vorlage für neue Substanzen dienen, die selektive Aktivität an β₃-Homopentameren besitzen.

5.3.2. GLIC

GLIC ist ein prokaryotischer Rezeptor, der eine hohe Ähnlichkeit zu den eukaryotischen pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanälen aufweist (Hilf and Dutzler, 2009). Im Gegensatz zu den eukaryotischen Rezeptoren ist GLIC ein kationischer Kanal, der nur durch Protonen aktiviert werden kann (Bocquet et al., 2009). Dennoch reagiert GLIC empfindlich auf klassische allosterische Modulatoren eukaryotischer pLGICs wie Kanalblocker, Alkohol oder allgemeine Anästhetika (Prevost et al., 2013). Dabei konnte jedoch festgestellt werden, dass positiv

allosterische Modulatoren von GABA_A-Rezeptoren eine inhibierende Wirkung an GLIC zeigen (Weng et al., 2010; Ghosh et al., 2013; Prevost et al., 2013). Das Ziel der Untersuchung von DHAA an GLIC war, zu testen, ob DHAA auch eine inhibitorische Wirkung an GLIC besitzt. DHAA inhibierte den Protonen-induzierten Kationenstrom um $18 \pm 3\%$.

Es gilt jedoch zu bedenken, dass alle vorherigen Experimente an den homo- und heterooligomeren GABA_A-Rezeptoren im neutralen Milieu (pH=7,4) durchgeführt wurden, während die Experimente an GLIC in einer sauren Umgebung (pH=5,5) stattfanden. DHAA trägt als Substituenten eine Carboxylgruppe, dessen Protonierungsgrad sich beim Ansäuern verändert. So liegt die Carboxylgruppe im neutralen Milieu deprotoniert, das heißt negativ geladen, vor. Bei der Zugabe von Säure wird die Protonenkonzentration in der Umgebung erhöht, wodurch sich ein Proton an die negativ geladene Carboxylgruppe anlagert. Aus der negativ geladenen Carboxylat-Gruppe wird somit eine neutrale Carboxyl-Gruppe. Diese Änderung im Protonierungsstatus könnte Einflüsse auf die Bindungseigenschaften von DHAA haben. Folglich ist es notwendig, weitere Derivatisierungen vorzunehmen, um die Rolle der Carboxylgruppe für die Aktivität an GLIC zu ermitteln.

5.4. Schlussfolgerung

Zusammenfassend hat diese Arbeit GABA_A-Rezeptor-modulierende Eigenschaften von Pflanzenextraktfraktionen einer südafrikanischen Pflanze beschrieben, welche für weitere Fraktionsschritte interessant sein könnten. Weiters konnten wichtige Informationen zur Struktur-Aktivitäts-Beziehung von DHAA-Derivaten an GABA_A-Rezeptoren erhalten und inhibitorische Wirkungen von DHAA an GLIC Kanälen festgestellt werden.

6. Danksagung

In allererster Linie möchte ich mich bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering bedanken, einerseits für die Möglichkeit meine Diplomarbeit am Department für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien abzulegen, andererseits aber auch für die gute Betreuung sowie die gesamten Erfahrungen, die ich im Bereich des wissenschaftlichen Arbeitens sammeln konnte.

Besonderer Dank gilt auch meinem Diplomarbeitsbetreuer Mag. Marco Stadler, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Mit seiner hilfsbereiten und fröhlichen Art trug er nicht nur zu einem angenehmen Arbeitsklima im Department bei, sondern auch wesentlich zum Gelingen meiner Diplomarbeit.

Weiters möchte ich mich bei allen Kollegen des Departments für Pharmakologie und Toxikologie bedanken für deren Hilfe und für die Beantwortung aller meiner Fragen. Ein großes Dankeschön gilt hierbei Dr. Annette Hohaus für die Vorbereitung der cRNAs sowie Dr. Igor Baburin, der mich bei allen technischen Problemen bereitwillig unterstützt hat.

Vielen Dank auch meinen Eltern für die finanzielle aber besonders auch für ihre moralische Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung.

Zu allerletzt möchte ich auch meinen beiden Geschwistern danken, die mich einerseits fürs Lernen und Abschließen meines Studiums motiviert haben, mir andererseits aber gezeigt haben, dass es auch ein Leben neben dem Studium gibt.

Vielen Dank!

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines pentameren Liganden-gesteuerten Ionenkanals (Moss and Smart, 2001)	11
Abbildung 2: (A) Agonist-induzierte Konformationsübergänge (Sauguet et al., 2015) (B) Essentielle Strukturen für Gating-Mechanismus (Calimet et al., 2013)	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des GABA _B -Rezeptors (Filip and Frankowska, 2008)	14
Abbildung 4: Biosynthese der γ -Aminobuttersäure (Uusi-Oukari and Korpi, 2010)	15
Abbildung 5: Unterschied zwischen synaptischen und extrasynaptischen Rezeptoren (Reddy, 2011)	18
Abbildung 6: Röntgenkristallstruktur des β_3 -Homopentamers (Miller and Aricescu, 2014).....	20
Abbildung 7: Röntgenkristallstruktur von ELIC, GLIC und Glu-CI (daCosta and Baenziger, 2013)	23
Abbildung 8: Bindungsstelle von Benzodiazepinen am GABA _A -Rezeptoren (Cheng et al., 2018).....	25
Abbildung 9: Korrelation zwischen klinischem Profil und molekularen Zielen von Allgemeinanästhetika (Forman, 2010)	26
Abbildung 10: Bindungsstelle von Ethanol und Barbituraten (Themes, 2017)	30
Abbildung 11: Schematische Darstellung des Expressionsprozesses eines exogenen Proteins in den Oozyten (Bianchi and Driscoll, 2006).....	37

Abbildung 12: Schematische Darstellung der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Baburin et al., 2006)	39
Abbildung 13: Schematische Darstellung der Mikroperfusionskammer (Baburin et al., 2006)	40
Abbildung 14: GABA-induzierte Chloridströme an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA _A -Rezeptoren	44
Abbildung 15: GABA-Dosis-Wirkungskurven an den angegebenen Rezeptorsubtypen.....	45
Abbildung 16: (A) I_{GABA} -Potenzierung der Fraktionen V20-V27 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ -GABA _A -Rezeptoren (B) Abbildungen der signifikanten Ströme (V24 und V25)	47
Abbildung 17: Strukturformel der DHAA und deren Derivate	48
Abbildung 18: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA} -Modulation von DHAA an den angegebenen Rezeptorsubtypen (B) Abbildungen der Chloridströme bei unterschiedlichen DHAA-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA _A -Rezeptoren.....	49
Abbildung 19: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA} -Modulation von DH12-3 an den angegebenen Rezeptorsubtypen (B) Abbildungen der Chloridströme bei unterschiedlichen DH12-3-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA _A -Rezeptoren.....	51
Abbildung 20: (A) I_{GABA} -Modulation von DH20-1 an den angegebenen Rezeptorsubtypen (B) Abbildungen von ausgewählten Chloridströmen bei unterschiedlichen DH20-1-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$ (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA _A -Rezeptoren.....	52
Abbildung 21: (A) Dosis-Wirkungskurve der I_{GABA} -Modulation von DH13-1 an den angegebenen Rezeptorsubtypen (B) Abbildungen der Chloridströme bei	

unterschiedlichen DH13-1-Konzentrationen an (a) $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$, (b) $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S^-}$ bzw. (c) $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren 53

Abbildung 22: (A) Vergleich der Modulation von Pentobarbital, Bicucullin und DHAA am β_3 -Homomer (B) Abbildung der Ströme 54

Abbildung 23: Effekt von DHAA auf protoneninduzierte Ströme am GLIC-Kanal (A) Das Säulendiagramm zeigt den inhibierenden Effekt von DHAA auf Ströme induziert bei pH 5,5. Die Werte sind normalisiert auf pH 5,5. (B) Repräsentative Ströme induziert durch pH 5,5 (links) und DHAA + pH 5,5. Die schwarzen Balken zeigen die Anwesenheit von pH 5,5 (ein Balken) oder DHAA + pH 5,5 (zwei Balken) an..... 55

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ermittelte Werte EC_5 , EC_{50} und Hill-Koeffizient an den angegebenen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den ermittelten EC_{50} -Werten.....	45
Tabelle 2: I_{GABA} -Modulation der Fraktionen (V20-V27) an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren	47
Tabelle 3: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA} -Modulation durch DHAA an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten.....	50
Tabelle 4: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA} -Modulation durch DH12-3 an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten.....	51
Tabelle 5: Zusammenfassung der Werte der I_{GABA} -Modulation durch DH13-1 an den unterschiedlichen Rezeptorsubtypen sowie statistische Signifikanz zwischen den Werten.....	53
Tabelle 6: Ausmaß der Aktivierung sowie statistische Signifikanz zwischen DHAA und Bicucullin bzw. Pentobarbital	54
Tabelle 7: Hemmung des protoneninduzierten Stroms an GLIC Kanälen durch DHAA.....	56

Literaturverzeichnis

Alqazzaz M, Thompson AJ, Price KL, Breitinger H-G, Lummis SCR (2011) Cys-Loop Receptor Channel Blockers Also Block GLIC. *Biophys J* 101:2912–2918.

Atack JR (2011) GABAA receptor subtype-selective modulators. I. $\alpha 2/\alpha 3$ -selective agonists as non-sedating anxiolytics. *Curr Top Med Chem* 11:1176–1202.

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

Ben-Ari Y, Khalilov I, Kahle KT, Cherubini E (2012) The GABA excitatory/inhibitory shift in brain maturation and neurological disorders. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 18:467–486.

Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann K-H, Schubiger M, Vogt KE, Rudolph U, Möhler H (2009) GABA A receptors as in vivo substrate for the anxiolytic action of valerenic acid, a major constituent of valerian root extracts. *Neuropharmacology* 56:174–181.

Bergmann R, Kongsbak K, Sørensen PL, Sander T, Balle T (2013) A unified model of the GABA(A) receptor comprising agonist and benzodiazepine binding sites. *PloS One* 8:e52323.

Bianchi L, Driscoll M (2006) Heterologous expression of *C. elegans* ion channels in *Xenopus* oocytes. *WormBook Online Rev C Elegans Biol*:1–16.

Bocquet N, Nury H, Baaden M, Le Poupon C, Changeux J-P, Delarue M, Corringer P-J (2009) X-ray structure of a pentameric ligand-gated ion channel in an apparently open conformation. *Nature* 457:111–114.

- Bowery NG, Smart TG (2006) GABA and glycine as neurotransmitters: a brief history. *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1:S109-119.
- Brambilla P, Perez J, Barale F, Schettini G, Soares JC (2003) GABAergic dysfunction in mood disorders. *Mol Psychiatry* 8:721–737, 715.
- Buhr A, Wagner C, Fuchs K, Sieghart W, Sigel E (2001) Two novel residues in M2 of the gamma-aminobutyric acid type A receptor affecting gating by GABA and picrotoxin affinity. *J Biol Chem* 276:7775–7781.
- Calimet N, Simoes M, Changeux J-P, Karplus M, Taly A, Cecchini M (2013) A gating mechanism of pentameric ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:E3987-3996.
- Carpenter TS, Lau EY, Lightstone FC (2013) Identification of a possible secondary picrotoxin-binding site on the GABA(A) receptor. *Chem Res Toxicol* 26:1444–1454.
- Cheng T, Wallace DM, Ponteri B, Tuli M (2018) Valium without dependence? Individual GABAA receptor subtype contribution toward benzodiazepine addiction, tolerance, and therapeutic effects. *Neuropsychiatr Dis Treat* 14:1351–1361.
- Chiara DC, Dostalova Z, Jayakar SS, Zhou X, Miller KW, Cohen JB (2012) Mapping general anesthetic binding site(s) in human $\alpha 1\beta 3$ γ -aminobutyric acid type A receptors with [3H]TDBzl-etomidate, a photoreactive etomidate analog. *Biochemistry* 51:836–847.
- Chua HC, Chebib M (2017) GABAA Receptors and the Diversity in their Structure and Pharmacology. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 79:1–34.
- daCosta CJB, Baenziger JE (2013) Gating of pentameric ligand-gated ion channels: structural insights and ambiguities. *Struct Lond Engl* 1993 21:1271–1283.

Desai R, Ruesch D, Forman SA (2009) γ -Amino Butyric Acid Type A Receptor Mutations at β 2N265 Alter Etomidate Efficacy While Preserving Basal and Agonist-dependent Activity. *Anesthesiology* 111:774–784.

Enz R, Cutting GR (1998) Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Res* 38:1431–1441.

Feng H-J, Macdonald RL (2010) Barbiturates require the N terminus and first transmembrane domain of the delta subunit for enhancement of α 1 β 3 δ GABAA receptor currents. *J Biol Chem* 285:23614–23621.

Filip M, Frankowska M (2008) GABA(B) receptors in drug addiction. *Pharmacol Rep PR* 60:755–770.

Forman SA (2010) Molecular Approaches to Improving General Anesthetics. *Anesthesiol Clin* 28:761–771.

Fritschy JM, Kiener T, Bouillere V, Loup F (1999) GABAergic neurons and GABA(A)-receptors in temporal lobe epilepsy. *Neurochem Int* 34:435–445.

Ghosh B, Satyshur KA, Czajkowski C (2013) Propofol binding to the resting state of the *Gloeobacter violaceus* ligand-gated ion channel (GLIC) induces structural changes in the inter- and intrasubunit transmembrane domain (TMD) cavities. *J Biol Chem* 288:17420–17431.

Gravielle MC (2018) Regulation of GABAA receptors by prolonged exposure to endogenous and exogenous ligands. *Neurochem Int* 118:96–104.

Greenfield LJ (2013) Molecular mechanisms of antiseizure drug activity at GABAA receptors. *Seizure* 22:589–600.

Griffin CE, Kaye AM, Bueno FR, Kaye AD (2013) Benzodiazepine pharmacology and central nervous system-mediated effects. *Ochsner J* 13:214–223.

Gunja N (2013a) The clinical and forensic toxicology of Z-drugs. *J Med Toxicol Off J Am Coll Med Toxicol* 9:155–162.

Gunja N (2013b) In the Zzz zone: the effects of Z-drugs on human performance and driving. *J Med Toxicol Off J Am Coll Med Toxicol* 9:163–171.

Hackam AS, Wang TL, Guggino WB, Cutting GR (1997) The N-terminal domain of human GABA receptor rho1 subunits contains signals for homo-oligomeric and heterooligomeric interaction. *J Biol Chem* 272:13750–13757.

Hibbs RE, Gouaux E (2011) Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature* 474:54–60.

Hilf RJC, Dutzler R (2008) X-ray structure of a prokaryotic pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 452:375–379.

Hilf RJC, Dutzler R (2009) Structure of a potentially open state of a proton-activated pentameric ligand-gated ion channel. *Nature* 457:115–118.

Hood SD, Norman A, Hince DA, Melichar JK, Hulse GK (2014) Benzodiazepine dependence and its treatment with low dose flumazenil. *Br J Clin Pharmacol* 77:285–294.

Jembrek MJ, Vlainic J (2015) GABA Receptors: Pharmacological Potential and Pitfalls. *Curr Pharm Des* 21:4943–4959.

Johnston GA (2013) Advantages of an antagonist: bicuculline and other GABA antagonists. *Br J Pharmacol* 169:328–336.

Johnston GAR, Hanrahan JR, Chebib M, Duke RK, Mewett KN (2006) Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 54:285–316.

Kalueff AV, Nutt DJ (2007) Role of GABA in anxiety and depression. *Depress Anxiety* 24:495–517.

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

Khom S, Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S (2010) Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol* 161:65–78.

Kinde MN, Bu W, Chen Q, Xu Y, Eckenhoff RG, Tang P (2016) Common Anesthetic-binding Site for Inhibition of Pentameric Ligand-gated Ion Channels. *Anesthesiology* 124:664–673.

Kishi T, Inada K, Matsui Y, Iwata N (2017) Z-drug for schizophrenia: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res* 256:365–370.

Krishek BJ, Moss SJ, Smart TG (1996) Homomeric beta 1 gamma-aminobutyric acid A receptor-ion channels: evaluation of pharmacological and physiological properties. *Mol Pharmacol* 49:494–504.

Li G-D, Chiara DC, Sawyer GW, Husain SS, Olsen RW, Cohen JB (2006) Identification of a GABAA receptor anesthetic binding site at subunit interfaces by photolabeling with an etomidate analog. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:11599–11605.

Liang J, Olsen RW (2014) Alcohol use disorders and current pharmacological therapies: the role of GABA(A) receptors. *Acta Pharmacol Sin* 35:981–993.

Löscher W, Rogawski MA (2012) How theories evolved concerning the mechanism of action of barbiturates. *Epilepsia* 53 Suppl 8:12–25.

Mehta AK, Ticku MK (2013) Characterization of the picrotoxin site of GABAA receptors. *Curr Protoc Pharmacol* 63:Unit 1.18.

Miller PS, Aricescu AR (2014) Crystal structure of a human GABAA receptor. *Nature* 512:270–275.

Mizielinska S, Greenwood S, Connolly CN (2006) The role of GABAA receptor biogenesis, structure and function in epilepsy. *Biochem Soc Trans* 34:863–867.

Mortensen M, Patel B, Smart TG (2012) GABA Potency at GABAA Receptors Found in Synaptic and Extrasynaptic Zones. *Front Cell Neurosci* 6 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3262152/> [Accessed September 20, 2018].

Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci* 2:240–250.

Naffaa MM, Chebib M, Hibbs DE, Hanrahan JR (2015) Comparison of templates for homology model of $\rho 1$ GABAC receptors: More insights to the orthosteric binding site's structure and functionality. *J Mol Graph Model* 62:43–55.

Naffaa MM, Hung S, Chebib M, Johnston GAR, Hanrahan JR (2017) GABA- ρ receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. *Br J Pharmacol* 174:1881–1894.

Nemecz Á, Prevost MS, Menny A, Corringer P-J (2016) Emerging Molecular Mechanisms of Signal Transduction in Pentameric Ligand-Gated Ion Channels. *Neuron* 90:452–470.

Newland CF, Cull-Candy SG (1992) On the mechanism of action of picrotoxin on GABA receptor channels in dissociated sympathetic neurones of the rat. *J Physiol* 447:191–213.

Nicholson RA (1994) Excitatory actions of dehydroabiatic acid on mammalian synaptosomes. *Pharmacol Toxicol* 75:274–279.

Nilsson J, Sterner O (2011) Modulation of GABA(A) receptors by natural products and the development of novel synthetic ligands for the benzodiazepine binding site. *Curr Drug Targets* 12:1674–1688.

Oakley S, Vedula LS, Bu W, Meng QC, Xi J, Liu R, Eckenhoff RG, Loll PJ (2012) Recognition of Anesthetic Barbiturates by a Protein Binding Site: A High Resolution Structural Analysis. *PLoS ONE* 7 Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3281113/> [Accessed September 21, 2018].

Olsen RW (2015) Allosteric ligands and their binding sites define γ -aminobutyric acid (GABA) type A receptor subtypes. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 73:167–202.

Petroff OAC (2002) GABA and glutamate in the human brain. *Neurosci Rev J Bringing Neurobiol Neurol Psychiatry* 8:562–573.

Prevost MS, Delarue-Cochin S, Marteaux J, Colas C, Van Renterghem C, Blondel A, Malliavin T, Corringer P-J, Joseph D (2013) Identification of cinnamic acid derivatives as novel antagonists of the prokaryotic proton-gated ion channel GLIC. *J Med Chem* 56:4619–4630.

Razet R, Thomet U, Furtmüller R, Jursky F, Sigel E, Sieghart W, Dodd RH (2000) Use of bicuculline, a GABA antagonist, as a template for the development of a new class of ligands showing positive allosteric modulation of the GABA(A) receptor. *Bioorg Med Chem Lett* 10:2579–2583.

Reddy DS (2011) Role of anticonvulsant and antiepileptogenic neurosteroids in the pathophysiology and treatment of epilepsy. *Front Endocrinol* 2:38.

Rudolph U, Knoflach F (2011) Beyond classical benzodiazepines: Novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov* 10:685–697.

Rueda DC, Raith M, De Mieri M, Schöffmann A, Hering S, Hamburger M (2014) Identification of dehydroabietyl acid from *Boswellia thurifera* resin as a positive GABAA receptor modulator. *Fitoterapia* 99:28–34.

Sarto-Jackson I, Sieghart W (2008) Assembly of GABA(A) receptors (Review). *Mol Membr Biol* 25:302–310.

Sauguet L, Shahsavari A, Delarue M (2015) Crystallographic studies of pharmacological sites in pentameric ligand-gated ion channels. *Biochim Biophys Acta* 1850:511–523.

Seeger C, Christopeit T, Fuchs K, Grote K, Sieghart W, Danielson UH (2012) Histaminergic pharmacology of homo-oligomeric β_3 γ -aminobutyric acid type A receptors characterized by surface plasmon resonance biosensor technology. *Biochem Pharmacol* 84:341–351.

Sieghart W (2015) Allosteric modulation of GABAA receptors via multiple drug-binding sites. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 72:53–96.

Sieghart W, Ramerstorfer J, Sarto-Jackson I, Varagic Z, Ernst M (2012) A novel GABAA receptor pharmacology: drugs interacting with the $\alpha+\beta$ - interface. *Br J Pharmacol* 166:476–485.

Sigel E, Lüscher BP (2011) A closer look at the high affinity benzodiazepine binding site on GABAA receptors. *Curr Top Med Chem* 11:241–246.

Simeone TA, Wilcox KS, White HS (2011) Topiramate modulation of $\beta(1)$ - and $\beta(3)$ -homomeric GABA(A) receptors. *Pharmacol Res* 64:44–52.

Spurny R, Ramerstorfer J, Price K, Brams M, Ernst M, Nury H, Verheij M, Legrand P, Bertrand D, Bertrand S, Dougherty DA, de Esch IJP, Corringer P-J, Sieghart W, Lummis SCR, Ulens C (2012) Pentameric ligand-gated ion channel ELIC is activated by GABA and modulated by benzodiazepines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:E3028-3034.

Tan KR, Rudolph U, Lüscher C (2011) Hooked on benzodiazepines: GABAA receptor subtypes and addiction. *Trends Neurosci* 34:188–197.

Themes UFO (2017) Sedative-Hypnotic and Anxiolytic Drugs. Basicmedical Key Available at: <https://basicmedicalkey.com/sedative-hypnotic-and-anxiolytic-drugs-2/> [Accessed September 25, 2018].

Thompson AJ, Alqazzaz M, Ulens C, Lummis SCR (2012) The pharmacological profile of ELIC, a prokaryotic GABA-gated receptor. *Neuropharmacology* 63:761–767.

Trauner G, Khom S, Baburin I, Benedek B, Hering S, Kopp B (2008) Modulation of GABAA receptors by valerian extracts is related to the content of valerenic acid. *Planta Med* 74:19–24.

Uusi-Oukari M, Korpi ER (2010) Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev* 62:97–135.

Valenzuela CF, Jotty K (2015) Mini-Review: Effects of Ethanol on GABAA Receptor-Mediated Neurotransmission in the Cerebellar Cortex--Recent Advances. *Cerebellum Lond Engl* 14:438–446.

Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW (2014) Alcohol selectivity of β 3-containing GABAA receptors: evidence for a unique extracellular alcohol/imidazobenzodiazepine Ro15-4513 binding site at the α + β - subunit interface in α 3 β 5 GABAA receptors. *Neurochem Res* 39:1118–1126.

Wassef A, Baker J, Kochan LD (2003) GABA and schizophrenia: a review of basic science and clinical studies. *J Clin Psychopharmacol* 23:601–640.

Weng Y, Yang L, Corringer P-J, Sonner JM (2010) Anesthetic sensitivity of the *Gloeobacter violaceus* proton-gated ion channel. *Anesth Analg* 110:59–63.

Yoon B-E, Woo J, Lee CJ (2012) Astrocytes as GABA-ergic and GABA-ceptive cells. *Neurochem Res* 37:2474–2479.

Zhu S, Noviello CM, Teng J, Walsh RM, Kim JJ, Hibbs RE (2018) Structure of a human synaptic GABAA receptor. *Nature* 559:67–72.