



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Untersuchung der Untereinheiten-spezifischen Modulation von GABA_A-
Rezeptoren durch pflanzliche Extrakte und eines ausgewählten
Naturstoffes

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin / Verfasser:	Simone Christlbauer
Matrikel-Nummer:	0104235
Studienrichtung (lt. Studienblatt):	A474 Ernährungswissenschaften
Betreuerin / Betreuer:	ao. Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber

Wien, im Oktober 2009

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Danksagung	VII
1 Zusammenfassung	1
1.1 Zusammenfassung	1
1.2 Abstract	2
2 Einleitung	3
2.1 Nervensystem	3
2.1.1 Ruhemembranpotential	4
2.1.2 Aktionspotential	4
2.1.3 Synaptische Erregungsübertragung	4
2.2 γ -Aminobuttersäure (GABA)	5
2.3 GABA-aktivierte Rezeptoren	6
2.4 Der GABA _A -Rezeptor	8
2.4.1 Vorkommen und Funktion	8
2.4.2 GABA _A -Rezeptoruntereinheiten	9
2.4.3 GABA-Bindungsstelle	11
2.5 Modulatoren am GABA _A -Rezeptor	12
2.5.1 Benzodiazepine	12
2.5.2 Barbiturate	15
2.5.3 Neurosteroiden	16
2.5.4 Anästhetika	18
2.5.5 Alkohol	21
2.5.6 Antiepileptika	23
2.5.7 Diverse Modulatoren an GABA _A -Rezeptoren	25
2.5.8 Naturstoffe als GABA _A -Rezeptor Modulatoren	26
2.6 GABA _A -Rezeptor und ZNS-Krankheiten	30
3 Methoden	33
3.1 Oozytenpräparation	33
3.2 cRNA-Vorbereitung	34
3.3 Injektion von cRNA	34

3.4 Arbeitsablauf zur Herstellung der Messlösungen	35
3.5 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp).....	35
3.6 Perfusionssystem.....	35
4 Problemstellung und Zielsetzung	36
5 Ergebnisse.....	37
5.1 Modulation von I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ –Rezeptoren durch 14 pflanzliche Extrakte und den Naturstoff ZFP	37
5.1.1 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch 14 Pflanzenextrakte	39
5.1.2 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch den Naturstoff ZFP	40
5.1.3 Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des Effekts von der γ -Untereinheit..	42
5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse	43
6 Diskussion	44
7 Literaturverzeichnis	48
8 Lebenslauf	61

Abbildungsverzeichnis und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Neurons.....	3
Abbildung 2: schematische Darstellung der GABA-Synthese aus Glutamat	6
Abbildung 3: schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptors aus den möglichen α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ und π Untereinheiten	7
Abbildung 4: schematische Darstellung des GABA _B -Rezeptors aus den R1a, R1b und R2 Untereinheiten	7
Abbildung 5: schematische Darstellung des GABA _C -Rezeptors aus den ρ 1-3 Untereinheiten	8
Abbildung 6: Die 4 transmembranären Domänen	9
Abbildung 7: Darstellung der extrazellulären Domänen des pentameren GABA _A -Rezeptors, der aus 2 α , 2 β und einer γ -Untereinheit besteht	10
Abbildung 8: schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptors mit den Liganden-Bindungsstellen.....	11
Abbildung 9: Molekulares Modell der Agonisten-Bindungsstelle am GABA _A -Rezeptor.	12
Abbildung 10: Benzodiazepin-Bindungsstelle	14
Abbildung 11: chemische Strukturformeln von Diazepam	15
Abbildung 12: chemische Strukturformel von Thiopental.....	16
Abbildung 13: chemische Strukturformeln einiger Neurosteroiden.....	18
Abbildung 14: schematische Darstellung des GABA _A -Rezeptor-Interfaces zwischen der β ₂ -M3 und der α ₁ -M1 der TMD für die Etomidat-Bindungsstelle	20
Abbildung 15: Darstellung der drei Polyacetylen-Liganden	26
Abbildung 16: (-)-Menthol und (+)-Menthol.....	27
Abbildung 17: Ginkgo.....	28
Abbildung 18: Strukturformel α -Thujon	28
Abbildung 19: Baldrian.....	29
Abbildung 20: Johanniskraut.....	29
Abbildung 21: Hopfen.....	30
Abbildung 22: Xenopus laevis Frösche.....	33
Abbildung 23: Xenopus laevis Oozyten	34
Abbildung 24: schematischer Aufbau der Messkammer	36
Abbildung 25: Schematische Darstellung und Bild einer Oozyten-Perfusionskammer	36
Abbildung 26: (A) GABA-Dosis-Wirkungskurve an α ₁ β ₂ γ _{2S} -Rezeptoren. (B) Typisches Experiment. Applikation von GABA in den Konzentrationen: 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M.	38

Abbildung 27: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch die getesteten Pflanzenextrakte.	39
Abbildung 28: (A) Dosiswirkungskurve für ZFP an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren. (B) Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von ZFP. GABA wurde in einer Konzentration von 1 μM , entsprechend einer EC_{5-10} gemeinsam mit 0,1 μM , 1 μM und 10 μM ZFP appliziert. Eine Ko-Applikation von GABA und ZFP wird durch einen Doppelbalken oberhalb des Stroms angezeigt.	41
Abbildung 29: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren durch ZFP	42
Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die untersuchten GABA_A -Rezeptor-Subtypen.....	46
Tabelle 1:	40
Tabelle 2:	43

Abkürzungsverzeichnis

3 α 5 α -THP	Allopregnanolon
3 α 5 β THDOC	(3 α ,5 β)-3,21-Dihydroxypregnan-20-on
3 α 5 β P	Pregnanolon
Al ³⁺	Aluminium
Asn	Asparagin
Arg	Arginin
ATPase	Adenosintriphosphatase
Ca ²⁺	Calcium
cDNA	komplementär-Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementär-Ribonukleinsäure
C-terminal	Carboxy-terminal
DEPC5	Diethylpyrocarbonat
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EEG	Elektroenzephalografie
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -Rezeptor	γ -Aminobuttersäure Typ-A Rezeptor
GABA _B -Rezeptor	γ -Aminobuttersäure Typ-B Rezeptor
GABA _C -Rezeptor	γ -Aminobuttersäure Typ-C Rezeptor
GAD	Glutaminsäure-Decarboxylase
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
5-HT ₃	Serotonin
I _{GABA}	GABA-induzierter Ionenstrom
IGEs	idiopathisch generalisierte Epilepsien
Ile	Isoleucin
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
La ³⁺	Lanthan
MgCl	Magnesiumchlorid
N	Stickstoff

Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-methyliert	Stickstoff-methyliert
N-terminal	Aminoterminal
PET	Positronen Emissions Tomographie
Phe	Phenylalanin
PKC	Proteinkinase C
PS	Pregnenolonsulfat
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
REM-Phase	rapid-eye-movement-Phase
Ro 15-4513	Ethyl-8-azido-5,6-dihydro-5-methyl-6-oxo-4H-imidazol(1,5-a)(1,4)benzodiazepine-3-carboxylat
Ser	Serin
SPET	Einzel Photon Emissions Tomographie
TBPS	T-Butylbicyclophosphorothionat
THDOC	Allotetrahydroxycorticosteron
Thr	Threonin
TMD	Transmembranäre Domäne
Tyr	Tyrosin
Zn ²⁺	Zink
ZNS	Zentralnervensystem

Danksagung

Ich möchte mich in aller Form bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit des wissenschaftlichen Arbeitens in den letzten Monaten sowie die gute Betreuung bedanken. Dieser Dank gebührt gleichermaßen Frau Univ. Prof. Dr. Rosa Lemmens-Gruber, ohne deren Hilfe diese Diplomarbeit nicht zustande gekommen wäre.

Besonderen Dank gilt es Dr. Sophia Khom und Dr. Igor Baburin, welche mich von Anfang an außerordentlich engagiert betreut, unterstützt und motiviert haben, auszusprechen. Ihre Hilfsbereitschaft, Geduld und Kompetenz möchte ich hier speziell erwähnen.

Ich bedanke mich auch bei Dr. Annette Hohaus und Mag. Christine Weisz für die Bereitstellung der cRNA.

Da diese Diplomarbeit in Kooperation mit Maria Novak entstanden ist, möchte ich mich bei ihr recht herzlich für die hervorragende Zusammenarbeit bedanken. Es war mir eine Freude.

Bei allen anderen wissenschaftlichen und nichtwissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts, die an dieser Diplomarbeit direkt oder indirekt beteiligt waren, möchte ich mich ebenfalls bedanken.

Meiner Familie möchte ein spezielles, persönliches Dankeschön aussprechen. Sie hat mich immer und in allen Belangen unterstützt und mir stets den nötigen Rückhalt geboten. Ohne ihre Unterstützung wäre mir dieses Studium nicht möglich gewesen.

Meiner Familie

1 Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure Typ A (GABA_A) Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren im Zentralnervensystem (ZNS) und vermitteln schnelle synaptische Inhibition. Sie gehören zur Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle und stellen Chloridkanäle dar. Charakteristisch für Mitglieder dieser Familie ist der heteropentamere Aufbau aus fünf Protein-Untereinheiten. Bindung von GABA (γ -Aminobuttersäure) an den GABA_A -Rezeptor bewirkt eine Membran-Hyperpolarisation und folglich eine verminderte neuronale Erregbarkeit.

Bislang konnten 19 unterschiedliche Gene für GABA_A -Rezeptoren-Untereinheiten identifiziert werden: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ und ρ_{1-3} . Die Mehrheit der GABA_A -Rezeptoren setzt sich aus 2 α_1 , 2 β_2 und 1 γ_2 Untereinheiten zusammen.

GABA_A -Rezeptoren werden von zahlreichen, klinisch relevanten Arzneistoffen wie den Benzodiazepinen, Barbituraten oder Injektionsanästhetika moduliert.

Neben synthetischen Substanzen sind auch einige Naturstoffe mit modulatorischer Wirkung auf GABA_A -Rezeptoren bekannt.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde die Untereinheiten-spezifische Modulation von GABA_A -Rezeptoren durch 14 Pflanzenextrakte sowie durch den Naturstoff ZFP untersucht. Dafür wurden GABA_A -Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und GABA-induzierte Chloridströme (I_{GABA}) mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik analysiert.

Drei der getesteten Pflanzenextrakte reduzierten signifikant GABA-induzierte Chloridströme, für die restlichen Extrakte konnte kein signifikanter Effekt beobachtet werden.

ZFP potenzierte I_{GABA} durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren, der Maximaleffekt betrug $629,8 \pm 104,5 \%$ bei einer EC_{50} von $12,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$. An $\alpha_1\beta_2$ - ($318,4 \pm 35,0 \%$) sowie an $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren ($113,3 \pm 70,5 \%$) war der potenzierende Effekt durch ZFP deutlich schwächer ausgeprägt. Die EC_{50} lag für $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren bei $9,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$, bei $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren bei $9,4 \pm 7,8 \mu\text{M}$. ZFP wurde in diesen Untersuchungen als γ - und β_2 -Untereinheiten-abhängiger Modulator von GABA_A -Rezeptoren identifiziert.

1.2 Abstract

γ -Aminobutyric acid type A (GABA_A) receptors are the most abundant inhibitory neurotransmitter receptors in the mammalian central nervous system (CNS) and are responsible for fast synaptic inhibitory neurotransmission. They belong to the superfamily of ligand-gated ion channels and are chloride-conducting. The family-members are characterized by the heteropentameric structure by five protein-subunits. Binding of GABA to the GABA_A receptor causes membrane-hyperpolarisation and decreased neuronal excitability.

19 different genes for GABA_A receptor subunits have been identified: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ and ρ_{1-3} . Based on the subunit repertoire various receptor subtypes can be formed. The majority of GABA_A receptors is composed of 2 α_1 , 2 β_2 and 1 γ_2 subunits.

GABA_A receptors represent the molecular target for many clinically relevant drugs including benzodiazepines, barbiturates or injection anaesthetics.

In addition to these drugs several natural compounds have been identified as modulators of GABA_A receptors.

During this project the subunit-specific modulation of GABA_A receptors by 14 plant extracts and the natural compound ZFP was analysed. Therefore GABA_A receptors were expressed in *Xenopus laevis* oocytes and GABA-induced currents (I_{GABA}) were measured using the 2-Microelectrode Voltage Clamp technique.

Three of the tested plant extracts significantly reduced GABA-induced currents (I_{GABA}), the other extracts did not show a significant effect.

ZFP potentiated I_{GABA} through $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ receptors, the maximal stimulation was $629,8 \pm 104,5$ % and the EC_{50} was $12,2 \pm 3,2$ μM .

At $\alpha_1\beta_2$ ($318,4 \pm 35,0$ %) and $\alpha_1\beta_1$ receptors ($113,3 \pm 70,5$ %) the ZFP effect was significantly reduced. EC_{50} values were $9,9 \pm 2,7$ μM at $\alpha_1\beta_2$ receptors and $9,4 \pm 7,8$ μM at $\alpha_1\beta_1$ receptors.

Thus, ZFP was identified as a γ - and β_2 -subunit dependent modulator of GABA_A receptors.

2 Einleitung

2.1 Nervensystem

Das menschliche Nervensystem besteht aus über 10^{10} Neuronen (Nervenzellen). Neuronen stellen die strukturellen und funktionellen Einheiten des Nervensystems dar und sind für die Informationsaufnahme, -verarbeitung und -übermittlung verantwortlich.

Ein Neuron besteht aus einem Zellkörper (Soma) und besitzt zwei Arten von Fortsätzen: Die Dendriten und das Axon (Neurit). Durch Dendriten, welche baumartig verzweigt sind, werden afferente (sowohl fördernde als auch hemmende) Signale von anderen Neuronen aufgenommen; durch das Axon werden efferente Signale auf Effektoren oder auch nachgeschaltete Nervenzellen weitergeleitet (Mutschler et al., 2002; Silbernagl und Despopoulos, 2003).

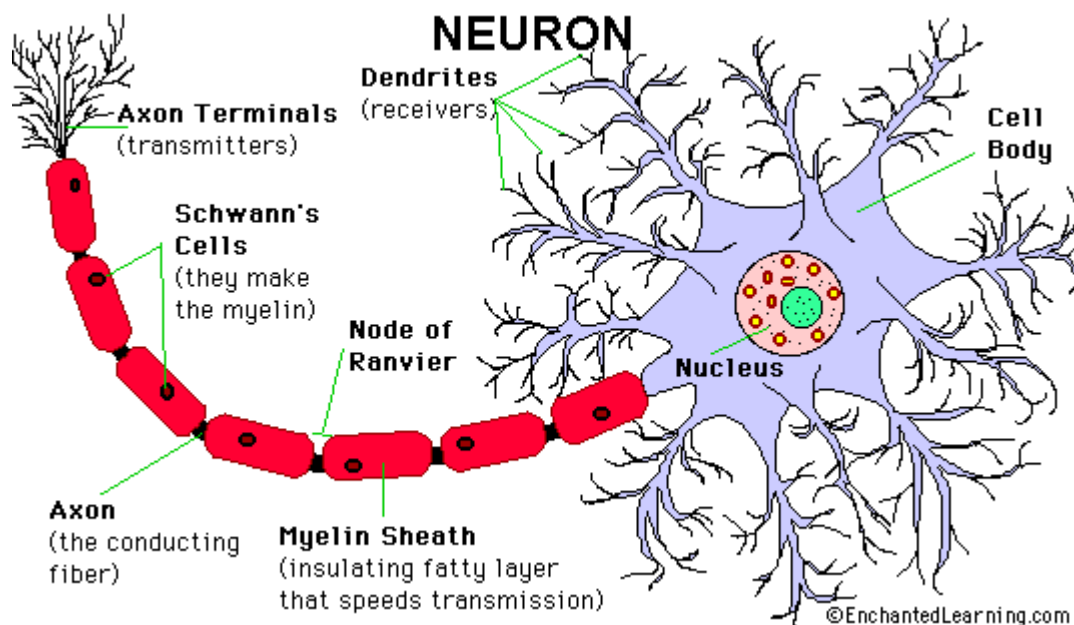


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines Neurons

<http://1.2.3.13/bmi/www.enchantedlearning.com/subjects/anatomy/brain/gifs/Neuron.GIF> (28.09.09)

Die Entstehung und Weiterleitung einer Erregung wird durch ionale Prozesse bewerkstelligt. An der Zellmembran ergibt sich durch ungleiche Ionenverteilung zwischen Intra- und Extrazellulärraum eine ständige Potentialdifferenz – auch Membranpotential genannt – welches die Basis für die Fortleitung von Erregungen und somit für die Signalübertragung und Kontraktionsauslösung darstellt (Mutschler et al., 2002; Silbernagl und Despopoulos, 2003).

2.1.1 Ruhemembranpotential

Bei einer erregbaren Zelle zeigt das Zellinnere im Ruhezustand gegenüber dem Außenraum ein negatives Potential von -60 bis -100 mV an. Die Potentialdifferenz in den beiden Kompartimenten ist der Grund für diese Negativität, wobei für deren Aufrechterhaltung vor allem die Na^+/K^+ -ATPase durch aktiven Transport verantwortlich ist (Mutschler et al., 2002).

2.1.2 Aktionspotential

Wird das Membranpotential durch einen eintreffenden chemischen oder physikalischen Reiz so verändert, dass es um einen bestimmten Betrag erniedrigt (Depolarisation) und somit ein gewisses Schwellenpotential überschritten wird, so verringert es sich durch Öffnung spannungsabhängiger Ionenkanäle noch weiter. Dadurch kann das Nerveninnere gegenüber der Aussenmembran zeitweise sogar positiv werden. Das vorhergehende Membranpotential wird im Anschluss wieder aufgebaut, was die Repolarisation darstellt. Der Gesamtvorgang, der eine De- und Repolarisationsphase beinhaltet, wird als Aktionspotential oder auch Nervenimpuls bezeichnet und kommt durch eine kurzzeitige Öffnung von Natriumkanälen, durch einen eintreffenden Reiz ausgelöst, zustande. Dem entstandenen Konzentrationsgradienten folgen die Na^+ -Ionen passiv in das Zellinnere, wodurch es zu einer Polarisationsumkehr und weiters zu einer raschen Abnahme der Natrium-Permeabilität und einem langsamen Anstieg der Kalium-Permeabilität kommt. Das Ruhemembranpotential kann sich wieder einstellen (Mutschler et al., 2002).

2.1.3 Synaptische Erregungsübertragung

Synapsen leiten eine Erregung von einem Axon auf eine andere Zelle weiter. Je nachdem, wie sich diese Erregung auf die nachgeschaltete Nervenzelle auswirkt, kann man zwischen exzitatorischen (erregenden) und inhibitorischen (hemmenden) Synapsen unterscheiden.

Während über exzitatorische Synapsen ein Aktionspotential ausgelöst wird, wird über inhibitorische Synapsen die Auslösung eines Aktionspotentials erschwert (Mutschler et al., 2002).

Bei chemischen Synapsen erfolgt die Reizweiterleitung durch Überträgersubstanzen (Neurotransmitter), welche durch ein im Axon eintreffendes Aktionspotential aus den präsynaptischen Axonendigungen freigesetzt werden. Mittels Diffusion durch den synaptischen Spalt und anschließender postsynaptischer Bindung an Rezeptoren der subsynaptischen Membran von Neuronen, Drüsen- oder Muskelzellen, wird die postsynaptische Membran – in Abhängigkeit von Transmitter und Rezeptortyp – erregt oder gehemmt (Silbernagl und Despopoulos, 2003).

Während Glutaminsäure den bedeutendsten exzitatorischen Neurotransmitter im Zentralnervensystem darstellt, ist die γ -Aminobuttersäure der wichtigste inhibitorisch wirkende Neurotransmitter. Etwa 20 – 50 % aller Synapsen im ZNS sind GABAerg (Hevers und Lüddens, 1998; Sieghart et al., 1999).

2.2 γ -Aminobuttersäure (GABA)

Biosynthese und Metabolismus

γ -Aminobuttersäure, das biogene Amin der Glutaminsäure, wird aus Glutamat durch das Enzym Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) gebildet, welches ausschließlich in GABA-synthetisierenden Neuronen im Gehirn vorkommt (Rang et al., 2007). Durch Transaminierung wird die Aminogruppe auf eine α -Ketosäure - in diesem Fall Glutamat – übertragen (Elmadfa, 2004), wodurch Succinatsemialdehyd und in weiterer Folge Bernsteinsäure entstehen. Katalysiert wird diese Reaktion von der GABA-Transaminase, die durch Vigabatrin (ein Antiepileptikum) inhibiert werden kann (Rang et al., 2007). GABAerge Neuronen und Astrozyten nehmen GABA über spezifische Transporter auf, oder aber GABA wird durch die GABA-Transaminase abgebaut. GABA kommt ubiquitär im Zentralnervensystem vor, hohe GABA-Konzentrationen sind vor allem in den Basalganglien zu finden (Mutschler et al., 2002). Die GABA-Transporter können durch Guvacin und Nipecotinsäure gehemmt werden (Rang et al., 2007).

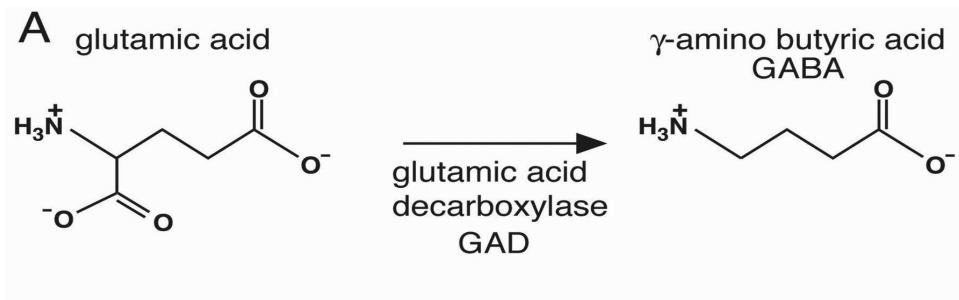


Abbildung 2: schematische Darstellung der GABA-Synthese aus Glutamat (Jorgensen, 2005)

2.3 GABA-aktivierte Rezeptoren

GABA aktiviert sowohl ionotrope als auch metabotrope Rezeptoren. Zu den ionotropen Rezeptoren zählen GABA_A - und GABA_C -Rezeptoren, während GABA_B -Rezeptoren metabotroper Natur sind. Diese beiden Rezeptorgruppen unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch in ihren molekularen sowie pharmakologischen Eigenschaften (Lukasiewicz und Shields, 1998).

Ein Großteil der GABA-bedingten physiologischen Vorgänge geschieht in Interaktion mit GABA_A -Rezeptoren (Sieghart et al., 1999). GABA_A -Rezeptoren gehören zu den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen und stellen Chloridkanäle dar. Sie sind wie die anderen Mitglieder der Familie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle Heteropentamere, das heißt, sie werden aus fünf Untereinheiten gebildet (Sieghart et al., 1994; Baumann et al., 2001; Henschel et al., 2008). Bicucullin und Picrotoxin zählen zu den GABA_A -Rezeptor Antagonisten; Barbiturate, Benzodiazepine und Steroide verstärken hingegen den Effekt der GABA am GABA_A -Rezeptor (Lukasiewicz und Shields, 1998; Chebib und Johnston, 1999; Olsen und Sieghart, 2008a,b). Weitere Beispiele für Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sind unter anderem Glutamat-, Glycin-, 5-HT_3 - sowie nicotinerge Acetylcholin-Rezeptoren (Sigel und Buhr, 1998; Mutschler et al., 2006; Goetz et al., 2007).

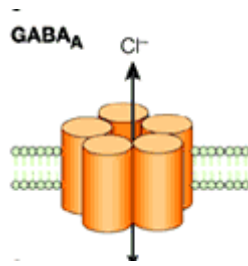


Abbildung 3: schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors aus den möglichen α 1-6, β 1-3, γ 1-3, δ , ϵ , θ und π Untereinheiten (Owens und Kriegstein, 2002)

GABA_B-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und bestehen aus sieben transmembranären Domänen. Sie sind im ZNS weitläufig verbreitet, wobei sie als Heterodimer an der Zelloberfläche vorliegen müssen, um agieren zu können. Bei der Signaltransduktion durch ein G-Protein kommt es postsynaptisch zu einer Aktivierung von Kalium-Kanälen und präsynaptisch zu einem Verschließen von Calcium-Kanälen, was intrazellulär über second-messenger-Systeme reguliert wird (Enz und Cutting, 1998; Lukasiewicz und Shields, 1998; Barnard et al., 1998; Bettler et al., 2004; Mutschler et al., 2006; Emson, 2007). GABA_B-Rezeptoren werden durch Baclofen und CCGP27492 stimuliert, durch Phaclofen gehemmt und werden nicht von GABA_A-Rezeptor Liganden moduliert (Chebib und Johnston, 1999; Bormann, 2000).

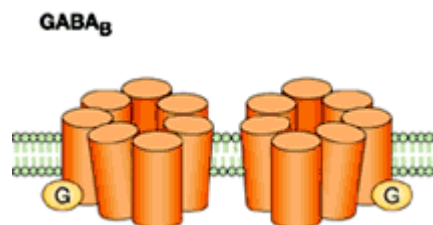


Abbildung 4: schematische Darstellung des GABA_B-Rezeptors aus den R1a, R1b und R2 Untereinheiten (Owens und Kriegstein, 2002)

GABA_C-Rezeptoren

Eine dritte, ebenfalls ionotrope Gruppe von GABA-aktivierten Rezeptoren, die als GABA_C-Rezeptoren bezeichnet wird, bewirkt wie GABA_A-Rezeptoren schnelle, synaptische Neurotransmission durch Öffnen eines Chlorid-Ionen-Kanals. GABA_C-Rezeptoren kommen in großer Zahl in der Retina vor und bestehen aus ρ -Untereinheiten (ρ ₁₋₃; wobei die ρ ₁-Untereinheiten bisher am besten untersucht sind). Sie weisen im Gegensatz zu GABA_A-

Rezeptoren unterschiedliche elektrophysiologische Eigenschaften auf (Enz und Cutting, 1998; Lukasiewicz und Shields, 1998; Barnard et al., 1998; Osolodkin et al., 2009).

Im Vergleich zu GABA_A-Rezeptoren zeigen sie eine zehn-mal größere Sensibilität für GABA; sie sind unempfindlich gegenüber GABA_A-Rezeptor-Modulatoren wie Barbituraten und Benzodiazepinen, ebenso gegen den typischen GABA_A-Rezeptor-Antagonisten Bicucullin. GABA_C-Rezeptoren werden auch nicht vom GABA_B-Rezeptor-Agonisten Baclofen aktiviert, sind dafür aber für Picrotoxin, Neurosteroiden oder auch 3-Aminopropyl(methyl)phosphonsäure empfindlich (Enz und Cutting, 1998; Lukasiewicz und Shields, 1998; Olsen und Sieghart, 2008b).

Obwohl die Bezeichnung GABA_C-Rezeptoren noch immer in Verwendung ist, wird von der International Union of Pharmacology (IUPHAR) vorgeschlagen, diesen Begriff nicht mehr zu gebrauchen, da die ρ -Untereinheiten von GABA_C-Rezeptoren strukturell Teile der GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten sind und der „GABA_C-Rezeptor“ somit eigentlich einen GABA_A-Rezeptor-Subtyp darstellt (Barnard et al., 1998).

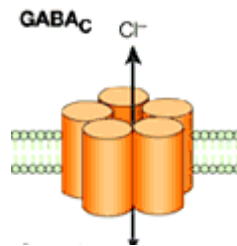


Abbildung 5: schematische Darstellung des GABA_C-Rezeptors aus den ρ 1-3 Untereinheiten (Owens und Kriegstein, 2002)

2.4 Der GABA_A-Rezeptor

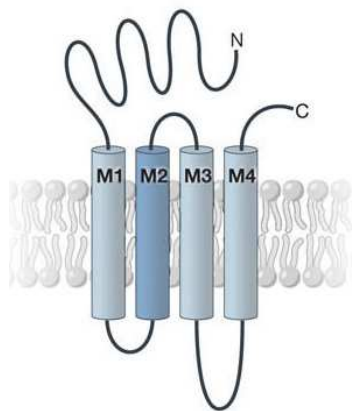
2.4.1 Vorkommen und Funktion

GABA_A-Rezeptoren sind, wie bereits erwähnt, die am häufigsten vorkommenden inhibitorischen Rezeptoren im Zentralnervensystem. Obwohl theoretisch eine große Zahl an verschiedenen Subtypen möglich wäre, sind erst wenige von ihnen auch *in vivo* identifiziert worden (Olsen und Sieghart, 2008b). Die einzelnen Mitglieder einer Subklasse weisen eine Aminosäuresequenz-Identität von 70 – 80 % auf, die Aminosäuresequenz-Identität der

Subklassen untereinander liegt zwischen 30 – 40 % (Hevers und Lüddens, 1998; Dawson et al., 2005). Durch ihre ubiquitäre Verteilung innerhalb des ZNS nehmen GABA_A-Rezeptoren eine zentrale Rolle bei physiologischen Vorgängen ein und dienen als Wirkort zahlreicher Arzneistoffe (Olsen und Sieghart, 2008b).

2.4.2 GABA_A-Rezeptoruntereinheiten

GABA_A-Rezeptoren bestehen aus fünf Protein-Untereinheiten, die um eine Zentralpore so angeordnet sind, dass sie einen Ionen-Kanal ausbilden. Jede Untereinheit ist aus einer langen N-terminalen, extrazellulären Domäne, welche die Agonisten/Antagonisten-Bindungsstelle beinhaltet, vier hydrophoben, transmembranären Domänen (M1 – M4) und



einem kurzen, extrazellulären, C-terminalen Ende aufgebaut. Intrazellulär, zwischen M3 und M4 befindet sich eine α -helikale cytoplasmatische Schleife, welche Phosphorylierungsstellen bietet. Die zweite transmembranär Membran-durchspannende Domäne (M2) aller fünf Untereinheiten formt durch ihre spezifische Anordnung die Wand der Kanalpore (Burt und Kamatchi, 1991; Möhler, 2006a; Henschel et al., 2008; Tretter und Moss, 2008).

Abbildung 6: Die 4 transmembranären Domänen (Meldrum und Rogawski, 2007)

Insgesamt existieren 19 unterschiedliche Gene für GABA_A-Rezeptoren-Untereinheiten: α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , π , θ und ρ_{1-3} . Zusätzlich ergeben sich jedoch noch weitere Isoformen der Untereinheiten durch alternatives splicing, wie zum Beispiel bei den α_6 , β_2 und γ_2 Untereinheiten (Korpi et al., 2002; Möhler, 2006a; Ben-Ari et al., 2007; Olsen und Sieghart, 2008b).

Die Mehrheit der GABA_A-Rezeptoren ist aus α , β , und γ oder δ Untereinheiten aufgebaut, wobei die Kombination von $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ mit 60 % am häufigsten vorkommt, gefolgt von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ (15 %) und $\alpha_3\beta_3\gamma_2$ (10 %). Einige der Untereinheiten, wie α_1 , β_1 , β_2 , β_3 und γ_2 finden sich mit unterschiedlicher Expressionsdichte im gesamten Gehirn, während andere Untereinheiten wie α_6 auf das Cerebellum oder γ_1 unter anderem auf Amygdala und Striatum beschränkt sind. Ebenso verändert sich das Expressionsmuster der Untereinheiten-Isoformen während der Entwicklung (Pirker et al., 2000; Henschel et al., 2008; Enoch, 2008; Olsen und Sieghart, 2008a).

Während man annimmt, dass Rezeptoren, die aus α , β , und γ Untereinheiten in einer 2:2:1 Stöchiometrie zusammengesetzt sind, wird für Rezeptor-Untereinheiten, welche aus α und β bestehen eine 3:2 oder 2:3 Stöchiometrie diskutiert, wobei $2\alpha 3\beta$ als wahrscheinlicher angesehen wird (Horenstein et al., 2001; Boileau et al., 2002a).

Die Kombination der Rezeptor-Untereinheiten hat sowohl große Bedeutung für die kinetischen Eigenschaften als auch für die spezifischen Effekte allosterischer Modulatoren wie Benzodiazepinen, Barbituraten, Steroiden, einigen Konvulsiva, polyvalenten Kationen und Ethanol auf den Rezeptor (Olsen und Tobin, 1990; Hevers und Lüddens, 1998; Henschel et al., 2008).

So unterscheiden sich zum Beispiel GABA_A -Rezeptoren, welche aus α und β Untereinheiten aufgebaut sind, von Rezeptoren, die zusätzlich noch γ Untereinheiten aufweisen, in Bezug auf Zn^{2+} - und Benzodiazepin-Sensitivität (Horenstein et al., 2001; Boileau et al., 2002a).

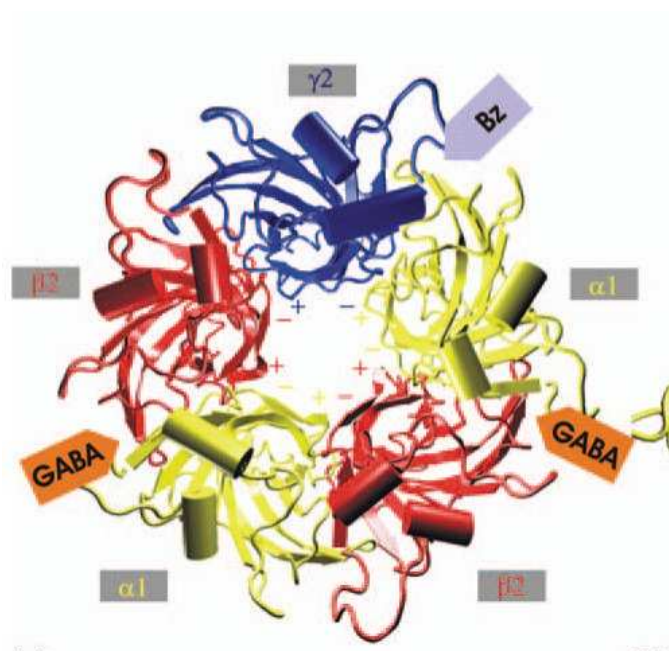


Abbildung 7: Darstellung der extrazellulären Domänen des pentameren GABA_A -Rezeptors, der aus 2 α , 2 β und einer γ -Untereinheit besteht (Goetz et al., 2007)

2.4.3 GABA-Bindungsstelle

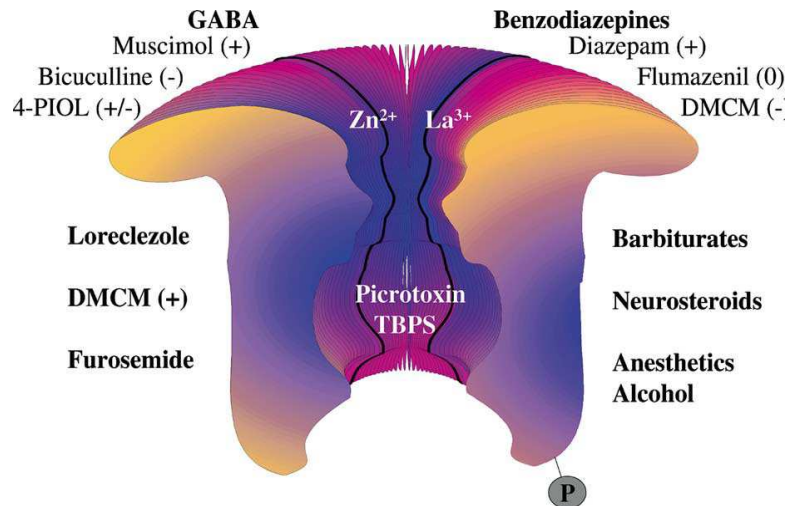


Abbildung 8: schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptors mit den Liganden-Bindungsstellen (Korpi et al., 2002)

In der extrazellulären Domäne befinden sich fünf potentielle Bindungstaschen an den Grenzflächen der fünf Untereinheiten, wobei sich am β/α -Interface die 2 GABA-Bindungsstellen, und zwischen den α/γ Untereinheiten die Benzodiazepin-Bindungsstelle befinden (Buhr et al., 1997; Kloda und Czajkowski, 2007; Olsen und Sieghart, 2008a; Hanson und Czajkowski, 2008). Die GABA-Bindungstasche setzt sich aus verschiedenen Polypeptid-Schleifen zusammen – loops A, B, und C von der β^+ („principal“) side und loops D, E, und F von der α^- („complementary“) side. Die Anordnung der Agonisten-Bindungsstelle zwischen der β/α Untereinheit sowie die der Benzodiazepin-Bindungsstelle ist dabei für alle Mitglieder der Superfamilie von Liganden-gesteuerten Ionenkanälen homolog (Olsen und Sieghart, 2008a).

Im Rahmen verschiedener Untersuchungen konnten Phe64, Arg66, Ser68 (loop D); Arg119 und Ile120 (loop E); Pro174 – Asp191 (loop F) der α_1 -Untereinheit sowie Trp92 – Asp101 (loop A); Tyr157, Thr160 (loop B); Thr202, Ser204, Tyr205, Arg207 und Ser209 (loop C) der β_2 -Untereinheit als Aminosäurereste identifiziert werden, die an der GABA-Bindung beteiligt sind (Boileau et al., 2002a).

Im Inneren der GABA_A-Untereinheiten, welche die transmembranäre Domäne ausbilden, befinden sich zusätzliche Taschen, die als weitere Bindungsstellen für Modulatoren dienen könnten. Die Bindung eines Liganden an eine dieser Bindungsstellen könnte durch Induzierung und Stabilisierung der Konformationsänderung des Rezeptors an der Erhöhung

oder Erniedrigung des GABA-induzierten Chlorid-Ionen-Stroms beteiligt sein (Olsen und Sieghart, 2008a).

Eine Öffnung des Kanals in der transmembranären Domäne wird durch Bindung eines Agonisten an die extrazelluläre Domäne und damit einhergehender Konformationsänderung bewirkt (Enoch, 2008).

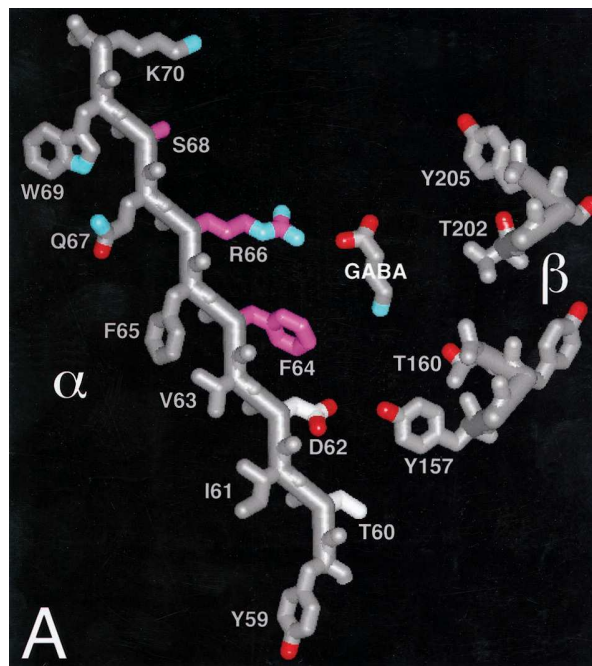


Abbildung 9: Molekulares Modell der Agonisten-Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor. (Boileau et al., 1999)

2.5 Modulatoren am GABA_A-Rezeptor

2.5.1 Benzodiazepine

Benzodiazepine gehören zur Gruppe der Tranquillantien (Tranquilizer, Ataraktika), wobei sie innerhalb dieser Gruppe die größte Bedeutung haben. Tranquillantien haben einen angstlösenden (anxiolytischen) und beruhigenden Effekt, ohne dabei antipsychotisch zu wirken. Zusätzlich verfügen die meisten Tranquillantien über schlafanstoßende, antikonvulsive und muskelrelaxierende Effekte. Anwendung finden sie daher unter anderen bei der Behandlung von Angst- und Spannungszuständen, Unruhe, psychosomatischen

Beschwerden, funktionellen Schlafstörungen oder bei der Dauerbehandlung von Muskelspasmen (Sieghart, 1994; Mutschler et al., 2006; Henschel et al., 2008).

Die 1,4-Benzodiazepine stellen schwache Basen dar, deren pharmakodynamische Aktivität an den intakten Diazepinring gebunden ist. Alle Ebenen des ZNS werden durch Benzodiazepine beeinflusst, vorrangig aber polysynaptische Bahnen. Dabei weisen verschiedene Systeme, unter anderem das limbische oder retikuläre System, eine höhere Empfindlichkeit gegenüber dieser Stoffklasse auf. Die einzelnen Vertreter dieser Stoffklasse sind dabei als Derivate der chemischen Benzodiazepin-Grundstruktur in ihrer pharmakologischen Wirkungsweise miteinander vergleichbar (Schmidt, 2007).

Benzodiazepine sind durch eine schnelle Resorbierbarkeit charakterisiert. 30 – 90 min. nach der Einnahme ergibt sich ein maximaler Plasmaspiegel. Benzodiazepine werden über die Galle ausgeschieden, im Darm jedoch rückresorbiert (enterohepatischer Kreislauf). In der Leber findet eine oxidative Metabolisierung durch N-Dealkylierung und Ringhydroxylierung sowie Konjugatbildung mit Glucuronsäure statt. Die Ausscheidung erfolgt, vor allem in metabolisierter Form, über den Urin. Benzodiazepine sind Plazenta-gängig und werden auch über die Muttermilch sezerniert (Schmidt, 2007).

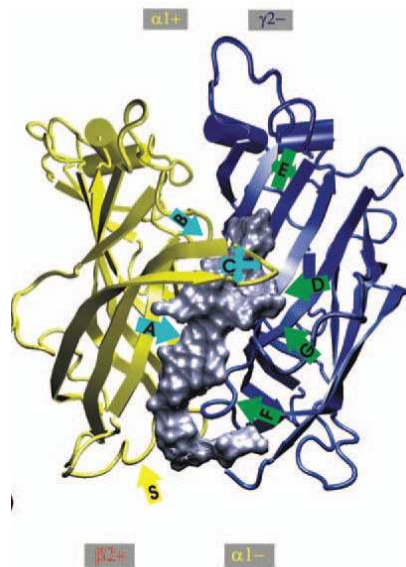
Nebenwirkung der Benzodiazepine stellen Müdigkeit und Schläfrigkeit mit einer Beeinträchtigung der Aufmerksamkeit sowie des Reaktionsvermögens dar. Bei chronischem Gebrauch ist mit neurologischen Symptomen wie Schwindel, Kopfschmerzen oder Ataxie zu rechnen, weiters ist das Auftreten einer verminderten Leistungsfähigkeit, psychischer sowie körperlicher Abhängigkeit bekannt. Ein plötzliches Absetzen dieser Präparate führt häufig zu Entzugssymptomen. Patienten leiden dabei oftmals unter Angstzuständen, innerer Unruhe, Schlaflosigkeit oder vegetativen Symptomen wie Tremor und Schwitzen. In schweren Fällen können Verwirrheitszustände oder auch epileptische Anfälle auftreten, weswegen Benzodiazepine langsam abgesetzt werden sollten (Atack, 2003; Aktories et al., 2005; Schmidt, 2007).

Benzodiazepine verstärken GABA-induzierte Chloridströme, alleine sind sie nicht in der Lage, den GABA_A-Rezeptor zu öffnen. Über Interneurone ablaufend, kommt es zu einer selektiven Verstärkung der neuronalen GABAergen inhibitorischen Neurotransmission. Folglich müssen postsynaptische GABA_A-Rezeptoren und GABA-freisetzende Neurone vorhanden sein, um die Potenzierung der Wirkung durch die Benzodiazepine zu gewährleisten (Sieghart, 1994; Hevers und Lüddens, 1998; Nutt und Malizia, 2001; Boileau et al., 2002b; Schmidt, 2007; Henschel et al., 2008).

Eine durch maximale GABA-Konzentration resultierende Wirkung kann von Benzodiazepinen nicht weiter gesteigert werden. Die GABA-Dosis-Wirkungskurve wird nur in Richtung

geringerer GABA-Konzentration verschoben. Damit kann eine Benzodiazepin-Überdosierung ausgeschlossen werden, was auch von klinischer Relevanz ist (Hevers und Lüddens, 1998).

Die Benzodiazepinbindungsstelle befindet sich, wie schon vorhin erwähnt, zwischen der α/γ



Untereinheit des GABA_A-Rezeptors, wobei der α -Untereinheit die größere Bedeutung zukommt (Da Settimo, 2007; Berezhnoy et al., 2008; Henschel et al., 2008). Dabei hat vor allem ein Histidin-Rest in der α_1 -Untereinheit (α_1 H101) einen großen Einfluss auf die Benzodiazepin-Sensitivität. Dieser Histidin-Rest, der auch in den α_2 , α_3 und α_5 Untereinheiten vorkommt, ist in α_4 und α_6 Untereinheiten durch Arginin ersetzt, wodurch α_4 und α_6 -beinhaltende Rezeptoren nicht von den klassischen Benzodiazepinen wie Diazepam, Flunitrazepam oder Clonazepam moduliert werden; andere Benzodiazepin-Liganden wie Ro 15-4513 und Flumazenil werden davon nicht beeinflusst (Sieghart, 1994; Rudolph et al., 1999; Henschel et al., 2008).

Abbildung 10: Benzodiazepin-Bindungsstelle
(Goetz et al., 2007)

GABA_A-Rezeptoren, welche eine α_1 -Untereinheit beinhalten, weisen außerdem eine hohe Sensitivität für Nicht-Benzodiazepine (Benzodiazepin-Analoga) wie Zolpidem (Imidazopyridin), CL 218-872 (Triazolopyridazin), Zaleplon, Indiplon und Abecarnil (β -Carboline) auf (Sieghart, 1994; Smith, 2001; Olsen und Sieghart, 2008a). Zolpidem zeigt geringe Affinität zu Rezeptoren, die eine α_2 oder α_3 -Untereinheit besitzen und kaum zu Rezeptoren mit einer α_5 -Untereinheit (Sieghart, 1994; Dawson et al., 2005).

Daneben zeigen Rezeptoren, die eine γ_1 anstelle einer γ_2 -Untereinheit aufweisen, eine deutlich verringerte Benzodiazepin-Sensitivität (Sieghart, 1994; Wingrove et al., 1997; Henschel et al., 2008).

δ -Untereinheiten sind meist mit α_4 oder α_6 -Untereinheiten assoziiert und stellen Benzodiazepin-insensitive GABA_A-Rezeptoren dar (Rudolph et al., 2001; Möhler, 2006a). Diese extrasynaptisch vorkommenden Rezeptoren finden sich vor allem im Cerebellum und Gyrus dentatus (Möhler, 2006a).

Mit Hilfe von Punktmutationen in der α_1 -Untereinheit bei Mäusen gelang es, die Hauptwirkungsqualitäten von Diazepam, die von unterschiedlichen Rezeptorsubtypen vermittelt werden, zu identifizieren. Sedierung, antikonvulsive Wirkung und anterograde Amnesie sind mit α_1 , Anxiolyse mit α_2 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren assoziiert, was

darauf schließen lässt, dass Sedation und Anxiolyse pharmakologisch auftrennbar sind (Jurd et al., 2003; Schmidt, 2007; Olsen und Sieghart, 2008a). Weiters werden muskelrelaxierende Wirkungen vor allem mit α_2 , aber auch mit α_3 und α_5 -enthaltenden Rezeptoren (Schmidt, 2007); Ethanol-potenzierende Wirkungen und schwache anxiolytische Eigenschaften mit α_2 , α_3 und/oder mit α_5 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren in Verbindung gebracht (Rudolph et al., 1999). In Abbildung 11 ist die chemische Strukturformel von Diazepam dargestellt.

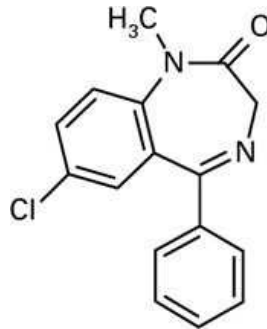


Abbildung 11: chemische Strukturformeln von Diazepam

http://1.2.3.11/bmi/content.answers.com/main/content/img/oxford/Oxford_Chemistry/0192801015.diazepam.1.jpg (30.09.09)

2.5.2 Barbiturate

Barbiturate, die Jahrzehnte lang als Mittel der Wahl bei Schlafstörungen gehandelt wurden, stellen chemisch betrachtet zyklisierte Harnstoff-Derivate dar. Im Gegensatz zu den Benzodiazepinen ist ihre therapeutische Breite jedoch gering (Lüllmann et al., 2006).

Barbitursäure liegt, aufgrund ihrer hohen Azidität, im Organismus als Anion (Barbiturat) vor. Da es die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann, existieren auch keine zentral-nervösen Effekte (Mutschler et al., 2006).

Anwendung finden Barbiturate heute nur noch in der Anästhesie und unter bestimmten Umständen in der Behandlung von Epilepsien (Grand-mal-Anfälle). Methohexital (N-methyliertes Barbiturat) und Thiopental (Thiobarbiturat) werden als Natriumsalze zur Einleitung einer Narkose eingesetzt (Mutschler et al., 2006).

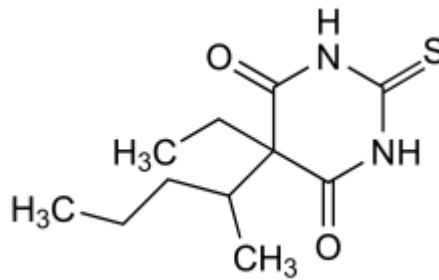


Abbildung 12: chemische Strukturformel von Thiopental
<http://www.medicinescomplete.com/mc/clarke/current/images/clk1597c001.gif> (30.09.09)

Barbiturate verstärken die GABA-induzierte Wirkung, indem sie die Kanal-Öffnungsdauer von GABA_A-Rezeptoren steigern, ohne dabei einen Effekt auf die Öffnungshäufigkeit oder die Leitfähigkeit auszuüben (Henschel et al., 2008).

Bei niedrigen Konzentrationen potenzieren sie GABA-induzierte Ströme (Macdonald und Barker, 1979), bei Konzentrationen über 50 μ M vermögen Barbiturate GABA_A-Rezeptoren auch in Abwesenheit von GABA zu öffnen (Yang und Olsen, 1987; Henschel et al., 2008). Bei noch höheren Konzentrationen können GABA_A-Rezeptoren durch Barbiturate blockiert beziehungsweise gehemmt werden (Drafts und Fisher, 2006).

Da Barbiturate mit geringer Affinität an GABA_A-Rezeptoren binden, wurden die meisten ihrer Effekte indirekt über Interaktionen mit der GABA/Muscimol- oder der Benzodiazepin-Bindungsstelle gemessen. Barbiturate erhöhen die GABA- und Benzodiazepin-Bindungswahrscheinlichkeit, inhibieren allerdings die Bindung von Picrotoxin/T-Butylbicyclophosphorothionat (TBPS) durch allosterische Modulation. Man nimmt an, dass mindestens zwei verschiedene Interaktionsstellen für Barbiturate am GABA_A-Rezeptor vorhanden sind (Hevers und Lüddens, 1998).

2.5.3 Neurosteroid

Steroide werden sowohl in der Peripherie als auch im Gehirn - in Gliazellen - synthetisiert, wo sie dann als Neurosteroid bezeichnet werden. Diese üben nicht-genomische Effekte auf die inhibitorische Neurotransmission und Verhalten aus, indem sie direkt mit GABA_A-Rezeptoren interagieren (Henschel et al., 2008).

Neuroaktive Steroide wie Allopregnanolon (3 α 5 α -THP), Pregnanolon (3 α 5 β P) Allotetrahydrocorticosteron (THDOC) und (3 α ,5 β)-3,21-Dihydroxypregnan-20-on

(3 α 5 β THDOC) stellen positive allosterische Modulatoren dar. Sie verfügen über sedative, anxiolytische und antikonvulsive Eigenschaften (Akk et al., 2007).

Ausgehend vom Cholesterol werden sie über Progesteron beziehungsweise Corticosteron synthetisiert. Änderungen des Progesteron-Spiegels können daher einen Einfluss auf die modulatorischen Effekte der Neurosteroiden auf den GABA_A-Rezeptor ausüben. Sie erhöhen die Bindungs-Affinität von Muscimol oder auch vom Benzodiazepin-Agonist Flunitrazepam, vermindern andererseits die Affinität der Bindung von Picrotoxin und TBPS (Akk et al., 2007; Smith et al., 2007).

Alphaxalon, ein synthetisches Derivat, welches als Anästhetikum zum Einsatz kommt und diverse Progesteron-Metaboliten verstärken auch den GABA-induzierten Chloridstrom. Ab einer Konzentration von 100 nM werden GABA_A-Rezeptoren direkt durch Neurosteroiden aktiviert (Paul und Purdy, 1992; Hosie et al., 2006; Akk et al., 2007; Henschel et al., 2008).

Neuroaktive Steroide mit einer Sulfatgruppe am C₃ wie Pregnenolonsulfat (PS) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) sind hingegen nicht-kompetitive Antagonisten und daher anxiogen und prokonvulsiv (Henschel et al., 2008). Während DHEAS ausschließlich antagonistische Eigenschaften aufweist, übt PS - konzentrationsabhängig – sowohl antagonistische als auch agonistische Effekte aus (Hevers und Lüddens, 1998).

Im Allgemeinen interagieren alle neuroaktiven Steroide mit GABA_A-Rezeptoren, jedoch gibt es Hinweise, dass der δ -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors eine besondere Rolle zukommt (Hevers und Lüddens, 1998; Akk et al., 2007; Smith et al., 2007; Henschel et al., 2008). So sind Maximal-Effekte durch Steroide an GABA_A-Rezeptoren, welche eine δ -Untereinheit beinhalten, deutlich größer als an Rezeptoren, die stattdessen eine γ -Untereinheit aufweisen (Wohlfarth et al., 2002; Akk et al., 2007).

Wie auch bei den Barbituraten geht man bei den Neurosteroiden von wenigstens zwei Interaktionsstellen am GABA_A-Rezeptor aus. Eine dieser Bindungsstellen befindet sich zwischen der M1 und der M4 der α -Untereinheit und ist für die potenzierenden Eigenschaften der Neurosteroiden verantwortlich, während die andere Bindungsstelle zwischen der M1 der α -Untereinheit und der M3 der β -Untereinheit direkten Einfluss auf das Gating des Kanals ausübt (Hosie et al., 2006; Akk et al., 2007; Henschel et al., 2008).

Abbildung 13 zeigt die chemischen Strukturformeln einiger Neurosteroiden.

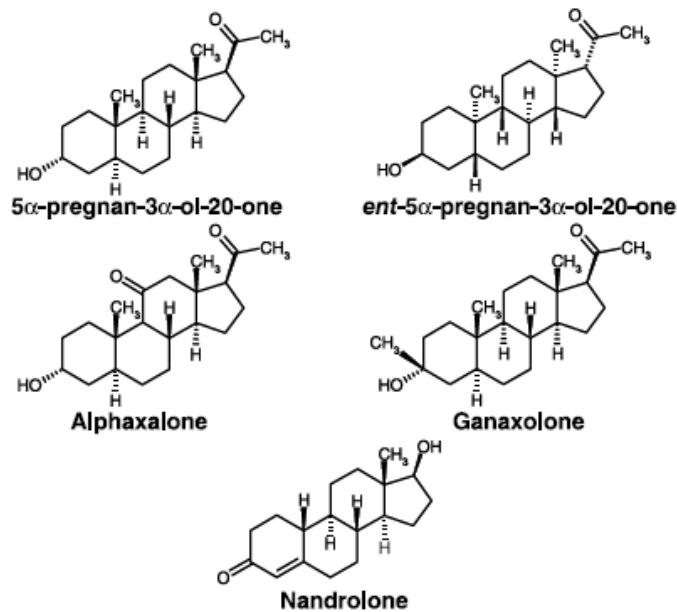


Abbildung 13: chemische Strukturformeln einiger Neurosteroiden
(Lambert et al., 2003)

2.5.4 Anästhetika

Allgemeinanästhetika können je nach Applikationsart in Inhalations- und Injektionsanästhetika unterteilt werden. Beide können durch partielle Lähmung des Zentralnervensystems das Bewusstsein, die Abwehrreflexe, die Muskelspannung sowie das Schmerzempfinden reversibel ausschalten (Mutschler et al., 2006).

Obwohl Anästhetika schon seit mehr als 150 Jahren bekannt sind, ist ihr genauer Wirkmechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt (Zeller et al., 2005). Eine nicht-spezifische Störung der Integrität der zellulären Membran wurde lange Zeit als Wirkmechanismus angenommen. Später aber konnte festgestellt werden, dass Allgemeinanästhetika in klinisch relevanten Konzentrationen direkt an Rezeptoren wirken beziehungsweise Liganden-gesteuerte Ionenkanäle modulieren (Krasowski et al., 1998; Jurd et al., 2002).

Ogleich Allgemeinanästhetika nicht nur mit GABA_A-Rezeptoren, sondern auch mit Glutamat- und Acetylcholin-Rezeptoren interagieren, kommt dem GABA_A-Rezeptor doch eine besondere Bedeutung zu (Hevers und Lüddens, 1998; Henschel et al., 2008; Enoch, 2008).

Die Dauer der synaptischen Inhibition wird durch allosterische Regulation des GABA_A-Rezeptors durch Allgemeinanästhetika verlängert (Jenkins et al., 2001).

In hohen Konzentrationen können vor allem Injektionsanästhetika wie Propofol oder Etomidat den GABA_A-Rezeptor auch direkt öffnen (Harris et al., 1995; Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002; Goetz et al., 2007). Die von Allgemeinnarkotika induzierten Ströme sind sensitiv für Bicucullin und können durch Picrotoxin gehemmt werden (Harris et al., 1995; Hevers und Lüddens, 1998; Goetz et al., 2007).

Stereoselektivität sowie nicht-kompetitive Interaktionen mit anderen Modulatoren weisen auf eine spezifische Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor hin, die bis heute noch nicht vollständig identifiziert werden konnte (Hevers und Lüddens, 1998; Henschel et al., 2008; Enoch, 2008).

Die Wirkung der Inhalationsanästhetika scheint nicht an eine bestimmte GABA_A-Rezeptoruntereinheit gebunden zu sein, generell zeigen sie nur wenig Untereinheitenspezifische Effekte. Durch Mutagenese-Untersuchungen konnten aber bestimmte Aminosäurereste in den M2 und M3-Domänen von GABA_A-Rezeptoren, in sowohl α - als auch β -Untereinheiten identifiziert werden, denen eine besondere Bedeutung in der Modulation einer Vielzahl von Inhalationsanästhetika zukommt. (Jurd et al., 2002; Zeller et al., 2005; Franks, 2006).

Für die Injektionsanästhetika Etomidat und Propofol hingegen scheinen nur die M2 und M3-Domänen der β_2 - oder β_3 -Untereinheit – nicht jedoch die der α -Untereinheiten – bedeutsam zu sein (Jurd et al., 2002; Zeller et al., 2005; Franks, 2006; Goetz et al., 2007).

In rekombinanten Rezeptoren modulierte Propofol Rezeptoren unabhängig von der exprimierten β -Untereinheit, Etomidat zeigte hingegen eine Selektivität für β_2 und β_3 -Untereinheiten, was vermutlich mit einem Asparagin-Rest in der M2-Domäne dieser β -Untereinheiten in Zusammenhang steht. Mutation des Asparagins zu einem Methionin (Asn 265 → Met) in der β_3 -Untereinheit hebt sowohl die modulatorischen als auch die direkten Effekte von Etomidat und Propofol größtenteils auf (Zeller et al., 2005). Die allosterischen Effekte von Enfluran werden durch diese Mutation ebenfalls signifikant reduziert. Auf Neurosteroid-Anästhetika wie Alphaxolon und 5- α -pregnan-3- α -ol-20-on hingegen zeigt diese Mutation keine Auswirkung (Belelli et al., 1997; Jurd et al., 2002).

Mutagenese-Untersuchungen in der transmembranären Domäne der α -Untereinheit ergaben, dass Ser270 vermutlich an der Bindung von Molekülen wie Ethanol und Isofluran involviert ist. Mascia et al. (2000) zeigten, dass ein Alkanethiol-Anästhetikum und ein Sulfhydryl-Reagent (Propylmethanethiosulfonat) eine irreversible Potenzierung der Ströme durch Rezeptoren mit mutierter α -Untereinheit auslösten. Durch diese Alkylierung konnte in weiterer Folge auch Isofluran nicht mehr binden, was darauf hinweist, dass Alkohol und Isofluran möglicherweise dieselbe Bindungsstelle haben könnten (Jenkins et al., 2001).

In einer Untersuchung konnte gezeigt werden, dass zwei Aminosäuren – eine in der α M1-Domäne (Met-236), die zweite in der β M3-Domäne (Met-286) – den Teil einer Bindungsstelle in der transmembranären Domäne (TMD) für ein modifiziertes Etomidat-Molekül („photoaffinity labeled“) darstellen, welche sich an den selben Untereinheiten-Interfaces wie die GABA-Bindungsstelle befindet (Li et al., 2006).

Bali et al. (2009) konnten ebenfalls bestätigen, dass Aminosäuren in den transmembranären Domänen einen großen Einfluss auf die Wirkung von Anästhetika ausüben. Da zwei $\alpha\beta$ -Interfaces für GABA sowie dadurch auch zwei $\alpha\beta$ -Interfaces für Anästhetika existieren, vermutet man, dass die Bindung an eine der beiden Bindungsstellen die allosterische Modulation von GABA-induzierten Strömen bewirkt, während die Besetzung beider Bindungsstellen mit einer direkten Aktivierung in Zusammenhang gebracht wird (Rüsch et al., 2004).

Es wird angenommen, dass bei der Kanal-Aktivierung eine Bewegung der β M3- zur α M1-Domäne stattfindet. Daher, in Analogie zur Aktivierung des Kanals durch GABA, wo durch die Bindung des Agonisten eine Kontraktion der Bindungsstelle induziert wird, könnte auch durch Etomidat ein ähnlicher Mechanismus in der transmembranären Domäne ausgelöst werden (M3 β zu α M1) (Bali et al., 2009).

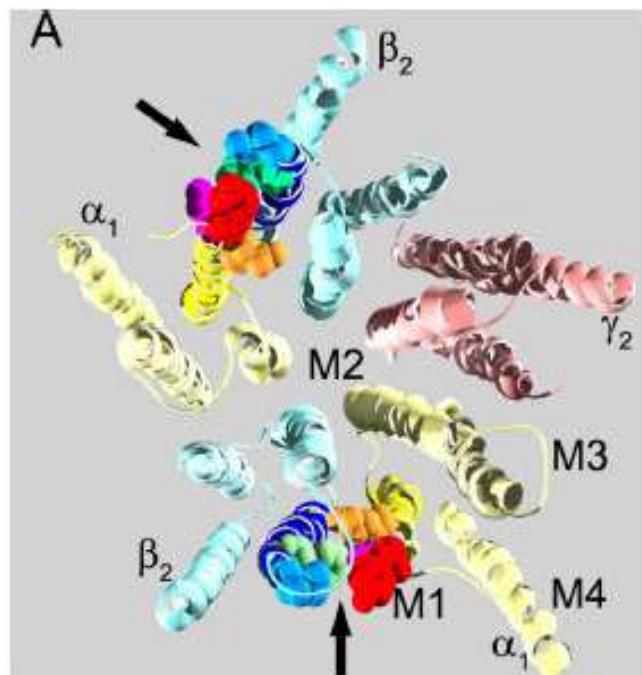


Abbildung 14: schematische Darstellung des GABA_A-Rezeptor-Interfaces zwischen der β_2 -M3 und der α_1 -M1 der TMD für die Etomidat-Bindungsstelle (Bali et al., 2009)

2.5.5 Alkohol

Alkohol, im speziellen Ethanol, ist in der Lage an spezifische Proteine, vor allem membrangebundene Liganden-gesteuerte Ionenkanäle sowie spannungsabhängige Ionenkanäle, zu binden und dadurch ihre Funktion zu verändern. Ebenso geht man davon aus, dass Ethanol einen Einfluss auf second-messenger-Prozesse ausübt. Bei den Liganden-gesteuerten Ionenkanälen kommt dem GABA_A-Rezeptor eine zentrale Rolle sowohl bei den Kurzzeit- als auch Langzeiteffekten von Ethanol im Zentralnervensystem zu (Davies, 2003; Botta et al., 2007).

Ethanol potenziert GABA-induzierte Ströme (Lobo und Harris, 2008); Suzdak und Paul (1987) konnten eine um bis zu 260 %ige Stimulation zeigen (Suzdak und Paul, 1987).

Bei Untersuchungen von, in *Xenopus*-Oozyten exprimierten, rekombinanten GABA_A-Rezeptoren konnten potenzierende Effekte durch Ethanol bei Konzentrationen unter 100 mM/L festgestellt werden; andere Untersuchungen konnten dies jedoch nicht bestätigen. Weiters konnte gezeigt werden, dass die Potenzierung von GABA-induzierten Strömen durch Ethanol eine Steigerung der Kanalöffnungsfrequenz sowie auch der Kanalöffnungsdauer auslöst (Davies, 2003; Lobo und Harris, 2008). Die Zeit, in jener der Kanal geschlossen ist, ist dabei vermindert. Als Summe dieser Effekte kann ein erhöhter Ionen-Fluss durch den geöffneten Kanal, in Anwesenheit von GABA und Ethanol, beobachtet werden (Davies, 2003).

Wafford und Whiting (1992) stellten fest, dass $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptoren Ethanol-abhängig moduliert werden. Die γ_{2L} splice-Form enthält, im Vergleich zur γ_{2S} -Form, eine aus acht zusätzlichen Aminosäuren bestehende Sequenz zwischen M3 und M4, die eine Bindungsstelle für die Proteinkinase C (PKC) beinhaltet (Hevers und Lüddens, 1998).

Dieses Ergebnis konnte durch andere Versuche jedoch nicht bestätigt werden, und so nimmt man an, dass Ethanol unabhängig vom Typ der γ_2 -Untereinheit im Rezeptor agiert. Mit Ausnahme der $\alpha_4\beta_1\delta$ -Isoform, welche gegenüber anderen Rezeptor-Isoformen sensibler erschien, zeigte sich keine signifikante Untereinheiten-spezifische Abhängigkeit (Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002; Davies, 2003).

Hanchar et al. (2005) und Wallner et al. (2003) konnten dagegen eine besondere Ethanol-Sensitivität für GABA-Rezeptoren, welche aus α_1 , α_4 oder α_6 in Kombination mit β_3 und einer δ -Untereinheit zusammengesetzt sind, feststellen. Bei diesen Rezeptoren konnten die GABA-induzierten Ströme um 30 bis 50 % durch 10 mM/L Ethanol und über 100 % durch 100 mM/L Ethanol gesteigert werden (Santhakumar et al., 2007). $\alpha_4\beta_3\delta$ -Rezeptoren sind

zusätzlich 10-mal sensitiver als $\alpha_4\beta_2\delta$ -Rezeptoren, was auf die Bedeutung der β_3 -Untereinheit in Bezug auf Alkohol-Sensitivität hinweist (Vengeliene et al., 2008).

Neben Ethanol zeigen auch andere Alkohole wie Methanol, Butanol, Hexanol, Octanol, Decanol und Dodecanol eine Verstärkung der GABA-induzierten Ströme. Diese Eigenschaft scheint in Abhängigkeit von der Kettenlänge zu stehen, wobei die potenzierenden Effekte mit steigender Kettenlänge zunehmen (Davies, 2003; Harris et al., 2008). Alkohole mit mehr als zwölf Kohlenstoff-Atomen zeigen jedoch keine modulierenden Eigenschaften mehr, was auf eine Bindungstasche, welche diese längeren Alkohole aufgrund ihrer Größe, nicht mehr zu binden vermag, schließen lässt (Davies, 2003; Harris et al., 2008; Lobo und Harris; 2008).

Kürzlich durchgeführte Untersuchungen deuten auf eine spezifische „high-affinity“ Ethanol-Bindungsstelle in aus α_4 (oder α_6), β_3 sowie aus δ -zusammengesetzten GABA_A-Rezeptoren hin, die eine Sensitivität für Ethanol in Konzentrationen von 3 mM aufweisen. Zusätzlich wird kontrovers diskutiert, ob diese Bindungsstelle auch für den Liganden Ro 15-4513 existiert, welcher mit Ethanol um diese Bindungsstelle konkurrieren könnte (Harris et al., 2008).

Chronischer Ethanol-Einfluss hat eine veränderte Erregbarkeit von Neuronen zur Folge. GABA_A-Rezeptor-Untereinheiten mRNA sowie der Proteinspiegel werden während längerdauernder Ethanol-Einwirkung beeinflusst. Im Tierversuch konnte man auch eine veränderte Modulation durch allosterische Liganden wie Benzodiazepine feststellen. Während positiv allosterische Modulatoren wie Flunitrazepam verminderte potenzierende Eigenschaften aufwiesen, konnte bei negativ allosterischen Modulatoren wie zum Beispiel Ro 15-4513 ein gesteigerter Effekt nachgewiesen werden (Davies, 2003; Santahkumar et al., 2007). Ebenso veränderte sich auch die Modulation durch Neurosteroiden (Davies, 2003; Follesa et al., 2006).

Langzeit-Ethanol-Einfluss führte außerdem zu einer veränderten Expression oder Funktion von Spannungs-abhängigen Kalzium- sowie anderen Liganden-gesteuerten Ionen-Kanälen (Davies, 2003; Santahkumar et al., 2007).

Chronischer Alkoholkonsum kann weiters auch für die Apoptose im Zentralnervensystem während der fetalen Entwicklungsphase verantwortlich gemacht werden (Henschel et al., 2008). Der dadurch entstehende Verlust von Neuronen scheint bei Kindern mit Fetalem-Alkohol-Syndrom, charakterisiert durch reduzierte Gehirnmasse und dem verminderten cerebralen Cortex, beteiligt zu sein (Davies, 2003).

2.5.6 Antiepileptika

Antiepileptika (Antikonvulsiva) werden zur symptomatischen Behandlung der unterschiedlichen Erscheinungsformen von Epilepsien eingesetzt, um so eine Erhöhung der Krampfschwelle ohne weitgehende Beeinflussung der normalen motorischen Erregbarkeit zu erreichen. Da sie über Jahre hinweg oder unter Umständen das gesamte Leben lang eingenommen werden müssen, setzt man eine gute Verträglichkeit bei Langzeitbehandlungen, eine relativ lange Wirkungsdauer sowie weitgehendes Ausbleiben von Nebenwirkungen voraus (Mutschler et al., 2006; Schmidt, 2007).

Ihre Wirkmechanismen sind bis heute nicht vollständig bekannt. Zahlreiche Antikonvulsiva agieren an mehreren Zielstrukturen, um so eine antiepileptische Wirkung zu erreichen. Sie blockieren spannungsabhängige Natriumkanäle, verringern den Einstrom von depolarisierenden Ca^{2+} -Ionen, verhindern die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat oder Aspartat, hemmen weiters die glutamaterge Erregungsübertragung an N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren, und verstärken die Wirkung der GABA (Mutschler et al., 2006; Schmidt, 2007; Mareš und Kubová, 2008).

Viele der Substanzen, die GABAerge Effekte potenzieren, verfügen auch über antiepileptische Eigenschaften. Jene, die GABAerge Effekte blockieren oder über allosterische Modulation die Rezeptorfunktionen inhibitorisch beeinflussen, wirken dagegen als Prokonvulsiva (Meldrum und Rogawski, 2007).

Antiepileptika, welche hauptsächlich die Wirkung von GABA verstärken, sind Phenobarbital; Primidon; Clonazepam, Diazepam, Lorazepam; Vigabatrin und Tiagabin (Mutschler et al., 2006).

Phenobarbital gehört, wie bereits erwähnt, zur Gruppe der Barbiturate und ist ein Phenylethyl-Derivat, das die GABA-induzierte inhibitorische Wirkung durch allosterische Modulation am GABA_A -Rezeptor verstärkt. Hauptindikation für Phenobarbital stellen Grand-mal-Anfälle dar. Es wird bei oraler Gabe fast zur Gänze resorbiert, die Plasmahalbwertszeit liegt zwischen 40 bis 120 Stunden. Als Nebenwirkungen treten kognitive Beeinträchtigungen, häufig mit sedativen Effekten auf. Bei Kindern kann es außerdem zu Hyperaktivität kommen. Für Primidon, ein Desoxybarbiturat, welches im Organismus zu den zwei aktiven Metaboliten Phenylethylmalonamid und Phenobarbital umgewandelt wird, gelten ähnliche Indikationen wie für Phenobarbital. Bei psychomotorischen und myoklonischen Anfällen ist es aber vermutlich wirksamer (Feely, 1999; Mutschler et al., 2002).

Klassische Benzodiazepine wie Clonazepam oder Diazepam werden beim lebensbedrohlichen Grand-mal-Status epilepticus eingesetzt, finden aber aufgrund ihres Gewöhnungseffektes in der Langzeitbehandlung von Epilepsien nur geringe Anwendung. Nicht-Benzodiazepine, die eine Selektivität für α_1 ebenso wie für α_5 -Rezeptoruntereinheiten aufweisen, wie zum Beispiel Zolpidem oder Loreclezol, welches β_2/β_3 -selektiv agiert, finden ebenfalls begrenzte Anwendung, da sie über sedative Nebeneffekte verfügen. Positive allosterische Modulatoren, die hingegen eine reduzierte Aktivität an α_1 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren aufweisen, üben weniger sedative Nebenwirkungen aus. Diese Nicht-Benzodiazepine bzw. Benzodiazepin-Analoga, welche an die Bindungsstelle aller Benzodiazepin-sensitiven Isoformen binden können, treten zum Teil als partielle Agonisten mit reduzierten Effekten auf. Weiters vermutet man bei diesen partiellen Agonisten einen verminderten Toleranzeffekt (Meldrum und Rogawski, 2007).

Vigabatrin, welches rasch resorbiert wird und eine Plasmahalbwertszeit von 6 bis 8 Stunden aufweist, ist ein γ -Vinylderivat der GABA (Mutschler, 2002). Es induziert eine irreversible Hemmung der GABA-Transaminase durch kovalente Bindung der Vinylgruppe am aktiven Zentrum und erhöht somit die synaptische GABA-Konzentration. Vigabatrin moduliert sowohl GABA_A- als auch GABA_B-Rezeptoren. Es findet unter anderem Anwendung bei Infantilen Spasmen und ist auch für die Behandlung von fokalen Anfällen und dem Lennox-Gastaut-Syndrom bei Kindern zugelassen (Mutschler, 2002; Stępień et al., 2005). Da vor allem Gesichtsfeldeinengungen als Nebenwirkungen auftreten können, ist die Behandlung mit Vigabatrin jedoch mit Sorgfalt zu überwachen (Feely, 1999).

Tiagabin, ein N-substituiertes Nipecotinsäure-Derivat, hemmt die Wiederaufnahme der GABA in Neuronen und Gliazellen. Es dient vor allem zur Zusatzbehandlung von fokalen und sekundär generalisierten tonisch-klonischen Anfällen. Unerwünschte Nebeneffekte stellen vor allem Schwindel, Tremor und Konzentrationsstörungen dar (Mutschler et al., 2002; LaRoche und Helmers, 2004; Stępień et al., 2005).

2.5.7 Diverse Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren

Picrotoxin/TBPS

Picrotoxin, TBPS (t-Butylbicyclophosphorothionat), t-Butylbicycloorthobenzoat, Pentylenetetrazol sowie einige Insektizide wie Dieldrin oder Lindan und Antihelminika stellen Antagonisten am GABA_A-Rezeptor dar und hemmen nicht-kompetitiv I_{GABA} , wodurch sich konvulsive Effekte ergeben. Man nimmt für diese Substanzen eine eigene Bindungsstelle, unterschiedlich zur GABA-, Benzodiazepin-, Barbiturat- oder Steroidbindungsstelle, an. TBPS übt partielle und allosterische Inhibition der GABA-Bindung aus, ebenso werden durch sie Effekte positiver Modulatoren am GABA_A-Rezeptor gehemmt. Die Bindung von negativ-allosterischen Modulatoren wird jedoch erleichtert. Diese allosterische Interaktion scheint bidirektional, da GABA, Benzodiazepine, Barbiturate und Steroide die TBPS-Bindung modulieren (Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002).

Kationen wie zum Beispiel Zink und Lanthan

Bestimmte mono-, bi- und trivalente Kationen können GABA_A-Rezeptoren über voneinander unabhängige Bindungsstellen modulieren. Intrazelluläre Ca^{2+} , extrazelluläre H^+ , Zn^{2+} , La^{3+} und Al^{3+} Ionen wirken dabei direkt modulierend auf GABA_A-Rezeptoren (Korpi et al., 2002).

Zink inhibiert GABA-induzierte Ströme (Hosie et al., 2003) vor allem an Rezeptoren bestehend aus $\alpha_6\beta_3\delta$ -Untereinheiten (Korpi et al., 2002). Wird die δ - gegen eine γ -Untereinheit substituiert, so reduziert sich die Sensitivität für eine Zink-Inhibition. Ebenso wird eine Verringerung der Sensitivität durch Ersatz der α_6 - durch eine α_1 -Untereinheit erreicht, wobei die Potenz von Zink, GABA_A-Rezeptoren zu hemmen, in folgender Weise abnimmt: $\alpha_1\beta_1\delta > \alpha_1\beta_1\gamma_2\text{L}\delta > \alpha_1\beta_1\gamma_{2\text{L}}$ (Korpi et al., 2002).

Wooltorton et al. (1997) stellten fest, dass die Zn^{2+} -Inhibition durch eine Mutation in der M2 (H292A) in homomeren β_3 und heteromeren $\alpha_1\beta_3$ (H292A) Rezeptoren reduziert werden kann, weswegen diese Aminosäure an der Zink-Bindungsstelle beteiligt sein könnte (Korpi et al., 2002).

Lanthan verstärkt GABA-induzierte Ströme, indem es die Sensitivität des Rezeptors für GABA erhöht. Während $\alpha_1\beta_3\gamma_{2\text{L}}$ -Rezeptor-Ströme durch La^{3+} potenziert werden, werden $\alpha_6\beta_3\gamma_{2\text{L}}$ - sowie $\alpha_6\beta_3\delta$ -Rezeptor-Ströme inhibiert. Die genauen molekularen Mechanismen der durch La^{3+} -induzierten Effekte sind bis jetzt jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt (Narahashi et al., 1994; Korpi et al., 2002).

Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid wirkt als Antagonist an GABA_A-Rezeptoren, wobei eine Spezifität für rekombinante $\alpha_6\beta_{2/3}\gamma_2$ -Rezeptoren festgestellt werden konnte. Die antagonistischen Eigenschaften von Furosemid sind dabei von α_6 - sowie $\beta_{2/3}$ -Untereinheiten abhängig, Coexpression von γ - oder δ -Untereinheiten zeigte keinen Effekt. Bei Rezeptoren mit β_1 - sowie α -Untereinheiten (exklusiv α_4 und α_6) konnte keine Inhibition festgestellt werden. Korpi et al. (1995) stellten fest, dass Furosemid nicht mit der GABA-, Benzodiazepin- oder der Ro 15-4513-Bindungsstelle agiert. Es scheint sich somit um eine individuelle Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor zu handeln (Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002).

2.5.8 Naturstoffe als GABA_A-Rezeptor Modulatoren

Polyacetylen-Liganden

Die meisten, an GABA_A-Rezeptoren modulatorisch wirkenden Substanzen, beinhalten eine zyklische Komponente. Baur et al. (2005) entdeckten drei lineare Moleküle mit Polyacetylen-Struktur, welche als allosterische Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren wirken. Diese Substanzen konnten aus *Cussonia zimmermannii* – einer ostafrikanischen, in der traditionellen Volksmedizin eingesetzten Pflanze – isoliert werden.

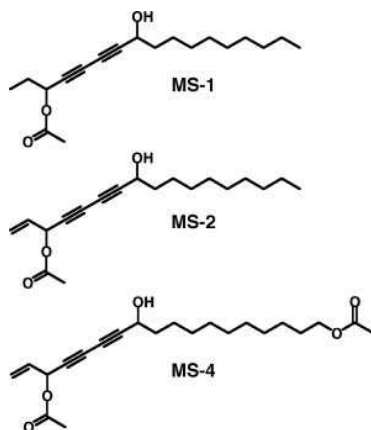


Abbildung 15: Darstellung der drei Polyacetylen-Liganden (Baur et al., 2005)

Für alle der drei isolierten Moleküle konnte die stärkste Modulation an $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA_A-Rezeptoren beobachtet werden, wobei die Effekte unabhängig von der γ -Untereinheit waren. Im Gegensatz dazu schien die β -Untereinheit einen starken Einfluss auf die Modulation auszuüben. Weiters konnte festgestellt werden, dass die Wirkung dieser Substanzen durch den Benzodiazepin-Antagonisten Ro 15-1788 nicht aufgehoben werden konnten. Folglich nimmt man eine eigene Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor an, die unterschiedlich zur Benzodiazepin-Bindungsstelle zu sein scheint.

Die beobachtete β -Untereinheiten-Spezifizität sowie ein ausbleibender Effekt durch eine β_2N256S -Mutation weisen außerdem auf eine Bindungsstelle, welche sich von der Loreclezol-Bindungsstelle unterscheidet, hin (Baur et al., 2005).

Menthol

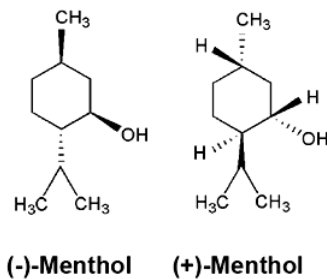


Abbildung 16: (-)-Menthol
und (+)-Menthol
(Zhang et al., 2008)

Hall et al. (2004) konnten zeigen, dass das Monoterpen Menthol, welches als Bestandteil des Pfefferminzöls vorkommt, eine stereoselektiv-positive Modulation an GABA_A-Rezeptoren ausübt. Watt et al. (2008) stellten daneben fest, dass Menthol an einer Bindungsstelle, welche sich von der Benzodiazepin-, Steroid-, sowie der Barbituratbindungsstelle unterscheidet, GABA_A-Rezeptoren moduliert (Zhang et al., 2008; Watt et al., 2008).

Borneol

(+)-Borneol, ist ein bicyklisches Monoterpen, welches aus dem ätherischen Öl verschiedener Pflanzen extrahiert werden kann und in der traditionellen chinesischen und japanischen Medizin als Analgetikum und Anästhetikum eingesetzt wird. Wie sein Enantiomer, (-)-Borneol, weist es stark modulierende Eigenschaften an GABA_A-Rezeptoren auf. Untersuchungen an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptoren konnten zeigen, dass die durch Borneol potenzierten Effekte sowohl vom Enantiomer als auch von der Anwesenheit von GABA abhängig sind. Die durch GABA-induzierten Ströme konnten durch beide Enantiomere um mehr als 1000 % potenziert werden. Bei hohen Konzentrationen (>1,5 mM) konnten (+)- und (-)-Borneol GABA_A-Rezeptoren direkt aktivieren. Da die beobachteten Effekte nicht durch Flumazenil gehemmt wurden, kann davon ausgegangen werden, dass (+)- und (-)-Borneol nicht an der Benzodiazepin-Bindungsstelle angreifen (Granger et al., 2005).

Thymol

Thymol, ein zyklisches Monoterpen, stellt mit rund 40 % den Hauptinhaltsstoff des ätherischen Öls von Thymian (*Thymus vulgaris*) dar (Priestley et al., 2003; Ebermann und Elmadfa, 2008).

Durch seine antimikrobiellen und antioxidativen Eigenschaften eignet es sich als Konservierungsmittel, weiters zeigt Thymol molluskizide (Singh et al., 1999) und insektizide Eigenschaften (Lee et al., 1997; Priestley et al., 2003). Thymol zeigt, ähnlich wie Propofol, direkt agonistische Effekte an GABA_A-Rezeptoren sowie Potenzierung der GABA-induzierten Ströme, was an drei verschiedenen GABA_A-Rezeptor-Subtypen nachgewiesen werden konnte. Die Modulationen von $\alpha_1\beta_3\gamma_{2S^-}$, $\alpha_6\beta_3\gamma_{2S^-}$ sowie $\alpha_1\beta_1\gamma_{2S^-}$ -GABA_A-Rezeptoren zeigten sich, in einem ähnlichen Konzentrationsbereich, dosisabhängig. Folglich dürfte es sich um eine nicht-Untereinheiten-spezifische Modulation handeln. Da Thymol bei verschiedenen Untersuchungen auch nicht mit anderen GABAergen Liganden um eine Bindungsstelle

konkurrierte, könnte möglicherweise eine eigene allosterische Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor für Thymol existieren (Priestley et al., 2003).

Bilobalide und Ginkgolide



Abbildung 17: Ginkgo
http://1.2.3.13/bmi/www.awl.ch/heilpflanzen/ginkgo_biloba/ginkgo.jpg
(28.09.09)

Bilobalide, Inhaltsstoffe von *Ginkgo biloba*, verfügen über neuroprotektive Eigenschaften und werden unter anderem in der Behandlung von chronisch neurodegenerativen Krankheiten, wie zum Beispiel bei Morbus Alzheimer, eingesetzt. Sie interferieren mit der GABAergen Neurotransmission und stellen dabei nicht-kompetitive Antagonisten an GABA_A-Rezeptoren dar, wobei der genaue Wirkmechanismus jedoch noch nicht vollständig bekannt ist (Kiewert et al., 2007).

Die Ginkgolide A, B, C, welche ebenfalls als Inhaltsstoffe von *Ginkgo biloba* vorkommen, stellen Diterpen-Trilactone dar und finden bei leichten Formen von Demenz Anwendung. Weiters sind sie potente, nicht-kompetitive Antagonisten von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2L}$ -GABA_A-Rezeptoren (Huang et al., 2004).

Thujon

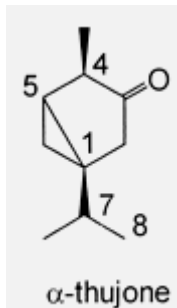


Abbildung 18: Strukturformel α -Thujon
(Höld et al., 2000)

Das Monoterpenoid α -Thujon, die toxische Komponente des Absinths, stellt ebenfalls einen Modulator von GABA_A-Rezeptoren dar. Es verfügt über prokonvulsive Eigenschaften und inhibiert nicht-kompetitiv GABA-induzierte Ströme (Höld et al., 2000; Olsen, 2000).

Honokiol und Magnolol

Honokiol und Magnolol konnten auch als Modulatoren an GABA_A-Rezeptoren identifiziert werden. Für beide Substanzen wird eine mögliche Selektivität für verschiedene GABA_A-Rezeptor-Subtypen angenommen. Ai et al. (2001) konnten sowohl für Honokiol als auch für Magnolol eine Präferenz für α_2 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren feststellen. Der beobachtete Effekt verhielt sich dabei unabhängig von der γ -GABA_A-Rezeptoruntereinheit (Ai et al., 2001).

Valerensäure



Abbildung 19:
Baldrian
(Längler, 2002)

Valerensäure ist ein Bestandteil des Baldrians, welcher als pflanzliches Schlafmittel eingesetzt wird (Khom et al, 2007; Mutschler et al., 2006).

Khom et al. (2007) konnten eine Untereinheiten-spezifische allosterische Stimulation von I_{GABA} durch Valerensäure feststellen.

Nur $GABA_A$ -Rezeptoren, welche eine β_2 - oder β_3 -Untereinheit beinhalteten, wurden dabei von Valerensäure stimuliert. Ersatz der $\beta_{2/3}$ - durch β_1 -Untereinheiten führte zu einer drastischen Reduzierung der Sensitivität für $GABA_A$ -Rezeptoren. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Valerensäure mit der Loreclezol-Bindungsstelle interagieren könnte (Khom et al., 2007).

Diverse Modulatoren pflanzlicher Natur

Pflanzliche Antidepressiva aus Johanniskraut-Extrakten werden oft bei leichten bis mittelschweren Depressionen mit Niedergeschlagenheit, Schlafstörungen oder auch Angst- und Unruhezuständen angewendet (Delini-Stula et al., 2002; Mutschler et al., 2006).



Abbildung 20:
Johanniskraut
(Längler, 2002)

Hypericin kommt im Johanniskraut als roter Farbstoff vor und wurde früher als Hauptkomponente für die antidepressive Wirkung angenommen (Delini-Stula et al., 2002). Mittlerweile wird der antidepressive Effekt aber hauptsächlich dem Inhaltsstoff Hyperforin (einem Acylphloroglucinol-Derivat) zugeschrieben. An Synaptosomen

konnte eine unselektive Wiederaufnahmehemmung von Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, GABA und in schwächerer Form für Glutamat durch Hyperforin dokumentiert werden. Der genaue Wirkmechanismus für Johanniskraut-Extrakte konnte bisweilen jedoch noch nicht identifiziert werden. Es wird angenommen, dass im Extrakt noch weitere Substanzen enthalten sind, die zur Wirkung beitragen könnten (Delini-Stula et al., 2002; Mutschler et al., 2006).

Oolong-Tee-Extrakte

Hossain et al. (2004) konnten durch Untersuchungen an $\alpha_1\beta_1$ - $GABA_A$ -Rezeptoren feststellen, dass cis-Jasmon, Jasmin-Lacton, Linalool-Oxid und Methyl-Jasmonat, welche im Oolong-Tee vorkommen, $GABA_A$ -Rezeptoren modulieren.

Hopfen, Myrcenol und aliphatische Bier-Ester



Abbildung 21: Hopfen
(Länger, 2002)

Hopfen (*Humulus Lupulus L.*), welches in Bier vorkommt und Myrcenol zeigen eine modulatorische Wirkung an GABA_A-Rezeptoren, indem sie GABA-induzierte Ströme verstärken. Daneben konnte auch für die, im Bier vorkommenden aliphatischen Ester, eine Potenzierung von I_{GABA} festgestellt werden, wobei die potenzierenden Effekte mit steigender Anzahl der Kohlenstoffatome zunahmen (Aoshima et al., 2006).

2.6 GABA_A-Rezeptor und ZNS-Krankheiten

Ein Gleichgewicht zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission ist die Voraussetzung für eine normale Gehirnfunktion.

Verschiebt sich dieses Gleichgewicht zu Gunsten von GABA, so hat dies wie schon beschrieben, anxiolytische, sedative, amnestische und ataktische Effekte zur Folge. Hingegen führt ein Mangel an GABA beziehungsweise eine Abschwächung des GABAergen Systems zu Schlafstörungen, Angstzuständen, Epilepsien und Schizophrenien. Eine genetische Prädisposition für die erwähnten Störungen sowie für Depressionen, Stimmungsstörungen und Alkoholismus konnten mit GABA_A-Rezeptor-Defiziten in Zusammenhang gebracht werden (Nutt und Malizia, 2001; Möhler, 2006b).

Angststörungen

Die mit hoher Prävalenz vorkommenden Angststörungen werden, wie vorhin beschrieben, mit einer GABAergen Dysfunktion assoziiert. Zum Beispiel hemmt Pentylenetetrazol die GABA_A-Rezeptor-Funktion und ruft extreme Angstzustände und Traumen hervor. Im Gegensatz dazu führt eine erhöhte GABAerge Transmission, zum Beispiel durch Benzodiazepine, zu anxiolytischen Effekten (Möhler, 2006b).

Durch PET- (positron emission tomography) und SPET- (single photon emission tomography) Untersuchungen am GABA_A-Benzodiazepin-Rezeptorkomplex in humanen Gehirnen konnte eine verringerte Bindung von Benzodiazepinen bei Patienten mit Angststörungen festgestellt werden. Die stärkste Abnahme der Benzodiazepin-Bindung fand man dabei in den orbitofrontalen und temporalen Cortexregionen sowie der Inselregion.

Durch Untersuchung von γ_2 -Knock-out-Mäusen konnte gezeigt werden, dass dadurch die Rezeptordichte reduziert ist, folgend konnte man Rezeptor-Defizite beobachten, einschließlich in den Gehirnregionen, die mit der Entstehung von Ängsten in Zusammenhang stehen (Nutt und Malizia, 2001; Möhler, 2006b).

Epilepsie

Epilepsien betreffen 0,5 – 1 % der Weltbevölkerung, wobei genetische Faktoren eine wichtige Rolle bei vielen Formen der idiopathisch generalisierten Epilepsien (IGEs) spielen (Macdonald et al., 2004; Mutschler et al., 2006; Meldrum und Rogawski, 2007).

GABA_A-Rezeptor-Mutationen, die mit IGEs assoziiert werden, konnten in den γ_2 - und α_1 -Untereinheiten gefunden werden (Macdonald et al., 2004). Die K289M-Mutation, welche den extrazellulären loop der γ_2 -Untereinheit betrifft, wird dabei mit generalisierten febrilen Anfällen assoziiert (Macdonald et al., 2004; Möhler, 2006b; Meldrum und Rogawski, 2007). Die R43Q-Mutation der γ_2 -Untereinheit wird dagegen mit Kindlicher Absence Epilepsie mit Fieberkrämpfen in Zusammenhang gebracht. Die genannten Mutationen üben dabei einen Einfluss auf die kinetischen Eigenschaften des Rezeptors und auch auf die Rezeptor-Expression aus (Sperk et al., 2004; Möhler, 2006b; Meldrum und Rogawski, 2007).

Mutationen der α_1 -Untereinheit, die vermindertes Trafficking und veränderte Rezeptor-Expression verursachen, sind dagegen mit autosomal dominanter juveniler myoklonischer Epilepsie assoziiert (Möhler, 2006b; Meldrum und Rogawski, 2007). Ebenso wurden Mutationen der δ -Untereinheit beobachtet, welche mit Epilepsien in Zusammenhang stehen (Meldrum und Rogawski, 2007).

Schlafstörungen

Ideale Schlafmittel sollten einen, dem physiologischen Schlaf entsprechenden, Zustand hervorrufen, ohne dabei verändernd in das Schlafprofil einzugreifen (Mutschler et al., 2006). Mutationen der GABA_A- β_3 Rezeptoruntereinheit und somit GABAerge Defizite werden mit chronischer Schlaflosigkeit in Verbindung gebracht. Untersuchungen von $\alpha_1\beta_3$ (R192H) γ_{2S} GABA_A-Rezeptoren zeigten im Vergleich zu $\alpha_1\beta_{2S}$ -GABA_A-Rezeptoren eine langsamere Desensibilisierungsphase. Zusätzlich konnte man eine schnellere Deaktivierung in den mutierten Rezeptoren beobachten. Ein weiterer Zusammenhang zwischen GABAerger-Inhibition und Schlaf kann durch die häufige Verwendung von positiv allosterischen, schlafinduzierenden Modulatoren hergestellt werden. Klassische Benzodiazepin-Hypnotika greifen verändernd in den Schlafrhythmus ein, indem sie die REM-Phase unterdrücken. Zusätzlich kann eine Abweichung bei EEG-Frequenz-Profilen festgestellt werden, wobei beide Effekte vor allem mit der GABA_A- α_2 -Rezeptoruntereinheit in Verbindung stehen.

Benzodiazepin-induzierte sedative Effekte werden hingegen mit α_1 -Untereinheiten assoziiert (Möhler, 2006b).

Schizophrenien

Psychische Erkrankungen mit komplexen Persönlichkeitsstörungen und charakteristischen Veränderungen des Denkens, Fühlens sowie ein veränderter Bezug zur Umwelt werden als Schizophrenien bezeichnet (Mutschler et al., 2006).

Pathophysiologisch kann neben einer Änderung der glutamatergen und serotonergen Erregungsübertragung vor allem eine Überaktivität des dopaminergen Systems beobachtet werden, welches speziell über GABA_A - α_3 -Rezeptoren einer inhibitorischen GABA ergen Kontrolle unterliegt (Mutschler et al., 2006; Möhler, 2006b).

Bei α_3 -Knockout Mäusen, ohne adaptive Veränderungen im Expressionsmuster der α_1 -, α_2 -, und α_5 -Untereinheiten, konnte man zwar normales Angstverhalten beobachten, jedoch zeigten sich Ausfälle von sensomotorischen Informationsprozessen. Diese Defizite konnten durch den antipsychotisch wirkenden D2-Rezeptor-Agonisten Haloperidol ausgeglichen werden. α_3 -selektive Agonisten könnten folglich als effektive Behandlungsmethode in einer Vielzahl von psychiatrischen Störungen herangezogen werden.

GABA_A - α_5 -Rezeptoruntereinheiten stellen ebenfalls wichtige Regulatoren des Ausdrucks von „prepulse-Inhibition“ dar. Bei postmortalen Gehirnuntersuchungen von Schizophrenie-Patienten konnten strukturelle Anomalitäten im Hippocampus festgestellt werden. Diese Anomalitäten, die eine Störung der α_5 - GABA_A -Rezeptorfunktion inkludieren, zeigen, dass Schizophrenie-Patienten eine Dysfunktion der „prepulse-Inhibition“ aufweisen. Demzufolge könnten Agonisten, welche sowohl α_3 - als auch α_5 - GABA_A -Rezeptoren modulierend wirken, einen guten Therapieansatz darstellen (Möhler, 2006b).

3 Methoden

Zur Untersuchung von elektrischen Membranvorgängen werden in der Elektrophysiologie unterschiedliche Messtechniken eingesetzt. Für die Untersuchungen während dieser Diplomarbeit wurde die 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gewählt, bei der transmembranäre Ionenströme bei einem konstant gehaltenem Membranpotential gemessen werden können. Rekombinante GABA_A-Rezeptorsubtypen wurden dafür in *Xenopus laevis* Oozyten, welche als Expressionsmodelle für funktionelle Untersuchungen von Spannungsabhängigen- und Ligandengesteuerten-Ionenkanälen sowie Membranrezeptoren verwendet werden, exprimiert (Sigel 1987; Crawley et al., 2007).

3.1 Oozytenpräparation

Weibliche *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden durch eine 0,2 prozentige Tricain-Lösung (Methansulfonsäuresalz des 3- Aminobenzoessäureethylesters, MS-222), der sie 15-30 min lang ausgesetzt waren, anästhesiert. Danach wurde, mit Hilfe einer Pinzette, Follikelgewebe vorsichtig operativ entnommen. Das Follikelgewebe wurde anschließend in eine, mit OR2-Lösung (82,5 mM NaCl, 2 mM KCl, 1 mM MgCl₂ 6H₂O, 5 mM HEPES; pH=7,5 (1M NaOH)) gefüllten Petrischale überführt, wo es mechanisch zerkleinert wurde (Hering, 2006). Nach der Zerkleinerung wurde es für circa 2 Stunden mit Collagenase-Lösung behandelt (2mg Collagenase Sigma Typ IA/ml OR2), um Bindegewebe und



Abbildung 22: *Xenopus laevis* Frösche

<http://www.bayertechnology.com/typo3temp/pics/7014a886d0.jpg> (15.09.09)

Follikelzellen enzymatisch zu entfernen (Boyle et al., 1991; Goldin 1993). Vor der Collagenase-Behandlung sowie im Speziellen auch danach mussten die Oozyten gründlich mit OR2-Lösung gewaschen werden, da enthaltenes Calcium eine toxische Wirkung durch Aktivierung von Proteasen ausüben kann (Goldin, 1993; Bianchi et al., 2006; Bossi et al., 2007). Nach dieser Behandlung erfolgte ein Transfer der Oozyten in ND96-Lösung (90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂ 6H₂O, 1 mM CaCl₂, 5 mM HEPES; pH=7,4 (1M NaOH)). Die zur Injektion am besten geeignetsten Stadium V-VI Oozyten, mit einem Durchmesser von 1000-1200 µm, konnten nach einer weiteren mehrstündigen Inkubationszeit ausgewählt werden (Goldin, 1993; Baumgartner et al., 1999; Khom et al., 2006).

3.2 cRNA-Vorbereitung

Poly(A⁺)cRNA-Transkripte wurden in pCMV-Vektor von linearisierter cDNA kloniert. Die cRNAs, welche für die spezifischen Untereinheiten kodierten, wurden in DEPC5 (Diethylpyrocarbonat) gelöst (Baburin et al., 2008).

3.3 Injektion von cRNA

Um bei der Injektion der cRNA in die Oozyten die Zellintegrität nicht zu zerstören, musste dabei auf mechanische Stabilität geachtet werden. Vor der Injektion wurden die für die unterschiedlichen Untereinheiten codierenden cRNAs im Verhältnis 1:1:10 ($\alpha_1\beta_2\gamma_2s$), 1:1 ($\alpha_1\beta_2$) sowie 3:1 ($\alpha_1\beta_1$) gemischt. Mithilfe einer pneumatischen Mikropumpe wurden 10 μ l bis 50 μ l der Lösung in die einzelnen Oozyten injiziert. Bei erfolgreicher Injektion konnte man eine deutliche Größenzunahme des Oozyten sehen. Nach der Injektion wurden die Oozyten für 24 Stunden bei 19° C in ND96 (100 U/ml Penicillin und 100 μ g/ml Streptomycin) inkubiert und konnten im Anschluss für die Messungen verwendet werden (Baburin et al., 2008; Cohen et al., 2009).

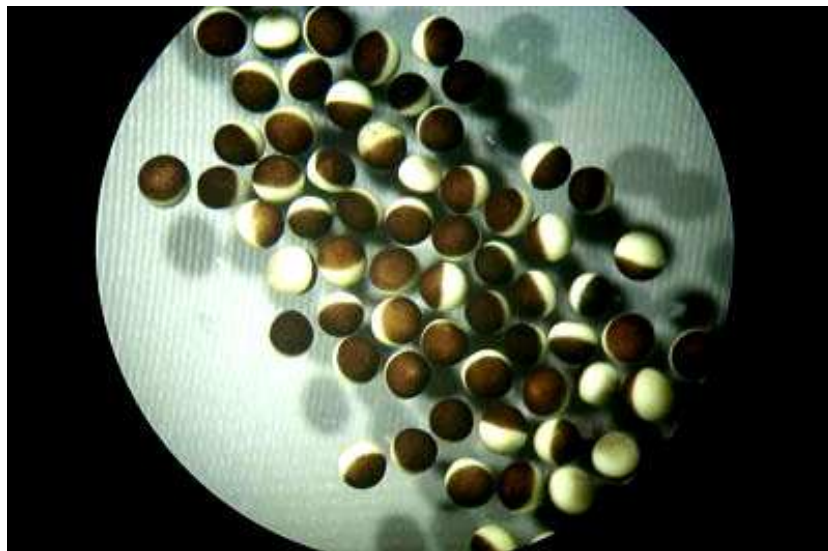


Abbildung 23: *Xenopus laevis* Oozyten

http://www.mpg.de/bilderBerichteDokumente/dokumentation/pressemitteilungen/2002/pri0267_bild2k.jpg (15.09.09)

3.4 Arbeitsablauf zur Herstellung der Messlösungen

In 100 % DMSO (Dimethylsulfonoxid) wurde eine 100 mM Stammlösung der zu untersuchenden Substanz ZFP hergestellt. Diese wurde mit ND 96 auf die Konzentrationen 0,1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M verdünnt. Die Stammlösungen der Extrakte unbekannter Herkunft lagen in einer Konzentration von 20 mg/ml vor. Die GABA-Testlösung mit einer Konzentration von 1 mM, 5,15 mg GABA in 50 ml ND 96, wurde mit ND 96 auf die gewünschte Konzentration verdünnt. In allen Testlösungen war DMSO in einer Maximalkonzentration von 0,3 % enthalten. Alle verwendeten Lösungen waren jeden Tag frisch herzustellen. Die Extrakte wurden bei einer Konzentration von 100 μ g/ml getestet.

3.5 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Voltage Clamp)

Die Versuchsanordnung setzt sich aus zwei Elektroden und einem Rückkopplungsverstärker zusammen. Eine intrazelluläre Elektrode („potential electrode“) dient dabei zur Messung des transmembranären Potentials, eine zweite intrazelluläre Elektrode („current electrode“) injiziert Strom in den Oozyten, welcher nötig ist, um das Haltepotential (-70 mV) zu erreichen beziehungsweise konstant zu halten. Der zwischengeschaltete Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC Amplifier) misst dabei die Abweichung des tatsächlichen Potentials zum benötigten Potential (Haltepotential). Der Verstärker arbeitet nach dem Prinzip der negativen Rückkoppelung, da der über die zweite Mikroelektrode injizierte Strom jeweils mit umgekehrtem Vorzeichen zum von der Zellmembran generierten Aktionsstrom fließt (Hille, 1992; Crawley et al., 2007).

3.6 Perfusionssystem

Die Messungen wurden in einer modifizierten Messkammer eines schnellen Perfusionssystems nach Baburin et al. (2006) durchgeführt. Abbildung 24 zeigt den schematischen Aufbau der Messkammer. Zwei Mikroelektroden (M1 und M2; 1 und 2) gelangen über kleine Öffnungen (microelectrode access holes MAH; 8) durch eine Glas-Deckplatte (glass plate; 7) in die Oozyten-Perfusionskammer. Der Oozyt befindet sich auf einer zylindrischen Halterung. Die Mikroelektroden sind manuell in den Oozyten einzuführen. Die Testlösung wird Roboter-gesteuert (TECAN Miniprep 60) von oben (application tube AT; 3) in einen Quarztrichter (funnel; 6) appliziert, welcher die beiden Mikroelektroden umschließt und auf der Oozytenkammer aufgesetzt ist. Perfusion des Oozyten (Oocyte; 10) erfolgt durch eine Pumpe (pump) des Miniprep 60, welche mit der Kammer (chamber body; 11) und einem Kammerausgang (chamber outlet; 12) verbunden ist. Restvolumina werden durch am Trichter befestigte Abflüsse (funnel outlets; 4 und 5) abgesaugt. In Abbildung 25 ist die Oozyten-Perfusionskammer dargestellt.

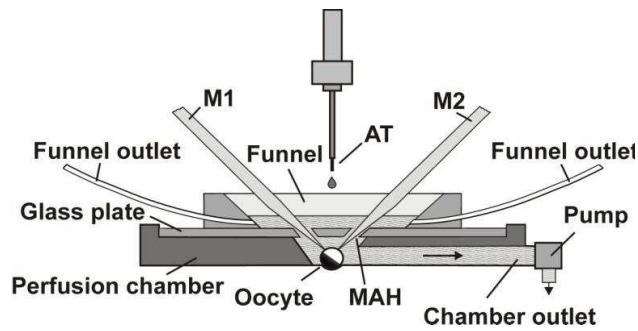


Abbildung 24: schematischer Aufbau der Messkammer. (Khom et al., 2006)

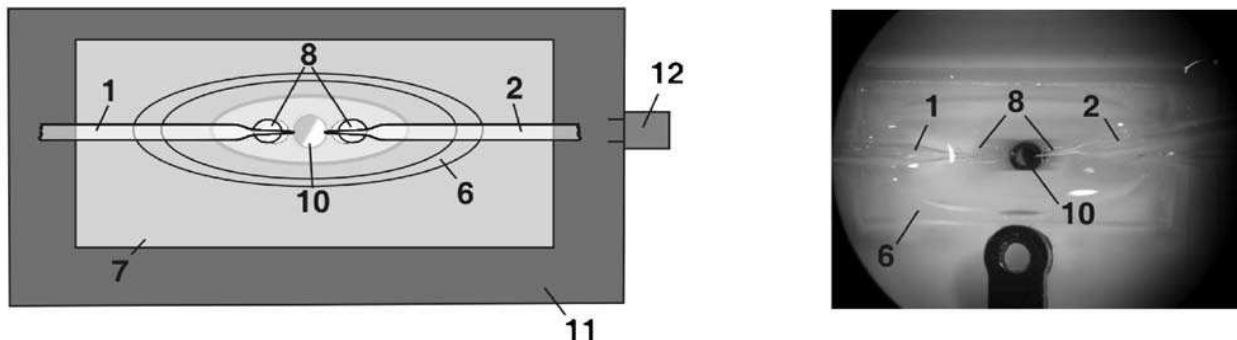


Abbildung 25: Schematische Darstellung und Bild einer Oozyten-Perfusionskammer.
(Baburin et al., 2006)

4 Problemstellung und Zielsetzung

GABA_A-Rezeptoren spielen eine wichtige Rolle in der Erregbarkeit des Zentralnervensystems, da inhibitorische Neurotransmission hauptsächlich durch GABAerge Neuronen vermittelt wird. Substanzen, die an GABA_A-Rezeptoren angreifen, stellen wichtige Arzneistoffe dar. Als Beispiel sollen hier die Benzodiazepine genannt werden, welche zur Behandlung von Angst- oder Panikstörungen sowie bei Schlaflosigkeit eingesetzt werden.

Substanzen, die im Gegensatz dazu die GABAerge Neurotransmission reduzieren, lösen *in vivo* unter anderem Unruhe, Krampfanfälle oder auch Epilepsien aus.

Am *Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien* wird seit einigen Jahren die Interaktion von unterschiedlichen Naturstoffen mit GABA_A-Rezeptoren untersucht.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte in Zusammenarbeit mit Maria Novak zunächst die Wirkung einer Auswahl von verschiedenen pflanzlichen Extrakten untersucht und in weiterer Folge der Effekt eines Naturstoffes, welcher GABA_A-Rezeptoren moduliert, genauer

charakterisiert werden. Die untersuchten pflanzlichen Extrakte und der Naturstoff werden in dieser Diplomarbeit nur in codierter Form (Extrakt 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27; Naturstoff ZFP) genannt, da die Untersuchungen für diese Diplomarbeit als Voruntersuchungen zu den jeweiligen Substanzen durchgeführt wurden und die gewonnenen Daten in Zukunft noch publiziert werden sollen.

Dafür sollten GABA_A-Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die mögliche Modulation von I_{GABA} mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik in einem Screening untersucht werden. Die Extrakte wurden bei einer Konzentration von 100 µg/ml an α₁β₂γ_{2S}-GABA_A-Rezeptoren untersucht.

Für den Reinstoff ZFP sollten EC₅₀-Werte und die maximale Stimulation an verschiedenen GABA_A-Rezeptorsubtypen bestimmt werden. Zuerst sollte der *in vivo* am häufigsten exprimierte GABA_A-Rezeptorsubtyp α₁β₂γ_{2S} untersucht werden, nachfolgend sollte die Abhängigkeit des Effekts von einer bestimmten GABA_A-Rezeptor β-Untereinheit bestimmt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Modulation von I_{GABA} durch α₁β₂γ_{2S} –Rezeptoren durch 14 pflanzliche Extrakte und den Naturstoff ZFP

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte der Effekt von 14 pflanzlichen Extrakten und eines Naturstoffes auf GABA_A-Rezeptoren untersucht werden. GABA_A-Rezeptoren wurden dazu in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} wurde mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Die Experimente sollten bei konstanter sowie geringer GABA-Konzentration durchgeführt werden, wofür im Vorfeld eine GABA-Dosis-Wirkungskurve erstellt und die Parameter EC₅₋₁₀ und EC₅₀ ermittelt wurden. Unter EC₅₋₁₀ bzw. EC₅₀ versteht man jene Konzentrationen, mit der 5 – 10 % bzw. 50 % des maximalen Effektes ausgelöst werden (Aktorics et al., 2005). 1 mM GABA wurde als Maximalstrom (= 100 %) festgelegt und die dosisabhängig-ansteigenden Amplituden wurden normalisiert.

Die nachfolgende Abbildung (Abb. 26) zeigt eine GABA-Dosis-Wirkungskurve an α₁β₂γ_{2S}-Rezeptoren sowie durch unterschiedliche GABA-Konzentrationen hervorgerufene GABA-induzierte Ströme an diesem GABA_A-Rezeptor-Subtyp. Die EC₅₀ lag bei α₁β₂γ_{2S}-Rezeptoren bei 35,5 ± 8,9 µM, während die EC₅₋₁₀ zwischen 1 bis 2,5 µM lag.

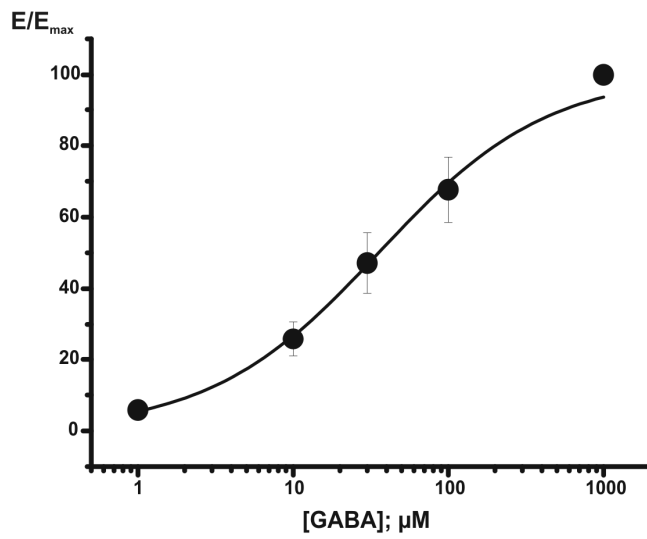
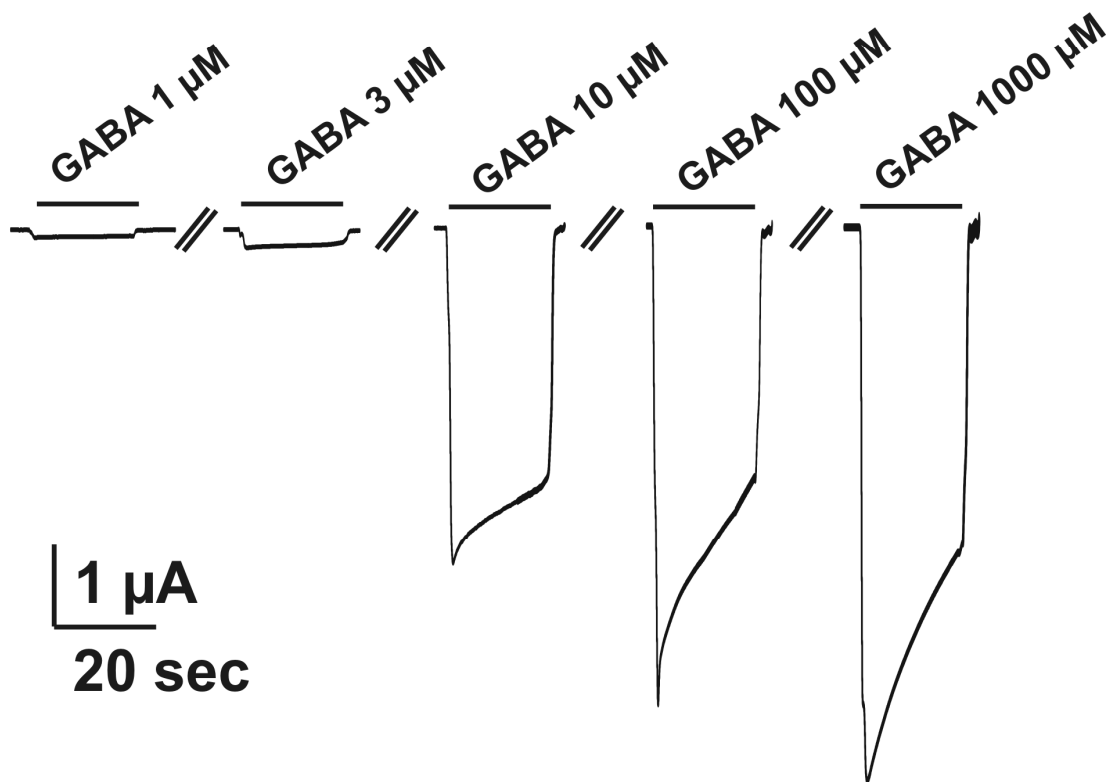
A**B**

Abbildung 26: (A) GABA-Dosis-Wirkungskurve an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren. Anzahl (n) der Experimente: 3. (B) Typisches Experiment. Applikation von GABA in den Konzentrationen: 1 μM , 3 μM , 10 μM , 100 μM , 1000 μM .

(Abbildung in Zusammenarbeit mit Maria Novak)

5.1.1 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch 14 Pflanzenextrakte

Um die Effekte der ausgewählten Pflanzenextrakte zu untersuchen, wurden $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert. Die Modulation von I_{GABA} wurde bei einer GABA EC_{5-10} analysiert. Die Messergebnisse sind in Abbildung 27 bzw. auch in Tabelle 1 dargestellt. Kein getesteter Extrakt induzierte eine positive Modulation von I_{GABA} , 11 Extrakte zeigten keinen signifikanten Effekt, drei Extrakte zeigten eine deutliche Inhibition von I_{GABA} . Der stärkste Effekt wurde für Extrakt 3 beobachtet und lag bei $-74,4 \pm 10,1 \%$.

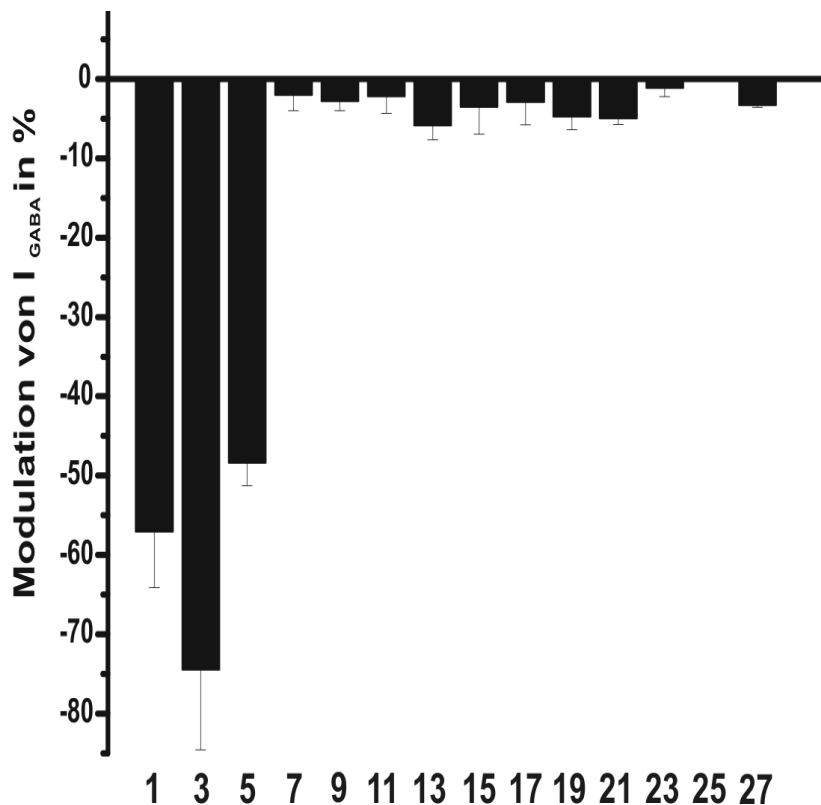


Abbildung 27: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch die getesteten Pflanzenextrakte. Die stärksten Effekte konnten für Extrakt 1, 3 und 5 beobachtet werden.

Die Ergebnisse des Screenings sind in der nachfolgenden Tabelle (Tabelle 1) zusammengefasst.

Extrakt	Maximale Stimulation von I_{GABA} (%)	Anzahl (n) der Experimente
1	$-57,1 \pm 7,1$	2
3	$-74,4 \pm 10,1$	2
5	$-48,4 \pm 2,9$	2
7	$-2,0 \pm 2,0$	2
9	$-2,8 \pm 1,2$	2
11	$-2,2 \pm 2,2$	2
13	$-5,8 \pm 1,8$	2
15	$-3,5 \pm 3,5$	2
17	$-2,9 \pm 2,9$	2
19	$-4,7 \pm 1,7$	2
21	$-4,9 \pm 0,8$	2
23	$-1,1 \pm 1,1$	2
25	$0,0 \pm 0,0$	2
27	$-3,3 \pm 0,3$	2

Tabelle 1: Zusammenfassung der EC_{50} -Werte und I_{GABA} (%) durch die getesteten Extrakte

5.1.2 Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch den Naturstoff ZFP

Um die Wirkung von ZFP auf $GABA_A$ -Rezeptor zu untersuchen, wurden zuerst $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren exprimiert. Die Modulation von I_{GABA} bei einer $GABA$ EC_{5-10} wurde durch unterschiedliche Konzentrationen von ZFP untersucht.

In der nachfolgenden Abbildung (Abb. 28) ist die Modulation von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren durch ansteigende Konzentrationen von ZFP (0,1 μM – 100 μM) dargestellt. I_{GABA} wurde von ZFP dosisabhängig positiv moduliert. Die ersten signifikanten Effekte waren bei 3 μM zu sehen und Saturation trat bei 30 μM auf. Die EC_{50} lag bei $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ - $GABA_A$ -Rezeptoren bei $12,2 \pm 3,2$ μM . Die maximale Potenzierung betrug $629,8 \pm 104,5$ %.

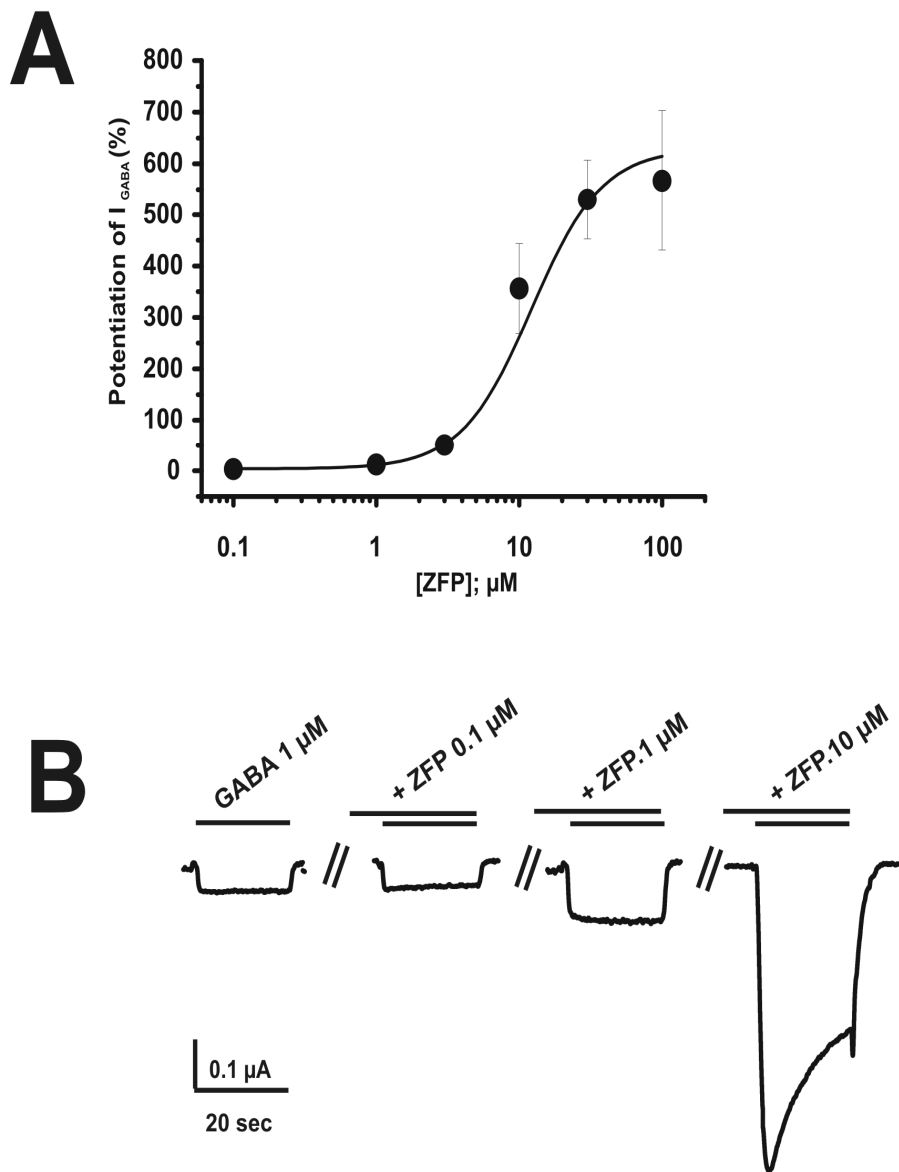


Abbildung 28: **(A)** Dosiswirkungskurve für ZFP an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren. Anzahl (n) der Experimente: 3
(B) Typisches Experiment für die Modulation von I_{GABA} durch ansteigende Konzentrationen von ZFP. GABA wurde in einer Konzentration von 1 μ M, entsprechend einer EC_{5-10} gemeinsam mit 0,1 μ M, 1 μ M und 10 μ M ZFP appliziert. Eine Ko-Applikation von GABA und ZFP wird durch einen Doppelbalken oberhalb des Stroms angezeigt.

5.1.3 Untersuchung einer möglichen Abhängigkeit des Effekts von der γ_2 -Untereinheit

Um eine mögliche Abhängigkeit des Effekts von ZFP von der γ_2 -Untereinheit zu untersuchen, wurden nun $\alpha_1\beta_2$ -GABA_A-Rezeptoren exprimiert und die Modulation von I_{GABA} analysiert. Erste potenzierende Effekte konnten auch hier bei 3 μM festgestellt werden, Saturation trat bei 100 μM (siehe Abb. 29) ein. Die EC_{50} betrug bei $\alpha_1\beta_2$ -GABA_A-Rezeptoren $9,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$. Die maximale Stimulation lag bei $318,4 \pm 35,0 \%$. Im Vergleich zu $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren war der Effekt durch ZFP an $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren deutlich schwächer ausgeprägt.

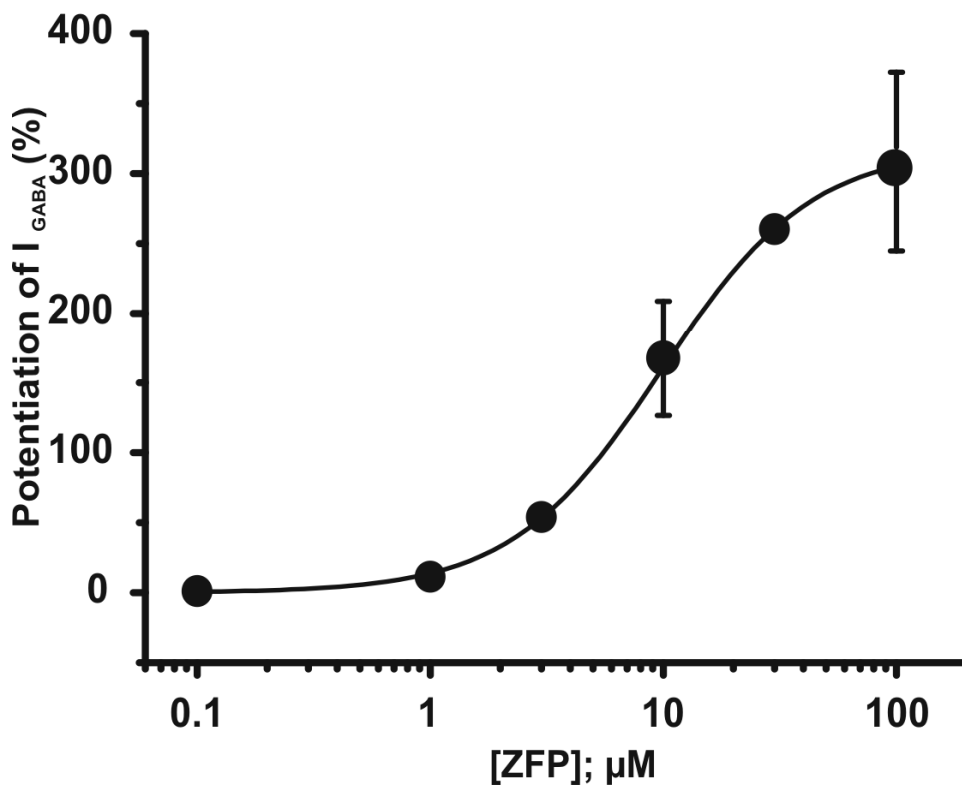


Abbildung 29: Modulation von I_{GABA} an $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren durch ZFP. Anzahl (n) der Experimente: 3.

5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Tabelle 2 zeigt die Zusammenfassung der EC_{50} -Werte, die maximalen Stimulationen von I_{GABA} (EC_{5-10}) sowie die Angabe zur jeweiligen Anzahl (n) der durchgeführten Experimente für den Naturstoff ZFP für die jeweiligen Rezeptor-Subtypen.

Rezeptor-Subtyp	EC_{50} (μM)	Maximale Stimulation von I_{GABA} (%)	Anzahl (n) der Experimente
$\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$	$12,2 \pm 3,2$	$629,8 \pm 104,5$	3
$\alpha_1\beta_2$	$9,9 \pm 2,7$	$318,4 \pm 35,0$	3
$\alpha_1\beta_1$	$9,4 \pm 7,8$	$113,3 \pm 70,5$	3

Tabelle 2: Zusammenfassung der EC_{50} -Werte, I_{GABA} (%) und die Anzahl der durchgeführten Experimente für den Naturstoff ZFP für die jeweiligen Rezeptor-Subtypen.

6 Diskussion

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte die Untereinheiten-spezifische Modulation von unterschiedlichen Pflanzenextrakten und eines ausgewählten Naturstoffes (ZFP) an GABA_A-Rezeptoren untersucht werden.

Dazu wurde die Interaktion der verschiedenen Pflanzenextrakte mit GABA_A-Rezeptoren an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren, welche in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert wurden, in einem Screening untersucht. Bei drei Extrakten konnte dabei eine signifikante Inhibition von I_{GABA} festgestellt werden.

Substanzen, welche die GABAerge Neurotransmission reduzieren, können durch Blockade der Ionenkanäle und die daraus resultierende überschießende Erregungsübertragung– wie bereits erwähnt – *in vivo* Unruhe, Reizbarkeit, Bewegungsstörungen oder Krampfanfälle auslösen (Hevers und Lüddens, 1998; Korpi et al., 2002; Meldrum und Rogawski, 2007).

In den letzten Jahren haben Pflanzen als Bestandteile von Arzneimitteln, Nahrungsergänzungsmitteln oder Kosmetika zunehmend an Bedeutung gewonnen, wobei eine Vielzahl an Einsatzmöglichkeiten besteht (Esberger, 2001; IQWiG, 2008).

Pflanzliche Mittel werden im Gegensatz zu synthetischen Produkten häufig als harmlos und unbedenklich angesehen und so oft unbedacht, vor allem im Rahmen einer Selbstmedikation, eingenommen. Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass auch pflanzliche Präparate teils über beachtliche Nebenwirkungen verfügen. So werden zum Beispiel Wurzelextrakte vom Rauschpfeffer Kava-Kava (*Piper methysticum*), der vor allem im Pazifikraum kultiviert wird, traditionell als Anxiolytika eingesetzt. Der genaue Mechanismus der angstlösenden Wirkung dieser Pflanze konnte bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden (Wichtl, 2002). Bekannt sind jedoch die zum Teil schweren Nebenwirkungen, die von allergischen Reaktionen bis hin zu schwerem Leberversagen bei prädisponierten Personen führen können (Stoller, 2000; Strahl et al., 1998).

Auch Salbei (*Salvia officinalis*), der vor allem für seine schweißhemmende Wirkung und als Hausmittel bei Erkältungskrankheiten bekannt ist, scheint bei einem Dauergebrauch als Tee nicht unbedenklich zu sein (Bielenberg, 2002). Salbei enthält das bicyclische Monoterpen Thujon, welches auch als toxische Komponente im Absinth vorkommt. α -Thujon inhibiert nicht-kompetitiv GABA-induzierte Ströme und wirkt so konvulsiv (siehe auch Kapitel 3.5.8) (Höld et al., 2000; Olsen, 2000; Bielenberg, 2002).

Vor allem für Kinder und prädisponierte Personen kann sich somit ein Risiko durch vermeintlich harmlose Pflanzenextrakte ergeben.

Die, für diese Diplomarbeit getesteten Pflanzenextrakte, zeigten zum Teil stark GABA-inhibitorische Eigenschaften, wobei die, für die Hauptwirkung verantwortlichen Komponenten, nicht bekannt waren. Da weitere Untersuchungen den Rahmen dieser Diplomarbeit überschritten hätten, wäre es von weiterem Interesse, die Extrakte genauer zu analysieren. Auch bei jenen, für diese Arbeit getesteten, Pflanzenextrakte könnte es sich um solche handeln, welche - unwissentlich häufig eingenommen - unter Umständen gefährlich sein können, was auf die Wichtigkeit solcher Untersuchungen hinweisen soll.

Um die Modulation von GABA_A-Rezeptoren durch die Reinsubstanz ZFP zu analysieren, wurden - die in *Xenopus laevis* Oozyten exprimierten - GABA_A-Rezeptoren mittels der Zwei-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht. Anfangs wurde der ZFP-Effekt auf I_{GABA} am häufigsten physiologisch vorkommenden Rezeptor-Subtyp $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ untersucht. Wie in Abbildung 28 gezeigt, konnte eine dosisabhängige positive Modulation beobachtet werden.

Da $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren die Benzodiazepin-Bindungsstelle beinhalten, wurden anschließend $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren exprimiert, um eine mögliche Interaktion von ZFP mit dieser Bindungsstelle zu untersuchen. Wie in Abbildung 29 zu sehen, zeigte ZFP auch an $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren eine Modulation, wobei aber ein reduzierter Effekt zu beobachten war. Dieser zeigt die Abhängigkeit des Effekts von einer γ -Untereinheit. Daher könnte die Substanz über die Benzodiazepin-Bindungsstelle GABA_A-Rezeptoren modulieren.

Da sowohl $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren als auch $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren durch ZFP deutlich positiv moduliert wurden, kann - neben einer potentiellen Interaktion mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle - auf eine weitere Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor geschlossen werden.

Die EC₅₀ war an beiden Rezeptor-Subtypen gleich ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: $12,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$; $\alpha_1\beta_2$: $9,9 \pm 2,7 \mu\text{M}$), es zeigten sich jedoch deutliche Unterschiede in der jeweiligen Wirkstärke ($\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$: $629,8 \pm 104,5 \%$; $\alpha_1\beta_2$: $318,4 \pm 35,0 \%$). In Anbetracht dieser Ergebnisse könnte vermutet werden, dass die γ -Untereinheit zu einer stärkeren Potenzierung beiträgt.

Um weitere Hinweise zur Bindungsstelle von ZFP zu erhalten und um eine mögliche β -Spezifität von ZFP an GABA_A-Rezeptoren zu untersuchen, wurden anschließend, in Zusammenarbeit mit Maria Novak, $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und die Modulation von I_{GABA} analysiert. Wie in Abbildung 30 zu sehen ist, konnte auch an $\alpha_1\beta_1$ -Rezeptoren eine Modulation beobachtet werden, wobei sie im Vergleich mit der Modulation an $\alpha_1\beta_2$ -Rezeptoren wiederum mit deutlich reduziertem Maximaleffekt auftrat ($113,3 \pm 70,5$). Die beobachteten Effekte lassen auf eine Präferenz von ZFP für β_2 – und möglicherweise auch für β_3 -Rezeptoren – schließen.

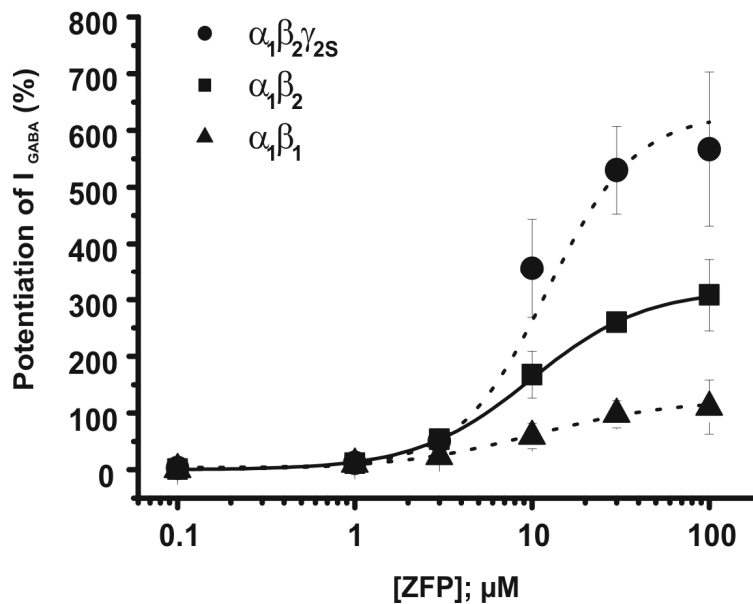


Abbildung 30: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse für die untersuchten GABA_A-Rezeptor-Subtypen. Anzahl (n) der Experimente: 3.

(Abbildung in Zusammenarbeit mit Maria Novak)

Auch aus der Literatur sind Substanzen wie das Antikonvulsivum Loreclezol, das Anästhetikum Etomidat oder auch Valerensäure bekannt, die eine Selektivität für β_2 und β_3 -beinhaltende GABA_A-Rezeptoren aufweisen und GABA-induzierte Ströme potenzieren können (Wingrove et al., 1994; Donnelly und MacDonald, 1996; Groves et al., 2006; Olsen und Sieghart, 2008). Für Loreclezol konnte, im Vergleich mit β_1 -beinhaltenden GABA_A-Rezeptoren, eine mehr als 300-mal größere Affinität für $\beta_{2/3}$ -enthaltende Rezeptoren beobachtet werden (Wingrove et al., 1994). $\beta_{2/3}$ -beinhaltende GABA_A-Rezeptoren zeigten weiters eine hohe Sensitivität für Etomidat (Belelli et al., 1997).

Durch Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Loreclezol-induzierten Effekte an GABA_A-Rezeptoren mit einer β_2 N265S Punktmutation stark reduziert auftreten (Thomet et al., 2000). Um eine mögliche Interaktion von ZFP mit der Loreclezol-Bindungsstelle zu untersuchen, wäre es interessant, $\alpha_1\beta_2$ N265S-Rezeptoren zu exprimieren, um so beobachten zu können, ob die von ZFP vermittelten Effekte ebenfalls beeinflusst werden oder aber ob sie sich von dieser Mutation unabhängig verhalten.

Etomidat, Propofol oder Loreclezol sind nicht in der Lage, den Chloridionen-Kanal des GABA_A-Rezeptors direkt zu aktivieren (Sieghart, 1994; Hevers und Lüddens, 1998; Lam et al., 1998; Feng et al., 2004). Es wäre von weiterem Interesse, die Effekte von ZFP in Abwesenheit von GABA an GABA_A-Rezeptoren zu untersuchen.

Weitere Hinweise auf die ZFP-Bindungsstelle könnten Untersuchungen der Modulation von verschiedenen α -Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors geben, um so festzustellen, ob möglicherweise auch eine Selektivität für bestimmte α -Untereinheiten vorliegt. Daraus könnten erste Voraussagungen für die *in vivo* Effekte getroffen werden.

α_1 -beinhaltende GABA_A-Rezeptoren sind mit sedativen, amnestischen und antikonvulsiven Effekten assoziiert (Rowlett et al., 2005), wohingegen α_2 -enthaltende Rezeptoren vor allem für die anxiolytischen Effekte der Benzodiazepine verantwortlich gemacht werden (Möhler, 2006a; Jansen et al., 2008). Weiters werden vor allem α_2 -GABA_A-Rezeptoruntereinheiten, zum Teil aber auch α_3 und α_5 -enthaltende Rezeptoren, mit muskelrelaxierenden Wirkungen assoziiert (Schmidt, 2007). Schwach anxiolytische sowie Ethanol-potenzierende Effekte werden über α_2 , α_3 und/oder über α_5 -enthaltenden GABA_A-Rezeptoren vermittelt. GABA_A-Rezeptoren, welche α_5 -Untereinheiten beinhalten, scheinen weiters eine Rolle bei Lernprozessen und dem Erinnerungsvermögen einzunehmen (siehe auch Kapitel 3.5.1) (Sieghart und Sperk, 2002).

Aufgrund des in den Voruntersuchungen erstellten Profils ($\beta_{2/3}$ -Präferenz) für ZFP lassen sich *in vivo* möglicherweise antikonvulsive oder anxiolytische Effekte für diesen selektiven GABA_A-Rezeptor-Liganden erwarten (Benke et al., 2009).

Zusammenfassend gesehen zeigte ZFP interessante pharmakologische Eigenschaften. Weitere Untersuchungen sollten noch durchgeführt werden, da vor allem Untereinheitenspezifische-Substanzen ein reduziertes Nebenwirkungsspektrum erwarten lassen (Rudolph und Möhler, 2006).

7 Literaturverzeichnis

Ai J, Wang X, Nielsen M (2001) Honokiol and magnolol selectively interact with GABAA receptor subtypes in vitro. *Pharmacology* 63(1):34-41.

Akk G, Covey D F, Evers A S, Steinbach J H, Zorumski C F, Mennerick S (2007) Mechanisms of neurosteroid interactions with GABAA receptors. *Pharmacol Ther.* 116(1):35–57.

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

Aoshima H, Takeda K, Okita Y, Hossain SJ, Koda H, Kiso Y (2006) Effects of beer and hop on ionotropic gamma-aminobutyric acid receptors. *J Agric Food Chem.*;54(7):2514-9.

Atack JR (2003) Anxiolytic compounds acting at the GABA(A) receptor benzodiazepine binding site. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 2(4):213-32.

Baburin I, Beyl S, Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening. *Pflugers Arch* 2006 Oct; 453(1):117–23.

Baburin I, Khom S, Timin E, Hohaus A, Sieghart W, Hering S (2008) Estimating the efficiency of benzodiazepines on GABAA receptors comprising $\gamma 1$ or $\gamma 2$ subunits. *British Journal of Pharmacology* 155, 424–433.

Bali M, Jansen M, Akabas M H (2009) GABA-Induced Intersubunit Conformational Movement in the GABAA Receptor $\alpha 1M1$ - $\beta 2M3$ Transmembrane Subunit Interface: Experimental Basis for Homology Modeling of an Intravenous Anesthetic Binding Site. *The Journal of Neuroscience*, 29(10):3083–3092.

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

Baumann S W, Baur R, Sigel E (2001) Subunit Arrangement of γ -Aminobutyric Acid Type A Receptors *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 39,pp 36275–36280.

Baumgartner W, Islas L, Sigworth F J (1999) Two-Microelectrode Voltage Clamp of *Xenopus* Oocytes: Voltage Errors and Compensation for Local Current Flow. *Biophysical Journal* Volume 77: 1980–1991.

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

Belelli D, Lambert J J, Peters J A, Wafford K, Whiting P J (1997) The interaction of the general anesthetic etomidate with the γ -aminobutyric acid type A receptor is influenced by a single amino acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:11031-11036.

Ben-Ari Y, Gaiarsa JL, Tyzio R, Khazipov R (2007) GABA: A Pioneer Transmitter That Excites Immature Neurons and Generates Primitive Oscillations. *Physiol Rev* 87: 1215–1284.

Benke D, Barberis A, Kopp S, Altmann KH, 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(1):174-81.

Berezhnoy D, Gravielle M C, Downing S, Kostakis E, Basile A S, Skolnick P, Gibbs T T, Farb D H (2008) Pharmacological Properties of DOV 315,090, an ocinaplon metabolite. *BMC Pharmacology*, 8:11. <http://www.biomedcentral.com/1471-2210/8/11>

Bettler B, Kaupmann K, Mosbacher J, Gassmann M (2004) Molecular structure and physiological functions of GABA(B) receptors. *Physiol Rev.* 84(3):835-67.

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

Bielenberg J (2002) Zentralnervöse Effekte durch Thujon. Die „Grüne Fee“. In: *ÖAZ Aktuell*, Hauptartikel 12/2002.

http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2002/12/haupt/haupt12_2002zent.html#top (16.09.09)

Boileau A J, Evers A R, Davis A F, Czajkowski C (1999) Mapping the Agonist Binding Site of the GABAA Receptor: Evidence for a β -Strand. *J. Neurosci.* 19(12):4847-4854.

Boileau A J, Newell J G, Czajkowski C (2002a) GABAA Receptor $\beta 2$ Tyr97 and Leu99 Line the GABA-binding Site Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. The Journal of Biological Chemistry Vol. 277, No. 4 pp. 2931–2937.

Boileau A J, Baur R, Sharkey L M, Sigel E, Czajkowski C (2002b) The relative amount of cRNA coding for $\gamma 2$ subunits affects stimulation by benzodiazepines in GABAA receptors expressed in *Xenopus* oocytes. Neuropharmacology 43 695–700.

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

Bossi E, Fabbrini MS, Ceriotti A (2007) Exogenous protein expression in *Xenopus* oocytes: basic procedures. Methods Mol Biol 375: 107-131.

Botta P, Radcliffe R A, Carta M, Mameli M, Daly E, Floyd K L, Deitrich R A, Valenzuela C F (2007) Modulation of GABAA receptors in Cerebellar Granule Neurons by Ethanol: A Review of Genetic and Electrophysiological Studies. Alcohol.; 41(3): 187–199.

Buhr A, Schaerer MT, Baur R, Sigel E (1997) Residues at positions 206 and 209 of the alpha 1 subunit of gamma-aminobutyric AcidA receptors influence affinities for benzodiazepine binding site ligands. Mol Pharmacol. 52(4):676-82.

Burt D R, Kamatchi G L (1991) GABAA receptor subtypes: from pharmacology to molecular biology. The FASEB Journal Vol. 5 2916-2923.

Chebib M, Johnston GA (1999) The ABC of GABA receptors: A brief review. Clin Exp Pharmacol Physiol 26(11):937-40.

Cohen S, Au S, Panté N (2009) Microinjection of *Xenopus* *Laevis* Oocytes. J Vis Exp (24) pii: 1106 <http://www.jove.com./index/details.stp?id=1106>, doi: 10.3791/1106

Crawley JN, Gerfen CR, Rogawski MA, Sibley DR, Skolnick P, Wray S (2007) Short protocols in neuroscience. Systems and behavioral methods. A Compendium of Methods from Current Protocols in Neuroscience. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey.

Da Settimo F, Taliani S, Trincavelli ML, Montali M, Martini C (2007) GABA A/Bz receptor subtypes as targets for selective drugs. Curr Med Chem. 14(25):2680-701.

- Davies M (2003) The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci*; 28(4):263-74.
- Dawson G R, Collinson N, Atack J R (2005) Development of Subtype Selective GABAA Modulators. *CNS Spectr*. 10(1):21-27.
- Delini-Stula A, Lorenz J, Holsboer-Trachsler E (2002) Pflanzliche Antidepressiva. *Schweiz Med Forum* Nr. 48 1146-1154.
- Donnelly JL, MacDonald RL (1996) Loreclezole enhances apparent desensitization of recombinant GABAA receptor currents. *Neuropharmacology* 35(9-10):1233-41.
- Drafts B C, Fisher, J L (2006) Identification of Structures within GABAA Receptor α Subunits That Regulate the Agonist Action of Pentobarbital. *JPET* 318:1094–1101.
- Ebermann R, Elmadfa I (2008) *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung* Springer Verlag, Wien/New York
- Elmadfa I (2004) *Ernährungslehre* Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart
- Emson P C (2007) GABA_B receptors: Structure and function. *Prog Brain Res* 160:43-57.
- Enoch M A (2008) The role of GABAA receptors in the development of alcoholism *Pharmacology. Biochemistry and Behavior* 90, 95 – 104.
- Enz R, Cutting G R (1998) Molecular composition of GABAC receptors. *Vision Research* 38: 1431 – 1441.
- Esberger R M (2001) Entwicklung eines Barometers zur Evaluierung von Patientenzufriedenheit mit dem Allgemeinmediziner und dem Facharzt in der niedergelassenen Arztpraxis, Dissertation an der Universität Wien, 2001.
- Feely M (1999) Drug treatment of epilepsy. *BMJ* 318:106–9.
- Feng HJ, Bianchi MT, Macdonald RL (2004) Pentobarbital differentially modulates $\alpha 1\beta 3\delta$ and $\alpha 1\beta 3\gamma 2L$ GABAA receptor currents. *Mol Pharmacol* 66(4): 988-1003.

Follesa P, Biggio F, Talani G, Murru L, Serra M, Sanna E, Biggio G (2006) Neurosteroids, GABAA receptors, and ethanol dependence: *Psychopharmacology (Berl)* 186(3):267-80.

Franks NP (2006) Molecular targets underlying general anaesthesia. *British Journal of Pharmacology* 147, S72–S81.

Goetz T, Arslan A, Wisden W, Wulff P (2007) GABAA receptors: structure and function in the basal ganglia. *Prog Brain Res.*; 160: 21–41.

Granger RE, Campbell EL, Johnston GA (2005) (+)- And (-)-borneol: efficacious positive modulators of GABA action at human recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABA(A) receptors. *Biochem Pharmacol* 69, 1101-1111.

Groves JO, Guscott MR, Hallett DJ, Rosahl TW, Pike A, Davies A, Wafford KA, Reynolds DS (2006) The role of GABA $\beta 2$ subunit-containing receptors in mediating the anticonvulsant and sedative effects of loreclezole. *Eur J Neurosci.* 24(1):167-74.

Hall AC, Turcotte CM, Betts BA, Yeung WY, Agyeman AS, Burk LA (2004) Modulation of human GABAA and glycine receptor currents by menthol and related monoterpenoids. *Eur J Pharmacol* 506:9-16.

Hanchar HJ, Dodson PD, Olsen RW, Otis TS, Wallner M (2005) Alcohol-induced motor impairment caused by increased extrasynaptic GABAA receptor activity. *Nat. Neurosci*; 8:339–345.

Hanson SM, Czajkowski C (2008) Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA $_A$ receptor. *J Neurosci.* 28(13): 3490-3499.

Harris R A, Mihic S J, Dildy-Mayfield J O, Machu T K (1995) Actions of anesthetics on ligand-gated ion channels: role of receptor subunit composition. *FASEB J.* 9, 1454-1462.

Harris R A, Trudell J R, Mihic S J (2008) Ethanol's Molecular Targets. *Sci Signal.*; 1(28):re7.

Henschel O, Gipson K E, Bordey A (2008) GABAA Receptors, Anesthetics and Anticonvulsants in Brain Development. *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets*, 7, 211-224 211.

Hering S (2006) Automated fast perfusion of *Xenopus* oocytes for drug screening *Pflügers Arch – Eur J Physiol* DOI 10.1007/s00424-006-0125-y

Hevers W, Lüddens H (1998) The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Molecular Neurobiology* 18(1):35-86.

Hille B (1992) *Ionic Channels of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sunderland, Mass. Sinauer Associates, Inc. 1992.

Höld K M, Sirisoma N S, Ikeda T, Narahashi T, Casida J E (2000) α -Thujone (the active component of absinthe): γ -Aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 97, No. 8; 3826–3831.

Horenstein J, Wagner DA, Czajkowski C, Akabas MH (2001) Protein mobility and GABA-induced conformational changes in GABA(A) receptor pore-lining M2 segment. *Nat Neurosci*. 4(5):477-85.

Hosie AM, Dunne EL, Harvey RJ, Smart TG (2003) Zinc-mediated inhibition of GABA(A) receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity. *Nat. Neurosci* (6):362–369.

Hosie AM, Wilkins ME, Da Silva HMA, Smart TG (2006) Endogenous neurosteroids regulate GABAA receptors via two discrete transmembrane sites. *Nature*; 444:486–489.

Hossain S J, Aoshima H, Koda H, Kiso Y (2004) Fragrances in Oolong Tea that enhances the response of GABA_A receptors. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. 68 (9), 1842-1848.

Huang SH, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA (2004) Ginkgolides, diterpene trilactones of *Ginkgo biloba*, as antagonists at recombinant $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors. *Eur J Pharmacol*; 494(2-3):131-8.

IQWiG Das Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (2008) Merkblatt: Nahrungsergänzungsmittel und komplementärmedizinische Präparate. Gesundheitsinformation.de Unabhängig, Objektiv und Geprüft
<http://www.gesundheitsinformation.de/merkblatt-nahrungsergaenzungsmittel-und-komplementaermedizinische.483.383.de.html>

Jansen M, Rabe H, Strehle A, Dieler S, Debus F, Dannhardt G, Akabas M H, Lüddens H (2008) Synthesis of GABAA Receptor Agonists and Evaluation of their α -Subunit Selectivity and Orientation in the GABA Binding Site. *J Med Chem*. 14; 51(15): 4430–4448.

Jenkins A, Greenblatt E P, Faulkner H J, Bertaccini E, Light A, Lin A, Andreassen A, Viner A, Trudell J R, Harrison N L (2001) Evidence for a Common Binding Cavity for Three General Anesthetics within the GABAA Receptor. *The Journal of Neuroscience*, Vol. 21 RC136 1 of 4.

Jorgensen E (2005) GABA. *WormBook*, ed. The C. elegans Research Community, *WormBook*, doi/10.1895/wormbook.1.14.1, <http://www.wormbook.org>.

Jurd R, Arras M, Lambert S, Drexler B, Siegwart R, Crestani F, Zaugg M, Vogt K E, Ledermann B, Antkowiak B, Rudolph U (2002) General anesthetic actions in vivo strongly attenuated by a point mutation in the GABAA receptor $\beta 3$ subunit. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.02-0611fje. Published online December 3, 2002.

Khom S, Baburin I, Timin E N, Hohaus A, Sieghart W, Hering S (2006) Pharmacological Properties of GABAA Receptors Containing $\gamma 1$ Subunits. *Mol Pharmacol* 69:640–649.

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(1):178-87.

Kiewert C, Kumara V, Hildmann O, Rueda M, Hartmann J, Naika R S, Klein J (2007) Role of GABAergic antagonism in the neuroprotective effects of bilobalide. *Brain Res.* 1128(1): 70–78.

Kloda J H, Czajkowski C (2007) Agonist-, Antagonist-, and Benzodiazepine-Induced Structural Changes in the $\alpha 1$ Met113-Leu132 Region of the GABA_A Receptor. *Mol Pharmacol* 71:483–493.

Korpi E R, Kuner T, Seeburg P H, Lüddens H (1995) Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific γ -aminobutyric acid type A receptor. *Mol. Pharmacol.* 47, 283-289.

Korpi E R, Gründer G, Lüddens H (2002) Drug interactions at GABAA receptors. *Progress in Neurobiology* 67, 113–159.

Krasowski M D, Koltchine V V, Rick C E, Ye Q, Finn S E, Harrison N L (1998) Propofol and Other Intravenous Anesthetics Have Sites of Action on the γ -Aminobutyric Acid Type A Receptor Distinct from That for Isoflurane. *Molecular Pharmacology*, 53:530-538.

Kubeczka K H (1982) Qualitätsbeurteilung arzneilich verwendeter Öle. Dtsch. Apoth. Ztg. 122: 2309-2316

Lam DW, Reynolds JN (1998) Modulatory and direct effects of propofol on recombinant GABAA receptors expressed in xenopus oocytes: influence of alpha and gamma2-subunits. Brain Res 784(1-2): 179-187.

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

Länger R (2002) Aktuelles zu Pflanzen mit Wirkung auf das Nervensystem. Baldrian, Hopfen, Kavakava & Co. Vortrag, gehalten bei der 35. Wissenschaftlichen Fortbildungswoche der Österreichischen Apothekerkammer, Saalfelden. In: ÖAZ Aktuell 13, Hauptartikel 13/2002 http://www.oeaz.at/zeitung/3aktuell/2002/13/haupt/haupt13_2002aktu.html (23.03.09)

LaRoche S M, Helmers S L (2004) The New Antiepileptic Drugs: Scientific Review. JAMA.; 291(5):605-614.

Lee S, Tsao R, Peterson C, Coats J R (1997) Insecticidal activity of monoterpenoids to western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae), twospotted spider mite (Acari: Tetranychidae), and house fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol., 90, 883 – 892.

Li GD, Chiara D C, Sawyer G W, Husain S S, Olsen R W, Cohen J B (2006) Identification of a GABAA Receptor Anesthetic Binding Site at Subunit Interfaces by Photolabeling with an Etomidate Analog. The Journal of Neuroscience (45):11599 –11605.

Lobo I A, Harris R A (2008) GABA_A receptors and alcohol. Pharmacol Biochem Behav. 90(1): 90–94.

Lukasiewicz P D, Shields C R (1998) A diversity of GABA receptors in the retina, seminars in cell and developmtal biology. Vol. 9: pp 293 – 299.

Lüllmann H, Mohr K, Wehling M (2006) Pharmakologie und Toxikologie Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen. Georg Thieme Verlag Stuttgart Deutschland 16. Auflage

Macdonald R L, Barker J L (1979) Anticonvulsant and anesthetic barbiturates: different postsynaptic actions in cultured mammalian neurons. Neurology (4):432-47.

Macdonald R L, Gallagher M J, Feng HJ (2004) GABAA receptor epilepsy mutations. *Biochemical Pharmacology* 68 1497-1506.

Mareš P, Kubová H (2008) What Is The Role of Neurotransmitter Systems in Cortical Seizures? *Physiol. Res.* 57 (Suppl. 3): S111-S120.

Mascia M-P, Trudell JR, Harris RA (2000) Specific binding sites for alcohols and anesthetics on ligand-gated ion channels. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:9305–9310.

Meldrum B S, Rogawski M A (2007) Molecular Targets for Antiepileptic Drug Development. *Neurotherapeutics* 4(1): 18–61.

Möhler H (2006a) GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res* 326:505-516.

Möhler H (2006b) GABAA receptors in central nervous system disease: Anxiety, Epilepsy and Insomnia. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 26:731-740.

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2002) Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8.Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer H K, Ruth P, Schäfer-Korting M (2006) Mutschler Arzneimittelwirkungen kompakt. Basiswissen Pharmakologie/Toxikologie. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, Deutschland

Narahashi T, Ma J Y, Arakawa O, Reuveny E, Nakahiro M (1994) GABA receptor–channel complex as a target site of mercury, copper, zinc and lanthanides. *Cell. Mol. Neurobiol.* 14, 599–621.

Nutt D J, Malizia A L (2001) New insights into the role of the GABAA-benzodiazepine receptor in psychiatric disorders. *British Journal of psychiatry*, 179, 398 – 396.

Olsen R W (2000) Commentary: Absinthe and γ -aminobutyric acid receptors. *PNA* vol. 97 no. 9: 4417–4418.

Olsen R W, Sieghart, W (2008a) GABAA receptors: Subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Pharmacol Rev* 60:243–260.

Olsen R W, Sieghart W (2008b) International Union of Pharmacology.LXX. Subtypes of gamma-Aminobutyric AcidA receptors: Classification on the basis of subunit composition, pharmacology, an function. Update. Pharmacol Rev 60:243-260.

Olsen R W, Tobin A J (1990) Molecular biology of GABA_A receptors. FASEB: 1469-1480.

Osolodkin D I, Chupakhin V I, Palyulin V A, Zefirov N S (2009) Molecular modeling of ligand-receptor interactions in GABAC receptor. J. Mol. Graph. Model, doi : 1008.12.0040.1016/j.jmgm.

Owens D F und Kriegstein A R (2002) Is there more to gaba than synaptic inhibition? Neuroscience 3, 715-727 doi:10.1038/nrn919

Paul S M, Purdy R H (1992) Neuroactive steroids. Faseb J. 6: 2322-2322.

Pirker S, Schwarzer C, Wieselthaler A, Sieghart W, Sperk G (2000) GABA(A) receptors: immunocytochemical distribution of 13 subunits in the adult brain. Neuroscience; 101(4):815-50.

Priestley C M, Williamson E M, Wafford K A, Sattelle D B (2003) Thymol, a constituent of thyme essential oil, is a positive allosteric modulator of human GABAA receptors and a homo-oligomeric GABA receptor from Drosophila melanogaster. British Journal of Pharmacology 140, 1363–1372.

Rang H P, Dale M M, Ritter J M, Flower R J (2007) Rang and Dale´s Pharmacology Churchill Livingstone Elsevier 6. Auflage

Rowlett J K, Cook J M, Duke A N, Platt D N (2005) Selective Antagonism of GABAA Receptor Subtypes: An In Vivo Approach to Exploring the Therapeutic and Side Effects of Benzodiazepine-Type Drugs. CNS Spectr. 10(1):40-48.

Rudolph U, Crestani F, Benke D, Brüning I, Benson J A, Fritschy JM, Martin J R, Bluethmann H, Möhler H (1999) Benzodiazepine actionsmediated by specific γ-aminobutyric acid_A receptor subtypes. Nature 401:769-800.

Rudolph U, Crestani F, Möhler H (2001) GABA(A) receptor subtypes: dissecting their pharmacological functions. Trends Pharmacol Sci 22:188-194.

Rudolph U, Möhler H (2006) GABA-Baded Therapeutic approaches: GABAA Receptor Subtype Functions. Current Opinion in Pharmacology 6, 18-23.

Rüsch D, Zhong H, Forman SA (2004) Gating allosterism at a single class of etomidate sites on $\alpha 1\beta 2\gamma 2L$ GABAA receptors accounts for both direct activation and agonist modulation. *J Biol Chem* 279:20982–20992.

Santhakumar V, Wallner M, Otis T S (2007) Ethanol acts directly on extrasynaptic subtypes of GABAA receptors to increase tonic inhibition *Alcohol*. 41(3): 211–221.

Schmidt H. (2007), *Pharmakologie und Toxikologie Für Studium und Praxis*. Schattauer GmbH Stuttgart, Germany, 6. Auflage

Sieghart W (1994) Pharmacology of Benzodiazepine Receptors: An Update. *J Psychiatr Neurosci*, Vol. 19, No. 1.

Sieghart W, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, H. Höger H, Adamiker D (1999) Structure and subunit composition of GABAA receptors. *Neurochemistry International* 34(5) 379±385.

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

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

Sigel E, Buhr A (1998) The benzodiazepine binding site of GABAA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 19(7):256.

Silbernagl S, Despopoulos A (2003) *Taschenatlas der Physiologie* Georg Thieme Verlag Stuttgart, 6. Auflage

Singh V K, Singh S, Singh D K (1999) Effect of active molluscicidal component of spices on different enzyme activities and biogenic amine levels in the nervous tissue of *Lymnaea acuminata*. *Phytother. Res.*, 13, 649 – 654.

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

Smith S S, Shen H, Gong Q H, Zhou X (2007) Neurosteroid regulation of GABA_A receptors. *Pharmacol Ther.* 116(1): 58-76.

Sperk G, Furtinger S, Schwarzer C, Pirker S (2004) GABA and its receptors in epilepsy. *Adv Exp Med Biol.* 584:92-103.

Stępień K, Tomaszewski M, Czuczwar S (2005) Profile of anticonvulsant activity and neuroprotective effects of novel and potential antiepileptic drugs – an update. *Pharmacological Reports* 57, 719 – 733.

Stoller R (2000) Schweizerische Ärztezeitung. 81: 1335-6. In: *Arzneitelegamm. Nebenwirkungen. Akuter Leberzerfall u. a. durch Kava-Kava-Extrakt (Antares u. a.)* <http://www.arznei-telegramm.de/zeit/0007c.php3?knr=> (16.09.09)

Strahl S et al. (1998) *Dtsch. med. Wschr.* 123: 1410-4. In: *Arzneitelegamm. Nebenwirkungen. Akuter Leberzerfall u. a. durch Kava-Kava-Extrakt (Antares u. a.)* <http://www.arznei-telegramm.de/zeit/0007c.php3?knr=> (16.09.09)

Suzdak PD, Paul SM (1987) Ethanol stimulates GABA receptormediated Cl-ion flux in vitro: possible relationship to the anxiolytic and intoxicating actions of alcohol. *Psychopharmacol Bull* 23(3):445-51.

Thomet U, Baur R, Razet R, Dodd RH, Furtmüller R, Sieghart W, Sigel E (2000) A novel positive allosteric modulator of the GABAA receptor: the action of (+)-ROD188. *British Journal of Pharmacology* 131, 843 ± 850.

Tretter V, Moss S J (2008), GABA_A Receptor Dynamics and Constructing GABAergic Synapses. *Front Mol Neurosci.* 2008; 1: 7.

Vengeliene V, Bilbao A, Molander A, Spanagel R (2008) Neuropharmacology of alcohol addiction. *British Journal of Pharmacology* 154, 299–315.

Wafford K A, Whiting P J (1992) Ethanol potentiation of GABAA receptors requires phosphorylation of the alternatively spliced variant of the $\gamma 2$ subunit. *FEBS Lett.* 313, 113–117.

Wallner M, Hancher HJ, Olsen RW (2003) Ethanol enhances $\alpha 4\beta 3\delta$ and $\alpha 6\beta 3\delta$ γ -aminobutyric acid type A receptors at low concentrations known to affect humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA;* 100:15218–15223.

Watt EE, Betts BA, Kotey FO, Humbert DJ, Griffith TN, Kelly EW, Veneskey KC, Gill N, Rowan KC, Jenkins A, Hall AC (2008) Menthol shares general anesthetic activity and sites of action on the GABAA receptor with the intravenous agent, propofol. *Eur J Pharmacol* 590 (1-3): 120–126.

Wichtl M (2002) Gelobt und verteufelt. Modetrends bei Phytopharmaka. In: *Die Apotheke* 03/2002: Arzneipflanzen - Potenziale und Gefahren.

http://www.apoverlag.at/DieApotheke/03_2002/seiten/haupt_modetrends_0302.html

(16.09.09)

Wingrove P B, Wafford K A, Bain C, Whiting P J (1994) The modulatory action of loreclezole at the γ -aminobutyric acid type A receptor is determined by a single amino acid in the $\beta 2$ and $\beta 3$ subunit. *Proc. Nati. Acad. Sci. USA* Vol. 91; 4569-4573.

Wingrove P B, Thompson S A, Wafford K A, Whiting P J (1997) Key Amino Acids in the γ Subunit of the γ -Aminobutyric AcidA Receptor that Determine Ligand Binding and Modulation at the Benzodiazepine Site. *Molecular Pharmacology*, 52:874–881.

Wohlfarth KM, Bianchi MT, Macdonald RL (2002) Enhanced neurosteroid potentiation of ternary GABAA receptors containing the δ subunit. *J Neurosci* 2002;22:1541–1549.

Wooltorton J R, McDonald B J, Moss S J, Smart T G (1997) Identification of a Zn^{2+} binding site on the murine GABAA receptor complex: dependence on the second transmembrane domain of β subunits. *J. Physiol.* 505, 633–640.

Yang JS, Olsen RW (1987) gamma-Aminobutyric acid receptor-regulated $^{36}Cl^-$ flux in mouse cortical slices. *J Pharmacol Exp Ther.*; 241(2):677-85.

Zhang X-B, Jiang P, Gong N, Hu X-L, Fei D, Xiong Z-Q, Xu L, Xu T-L (2008) A-Type GABA Receptor as a Central Target of TRPM8 Agonist Menthol. *PLoS ONE* 3(10): e3386. doi:10.1371/journal.pone.0003386

Zeller A, Arras M, Lazaris A, Jurd R, Rudolph U (2005) Distinct molecular targets for the central respiratory and cardiac actions of the general anesthetics etomidate and propofol. *The FASEB Journal express article* 10.1096/fj.04-3443fje

8 Lebenslauf

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name, Vorname: Christlbauer, Simone
Geburtsdatum: 09.10.1981
Geburtsort: Wien

Ausbildung

2001 Diplomstudium der Ernährungswissenschaften,
Universität Wien
1996 – 2001 Höhere Lehranstalt für wirtschaftliche Berufe
und Fremdsprachen, Wien
1992 – 1996 Schulversuch Mittelschule, Wien
1988 – 1992 Volksschule, Wien

Praktika

Jul/09 – Aug/09 Erste Wiener Walzmühle Von Willer GesmbH,
Jul/08 – Sep/08 Schwechat
Jul/07 – Sep/07 Abteilung: Qualitätslabor
Tätigkeitsbereich: Getreide- und Mehluntersuchungen,
Analysen u. Auswertung der Untersuchungsergebnisse

Feb/06 – März/06 AKE – Arbeitsgemeinschaft für klinische Ernährung
Nutrition Day 2006 in European Hospitals
Tätigkeitsbereich: Dateneingabe

Jun/06 – Jul/06 Coca Cola Hellenic Austria GmbH, Wien
Abteilung: Qualitätslabor
Tätigkeitsbereich: Quarbo-QC-Studie; Mikrobiologie,
Wareneingangskontrolle von Zucker und Kohlendioxid

Jul/06 – Aug/06 Merkur AG, Vösendorf
Jul/05 – Aug/05 Abteilung: Backshop
Jul/04 – Aug/04 Tätigkeitsbereich: Verkauf, Backen, Wareneingang,
Jul/03 – Aug/03 Inventur

Sonstiges

Aug/02 – Okt/09 Geringfügige Beschäftigung bei Merkur AG, Vösendorf