



universität  
wien

# DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Piperin-Derivate als neue Liganden am GABA<sub>A</sub>  
Rezeptor“

Mihaela Coner

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt.  
Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt.  
Studienblatt:

Pharmazie

Betreuer:

Univ.-Prof. Dr. med. Steffen Hering

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Danksagung</b> .....	<b>4</b>
<b>2. Zusammenfassung</b> .....	<b>5</b>
<b>2.1. Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>2.2. Zusammenfassung</b> .....	<b>6</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>8</b>
<b>3.1. Das Nervensystem</b> .....	<b>8</b>
3.1.1. Die Nervenzelle .....	8
3.1.2. Ruhemembranpotential und Aktionspotential .....	10
3.1.3. Neurotransmitter .....	12
3.1.4. Synaptischen Erregungsübertagung .....	13
<b>3.2. GABA (<math>\gamma</math>-Aminobuttersäure)</b> .....	<b>13</b>
3.2.1. Bereitstellung und Inaktivierung von GABA .....	14
<b>3.3. GABA-aktivierte Rezeptoren</b> .....	<b>15</b>
3.3.1. Der GABA <sub>B</sub> -Rezeptor .....	16
3.3.2. Der GABA <sub>ρ</sub> -Rezeptor (GABA <sub>C</sub> -Rezeptor) .....	17
<b>3.4. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor</b> .....	<b>17</b>
3.4.1. Struktur des GABA <sub>A</sub> -Rezeptors .....	18
3.4.2. GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Untereinheiten und ihre Kombinationsmöglichkeiten..	20
3.4.3. Die GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Bindungsstellen .....	23
3.4.3.1 Die GABA-Bindungsstelle .....	23
3.4.3.1. Die Benzodiazepin-Bindungsstelle.....	25
<b>3.4.4. Präsynaptische und extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im</b>	
<b>Zentralnervensystem</b> .....	<b>26</b>
<b>3.5. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte ZNS-Störungen</b> .....	<b>28</b>
3.5.1. Schizophrenie.....	28
3.5.2 Angststörungen.....	28
3.5.3. Schlafstörungen .....	29
3.5.4. Epilepsie .....	32
<b>3.6. Ausgewählte Modulatoren von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren</b> .....	<b>38</b>
3.6.1. Benzodiazepine .....	38
3.6.1.1. Pharmakokinetik .....	39
3.6.1.2. Unerwünschte Nebenwirkungen.....	39
3.6.1.3. Abhängigkeit .....	40
3.6.1.4. Benzodiazepin-Antagonisten .....	41
3.6.2. Barbiturate .....	41
3.6.3. Anästhetika .....	43
3.6.3.1. Etomidat.....	43
3.6.3.2 Propofol .....	44
3.6.4. Neurosteroidoide .....	45
3.6.5. Kationen .....	46
3.6.5.1. Zink (Zn <sup>2+</sup> ).....	46
3.6.5.2. Lanthan (La <sup>3+</sup> ).....	47
3.6.6. Ethanol .....	47
3.6.7. Picrotoxin .....	48
3.6.8. Muscimol.....	49

3.6.9. Furosemid .....	49
3.6.10. Pflanzliche Modulatoren.....	50
3.6.10.1. Piperin .....	51
3.6.10.1.1. Der schwarze Pfeffer ( <i>Piper nigrum L., Piperaceae</i> ) .....	51
3.6.10.1.2. Piperin .....	52
<b>4. Problemstellung und Zielsetzung .....</b>	<b>54</b>
<b>5. Materialien und Methoden .....</b>	<b>55</b>
5.1. Materialien und Software .....	55
5.2. Präparation der <i>Xenopus laevis</i> Oozyten.....	57
5.3. Vorbereitung der cRNA.....	58
5.4. Mikroinjektion von cRNA.....	58
5.5. Messlösungen .....	59
5.6. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik.....	59
5.7. Perfusionssystem .....	60
5.8. Verwendete Software.....	61
<b>6. Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
6.1. Pharmakologie von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren.....	63
6.1.1 GABA-Konzentrations-Wirkungskurve für $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren .....	63
6.2. Modulation von $I_{GABA}$ durch Piperinderivate.....	65
6.2.1 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-12 .....	65
6.2.2 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-20 .....	66
6.2.3 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-64 .....	67
6.2.4 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-66 .....	68
6.2.5 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-73 .....	69
6.2.6 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-74 .....	70
6.2.7 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-79 .....	71
6.2.8 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-80 .....	72
<b>7. Diskussion.....</b>	<b>74</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>77</b>
<b>9. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>79</b>
<b>10. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
<b>11. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>82</b>
<b>12. Curriculum Vitae .....</b>	<b>96</b>

## **1. Danksagung**

Ich möchte mich vor allem bei Univ. Prof. Dr. Steffen Hering für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in den letzten Monaten sowie die gute Betreuung bedanken.

Mein ganz besonderer und größter Dank gilt Frau Mag. Angela Schöffmann. Durch ihre unermüdliche Unterstützung und ihren Rat hat sie wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Weiters möchte ich Herrn Dr. Igor Baburin danken, der mich bei technischen Problemen immer bereitwillig unterstützt hat. Ich bedanke mich auch bei Frau Dr. Sophia Khom, die mich für die Diplomarbeit am Pharmakologie Department motiviert hat, und für ihre große Hilfsbereitschaft bei der Fertigstellung meiner Diplomarbeit.

Bei Božo bedanke ich mich ganz besonders für seine seelische Unterstützung während des Studiums und am meisten während der Fertigstellung der Diplomarbeit.

Schließlich möchte ich meinen Geschwister und meinen Eltern danken, die mich während des gesamten Studiums in jeder Hinsicht unterstützt haben.

Mama, Tata, hvala vam!

## 2. Zusammenfassung

### 2.1. Abstract

Synaptic  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) type A (GABA<sub>A</sub>) receptors are the most common inhibitory neurotransmitter receptors in the mammalian central nervous system (CNS). They belong to the superfamily of ligand-gated ion channels and are characterized by their pentameric structure (Olsen und Sieghart, 2008). The central ion channel is activated by endogenous GABA and selectively conducts Cl<sup>-</sup> ions through its pore. This results in hyperpolarisation of the membrane, and an inhibitory effect on neuronal excitability (Sieghart et al., 1999).

An imbalance of excitation and inhibition causes a variety of disease states, including sleep disorders, anxiety and epilepsy (Siegel, 2005). Reduced GABAergic inhibition, which can also be caused by a number of GABA<sub>A</sub> receptor mutations, has been implicated to play a significant role in epilepsy (Jones-Davies et al., 2003). A variety of synthetic substances are used clinically as antiepileptic drugs. On the other hand, natural products with anticonvulsive effects are being studied as potential new scaffolds. One of them, piperine, isolated from the black pepper seeds (*Piper nigrum* L., *Piperaceae*), has been identified as a positive GABA<sub>A</sub> receptor modulator (Zaugg et al., 2010). Piperine, however, displays moderate I<sub>GABA</sub> enhancement and potency. Therefore, a series of new piperine derivatives has been synthesized.

During the course of this diploma thesis, I have studied the concentration-dependent modulation of GABA-induced chloride currents (I<sub>GABA</sub>) through  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  GABA<sub>A</sub> receptors by 8 selected piperine derivatives (MC-12, MC-20, MC-64, MC-66, MC-73, MC-74, MC-79 and MC-80). GABA<sub>A</sub> receptors were expressed in *Xenopus laevis* oocytes, and the experiments conducted by means of the two-microelectrodes-voltage clamp technique. I have compared their effects (efficacy and potency) on this receptor subtype with that of piperine. Two out of eight of the derivatives displayed higher efficacy than piperine (MC-64: E<sub>max</sub> = 1673,0 ± 146,3 %; EC<sub>50</sub> = 51,7 ± 9,5 μM; MC-66: E<sub>max</sub> = 359,1 ± 3,6 %; EC<sub>50</sub> = 21,4 ± 1,4 μM). The other six derivatives did not exceed piperine's maximum efficacy.

Concluding, the modifications of the piperine molecule did affect maximum efficacy of the derivatives, however, could not reasonably alter the compounds' potency.

Further studies focusing on the structure-activity-relationship of the piperine derivatives have to be conducted in the future.

## 2.2. Zusammenfassung

$\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) Typ A ( $\text{GABA}_A$ ) Rezeptoren sind die wichtigsten inhibitorischen Neurotransmitterrezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS) der Säugetiere. Sie gehören zur Superfamilie der Liganden-gesteuerten Ionenkanäle und weisen einen charakteristischen, pentameren Aufbau auf (Olsen und Sieghart, 2008). Nach der Bindung von endogener GABA leitet der Ionen-Kanal, der sich in der Mitte des Rezeptor befindet, selektiv Chlorid-Ionen durch die Zellmembran. Dadurch kommt es zur Hyperpolarisation der Membran und folglich zu verminderter neuronaler Erregbarkeit (Sieghart et al., 1999). Störungen des Gleichgewichts zwischen Erregbarkeit und Hemmung im ZNS sind unter anderem maßgeblich an der Entstehung von Schlafstörungen, Angst und Epilepsie beteiligt (Sigel, 2005). Vor allem bei Epilepsie kommt es, unter anderem durch verschiedene Mutationen des  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors, zu verminderter GABA-erger Hemmung (Jones-Davies et al., 2003). Neben synthetischen Antiepileptika wie Benzodiazepinen oder Barbituraten, werden in den letzten Jahren auch Naturstoffe im Hinblick auf ihre antikonvulsive Wirkung untersucht.

Piperin, das Hauptalkaloid aus dem schwarzen Pfeffer (*Piper nigrum L.*, *Piperaceae*), konnte kürzlich als positiver  $\text{GABA}_A$ -Rezeptor Modulator identifiziert werden (Zaugg et al., 2010). Piperin zeigt jedoch moderate Wirksamkeit und Wirkstärke. Daher wurde eine Reihe neuer Piperinderivate synthetisiert.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurde der am häufigsten vorkommende  $\text{GABA}_A$ -Rezeptorsubtyp  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert, und die konzentrations-abhängige Modulation von GABA-induzierten Chloridströmen ( $I_{\text{GABA}}$ ) durch ausgewählte Piperinderivate (MC-12, MC-20, MC-64, MC-66, MC-73, MC-74, MC-79 und MC-80) mittels der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik gemessen.

Von den acht getesteten Derivaten zeigten zwei im Vergleich zu Piperin eine wesentlich stärkere maximale Wirksamkeit (MC-64:  $E_{\text{max}} = 1673,0 \pm 146,3 \%$ ;  $EC_{50} =$

51,7 ± 9,5 µM; MC-66:  $E_{\max} = 359,1 \pm 3,6 \%$ ;  $EC_{50} = 21,4 \pm 1,4 \mu\text{M}$ ). Die restlichen sechs Derivate konnten den maximalen Effekt von Piperin am Rezeptor nicht übersteigen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Modifikationen am Molekül des Piperins die maximale Potenzierung der GABA-induzierten Chloridströme beeinflussen konnte, hingegen auf die Wirkstärke der Substanzen keinen deutlichen Einfluss ausübte. Weitere Studien, die sich mit der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Piperinderivate beschäftigen, sollten in Zukunft durchgeführt werden.

### **3. Einleitung**

#### **3.1. Das Nervensystem**

Im Organismus bezeichnet das Nervensystem die Gesamtheit aller Nervenzellen (Neuronen). Alle geistigen und psychischen Vorgänge werden vom Nervensystem reguliert.

Die Aufgaben des Nervensystems sind:

- die Aufnahme umweltbedingter oder im Körper entstehender Reize,
- deren Umwandlung in nervöse Erregungen und ihre Weiterleitung,
- sowie die Koordination und Steuerung der Körperfunktionen durch vom Zentrum zur Peripherie abgegebene Impulse (Mutschler, 2008).

Man unterscheidet zwischen dem Zentralnervensystem (ZNS) und dem peripheren Nervensystem. Dem Zentralnervensystem gehören Gehirn und Rückenmark an, während das periphere Nervensystem die Leitungsbahnen von der Peripherie zum ZNS (afferente, sensorische Bahnen), die peripher gelegenen Nervenzellen, sowie die vom ZNS zur Peripherie verlaufenden Nervenbahnen (efferente, motorische Bahnen) umfasst. Das Darmnervensystem gehört ebenfalls zum peripheren Nervensystem. Weiters wird das Nervensystem in autonomes (vegetatives) und somatisches (willkürliches) Nervensystem gegliedert (Mutschler, 2008).

##### **3.1.1. Die Nervenzelle**

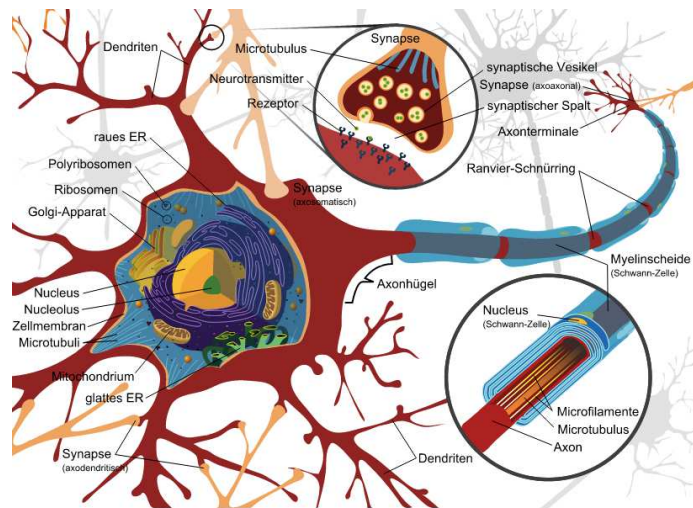
Die Nervenzelle (Neuron) ist die kleinste funktionelle Einheit des Nervensystems. Die Aufgaben der Neuronen umfassen die Aufnahme von Informationen, ihre Übermittlung und Verarbeitung. Eine Nervenzelle ist aus einem Zellkörper (Soma, auch Perikaryon genannt) und mehreren Zellfortsätze (Axon und Dendriten) aufgebaut. Das Axon (oder Neurit) ist der Zellfortsatz, der die Informationen in Form von Aktionspotentialen zu anderen Zellen leitet, wo sie von den baumartig verzweigten Dendriten empfangen werden (Mutschler, 2008).



Das Axon (Nervenfasern) stellt den röhrenförmigen, faserartigen Fortsatz einer Nervenzelle dar, der nur wenig bis gar nicht verzweigt ist. Verzweigungen werden als „Kollaterale“ bezeichnet. Axone variieren stark in ihrer Länge und können im menschlichen Organismus über 1 m lang werden. Der Durchmesser des Zellfortsatzes liegt zwischen 0,05 und 20 µm und bleibt über die gesamte Länge relativ konstant. Axone werden in myelinisierte (markhaltige, lipidreiche) und nicht myelinisierte (marklose, lipidarme) Nervenfasern unterschieden (Kirschbaum, 2008). Im Zentralnervensystem wird die Myelinscheide von Oligodendrogliazellen gebildet, im peripheren Nervensystem von Schwannschen-Zellen. Die Myelinscheide wirkt elektrisch isolierend. Durch diese Isolierung wird die Membrankapazität verringert und so die Leitung von zufälligen Strömen durch die Membran verhindert.

Bei peripheren markhaltigen Nervenfasern findet man in regelmäßigen Abständen Unterbrechungen der Myelinscheide, die als „Ranvier-Schnürringe“ bezeichnet werden und für die Leitungsgeschwindigkeit von großer Bedeutung sind. An diesen unisolierten Unterbrechungen ankommende Aktionspotentiale treffen auf einen Bereich der Axon-Membran, der besonders reich an spannungsgesteuerten Kanälen ist. Die Kanäle reagieren auf den Reiz, regenerieren ihn und leiten ihn durch das nächste Axonsegment weiter. Die Myelinscheide bildet so die Voraussetzung zur sprunghaften (saltatorischen) Übertagung von Potentialen von einem Schnürring zum nächsten. Dabei kann eine Fortleitungsgeschwindigkeit von bis zu 100 m/s erreicht werden (Mutschler, 2008; Müller-Esterl, 2004; Silbernagl und Lang, 2005).

Durch Schädigung der Nerven aufgrund degenerativer, toxischer oder entzündlicher Einflüsse kann es zur Demyelinisierung von Nervenfasern kommen. Dabei nimmt im Internodium, dem Teil des Axons zwischen zwei Ranvier-Schnürringe, der Membranwiderstand ab, wodurch die Membrankapazität steigt und die Erregungsleitung verlangsamt wird. Stärkere Reize werden zur Umpolarisierung des Internodiums benötigt und durch das Freiliegen von Ionenkanälen können größere Stromverluste auftreten.



**Abb. 1.** Aufbau einer Nervenzelle (Mariana Ruiz Villarreal, 2007)

### 3.1.2. Ruhemembranpotential und Aktionspotential

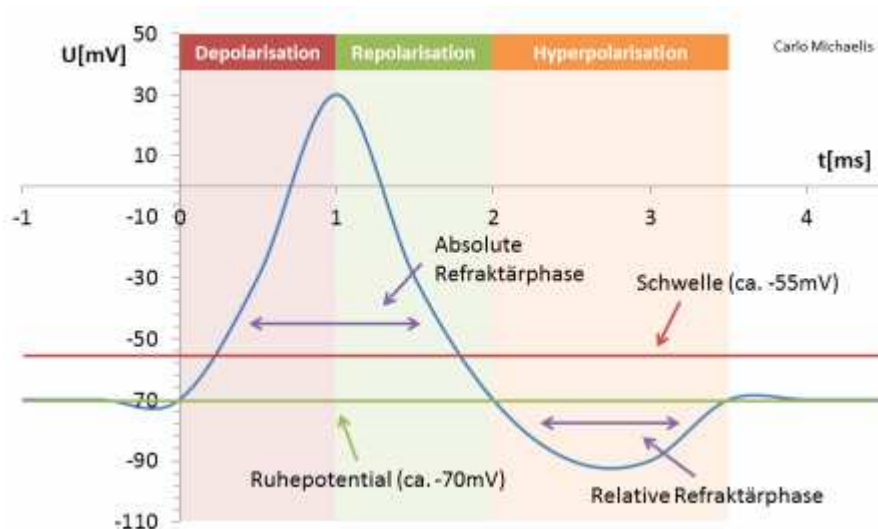
Die spezifische Reaktion, mit der eine Zelle auf einen physikalischen oder chemischen Reiz reagiert, heißt Erregung. Erregbarkeit ist die wichtigste Eigenschaft eines Organismus. Sie ermöglicht die Fortleitung von Reizen und beeinflusst so die Organfunktionen. Zusammen mit Nervenzellen sind auch Sinnes- und Muskelzellen an der Erregungsförtleitung beteiligt. In Muskel- und Nervenzelle beruht die Entstehung und Fortleitung der Erregung auf ionischen Prozessen. Aufgrund der unterschiedlichen intra- und extrazellulären Ionenverteilung bildet sich ein Potentialdifferenz, das (Ruhe-)Membranpotential. Die Grundlage für die Fortleitung der Erregung ist die Änderung dieses Membranpotentials (Mutschler, 2008).

Da im Zytoplasma der lebenden Zelle negative Ladungen im Überschuss vorliegen, besitzt das Membranpotential ein negatives Vorzeichen. Jede lebende Zelle weist ein solches negatives Membranpotential auf, das einen Wert zwischen  $-20$  mV und  $-200$  mV besitzt. Bei Nervenzellen beträgt das Ruhe(membran)potential  $-70$  mV. Für die Potentialdifferenz sind verschiedene Ionen verantwortlich: Natrium-, Kalium-, Calcium-, und Chlorid-Ionen. Besonders der Kalium-Ionen-Konzentrationsgradient spielt eine zentrale Rolle (Müller-Esterl, 2004).

Eine kurzzeitige Potentialänderung in einem Interneuron bezeichnet man als Aktionspotential oder Nervenimpuls. Mit einem Aktionspotential reagiert die Zelle auf einen Reiz, der einen bestimmten Schwellenwert überschreitet. Ausgelöst durch einen chemischen oder physikalischen Reiz, wird das Membranpotential zu positiveren Werten verändert („Depolarisation“), nimmt jedoch innerhalb von Millisekunden ( $< 0,1$  ms) schlagartig wieder ab. Für kurze Zeit wird so das Innere der Nervenzelle gegen die Außenseite der Membran positiv geladen. Nachfolgend wird das (Ruhe-)Membranpotential wieder hergestellt, was als „Repolarisation“ bezeichnet wird.

Wird das sogenannte Schwellenpotential erreicht, öffnen sich spannungsabhängige Natriumkanäle, sodass Natrium-Ionen dem Konzentrationsgradienten folgend in das Zellinnere strömen. Der massive Einstrom positiver Ladungen führt zur „Potentialumkehr“ und das Membranpotential steigt in den positiven Bereich. Durch die anschließende rasche Aktivierung von (spannungsabhängigen) Kalium-Kanälen wird die ursprüngliche Ladungsverteilung wiederhergestellt und die Zelle kehrt in den Ruhezustand zurück. Ist das Ruhemembranpotential von  $-70$  mV erreicht, schließen sich die Kalium-Kanäle wieder (Mutschler, 2008).

In vielen Zellen, vor allem in Neuronen, kommt es am Ende der Repolarisation zu einer sogenannten „Hyperpolarisation“. Im Gegensatz zur Depolarisation, durch die das Membranpotential in den positiven Bereich verschoben wird, kommt es bei der Hyperpolarisation in Muskel-, Nerven- und Sinneszellen durch eine verlängert erhöhte Kalium-Leitfähigkeit zum weiteren Abfall des Potentials (das Zellinnere wird noch stärker negativ geladen) auf ca.  $-100$  mV. Dieser auch als „Nachpotential“ bezeichnete Mechanismus verhindert eine weitere Erregung der jeweiligen Zelle für die Dauer von ca. 1 ms. Diese Phase wird als Refraktärphase bezeichnet (Mutschler, 2008). ( **Abb. 2** )



**Abb. 2.** Aktionspotential einer Nervenzelle. (uni.carlo-michaelis.de)

### 3.1.3. Neurotransmitter

Transmitter sind chemische Botenstoffe mit der Aufgabe, Erregungen von einer Zelle zu einer anderen zu übertragen. Man unterscheidet zwölf zentrale Neurotransmitter:

- **Aminosäuren:** Glycin, Glutaminsäure, Asparaginsäure und  $\gamma$ -Aminobuttersäure,
- **Aminosäure-derivate:** Adrenalin, Noradrenalin, Dopamin, Serotonin, Histamin Acetylcholin, und Adenosintriphosphat (ATP) (Forth, 2009).

Fast alle Neurotransmitter werden in den Nervenendigungen selbst aus Vorstufen gebildet (z.B. Acetylcholin mithilfe des Enzyms Cholinacetyltransferase aus Acetyl-CoA und Cholin). Neuropeptide können hingegen nicht direkt in den Nervenendigungen gebildet werden; ihre Synthese findet im Zellkörper statt (Forth, 2009). Alle Neurotransmitter werden in Vesikeln gespeichert und so für den Transport zu ihrem Wirkort bereitgestellt. Zusätzlich dienen die Vesikel dem Schutz der Neurotransmitter vor Abbau im Zytoplasma.

Die Freisetzung der Transmitter erfolgt, nachdem ein Aktionspotential die präsynaptische Nervenendigung erreicht hat. Es kommt zu Öffnung von spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen und zum Einstrom von Calcium-Ionen ins Axoplasma. Durch den Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration kommt es zur Exozytose der Transmitter aus dem Vesikel. Die Inaktivierung der Transmitter erfolgt durch Wiederaufnahme in die Nervenendigung (Reuptake) oder durch ihren Abbau (Forth, 2009).

### **3.1.4. Synaptischen Erregungsübertragung**

Als Synapse wird der Ort der Erregungsübertragung von einem Axon auf eine andere Nerven-, Muskel- oder Drüsenzelle bezeichnet (Mutschler, 2008). Im Nervensystem finden sich erregende (exzitatorische) und hemmende (inhibitorische) Synapsen. Während die exzitatorischen Synapsen die Auslösung eines Aktionspotentials fördern, wirken die inhibitorischen Synapsen genau entgegengesetzt und hemmen die Ausbreitung von Erregungen.

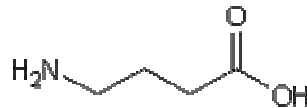
In inhibitorischen Synapsen bewirken die freigesetzten Neurotransmitter eine Hyperpolarisation der Zellmembran, d.h. ein kurzzeitiges Absinken des Membranpotentials unter das Ruhemembranpotential. Ein inhibitorisches postsynaptisches Potential („inhibitory postsynaptic potential“, IPSP) wird durch eine stark erhöhte Kalium- und Chlorid-Ionen-Permeabilität der Membran ermöglicht. Da eine Hyperpolarisation das Membranpotential weit unter den Schwellenwert sinken lässt, kann kein weiteres Aktionspotential ausgelöst werden, und die Zelle bleibt für ankommende Reize unempfindlich (Mutschler, 2008).

### **3.2. GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure)**

GABA ( $\gamma$ -Aminobuttersäure, 4-Aminobuttersäure) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im Zentralnervensystem (ZNS) der Säugtiere. GABA ist wesentlich für das Gleichgewicht zwischen neuronaler Erregung und Hemmung (Chebib und

Johnston, 2000). Ein Ungleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Prozessen im ZNS führt zu verschiedensten Störungen, wie z.B. Krampfanfällen, Angststörungen, Bluthochdruck, Unruhe und Schlafstörungen (Insomnia). Massive Störungen dieses Gleichgewichts können sogar zum Tod führen (Siegel, 2005).

Produktion und Metabolisierung von GABA erfolgen im Zentralnervensystem (Gohar, 2004).



**Abb. 3.** Chemische Struktur der 4-Aminobuttersäure.

### 3.2.1. Bereitstellung und Inaktivierung von GABA

GABA wird mit Hilfe des Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus Glutamat, dem wichtigsten exzitatorischen Neurotransmitter, in einem einzigen Schritt synthetisiert (**Abb. 4**). Das Enzym GAD wird im Zentralnervensystem in Interneuronen exprimiert. Nach der Freisetzung wird GABA teilweise in Gliazellen transportiert, wo es durch die GABA-Transaminase zu Succinat-Semialdehyd umgewandelt, in den Citratzyklus eingeschleust und schließlich abgebaut wird. Glutamin wird in die GABAergen Nervenendigungen aufgenommen, dort vom Enzym Glutaminase zu Glutamat hydrolysiert und schließlich erneut zu GABA decarboxyliert. GABA wird mit Hilfe von Protonenpumpen in Vesikeln gespeichert und nach Bedarf durch Exozytose wieder freigesetzt.

Inaktiviert wird GABA durch carrier-vermittelte Aufnahme. So kann der Transmitter entweder wieder in Vesikel gespeichert, oder durch GABA-Transaminase über Succinat-Semialdehyd zu Bernsteinsäure abgebaut werden (Owens und Kriegstein, 2002; D'Hulst et al., 2009).



GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren (GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren) gehören zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen, während GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zählen (Chebib und Johnston, 2000).

### 3.3.1. Der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor

Lange Zeit war man der Meinung, der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor sei der einzige GABA-aktivierte Rezeptor im Gehirn. Erst 1979 bewiesen Bowery und Hudson durch Experimente an myokardialen Gewebe von Ratten die Existenz eines weiteren Rezeptors, der durch Baclofen aktiviert werden konnte, sich gegenüber den bekannten Agonisten 3-Aminopropan-sulfonsäure (3-APS) und Antagonisten wie Bicucullin und Picrotoxin hingegen unempfindlich zeigte (Bowery et al., 1979).

Im Gegensatz zum GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist der GABA<sub>B</sub>-Rezeptor kein ligandengesteuerter, sondern ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Die Aktivierung des Rezeptors führt über ein G<sub>i/o</sub>-Protein zur Entstehung eines inhibitorischen postsynaptischen Potentials („inhibitory postsynaptic potential“, IPSP), während es präsynaptisch neben der Aktivierung von K<sup>+</sup>-Kanälen zum Schließen ligandengesteuerter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle kommt. Diese Prozesse werden intrazellulär über Second-Messenger-Systeme reguliert (Bettler und Tiao, 2006).

Studien zu neuen GABA<sub>B</sub>-Rezeptor-Agonisten und –Antagonisten haben gezeigt, dass Agonisten neben einem muskelrelaxierenden Effekt ebenso eine analgetische Wirkung aufweisen, und zudem während eines Cocain-Entzugs das Verlangen nach dem Suchtmittel reduzieren. Antagonisten können kognitive Leistungen verbessern und zeigten zusätzlich antidepressive und antiepileptische Wirkung (Bowery und Enna, 2000).



### 3.3.2. Der GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptor (GABA<sub>C</sub>-Rezeptor)

Einem Beschluss des Nomenklatur-Ausschuss der IUPHAR (International Union of Pharmacology) folgend, wird die Bezeichnung „GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren“ nicht mehr verwendet. Die früher als solche bezeichneten Rezeptoren werden nun als eine Untergruppe der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren betrachtet (Barnard et al., 1998; Olsen und Sieghart 2008), und als GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren bezeichnet. GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren bilden Homooligomere aus ρ-Untereinheiten (ρ<sub>1</sub> und ρ<sub>2</sub>), wohingegen GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren Heterooligomere darstellen. Obwohl die GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren in allen ZNS Regionen nachweisbar sind, werden die überwiegend in der Retina exprimiert (Koulen et al., 1997).

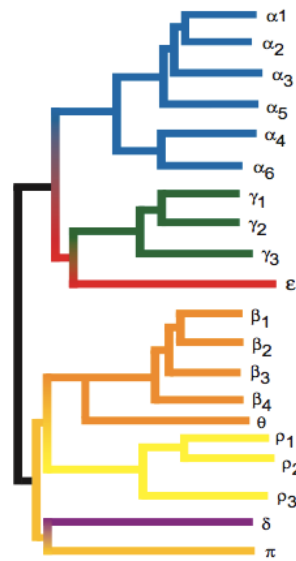
GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren zeigen eine zu den GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren verschiedene Pharmakologie. Sie werden weder durch Bicucullin inhibiert, noch durch Barbiturate, Benzodiazepine oder Neurosteroiden moduliert. Vergleicht man sie mit GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, zeigen die GABA<sub>ρ</sub>-Rezeptoren eine höhere Sensitivität für GABA, d.h. sie werden durch niedrigere GABA-Konzentrationen aktiviert. Eine weitere physiologisch signifikante Charakteristik ist, dass sie keine Desensibilisierung zeigen, und somit eine verlängerte Öffnungswahrscheinlichkeit ihrer Chlorid-Kanäle aufweisen (Johnston, 1996).

### 3.4. Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor stellt den bedeutendsten inhibitorischen Rezeptor im Zentralnervensystem dar (Olsen und Sieghart, 2008); Akk und Steinbach, 2011) Sie sind sowohl bei Wirbeltieren wie auch bei Wirbellosen ubiquitär im Nervensystem verbreitet (Buckingham et al., 2005).

Durch Klonierung konnten 19 GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten bei Säugetieren identifiziert werden: α<sub>1-6</sub>, β<sub>1-3</sub>, γ<sub>1-3</sub>, δ, ε, θ, π, und ρ<sub>1-3</sub> (Simon et al., 2004). Die Sequenzidentität liegt dabei zwischen den einzelnen Subfamilien bei 30 – 40 % und

innerhalb einer Subfamilie bei 70 – 80 % (Macdonald und Olsen, 1994; Mehta und Ticku, 1999).



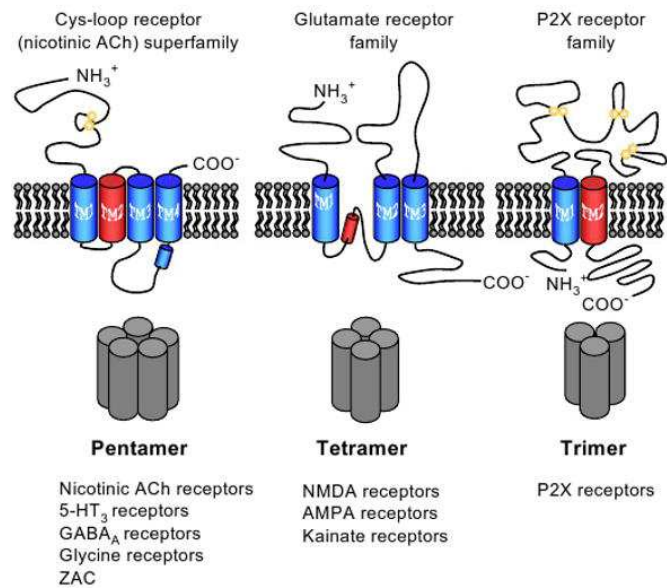
**Abb. 6.** Überblick über die bekannten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten  
(modifiziert, Nutt, 2006)

Durch Bindung von GABA an den Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung, die in einem Anstieg der Chlorid- ( $\text{Cl}^-$ ) und, in geringerem Ausmaß, auch der Bikarbonat- ( $\text{HCO}_3^-$ )-Permeabilität resultiert (Henschel et al., 2008). Um den GABA<sub>A</sub>-Rezeptorkanal zu öffnen und zur Entfaltung der vollen GABA-Wirkung, sind zwei Moleküle GABA notwendig, die extrazellulär zwischen der  $\alpha$  und  $\beta$  Untereinheit am Rezeptor binden. Wird GABA aus dem extrazellulären Raum entfernt, kehrt der Rezeptor aus dem offenen in den geschlossenen Zustand zurück. Darauf folgt die Phase der „Desensibilisierung“, während der der Kanal nicht aktiviert werden kann.

### 3.4.1. Struktur des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors

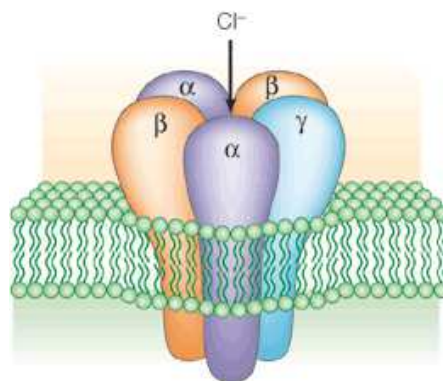
GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind Vertreter der Cys-loop pentameren LGIC (Ligand-Gated-Ion-Channel)-Superfamilie, zusammen mit nikotinischen Acetylcholin (Ach)-Rezeptoren, inhibitorischen Glycin-Glutamat-Purin-Rezeptor ( $\text{P}_2\text{X}$ )-Rezeptoren und ionotropen 5-HT<sub>3</sub> (Serotonin)-Rezeptoren (Johnston, 2005; Olsen und Sieghart 2008). Alle

Vertreter sind membrangebundene Ionenkanäle und besitzen einen ähnlichen Aufbau. Neben den pentameren LGIC Rezeptoren kennt man noch die Glutamat- (tetramer) und die Purin-Rezeptorfamilie (trimer) (**Abb. 7**).



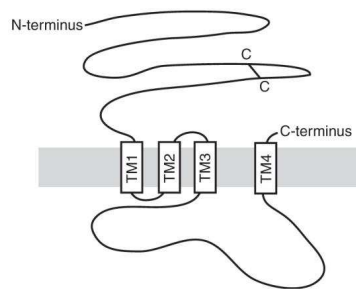
**Abb. 7.** Pentame, tetrame und trimere Cys-Loop-Rezeptoren  
 (Collingridge et al., 2009)

Strukturell ist der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ein Protein bestehend aus fünf Untereinheiten (Pentamer), die eine zentrale Pore, den eigentlichen Ionenkanal durch die Zellmembran, formen (Sieghart et al., 1999) (**Abb. 8**).



**Abb. 8.** Schematische Darstellung eines GABA<sub>A</sub> Rezeptors  
 (Belelli und Lambert, 2005).

Jede Untereinheit besteht aus einem langen extrazellulären N-Terminus, vier transmembranären Domänen (M1 – M4) von ungefähr 20 Aminosäuren Länge, die eine  $\alpha$ -Helix bilden, einer großen intrazellulären Schleife (Loop) zwischen M3 und M4, und einem kurzen extrazellulären C-Terminus. Jede Untereinheit ordnet sich so an, dass die zweite transmembranäre Domäne (M2) nach innen gerichtet ist und so die Wand der Kanalpore bildet (Johnston, 2005; Olsen und Sieghart, 2008) (**Abb. 9**).



**Abb. 9.** Schematischer Aufbau einer GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheit  
(Goetz et al., 2007)

Die N-terminale Domäne enthält eine Cystein-Disulfidbrücke (Cys-Loop) (Hevers und Lüdens, 1998), die charakteristisch für die LGIC-Superfamilie ist, und beinhaltet ungefähr 200 Aminosäuren (Goetz, 2007). Eine vollständig ausgebildete Untereinheit hat eine molekulare Masse von 50 – 60 kDa und besteht aus ungefähr 450 Aminosäureresten (Akk et al., 2011). Da sich N- und C-Terminus im extrazellulären Bereich befinden, ist die Schleife zwischen M3 und M4 die wichtigste Domäne für die Interaktion mit der intrazellulären Umgebung. Die weitere Erforschung der Funktion dieser intrazellulären Schleife ist für das Verständnis der Aktivität des Rezeptors von großer Bedeutung (Chen und Olsen, 2007).

### 3.4.2. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten und ihre Kombinationsmöglichkeiten

Die Zusammensetzung der verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten entscheidet über ihre biophysikalischen Eigenschaften, die Affinität zu GABA, sowie ihre Pharmakologie und Lokalisation in der Zelle (Goetz et al., 2007). Abhängig von der Kombination der jeweiligen Untereinheiten zeigen die Zellen des Nervensystems unterschiedliche Funktionalitäten (Olsen und Sieghart, 2009). Die Untereinheiten

werden in unterschiedlichen Gehirnbereichen in variablem Ausmaß exprimiert, wodurch die Zuordnung einzelner Rezeptorsubtypen zu verschiedenen Arealen im Gehirn erleichtert wird.

Die einzelnen Untereinheiten werden anhand der Übereinstimmung ihrer Aminosäuresequenz charakterisiert, wobei die größten Unterschiede in der langen intrazellulären Schleife zwischen M3 und M4 liegen (Olsen und Sieghart, 2008).

Aufgrund der vielen Kombinationsmöglichkeiten der Untereinheiten wird angenommen, dass im Gehirn mehr als 800 GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtypen vorliegen könnten (Barnard et al., 1998). Viele von diesen Rezeptoren sind jedoch nicht weit verbreitet (Henschel et al., 2008). Olsen und Sieghart (2008) vorschlagen eine Anzahl von 11 Rezeptor-Subtypen die bislang identifiziert wurden und in hohem Ausmaß im menschlichen Gehirn verbreitet sind.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit ist die am häufigsten inkorporierte  $\alpha$ -Untereinheit im Gehirn. Sie wird in fast allen Gehirnregionen exprimiert und kommt in 50% der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vor. Studien haben gezeigt, dass die  $\alpha_1$ -Untereinheit dem Rezeptorsubtyp spezifische pharmakologische Eigenschaften verleiht, die unterschiedliche GABA-Sensibilität und Effekte von Benzodiazepinen umfassen.

Die  $\alpha_1$ -Untereinheit vermittelt die sedierenden Wirkungen der Benzodiazepinen, während  $\alpha_{2/3}$ -Untereinheit für Anxiolyse, Muskelrelaxierung und die antikonvulsive Wirkungen nötig sind. Die  $\alpha_5$ -Untereinheit spielt wichtige Rolle bei Gedächtnis- und Lernen-Prozessen (Rudolph et al., 1999).

Die  $\alpha_2$ -Untereinheit ist bevorzugt im Vorderhirn und Kleinhirn lokalisiert.

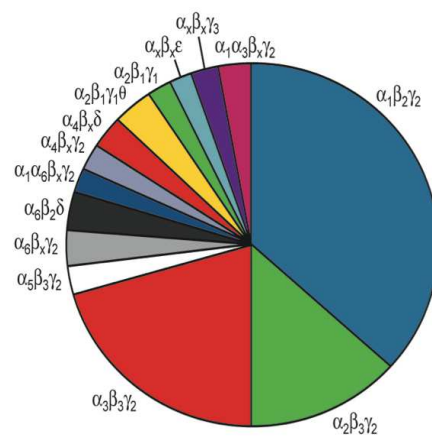
Von den verschiedenen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten existieren zahlreiche Spleißvarianten, vorrangig von der  $\gamma_2$ -Untereinheit. Die Spleißvarianten der  $\gamma_2$ -Untereinheit unterscheiden sich in nur 8 Aminosäuren in der intrazellulären Schleife, welche bei langen („long“, L)  $\gamma_{2L}$ -Untereinheit vorhanden sind und in der kurzen („short“, S)  $\gamma_{2S}$ -Untereinheit fehlen. Beide Spleißvarianten zeigen unterschiedliche Verbreitung in verschiedenen Gehirnregionen. Weiters existieren Spleißvarianten der  $\beta_2$ - und  $\gamma_3$ -Untereinheiten (Olsen und Sieghart, 2009).

Die  $\gamma_1$ -Untereinheit wird in der Amygdala, dem Pallidum, dem Septum, dem Hypothalamus, der Substantia nigra, dem Pars reticulata und dem Colliculus gefunden (D’Hulst et al., 2009) und kann durch die  $\gamma_2$ -Untereinheit ersetzt werden.

Dagegen inkorporiert nur ein kleiner Teil der Rezeptoren die  $\gamma_3$ -Untereinheit (Pirker et al., 2000).

Die Untereinheiten  $\delta$ ,  $\epsilon$  und  $\pi$  sind dazu in der Lage die  $\gamma$ -Untereinheit zu ersetzen, während die  $\theta$ -Untereinheit mit der  $\beta$ -Untereinheit ausgetauscht werden könnte. Die  $\rho$ -Untereinheit, welche den früher als GABA<sub>C</sub>-Rezeptoren bezeichneten Subtyp formt, kann hingegen mit keiner der anderen Klassen von GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten kombiniert werden (Sieghart et al., 1999).

Der am weitesten verbreitete Subtyp des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors im ZNS (**Abb. 10**) besteht aus zwei  $\alpha_1$ , zwei  $\beta_2$ , und einer  $\gamma_2$ -Untereinheit, welche, von der extrazellulären Seite betrachtet, im Uhrzeigersinn angeordnet sind ( $\beta_2$ - $\alpha_1$ - $\beta_2$ - $\alpha_1$ - $\gamma_2$ ) (Sander et al., 2011). Diese Rezeptoren antworten auf hohe GABA-Konzentrationen (mM-Bereich) mit einer schnellen und kurzen (< 1 ms) Stromänderung, wobei die Kinetik der Ströme durch einen schnellen Anstieg, eine große Amplitude und eine rasche Inaktivierung gekennzeichnet ist. Die so charakterisierten Rezeptoren werden auch als synaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren bezeichnet. Im Gegensatz dazu formen Rezeptoren, die aus  $\alpha\beta$  oder  $\alpha_{4/6}\beta\delta$ -Untereinheiten bestehen, extrasynaptische Rezeptoren. Diese zeigen eine größere Affinität zu Agonisten und eine längere Öffnungswahrscheinlichkeit als synaptische Rezeptoren. Zudem sprechen sie bereits auf geringe GABA Konzentrationen ( $\mu$ M-Bereich) an (Tretter et al., 2012). Ähnlich den  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptoren sind auch  $\alpha_{2,3,4,5,6}\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_4\beta\delta$  und  $\alpha_6\beta\delta$ -Rezeptoren weit verbreitet, jedoch nur in geringem Ausmaß (Sieghart, 2002).



**Abb. 10.** Häufigkeit der bekannten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtypen (Nutt, 2006)

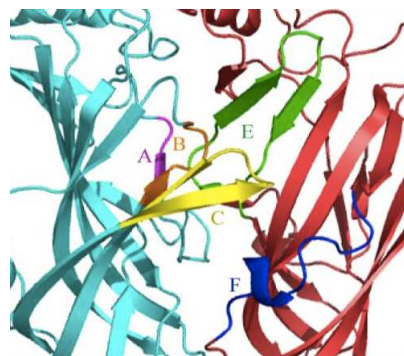
### 3.4.3. Die GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Bindungsstellen

#### 3.4.3.1 Die GABA-Bindungsstelle

Zur Aktivierung des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors sind zwei Moleküle GABA erforderlich. Diese binden an spezifische Bindungsstellen in der extrazellulären Domäne zwischen  $\beta$ - und  $\alpha$ -Untereinheiten. Wenn der Neurotransmitter oder eine strukturverwandte Verbindung an die Bindungsstelle bindet, kommt es zur Konformationsänderung des Rezeptors und anschließender Öffnung der Kanalpore in der transmembranären Domäne. Dieser Prozess wird als „gating“ bezeichnet (Goetz et al., 2007).

Neben GABA kann der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor auch durch Barbiturate (z.B. Phenobarbital), Neurosteroide (z.B. Allopregnanolon) und Anästhetika (z.B. Etomidat) direkt aktiviert werden. Diese Stoffe binden an anderen Stellen, die nicht mit der GABA-Bindungsstelle überlappen. Zusätzlich sind Barbiturate, Etomidat und Neurosteroide in der Lage Ströme zu potenzieren, die durch geringe GABA-Konzentrationen hervorgerufen wurden (Akk et al., 2011).

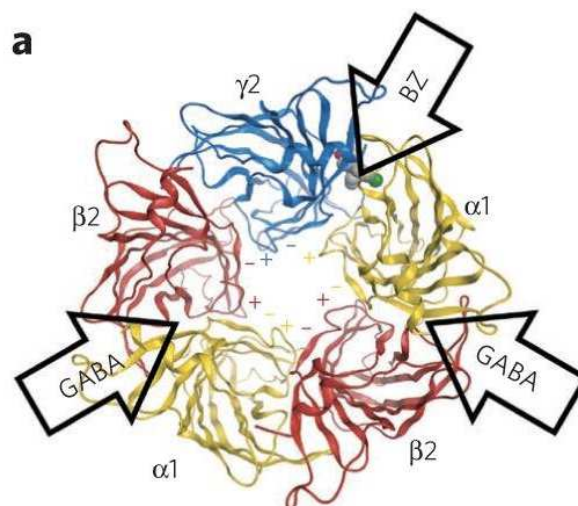
Die Bindungstasche von GABA wird von vielen Aminosäuren gebildet, die auf die Loops A – F aufgeteilt sind. Die entscheidenden Reste, welche die Interaktion mit GABA ermöglichen, sind in der  $\alpha_1$ -Untereinheit die Aminosäuren Phe<sup>64</sup>, Arg<sup>66</sup>, Ser<sup>68</sup>, (bilden Loop D) und Arg<sup>119</sup> und Ile<sup>120</sup> (bilden Loop E), in der  $\beta_2$ -Untereinheit die Reste Tyr<sup>157</sup> und Thr<sup>160</sup> (Loop B), und Thr<sup>202</sup>, Ser<sup>204</sup>, Tyr<sup>205</sup>, Arg<sup>207</sup>, und Ser<sup>209</sup> (Loop C). Loop A wird von Aminosäureresten Trp<sup>92</sup> und Asp<sup>101</sup> der  $\beta_2$ -Untereinheit gebildet (Boileau et al., 2002).



**Abb. 11.** Loops A – F im GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Marlock und Czajkowski, 2011)

Die Kanalpore ist etwas von der Agonisten-Bindungsstelle entfernt, und liegt vermutlich in der Mitte der zweiten transmembranären Domäne (M2). Weil Loop F am Grund der Bindungsspalte lokalisiert ist, wurde ihm die größte Bedeutung für die Bindung des Liganden und Öffnung des Kanals zugeschrieben (Khatri et al., 2009).

Die  $\beta$ -Untereinheit bildet die primäre oder plus (+) Seite, während die  $\alpha$ -Untereinheit die komplementäre oder minus (-) Seite der Bindungsstelle formt (Akk et al., 2011). Die Kombinationen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten weisen darauf hin, dass sich die Bindungsseite des Neurotransmitters an der  $\beta$ - $\alpha$  „plus-minus“ Schnittstelle befindet. Im Gegensatz dazu liegen die Aminosäuren, die für die Benzodiazepin-Bindung erforderlich sind, in den Loops A, B und C der  $\alpha$ -Untereinheit und den Loops D und E der  $\gamma$ -Untereinheit. Somit befindet sich diese Bindungsstelle an der  $\alpha$ - $\gamma$  „plus-minus“ Schnittstelle (Crommer et al., 2002).



**Abb. 12.** GABA- und Benzodiazepin-Bindungsstellen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor  
(Richter et al., 2012)

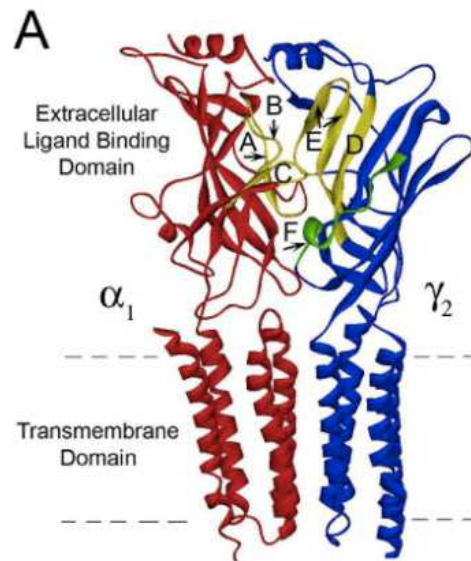


### 3.4.3.1. Die Benzodiazepin-Bindungsstelle

Die Benzodiazepin-Bindungsstelle liegt zwischen der  $\alpha$ - und  $\gamma_2$ -Untereinheit (Richter et al., 2012).

Die Wirkung des BDZ Diazepam ist stark von der inkorporierten  $\alpha$ -Untereinheit abhängig. Über den am weitesten verbreiteten  $\alpha_1\beta\gamma_2$ -Rezeptorsubtyp vermittelt Diazepam seine sedative, hypnotische, anterograd amnestische, suchterzeugende und krampflösende Wirkung, über  $\alpha_2\beta\gamma_2$ -Rezeptoren ausschließlich anxiolytische Eigenschaften, während  $\alpha_2\beta\gamma_2$ ,  $\alpha_3\beta\gamma_2$  und  $\alpha_5\beta\gamma_2$ -Rezeptoren die muskelrelaxierende Wirkungen vermitteln. Die  $\alpha_5$ -inkorporierende Rezeptoren sind für das Gedächtnis wichtig, aber vermitteln auch die Toleranzentwicklung des Diazepams (Lüscher et al., 2011). Im Gegensatz zu diesen „Diazepam-empfindlichen Rezeptoren“ sprechen die Subtypen  $\alpha_4\beta\gamma_2$  und  $\alpha_6\beta\gamma_2$  nicht auf die häufig verwendeten Benzodiazepine, wie Diazepam, Flunitrazepam oder Clonazepam an und werden daher auch als „Diazepam-unempfindliche Rezeptoren“ bezeichnet. Imidazobenzodiazepine wie der kompetitive  $GABA_A$ -Rezeptorantagonist Flumazenil reagieren hingegen mit diesen Rezeptoren, entfalten ihre Wirkung aber auch an  $\alpha_{1-5}\beta\gamma_2$ -Rezeptoren. Zusätzlich zeigt Flumazenil partial-agonistische Effekte an diesen  $GABA_A$ -Rezeptoren (Lüscher et al., 2011).

Studien an  $\gamma_2/\alpha_1$  chimären Untereinheiten identifizierten mehreren Aminosäurereste in der Nähe der Kanaldomäne der  $\gamma_2$ -Untereinheit, die für die Modulation  $GABA$  induzierter Ströme ( $I_{GABA}$ ) durch BDZ-Bindungsstellen-Liganden erforderlich sind (Boileau et al., 1998). In der  $\alpha_1$ -Untereinheit sind 3 unterschiedliche Bereiche an der Benzodiazepin-Bindung beteiligt: His<sup>101</sup>, Tyr<sup>159</sup> – Thr<sup>162</sup> und Gly<sup>200</sup> – Val<sup>211</sup> (Boileau et al., 1998), während in der  $\gamma_2$ -Untereinheit die beiden Aminosäuren Phe<sup>77</sup> und Thr<sup>142</sup> identifiziert werden konnten (Boileau et al., 1998).



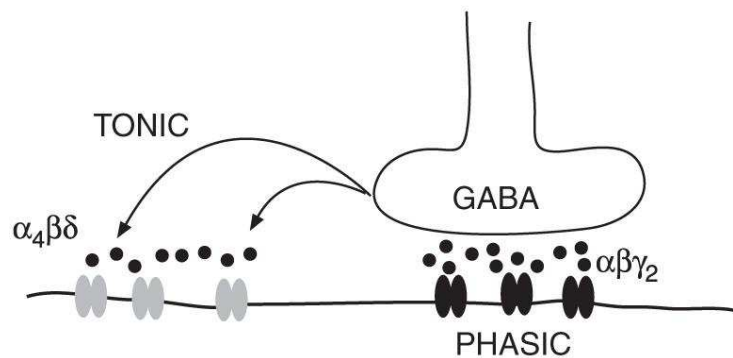
**Abb. 13.** Die  $\alpha_1/\gamma_2$ -Schnittstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Hanson und Czajkowski, 2008)

Von allen genannten Aminosäuren kommt dem Histidin in Position 101 (H101) in der  $\alpha_1$ -Untereinheit und seinen Homologen ( $\alpha_2$ H101,  $\alpha_2$ H126 und  $\alpha_5$ H105) die wohl größte Bedeutung. In  $\alpha_4$ - und  $\alpha_6$ -inkorporierenden Rezeptoren findet sich in dieser Position ein Arginin (R101), wodurch sich diese Rezeptoren unempfindlich gegen klassische Benzodiazepine zeigen. Die Mutation Arginin gegen Histidin (R101H) macht  $\alpha_{4/6}$ -beihaltende Rezeptoren sensitiv für Benzodiazepine, wohingegen die entgegengesetzte Mutation (H101R) in den Untereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  und  $\alpha_5$  die Modulation durch Diazepam aufhebt (Lüscher et al., 2012).

#### 3.4.4. Präsynaptische und extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren im Zentralnervensystem

Zahlreiche Studien belegen die weite Verbreitung von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in inhibitorischen Synapsen von Dendriten und Zellkörpern von Neuronen. Zusätzlich werden die Rezeptoren auch in Synapsen von Axonen und in extrasynaptischen Membranen gefunden (Kullmann et al., 2005). Präsynaptische Rezeptoren modulieren Transmission in afferenten Nervenbahnen aus dem Rückenmark, aber auch in hippokampalen Fasern. Eine weitere Form der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-modulierten Signalübertragung ist die tonische Leitfähigkeit, die im Zellen im Kleinhirn, dem

Gyrus dentatus und Interneuronen des Hippokampus beobachtet wird (Kullmann et al., 2005). Schnelle präsynaptische Inhibition erfolgt durch Modulation von Rezeptoren, welche die  $\gamma_2$ -Untereinheiten beinhalten, während die tonische Signalübertragung von extrasynaptischen Rezeptoren, welche  $\delta$ -Untereinheiten inkorporieren, vermittelt wird (Goetz et al., 2007) (**Abb. 13**). Extrasynaptische GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden durch GABA-Überschuss im synaptischen Spalt aktiviert (Glykys und Mody, 2007).



**Abb. 14.** Schematische Darstellung phasischer und tonischer GABAerger Inhibition (Goetz et al., 2007)

Pharmakologie und Funktion betreffend unterscheiden sich die extrasynaptischen  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren von ihrem synaptischen  $\alpha\beta\gamma$  Gegenstück in vielerlei Hinsicht. Die  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren zeigen sich gegenüber Benzodiazepinen unempfindlich und weisen im Gegensatz dazu erhöhte Sensitivität gegenüber anderen allosterischen Modulatoren wie Zink, Lanthan, Neurosteroiden, Ethanol, Barbituraten und manchen Anästhetika auf. GABA besitzt an  $\alpha\beta\gamma$ -Rezeptoren eine größere Wirkung als an  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptoren, wodurch GABA an  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptor als partialer Agonist vorgeschlagen wurde (Belleli et al., 2009).

### **3.5. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-vermittelte ZNS-Störungen**

#### **3.5.1. Schizophrenie**

Das Krankheitsbild der Schizophrenie beschreibt eine schwerwiegende psychische Störung, die zur Desintegration (Loslösung der Person aus dem sozialen Umfeld) der betroffenen Person führt. Schizophrene Erkrankungen verlaufen teils akut, teils schleichend und gehen mit komplexen Störungen des Denkens, Handelns und Fühlens einher (Renschmidt und Theisen, 2011). Diese komplexe psychiatrische Störung betrifft ungefähr 1% der Population (Lewis et al., 2008). Klinisch wird Schizophrenie durch positive Symptome (Psychosen, Halluzinationen, Verfolgungswahn), negative Symptome (Aufmerksamkeit- und Motivationsmangel, Asozialität, Emotionslosigkeit) und kognitive Defiziten beschrieben (Lewis et al., 2008).

Durch Zwillingsstudien wurde eine hohe Vererblichkeit der Erkrankung festgestellt. Allerdings zeichnet kein einzelnes Gen für den Ausbruch von Schizophrenie verantwortlich, sondern vielmehr synergetische Effekte mehrerer Gene und Umweltfaktoren (Lisman et al., 2008). Im post-mortem Gehirnen von schizophrenen Patienten konnte eine reduzierte Aktivität der Glutamat-Decarboxylase (GAD), des für die Synthese von GABA verantwortliche Enzyms, festgestellt werden. Sowohl die Anzahl GABAerger Neurone, als auch die Bildung von GABA sind reduziert. Zudem wurde bei Patienten mit Schizophrenie eine verringerte Anzahl der GAT1, den GABA-Reuptake-Transportern, im dorso-lateralen präfrontalen-Cortex (DLPFC) nachgewiesen (Volk et al., 2002).

#### **3.5.2 Angststörungen**

Angst und Depression sind die heutzutage bei Menschen und Tieren am häufigsten auftretenden Folgen andauernder Stressbelastung. Nach der Amerikanischen psychiatrischen Vereinigung (American Psychiatric Association, APA) werden Angststörungen wie folgt unterteilt:

- generalisierte Angststörung (generalized anxiety disorder; GAD),
- Panikstörung (panic disorder; PD),
- Zwangsstörung (obsessive-compulsive disorder; OCD),
- Sozialphobie (social anxiety disorder; SAD) und
- posttraumatische Belastungsstörung (post-traumatic stress disorder; PTSD) (Möhler, 2012).

Neuronen der Stria terminalis (kompaktes Faserbündel zwischen Amygdala und Hypothalamus) und der Amygdala spielen eine zentrale Rolle bei emotionalen, assoziativen, absichtlichen und interpretativen Prozessen. Bei Angst und Unruhe zeigen diese Regionen unterschiedliche Wirkungen. Die Amygdala vermittelt bedingte, nicht zielgerichtete Angst (Panikstörung, generalisierte Angststörung), während die Kerne der terminalen Stria die Reaktionen von Kontext-abhängigen, gerichteten Ängsten (als Reaktion auf bestimmte Objekte oder Situationen, z.B. Höhenangst, Angst vor Spinnen, Blut, Schlangen oder Mäusen) vermitteln (Walker et al., 2003).

Die  $\alpha_2$ -Untereinheit der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wird spezifisch mit Anxiolyse in Verbindung gebracht. Dieser Subtyp der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren ist am häufigsten im Hippocampus, der Amygdala und im Striatum verbreitet. Anhand von  $\alpha_2$ - oder  $\alpha_3$ -Knock-out Mausmodellen konnte die Abhängigkeit der anxiolytische Wirkung des Benzodiazepins Diazepam von der  $\alpha_2$ -Untereinheit bewiesen werden: die  $\alpha_2$ -(H101R)-Mutation zeigte keine anxiolytische Wirkung mehr, die  $\alpha_3$ -(H126R)-Mutation hingegen schon (Löw et al., 2000). Inverse Agonisten des GABA-Rezeptors, wie  $\beta$ -Carbolin, wirken hingegen angsterzeugend (anxiogen) (Steimer, 2002).

### 3.5.3. Schlafstörungen

Schlafstörungen können in

- Insomnie,
- Hypersomnie (übermäßige Tagesschläfrigkeit) und
- Parasomnie (schlafbezogene Verhaltensbeeinträchtigung) unterteilt werden.

Weiters werden Schlafstörungen in primäre (idiopathische, ohne direkt erkennbare Ursache entstehende) bzw. sekundäre (durch psychische oder physische Erkrankungen ausgelöste) Schlafstörungen kategorisiert (Szabadi, 2006).

Anhand des Elektroenzephalogramms (EEG) werden zwei Schlafarten unterschieden: der paradoxe oder REM (Rapid Eye Movement)-Schlaf und der orthodoxe oder NREM (Non-Rapid Eye Movement)-Schlaf. Die beiden Arten wechseln einander ab und formen Zyklen von ungefähr 90 Minuten Dauer. REM-Schlaf ist einerseits im EEG durch starke elektrische Aktivität der Neuronen, und andererseits durch minimalen Muskeltonus und eine hohe Weckschwelle charakterisiert, und wird daher auch als Tiefschlaf bezeichnet. Die Bezeichnung paradoxer Schlaf ist auf den Umstand zurückzuführen, dass die REM-Phasen im Laufe der Nacht von 5–10 auf 20–30 Minuten zunehmen. Während der REM-Phasen kommt es zur Entstehung von Träumen. Die Dauer sowohl des NREM-, als auch REM-Schlafes nimmt mit zunehmendem Lebensalter ab (Mutschler, 2008).

Eine zentrale Rolle in der Kontrolle der Schlaf-Wach-Periodik besitzt der Nucleus suprachiasmaticus im Hypothalamus. Er wird auch als zirkadianer Schrittmacher bezeichnet, der sich täglich an die sich verändernden Tages- und Nachtperioden und andere Umgebungsreize anpasst (Ehlen und Paul, 2009). Der Nucleus suprachiasmaticus erhält von Kollateralen der Sehbahnen Informationen über die Lichteinstrahlung auf die Retina. Melatonin, das in Abhängigkeit davon von der Epiphyse freigesetzt wird, wirkt rückkoppelnd auf den N. suprachiasmaticus zurück (Mutschler, 2008). In fast allen Zellen des N. suprachiasmaticus findet man GABA-Rezeptoren, Enzyme der GABA-Synthese und GABA-Transporter. Es existieren reichlich Belege sowohl in vivo, als auch in vitro, dass gerade GABA eine bedeutende Rolle in der Regulation der Neuronen im N. suprachiasmaticus spielt. Aktivierung der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren in diesen Bereich steuert den zirkadianen Schrittmacher während des Tages, wobei die Aktivierung von GABA<sub>A</sub>- oder GABA<sub>B</sub>-Rezeptoren die Reaktionen auf Licht während der Nacht hemmt (Ehlen und Paul, 2009).

Pharmaka, die für die Behandlung der Schlafstörungen genutzt werden, umfassen sedierende bzw. hypnotisierende Arzneistoffe (zur Behandlung von Insomnie), weckenden Arzneistoffe (Hypersomnie) und Arzneistoffe, die Störungen im

Schlafverhalten bei Parasomnien regulieren können (Szabadi, 2006). Sedierende Pharmaka erhöhen die Effektivität schlaffördernder und/oder mindern die Aktivität der wachsamkeitsfördernden Systeme, während weckende Arzneistoffe in umgekehrter Weise wirken. Meistens liegen Störungen in mehr als nur einem System vor (Szabadi, 2006). Hypnotische Pharmaka greifen vor allem ins Schlafstadium 4 und die REM-Phase ein (Szabadi, 2006). Barbiturate verkürzen die REM-Phase, während Benzodiazepine die Schlafstadien 2 und 3 des orthodoxen Schlafes verlängern und das Stadium 4 wird verkürzt. Werden den REM-Schlaf beeinflussende Arzneimittel nach längerem Gebrauch abgesetzt, kommt es zum sogenannten REM-Rebound (REM-Überschuss), was die Verlängerung der REM-Phasen bezeichnet. Dabei besteht die Gefahr eines Entzugsdelirs. Viele Schlafmittel werden sehr langsam abgebaut. Folglich kommt es oft zu Müdigkeit und Abgeschlagenheit am nächsten Morgen. Durch den langsamen Abbau kann es zu Kumulation des Wirkstoffs kommen, bei manchen Pharmaka hingegen nimmt die Wirkung nach einiger Zeit (meist 2-4 Wochen) wieder deutlich ab. Manche Patienten erhöhen deswegen ohne ärztliche Anweisung ihre Dosis oder nehmen zusätzlich weitere Arzneimittel ein, wodurch sich leicht Abhängigkeiten entwickeln (Mutschler, 2008).

Um das Nebenwirkungsprofil von Schlafmitteln zu verbessern, wurden die ebenso über die GABA<sub>A</sub>- $\alpha_1$ -Untereinheit wirkenden sogenannten „Z“-Drugs (Zolpidem, Zaloplon und Zopiclon) entwickelt. Sie interagieren mit der Benzodiazepin-Bindungsstelle, greifen jedoch selektiver an als die klassischen Benzodiazepine. Die Unterschiede im Wirkprofil im Vergleich zu Benzodiazepinen sind gering. Zwar ist die muskelrelaxierende und antikonvulsive Wirkung infolge niedriger Affinität zur  $\alpha_2$ -Untereinheit der im Rückenmark lokalisierten Rezeptoren weniger stark ausgeprägt, trotzdem besteht die Gefahr von Gangunsicherheit und Stürzen bei älteren Patienten (Johnston, 2005).

Neben der Beteiligung der  $\alpha_1$ -Untereinheit wurde ein Zusammenhang zwischen erholsamem Schlaf und der  $\beta_3$ -Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors beobachtet. Oleamid, eine endogene schlaffördernde Fettsäure, verliert bei  $\beta_3$ -Knock-out Mäusen ihre Wirkung. Eine Mutation der  $\beta_3$ -Untereinheit konnte bei an chronischer Insomnie leidenden Patienten nachgewiesen werden (Johnston, 2005).

Zahlreiche pflanzliche Substanzen fördern das Ein- und Durchschlafen. Zum Beispiel entfalten Terpenoide und Flavanoide aus dem Baldrian (*Valeriana officinalis*, *Valerianaceae*) ihre schlaffördernde Wirkung vermutlich über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Johnston, 2005).

### 3.5.4. Epilepsie

Der Begriff Epilepsie leitet sich vom griechischen Wort „*epilepsia*“ für Fallsucht ab. Epilepsie kann auch als Anfall, Krampf oder Iktus bezeichnet werden (Das et al., 2012). An dieser anfallsweise auftretende Funktionsstörung des Gehirns sind verschiedene Arten von Neuronen beteiligt. Ein Anfall entsteht durch abnorme elektrische Entladungen im Großhirn. Dabei können, je nachdem welches Gebiet von der epileptischen Erregung erfasst wird, Bewusstsein, Motorik, vegetatives Nervensystem, Denken, Erinnerung, Wahrnehmung und Emotionen gestört sein (Forth, 2009). Erleidet ein Patient zwei oder mehrere Anfälle, wird Epilepsie diagnostiziert. Zwischen 0,5 – 1 % der gesamten Weltbevölkerung sind von der Diagnose dieses Krankheitsbilds betroffen (Macdonald et al., 2010).

Die Entstehung der Epilepsie kann auf ein Ungleichgewicht zwischen neuronaler Erregung und Hemmung zurückgeführt werden. Anhand elektrophysiologischer Messungen konnte festgestellt werden, dass es während einer epileptischen Aktivität zu Konzentrationsänderungen der Natrium-, Kalium-, Calcium- und Chlorid-Ionen im intra- und extrazellulären Bereich kommt (Mutschler, 2008).

Ätiologisch werden drei Formen der Epilepsie unterschieden:

- symptomatische (mit identifizierbaren strukturellen Grunderkrankungen),
- kryptogene (symptomatische Epilepsie ohne Nachweis der Grunderkrankung) und
- idiopathische (mit genetischen Ursachen) Epilepsie (Mutschler, 2008).

Ungefähr 60% aller Epilepsien sind idiopathisch, das heißt die Erkrankung entsteht ohne erkennbare oder nachweisbare Ursachen. Demgegenüber zählen zu den



häufigsten Ursachen nicht idiopathischer epileptischer Anfälle Tumore, Infektionen, Schädel-Hirn-Traumen, metabolische Erkrankungen sowie Intoxikationen (Das et al., 2012). Durch einen starken Fieberanstieg kann es vor allem bei Kindern im Alter zwischen 6 Monaten und 3 Jahren zu Fieberkrämpfen kommen, die epileptische Anfälle auslösen können. Weitere Ursachen sind sensorische Reize (z.B. Flackerlicht, Streifenmuster), zu kurzer und nicht ausreichender Schlaf, Alkohol(entzug), manche Pharmaka und Sauerstoffmangel (Silbernagl und Lang, 2005).

Die Klassifizierung der Epilepsie stellt die Grundlage für ihre erfolgreiche Therapie dar. Der Anfallstyp ist stark von den verwendeten diagnostischen Tests, sowie dem Alter des Patienten abhängig. Das „International Classification of Epileptic Seizures System (ICES)“ aus dem Jahr 1981 legte erstmals Richtlinien zur generellen Klassifizierung fest. Anfälle wurden gemäß dem ICES in partielle und generalisierte Typen eingeteilt. Das System wurde nachfolgend von der „International League Against Epilepsy“ (ILAE) überarbeitet, und die verschiedenen Formen der Epilepsie in fokale und generalisierte Anfälle unterschieden (Das et al., 2012).

Fokale Anfälle werden in einfache (ohne Bewusstseinsverlust), komplexe (mit Bewusstseinsverlust) und sekundär generalisierte Anfälle unterteilt. Einfache fokale Anfälle äußern sich entweder durch motorische (z.B. Krämpfe bei lokalisierten Jackson-Anfällen), sensorische (z.B. Sinneseindrücke, Halluzinationen) oder vegetative Symptome (z.B. Speichelfluss). Generalisierte Anfälle werden in Petit-mal-Anfälle (Absencen, Myoklonische Anfälle, Blitz-Nick-Salaam-Anfälle) und Grand-mal-Anfälle (tonisch-klonische Anfälle) unterteilt (Mutschler, 2008).

Als Status epilepticus wird ein Anfall bezeichnet, der ohne ein Intervall klinischer Normalisierung länger als 30 Minuten andauert. Während des Anfalls werden nichtkonvulsive Stadien, die sich als Stupor (Erstarrung), Koma oder bizarres Verhalten äußern, und konvulsive Stadien, bestehend aus generalisierten tonisch-klonischen Anfällen, unterschieden. Der Status epilepticus wird als medizinischer Notfall betrachtet, da die sich wiederholenden generalisierten Anfälle das Leben bedrohen und in 10% der Fälle durch Atemstillstand oder Azidose tödlich enden. Ein überstandener Status epilepticus geht immer mit einem erheblichen Neuronenuntergang einher (Forth, 2009).

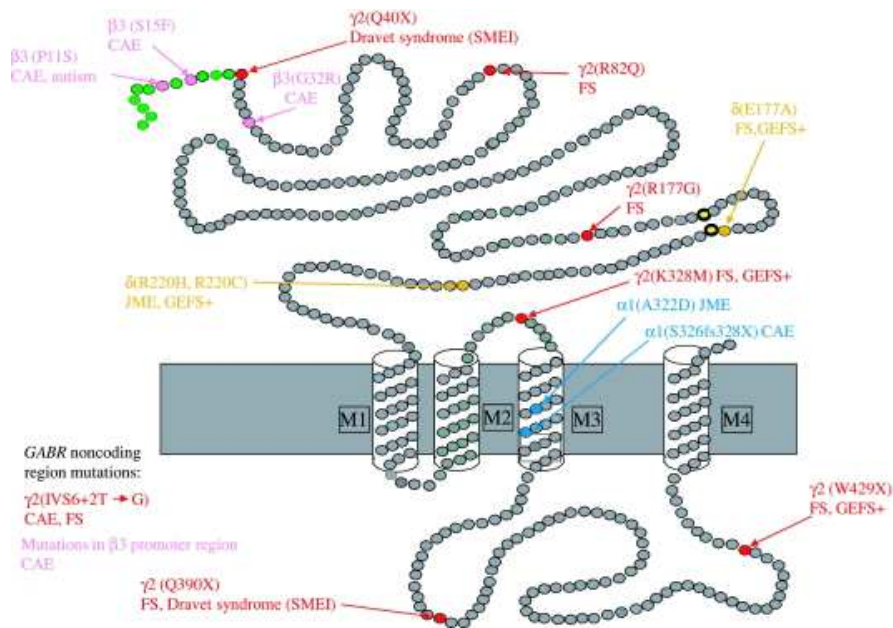
Epilepsie ist mit der übermäßigen Aktivierung von exzitatorischen neuronalen Kreisläufen verbunden, die entweder mit erhöhter Erregung (durch Glutamat) oder der reduzierten Hemmung (durch GABA) einhergeht. Bei Anfällen kann zu Veränderungen der präsynaptischen als auch der postsynaptischen GABAergen Inhibition kommen. Präsynaptische Veränderungen umfassen: verringerte GABA-Synthese oder verstärkter GABA-Abbau, verringerte GABA-Freisetzung aufgrund eines gestörten Freisetzungsmechanismus, oder Verminderung der GABAergen neuronalen Termini. Postsynaptische Veränderungen andererseits beziehen eine verminderte Zahl der aktivierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Jones-Davis et al., 2003) mit ein. Mutationen einzelner Gene von Ionenkanälen, die entweder direkt oder indirekt die erregende neuronale Transmission erhöhen oder die hemmende Transmission erniedrigen, können Übererregbarkeit im Gehirn verursachen. Derartige Mutationen konnten für die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoruntereinheiten  $\alpha_1$ ,  $\beta_3$ ,  $\delta$  und  $\gamma_2$  nachgewiesen werden (Macdonald et al., 2010). Mutationen an Genen, die für verschiedene GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Untereinheiten kodieren und mit dem Krankheitsbild der Epilepsie assoziiert sind, können in vier Klassen unterteilt werden:

1. missense Mutation in kodierenden Sequenzen
2. nonsense Mutation in kodierenden Sequenzen
3. frameshift Mutation in kodierenden Sequenzen
4. Mutationen in nicht kodierenden Sequenzen

Die folgende Tabelle zeigt die durch Mutationen einzelner Untereinheiten hervorgerufenen Fehlfunktionen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor.

**Tabelle 1.** GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Fehlfunktionen verursacht durch Mutationen (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis) (überarbeitet nach Macdonald et al., 2010)

Mutation	Lokalisation	GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Fehlfunktion	Auswirkung
γ <sub>2</sub> (R82Q)	N-Terminus der γ <sub>2</sub> /β <sub>2</sub> -Schnittstelle	Beeinträchtigung der Oligomerisierung; ER Retention; verminderte Oberflächenexpression; verminderte Ströme	CAE/FS
γ <sub>2</sub> (K328M)	M2-M3 Loop	Verminderte Kanalöffnungsdauer; beschleunigte Deaktivierung	GEFS+
δ(E177A)	Angrenzend an den Cys-Loop	Verminderte Öffnungszeiten; beschleunigte Deaktivierung	GEFS+
δ(R220H)	Zwischen Cys-Loop und M1	Verminderte Öffnungszeiten; beschleunigte Deaktivierung	GEFS+
γ <sub>2</sub> (R177G)	Insertion neutraler AS in den N-Terminus	Änderung der Leitfähigkeit	FS
α <sub>1</sub> (A322D)	Insertion geladener AS in die M3	Fehlfaltung; veränderte Struktur; verminderte Oberflächenexpression; verminderte Ströme	JME
β <sub>3</sub> (P11S)	Missense Mutation im Signalpeptid	Abnormale N-terminale Glykosylierung; verminderte Ströme	CAE, Autismus
β <sub>3</sub> (S15F)	Missense Mutation im Signalpeptid	Abnormale N-terminale Glykosylierung; verminderte Ströme	CAE
β <sub>3</sub> (G32R)	Missense Mutation im N-Terminus	Abnormale N-terminale Glykosylierung; verminderte Ströme	CAE
γ <sub>2</sub> (Q390X)	Intrazellulärer Loop zwischen M3-M4	ER Retention; negative Reduktion von „Wild-Typ“-Rezeptoren; Verminderte Ströme	GEFS+/DS
γ <sub>2</sub> (Q429X)	Erster Rest des reifen Peptid	Führt vermutlich zu NMD	DS
α <sub>1</sub> (S326FS328X)	Intrazellulärer Loop zwischen M3-M4	Führt vermutlich zu NMD	GEFS+



**Abb. 15.** Lokalisation der verschiedenen, epilepsierelevanten Mutationen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Macdonald et al., 2010)

Die genaue Diagnose in Kombination mit der korrekten Auswahl und Anwendung der verfügbaren antiepileptischen Arzneimittel ist für den therapeutischen Erfolg der Epilepsie unerlässlich. Durch die große Anzahl am Markt verfügbarer Medikamente bestehen umfassende Möglichkeiten einer individuell angepassten Therapie. Die Wahl des/der passenden Arzneimittel ist stark von verschiedenen Parametern, einschließlich Alter des Patienten, Geschlecht, Nebenwirkungsprofil, Begleiterkrankungen und gleichzeitige andere Therapien, abhängig (Das et al., 2012). Die derzeit zur Verfügung stehende medikamentöse Therapiemöglichkeiten der Epilepsie sind in **Tabelle 2** zusammengefasst.

**Tabelle 2.** Antiepileptische Arzneimittel und ihr Wirkmechanismus (bearbeitet, aus Das et al., 2012)

Arzneimittel	Wirkmechanismus
Vigabatrin	Hemmt irreversibel GABA-Transaminase
Tiagabin	Hemmt GAT-1 (GABA-Transporter-1)
Lamotrigin	Hemmt die Glutamat-Freisetzung; hemmt spannungsabhängige Na <sup>+</sup> -Kanäle; blockiert $\alpha_4\beta_2$ -nAChR
Carbamazepin, Oxcarbazepin	Stabilisiert den inaktivierten Zustand von Na <sup>+</sup> -Kanäle
Felbamat	Hemmt NMDA-Rezeptoren; potenziert GABAerge Inhibition; blockiert Na <sup>+</sup> -Kanäle
Topiramamat	Hemmt selektiv exzitatorische Transmission vermittelt durch GluR5
Zonisamid	Hemmt Na <sup>+</sup> -Kanäle; reduziert spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -T-Typ-Ströme; moduliert das GABAerge, das serotoninerge, und das dopaminerge System
Lacosamid	Verstärkt die langsame Inaktivierung der Na <sup>+</sup> -Kanäle
Ganaxolon	Positiv, allosterischer Modulator der GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren
Remacemid	Potenter Na <sup>+</sup> -Kanal Blocker und nicht kompetitiver NMDA-Kanal Antagonist
Retigabin	Aktiviert spannungsabhängige K <sup>+</sup> -Kanäle (KCNQ2)
Safinamid	Hemmt Ca <sup>2+</sup> - und Na <sup>+</sup> -Kanäle; hemmt reversibel MAO-B
Stiripentol	Positiver allosterischer Modulator der GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren
Pregabalin	Bindet an der $\alpha_2$ -Untereinheit der spannungsabhängigen Ca <sup>2+</sup> -Kanälen

## 3.6. Ausgewählte Modulatoren von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

### 3.6.1. Benzodiazepine

Strukturell betrachtet sind Benzodiazepine (BDZ) kondensierte Ringsysteme bestehend aus einem Benzol-Ring und einem Diazepin-Ring, in welchem zwei N-Atome in Positionen 1 und 4 lokalisiert sind (1,4-Benzodiazepin). In den 1950er Jahren wurde durch Zufall entdeckt, dass Benzodiazepine eine Vielzahl an therapeutisch nützlichen Wirkungen, wie Anxiolyse, Sedierung, Unterdrückung von Krampfanfällen und Muskelrelaxation, aufweisen. Einige der bekanntesten Benzodiazepine sind Diazepam, Midazolam, Brotiazolam, Flunitrazepam, Lorazepam, Temazepam, Clonazepam und Oxazepam. Sie werden nach ihrem Metabolismus in vier Gruppen unterteilt: BDZ mit sehr kurzer Halbwertszeit (HWZ), BDZ mit kurzer HWZ, BDZ mit mittlerer HWZ und BDZ mit langer HWZ (Forth, 2009).

Als schlafinduzierende Mittel ersetzten die Benzodiazepine aufgrund ihrer wesentlich größeren therapeutischen Breite die Barbiturate und stellten so den größten Fortschritt in der Psychopharmakologie der 1960er und 1970er Jahren dar. Fast zehn Jahre lang war Diazepam (Valium®) das meist verkaufte verschreibungspflichtige Arzneimittel weltweit. Nur kurze Zeit später wurden mehrere strukturelle Analoga wie Flunitrazepam, Nitrazepam und Triazolam auf den Markt gebracht (Lüscher et al., 2011).

Im Gegensatz zu den Barbituraten ist die Modulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch Benzodiazepine selbstbegrenzend, das heißt, dass die Chloridionen-Leitfähigkeit des Kanals bei gleichzeitiger Anwesenheit von GABA und Benzodiazepinen nicht höher als die maximal durch GABA selbst mögliche Leitfähigkeit werden kann. Zudem öffnen Benzodiazepine die Chlorid-Kanäle nicht in Abwesenheit von GABA, wozu die Barbiturate hingegen fähig sind (Rudolf und Knoflach, 2011).

### **3.6.1.1. Pharmakokinetik**

Aufgrund ihrer hohen Lipophilie passieren Benzodiazepine leicht die Bluthirnschranke. Nach rascher Verteilung im gesamten Organismus gelangen sie in die Leber, wo sie metabolisiert werden. Hierbei kommt es zuerst zu Oxidation durch Cytochrom-P<sub>450</sub>-abhängige Demethylierung, Dealkylierung und Hydroxylierung. Es entstehen einige aktive Metabolite. Danach erfolgt die Konjugation mit Glucuronsäure und die renale Eliminierung. Besondere Vorsicht ist bei Patienten mit Leberschäden angezeigt, da der Abbau der Benzodiazepinen dadurch verzögert wird (Forth, 2009). Ebenso werden bei älteren Patienten aufgrund eines langsameren Metabolismus höhere Plasmakonzentrationen erreicht (Roehrs und Roth, 2012).

### **3.6.1.2. Unerwünschte Nebenwirkungen**

Unerwünschte Nebenwirkungen von Benzodiazepinen sind bei therapeutischen Dosen mild ausgeprägt, von kurzer Dauer werden nur bei wenigen Patienten beobachtet. Viele Nebenwirkungen sind durch ihre gewünschten Wirkungen vermittelt, wie z.B. Sedierung (Roehrs und Roth, 2012).

Die Nebenwirkungen der Benzodiazepine hängen stark von Dosierung und Art der Applikation ab. Bei oraler Therapie kommt es vorwiegend zu Müdigkeit, Schläfrigkeit, Konzentrationsschwäche und der Beeinträchtigung von Aufmerksamkeit und Reaktionsvermögen. Muskelschwäche, als Folge der zentralen Muskelrelaxation, und Sedierung können bei älteren Patienten zu Gangunsicherheit und erhöhtem Sturzrisiko führen. In höheren Dosierungen hingegen kommt es vor allem bei älteren Patienten zu paradoxen Wirkungen, die sich in Schlaflosigkeit, Erregung und Reizbarkeit äußern (Mutschler, 2008).

Nach längerer Anwendung besteht die Gefahr der Toleranzentwicklung und Abhängigkeit. Besonders gefährlich sind höhere Dosen in Kombination mit Alkohol, da dies zu Atemdepression führen kann. Eine weitere Gefahr besteht in der Anwendung während der Schwangerschaft und Stillzeit. Bei Übertritt des Benzodiazepins in die Muttermilch oder Überwinden der Plazentaschranke kommt

es zum sogenannten „floppy infant syndrome“, welches durch Hypothermie, extreme Muskeler schlaffung, sowie Atem- und Saugstörungen gekennzeichnet ist (Forth, 2009).

### **3.6.1.3. Abhängigkeit**

Es wird geschätzt, dass ca. 0,1 – 0,2 % der erwachsenen Bevölkerung Benzodiazepine missbräuchlich verwenden oder sogar von ihnen abhängig sind (Rudolf und Knoflach, 2011). Da die initial beruhigende und sedierende Wirkung der Benzodiazepinen bei anhaltender Zufuhr allmählich abnimmt (Toleranzentwicklung), erhöhen Patienten sehr häufig selbständig ihre Dosis, um wieder die anfängliche Wirkung zu erzielen. Bei plötzlichem Absetzen des Medikaments kommt es zu einer Wirkungsumkehr („Rebound-Effekt“) und zum Auftreten von Entzugssymptomen. Die Entzugerscheinungen führen wiederum zur erneuten Einnahme der Pharmaka und somit zurück in den Kreislauf aus physischer und psychischer Abhängigkeit (Silbernagl und Lang, 2005).

Eine Benzodiazepinabhängigkeit bildet sich innerhalb weniger Wochen aus. Im Laufe der Zeit treten anstatt sedierender erregende Wirkungen auf. Beim Anwender kommt es zur Abnahme von Selbstkontrolle und Konzentration, sowie zu Ataxie (Störungen im Bewegungsablauf), Tremor (Zittern) und vegetativen Störungen (Speichelfluss o.ä.). Bei physischer Anhängigkeit treten die ersten Entzugssymptome 2 bis 10 Tage nach dem Absetzen auf, dauern 5 Tage bis 2 Wochen an und äußern sich in Delir, Ruhelosigkeit, Schlafstörungen, Angst und erhöhter Krampfneigung (Forth, 2009).

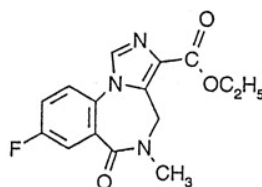
Man unterscheidet zwei Arten der Benzodiazepinabhängigkeit. Die „low dose dependency“ tritt häufiger auf und ist durch konstante Einnahme üblicher therapeutischer Dosis ohne Dosissteigerung gekennzeichnet. Personen mit Schlafstörungen nehmen meist niedrige Dosis über Jahre zu sich. Als zweite, „high dose dependency“, wird eine polyvalente Abhängigkeit bezeichnet, bei der die Patienten die verschriebene Dosis der Benzodiazepine erhöhen, auch über die therapeutischen Dosen hinaus. Diese Personen sind häufig bereits drogen- und/oder



alkoholabhängig, und konsumieren Benzodiazepine oft zusammen mit Alkohol (Forth, 2009).

#### 3.6.1.4. Benzodiazepin-Antagonisten

Flumazenil (**Abb. 16**), ein Imidazobenzodiazepin, ist ein kompetitiver Antagonist der BDZ-Bindungsstelle. Es wird zur Aufhebung einer Benzodiazepin-vermittelten Anästhesie sowie wie bei Intoxikationen infolge von Überdosierung mit Benzodiazepinen eingesetzt. Dabei werden anxiolytische, myotonolytische, antikonvulsive und sedativ-hypnotische Wirkungen, aber auch die paradoxen Wirkungen der Benzodiazepinen spezifisch aufgehoben (Forth, 2009).



Flumazenil

**Abb. 16.** Strukturformel von Flumazenil (Barnard et al., 1998)

#### 3.6.2. Barbiturate

Barbiturate sind Derivate der Barbitursäure und wurden seit der Entdeckung des ersten Vertreters mit schlaffördernder Wirkung, Barbital im Jahr 1903, als Schlafmittel eingesetzt. Zusätzlich zu unerwünschten Nebenwirkungen wie dem morgendlichen „Hangover“, Porphyrie, rascher Toleranzentwicklung (8 – 10 Tage), hohem Abhängigkeitspotenzial, oder paradoxen Erregungszuständen bei Kindern und älteren Personen weisen Barbiturate eine sehr geringe therapeutische Breite auf [z.B. LD<sub>50</sub> bei Phenobarbital: 162 mg/kgKG (Ratte, orale Gabe); 88 mg/kgKG (Maus, intraperitoneale Gabe)], wodurch es rasch zur Überdosierung kommen kann. Barbiturate unterliegen daher seit 1992 dem Betäubungsmittelgesetz und sind als Schlafmittel in der Humanmedizin nicht mehr zugelassen.

Barbiturate werden über das Cytochrom-P<sub>450</sub>-3A (CYP3A) in der Leber metabolisiert, welches sie gleichzeitig induzieren. Durch den so beschleunigten eigenen Abbau wird Toleranzentwicklung begünstigt, und gleichzeitig die Metabolisierung anderer Medikamente beschleunigt. Auf diese Weise vermindern Barbiturate die Wirkung oraler Kontrazeptiva, oraler Antikoagulantien vom Cumarin-Typ, von Antiepileptika, Glucocorticoiden und zahlreichen weiteren Wirkstoffen. (Forth, 2009; Mutschler, 2008).

Aktuell beschränkt sich die Anwendung von Barbituraten auf die injizierbaren Anästhetika Thiopental und Methohexital, die zur Narkoseeinleitung eingesetzt werden, und Phenobarbital, das als Antikonvulsivum Verwendung findet. Vorteilhaft bei der Anwendung injizierbarer Barbiturate ist das frühe Einsetzen der narkotischen Wirkung, sodass Patienten bereits während der Injektion das Bewusstsein verlieren. Diesem positiven Effekt steht jedoch die fehlende schmerzstillende Wirkung gegenüber, weshalb die Wirkstoffe ausschließlich in Kombination mit analgetischen Substanzen verabreicht werden können. In subnarkotischen Dosen können Barbiturate sogar erhöhtes Schmerzempfinden (Hyperalgesie) hervorrufen (Mutschler, 2008).

Barbiturate üben, neben der Hemmung von exzitatorischen Glutamat-ergen AMPA-Rezeptoren ( $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptor), ihre Wirkung fast ausschließlich über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aus. Ähnlich den Benzodiazepinen verstärken sie die Wirkung des Neurotransmitters GABA, binden jedoch an eine andere Bindungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Korpi et al., 2002). In therapeutischen Dosen erhöhen sie im Gegensatz zu den Benzodiazepinen die Dauer, nicht aber die Wahrscheinlichkeit der GABA-induzierten Öffnung des Chlorid-Ionen-Kanals. Bei Konzentrationen größer als 50  $\mu$ M zeigen die Barbiturate direkte Aktivierung des Rezeptors, d.h. sie lösen Effekte auch in der Abwesenheit des Neurotransmitters aus. Die Gruppe der Benzodiazepine hingegen erfordert zur Öffnung des Kanals und zur positiven allosterischen Modulation der Chloridströme die Anwesenheit von GABA. Durch diese beiden Eigenschaften der Barbiturate wird ihre höhere Toxizität im Vergleich zu den Benzodiazepinen (z.B. Atemdepressionen) erklärt. In noch höheren Konzentrationen beeinflussen die Barbiturate zusätzlich die

Desensibilisierung des Rezeptors und unterdrücken unselektiv ZNS-Prozesse (Henschel et al., 2008).

### **3.6.3. Anästhetika**

Die Allgemeinanästhesie (Narkose) ist ein Zustand, während dem Bewusstsein und Schmerzempfindung des Patienten unterdrückt werden, um diagnostische oder therapeutische Eingriffe durchführen zu können. Gleichzeitig mit dem Auftreten einer anterograden Amnesie (Ekmnesie, „nach vorne gerichtete Amnesie“) werden unbewusste Reflexe des Patienten unterdrückt. Um diese Effekte zu erzielen, wird eine Kombination aus sedierenden/hypnotischen und analgetischen Mitteln entweder durch Inhalation oder parenteral verabreicht. Im Unterschied zur Lokalanästhesie, bei der die Schmerzwahrnehmung nur in einzelnen Regionen des Körpers blockiert wird, wirken Allgemeinanästhetika im ZNS, wodurch der Patient während der Narkose nicht weckbar ist (Forth, 2009).

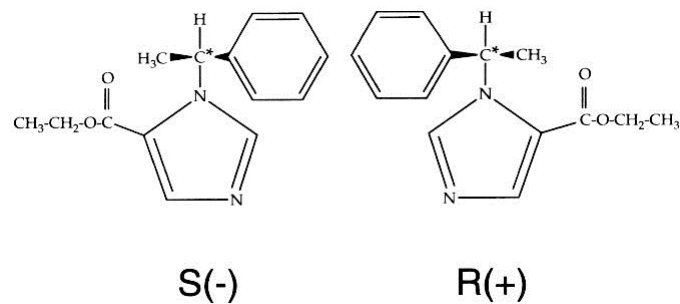
Bewusstlosigkeit, Bewegungslosigkeit und Amnesie werden durch die Unterdrückung der Neurotransmission in Thalamus, Cortex, Rückenmark, Hippocampus und Amygdala vermittelt. Anästhetika modulieren dort eine Vielzahl an Ionenkanälen, wobei sie vorwiegend GABA<sub>A</sub>- und N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptoren beeinflussen (Eckle et al., 2009).

Zu den fast ausschließlich über GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren wirkenden injizierbaren Anästhetika zählen Etomidat und Propofol.

#### **3.6.3.1. Etomidat**

Das pharmakologische Wirkspektrum von Etomidat [R-(+)-1-(1-ethylphenyl)-imidazol-5-ethylester] (**Abb. 17**) umfasst Hypnose, Amnesie und die Inhibition von Nozizeptoren. Wird dieses Kurzzeitanästhetikum parenteral verabreicht, setzt seine hypnotische Wirkung innerhalb von 30 Sekunden ein und hält 3 – 5 Minuten an (Forman, 2011).

Bindet Etomidat am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, können zwei Wirkungsweisen beobachtet werden: In therapeutischen Dosen (0,2–0,3 mg/kgKG; Bergen und Smith, 1997) wirkt Etomidat als positiver allosterischer Modulator des Rezeptors. In Anwesenheit des Modulators werden GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren schon bei niedrigeren GABA-Konzentrationen als üblich aktiviert (Tomlin et al., 1998). In höheren Konzentrationen verabreicht aktiviert der Arzneistoff den Rezeptor direkt, d.h. auch in der Abwesenheit von GABA, was als GABA-mimetische Wirkung bezeichnet wird (Hill-Venning et al., 1997). Beide Wirkungen sind stereospezifisch. Nur das R-(+)-Isomer wirkt als Ultrakurzzeitanästhetikum, während das S-(-)-Isomer keine hypnotische Wirkung entfaltet (Tomlin et al., 1998).



**Abb. 17.** Stereomere des Etomidats (Tomlin et al., 1998)

Die Modulation des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors durch Etomidat ist von der jeweiligen Untereinheitenkombination abhängig. GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, die die  $\beta_2$  und/oder  $\beta_3$ -Untereinheit inkorporieren, werden von Etomidat moduliert, während die Wirkung bei  $\beta_1$ -enthaltenden Rezeptoren um ein Vielfaches geringer ausgeprägt ist. Neben den  $\beta$ -Untereinheiten spielen die verschiedenen  $\alpha$ -Untereinheiten eine bedeutende Rolle bei der Modulation des Rezeptors (Hill-Venning et al., 1997).

### 3.6.3.2 Propofol

Propofol (2,6-Diisopropylphenol) wirkt am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor auf ähnliche Weise wie Etomidat. Anhand genetisch veränderter (punktmutierter) Mäuse konnte bewiesen werden, dass Propofol seine anästhetischen Eigenschaften über die  $\beta_3$ -Untereinheit

vermittelt. Tiere, denen diese Untereinheit fehlte, zeigten im Gegensatz zum Wildtyp keine hypnotischen Wirkungen (Eckle et al., 2009).

Propofol wie auch Etomidat werden zur Einleitung und Aufrechterhaltung einer Narkose zusammen mit einem Analgetikum (z.B. einem Opioid: Remifentanyl) verabreicht, da beide keinerlei schmerzstillende Wirkung zeigen. Als positive Eigenschaften des Propofols gelten eine ausgeglichene Stimmungslage (durch Erhöhung der Dopaminkonzentration), leichtes und rasches Einschlafen und Erwachen des Patienten und selten auftretende postoperative Übelkeit und Erbrechen (Forth, 2009).

Neben GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aktivieren beide Allgemeinanästhetika TRPA1-Kanäle (transient receptor potential typ A1), welche an Entzündungsreaktionen und Schmerzempfinden beteiligt sind. Aufgrund dessen kommt es bei der Injektion hoher Konzentrationen dieser Anästhetika zu starken lokalen Schmerzen (Matta et al., 2008).

#### **3.6.4. Neurosteroide**

Neurosteroide sind endogene GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Modulatoren. Sie sind reduzierte Metabolite der Steroidhormone Progesteron, Deoxycorticosteron und Testosteron. Neurosteroide wie Allopregnanolon oder Androstandiol werden durch Reduktion mithilfe der Enzyme 5 $\alpha$ -Reduktase und 3 $\alpha$ -Hydroxysteroidoxido-Reduktase im Gehirn, aber auch in Nebenhoden, Lunge, Leber, Nebennieren, Ovarien und der Haut, synthetisiert. Aufgrund ihrer Lipophilie passieren die peripher gebildeten Neurosteroide die Blut-Hirn-Schranke sehr leicht und akkumulieren im Gehirn (Reddy, 2010). Durch Bindung an den Rezeptor erhöhen Neurosteroide die Öffnungswahrscheinlichkeit des Chlorid-Kanals. Mehr Chlorid-Ionen strömen in die Zellen ein, es kommt zur Hyperpolarisation der Zellmembran und so zur Inhibition der Reizleitung.

Neurosteroide modulieren synaptische (phasische) und extrasynaptische (tonische) GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Bei der phasischen Inhibition aktivieren die Neurosteroide die

$\gamma_2$ -inkorporierenden GABA-Rezeptoren, während bei tonischer Hemmung die extrasynaptischen  $\delta$ -GABA-Rezeptoren aktiviert werden (Reddy, 2012).

Allopregnanolon und Androstanediol sind positive allosterische Modulatoren der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren (Akk et al., 2009), wobei Allopregnanolon auch direkte Aktivierung zeigt (Hosie et al., 2007). Allopregnanolon vermittelt nach der Bindung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Sedierung, Hypnose, Anxiolyse und Krampflösung. Zusätzlich zeigt das Neurosteroid Antistress- und neuroprotektive Wirkungen. Androstanediol wirkt anxiolytisch und antikonvulsiv. Sulfatierte Neurosteroiden, wie z.B. Pregnenolonsulfat, hingegen antagonisieren den Rezeptor und wirken so einerseits angst- und krampfauslösend, andererseits auch neuroprotektiv und stimulierend auf das Gedächtnis (Belelli et al., 2002).

Die Bindungsstelle der Neurosteroiden befindet sich an der transmembranären Domäne des Rezeptors zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit (Hosie et al., 2007).

### **3.6.5. Kationen**

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren werden von vielen ein-, zwei- oder dreiwertigen Kationen moduliert, wobei alle ihre eigene Bindungsstelle haben. Dazu zählen extrazelluläre  $H^+$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $La^{3+}$  und  $Al^{3+}$ , und intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Ionen (Korpi et al., 2002).

#### **3.6.5.1. Zink ( $Zn^{2+}$ )**

Aufgrund des hohen Gehalts dieses Spurenelementes im Hippocampus wurden die meisten Untersuchungen bisher an  $Zn^{2+}$  als GABA<sub>A</sub>-Modulator durchgeführt. Die Funktionen von Zink im ZNS sind äußerst vielseitig und hängen von der Art und Reife der Neuronen, sowie der Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ab (Korpi et al., 2002).

Zink scheint bei der Synthese der Neurotransmitter Glutaminsäure und GABA eine Rolle zu spielen. Das Spurenelement beeinflusst die Aktivität der Enzyme (Glutamatdecarboxylase), wodurch Unterversorgung zu einem Mangel an den entsprechenden Botenstoffen führen kann.

Zink spielt auch eine Rolle bei der synaptischen Signalübertragung. Das Metall wird im Hippocampus in synaptischen Vesikeln gespeichert, auf einen Reiz hin freigesetzt. Und anschließend aus dem synaptischen Spalt wieder aufgenommen (Goetz et al., 2007). An rekombinanten  $\alpha\beta$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zeigt Zink eine 3400-mal stärkere inhibitorische Wirkung als an  $\alpha\beta\gamma_2$ -Subtypen. Dieser Umstand deutet darauf hin, dass die  $\gamma_2$ -Untereinheit die Sensitivität für  $Zn^{2+}$  am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor senkt (Goetz et al., 2007). Obwohl die  $\alpha\beta\gamma_2$ -Rezeptor-Subtypen am weitesten im Gehirn verbreitet sind, zeigen sich tonische Rezeptoren weit empfindlicher gegenüber  $Zn^{2+}$ . Die  $\alpha_1\beta_3$ -Untereinheitenkombination weist dabei die stärkste Hemmung durch  $Zn^{2+}$  auf (Mathie et al., 2006).

### 3.6.5.2. Lanthan ( $La^{3+}$ )

Im Unterschied zu den meisten zweiwertigen Kationen moduliert  $La^{3+}$  GABA-induzierte Ströme sowohl in nativen, als auch in rekombinanten Rezeptoren. Das Metall erhöht die Sensitivität des Rezeptors für GABA (Im et al., 1992; Narahashi et al., 1994), wobei die an rekombinanten Rezeptoren hervorgerufenen Effekte von der  $\alpha$ -Untereinheit abhängig sind. Während  $La^{3+}$   $\alpha_1\beta_3\gamma_{2L}$ -Rezeptoren positiv moduliert (Im et al., 1992; Saxena et al., 1997), inhibiert es GABA-induzierte Chloridströme durch  $\alpha_6\beta_3\gamma_{2L}$ -Rezeptoren schwach, und durch  $\alpha_6\beta_3\delta$ -Rezeptoren stark (Saxena et al., 1997).

### 3.6.6. Ethanol

Ethanol ist, neben Koffein und Nikotin, das am häufigsten konsumierte legale Suchtmittel weltweit. Im Unterschied zu anderen Suchtmitteln ist Ethanol ein kleines amphiphiles Molekül, das leicht die Blut-Hirn-Schranke passiert. Die Metabolisierung erfolgt durch das Enzym Alkoholdehydrogenase (ADH) unter Aufwendung von  $NAD^+$  zu Ketonkörpern und NADH.

Ethanol vermittelt verschiedene Effekte im menschlichen ZNS, u.a. Sedierung, hypnotische und anästhetische Wirkung. Diese Wirkungen treten ab einer

Blutalkoholkonzentration von 5–10 mmol/l auf (Davies, 2003), die letale Dosis für den Menschen liegt im Bereich 50–110 mM (Koski et al., 2002; Gable, 2004). Im Gegensatz zu diesen sich sukzessive entfaltenden Wirkungen ist der akute Einfluss von Alkohol auf das ZNS durch die Schädigung von Nervenzellen charakterisiert. Es wird vermutet, dass sich Ethanol in Membranproteine einlagert und dadurch deren Funktion stört.

Ethanol moduliert einerseits GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren, und hemmt andererseits als nicht-kompetitiver Antagonist die glutamaterge Erregung über NMDA-Rezeptoren (Olsen et al., 2007). Die Untereinheitenabhängigkeit der Wirkung von Ethanol wurde lang kontrovers diskutiert. Während in manchen Studien der Effekt alleine  $\gamma_{2L}$ -inkorporierenden Rezeptoren zugeschrieben wird, deuten andere auf die Beteiligung beider Spleißvarianten ( $\gamma_{2L}$  und  $\gamma_{2S}$ ) hin (Davies, 2003; Olsen et al., 2007). Durch das Austauschen der  $\gamma_2$ - mit der  $\delta$ -Untereinheit erhöht sich die Sensitivität des Rezeptors für Ethanol auf das Dreifache (Wallner et al., 2003). Obwohl sich extrasynaptische  $\alpha_4\beta\delta$ - und  $\alpha_6\beta\delta$ -Rezeptor-Subtypen als empfindlicher gegenüber Ethanol erwiesen, konnte bisher keine generelle  $\alpha$ -Untereinheitenspezifität gezeigt werden (Davies, 2003), wohingegen Untersuchungen an  $\alpha\beta\delta$ -Rezeptor-Subtypen eine beinahe 10-fach stärkere Modulation der GABA-Ströme mit fast zehnfach größerer Sensitivität für Ethanol an der  $\beta_3$ -Untereinheit, verglichen mit  $\beta_2$ , zeigten. Diese Ergebnisse stimmen mit der anatomischen Verteilung der Rezeptor-Subtypen im Kleinhirn, dem Hippocampus und dem Thalamus, den Hauptwirkorten von Alkohol, überein (Wallner et al., 2003).

### **3.6.7. Picrotoxin**

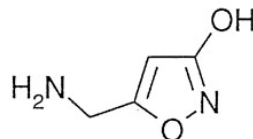
Picrotoxin ist ein äquimolares Gemisch aus zwei natürlich vorkommenden chemischen Verbindungen, Picrotoxinin und Picrotin. Das Sesquiterpenen-Gemisch wird aus den Samen des ostindischen Kletterstrauchs *Anamirta cocculus* (Kokkelskörner, Fischkörner) isoliert (Forth, 2009).



Picrotoxin wirkt als Porenblocker am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor. Es löst dabei eine umgekehrte Wirkung von Sedierung aus und verursacht Krämpfe (Krampfgift) (Hevers und Lüddens, 1998).

### 3.6.8. Muscimol

Das Fliegenpilzgift Muscimol (auch: Agarin, Pantherin) wird aus der in den Pilzen der Gattung *Amanita muscaria* enthaltenen Ibotensäure durch Decarboxylierung z.B. bei längerer Lagerung oder Trocknung bei 60° gebildet (Sauer und Weilemann, 2001). Muscimol hat strukturelle Ähnlichkeit mit cyclisierter GABA und bindet deshalb an der GABA-Erkennungsstelle. Muscimol ist ein direkter GABA<sub>A</sub>-Rezeptor Agonist (Johnston, 2005).



**Abb. 18.** Muscimol (Barnard et al., 1998)

### 3.6.9. Furosemid

Das Schleifendiuretikum Furosemid hemmt Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Co-Transporter in der Henle-Schleife der Niere. Dadurch kommt es zur vermehrter Ausscheidung von Flüssigkeit aus dem Körper. Abgesehen von dieser primären Wirkung beeinflusst Furosemid den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und mindert so GABAerge Effekte in Nervenzellen. Durch das Diuretikum wird zusätzlich zum renalen Co-Transporter auch der K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-Co-Transporter (KCC2-Transporter), der an der Aufrechterhaltung des Cl<sup>-</sup>-Gradienten durch die Zellmembran beteiligt ist, beeinflusst. Der KCC2-Transporter ist für die durch GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelte Hyperpolarisierung reifender Neuronen wichtig (Forth, 2009).

Furosemid fungiert als selektiver GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonist am α<sub>6</sub>β<sub>2/3</sub>γ<sub>2</sub>-Subtyp (Korpi et al., 1995a). Weder für den α<sub>6</sub>β<sub>1</sub>γ<sub>2</sub>-Subtyp, noch den am weitestend im ZNS

verbreiteten  $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtyp konnte diese inhibitorische Wirkung gezeigt werden (Korpi et al., 2002).

### 3.6.10. Pflanzliche Modulatoren

Pflanzliche Inhaltsstoffe gewannen in den letzten Jahren immer mehr an Bedeutung. Verschiedenste Phytopharmaka finden in der Volksmedizin als beruhigende, angstlösende, entspannende und schlaffördernde Heilmittel Verwendung. Im Hinblick darauf werden Substanzen pflanzlicher Herkunft mit gesteigertem Interesse auf ihre Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor hin untersucht.

Flavanoide, die am weitesten im Pflanzenreich verbreitete Stoffklasse, zeigen neben ihren antioxidativen und antikarzinogenen Wirkungen (Le Marchand, 2002) eine Vielzahl an Wirkungen am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor (Marder und Paladini, 2002).

Apigenin, ein in den Blüten der Echten Kamille (*Matricaria recutita*, *Asteraceae*) enthaltenes Flavanoid, wurde an Mäusen als anxiolytischer Ligand der Benzodiazepin-Bindungsstelle ohne sedierende oder antikonvulsive Wirkung charakterisiert (Viola et al., 1995).

Terpenoide wie Bilobalid, ein Sesquiterpenoid aus Ginkgo (*Ginkgo biloba*, *Ginkgoaceae*) wurden, wie Picrotoxin, als nicht-kompetitive Antagonisten von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren charakterisiert (Huang et al., 2003), welches die positiven kognitiven Effekte standardisierter Ginkgo biloba-Zubereitungen erklärt könnte. Bilobalid zeigt aber, im Gegensatz zu Picrotoxin, auch antikonvulsive Wirkung (Sasaki et al., 1999).

$\alpha$ -Thujon, ein Inhaltsstoff des (Gemeinen) Wermuts (*Artemisia absinthium* L., *Asteraceae*) wirkt am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor als negativer allosterischer Modulator und besitzt daher konvulsive Wirkung (Höld et al, 2000).

(+)-Borneol, ein Monoterpenoid, welches unter anderem im Baldrian (*Valeriana officinalis*, *Valeriaceae*) enthalten ist, wirkt als positiver allosterische Modulator des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Seine Wirkung lässt sich nicht durch Flumazenil blockieren (Johnston et al., 2005). Zusätzlich konnten Khom et al. (2007) bestätigen, dass auch

die in der Wurzel des Baldrians enthaltene Valerensäure ein positiver,  $\beta_2/\beta_3$ -selektiver allosterischer Modulator des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors ist.

Zaugg et al. (2010) beschrieben erstmals Piperin, das Hauptalkaloid des schwarzen Pfeffers (*Piper nigrum* L., *Piperaceae*), als positiven allosterischen GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Modulator.

### **3.6.10.1. Piperin**

#### **3.6.10.1.1. Der schwarze Pfeffer (*Piper nigrum* L., *Piperaceae*)**

Der schwarze Pfeffer (*Piper nigrum* L., *Piperaceae*) (**Abb. 19**) gehört zu den am meist verwendeten Gewürze der Welt. Pfeffer wird aber nicht nur als Lebensmittel, sondern auch in der Medizin, als Konservierungsmittel, in der Parfümindustrie als Duftkomponente und sogar als Insektizid verwendet (Srinivasan, 2007).

Der Pfefferstrauch gehört zur Familie der *Piperaceae* (Pfeffergewächse) und ist eine verholzende Kletterpflanze, die sich mit Haftwurzeln an Bäumen bis in eine Höhe von 10 Metern windet. Die Stengel sind 2 cm dick, holzig und knotig gegliedert. Die Blätter sind hellgrün, lederig und punktiert bis 18 cm lang und zugespitzt. 50–150 Blüten befinden sich während Blütezeit am 10 cm langen Ähren. Anders als bei wildwachsenden sind die Blüten bei kultivierten Pflanzen zu 90 % zwittrig. Nach ihrer Befruchtung entwickeln sich beerenartige, erbsengroße Steinfrüchte, die erst grün, dann rot und im völlig reifen Zustand gelb gefärbt sind. Geerntet werden die grünen, unreifen Früchte, die entweder durch Sonne oder Hitze getrocknet werden. Während der Trocknung kommt es zur enzymatischen Oxidation von ortho-Diphenolen, wodurch die Früchte ihre schwarze Farbe bekommen (Hänsel et al., 1999). Es wird noch zwischen grünem, weißem und rotem Pfeffer unterschieden. Ursprünglich in Indien heimisch, wird die Pfefferpflanze heute als Nutzpflanze in vielen tropischen Gebieten der Erde kultiviert.



**Abb. 19.** *Piper nigrum* (Köhler's Medizinalpflanzen, 1897)

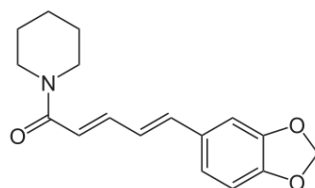
Der Hauptinhaltsstoff des Pfeffers ist das Alkaloid Piperin (5 – 9 %), seine natürlich vorkommenden Derivate sind Piperettin, Piperylin, Pepranin und Chavicin, ein Isomer des Piperins. Weitere Inhaltsstoffe sind zu 1,8 – 3,5 % ätherische Öle (hauptsächlich Monoterpene,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Pinen, Sesquiterpene, Caryophyllen und  $\beta$ -Farnesen), außerdem Stärke, fette Öle und Flavanoide (Hänsel et al., 1999).

In der asiatischen Volksheilkunde wird schwarzer Pfeffer aufgrund seiner vielzähligen Wirkungen gegen zahlreiche Erkrankungen verwendet.

Der Großteil der pharmakologischen Effekte des schwarzen Pfeffers werden durch seinen Hauptinhaltsstoff Piperin vermittelt (Srinivasan, 2007).

### 3.6.10.1.2. Piperin

Piperin (**Abb. 20**) ist ein Alkaloid bzw. Säureamid, das aus *Piper nigrum* und *Piper longum* isoliert wird und dem Pfeffer-Gewürz seine typische Schärfe verleiht. Es wird durch ethanolische Extraktion und anschließende Kristallisation aus Pfefferfrüchten gewonnen. Dabei bildet Piperin gelbe Kristalle.



**Abb. 20.** Piperin (Srinivasan, 2007)

Piperin vermittelt unterschiedlichste pharmakologische Wirkungen. Es

- senkt den Blutdruck bei Versuchstieren durch Blockierung von spannungsabhängigen Kalziumkanälen (Hlavackova et al., 2010),
- verbessert die Verdauung durch Stimulierung der Enzymsekretion der Bauchspeicheldrüse,
- wirkt antioxidativ durch Hemmung der Lipidperoxidation (Vijayakumar et al, 2004),
- wirkt stimmungsaufhellend bei depressiven Verstimmungen und verbessert die kognitive Leistung bei Versuchstieren; ist somit ein potentielles „functional food“ Nahrungsmittel, das zur Verbesserung der Gehirnfunktionen genutzt werden könnte (Wattanathorn et al., 2008),
- wirkt antikarzinogen durch Hemmung der Proliferation in kultivierten Darmkrebszellen (Duessel et al., 2008), und
- wirkt antikonvulsiv und wurde auch in der traditionellen chinesischen Medizin zur Behandlung von Epilepsie verwendet (D’Hooge et al., 1996).

Extrakte aus schwarzem Pfeffer mit hohem Gehalt an Piperin verbessern zudem auch die Bioverfügbarkeit vieler pharmakologisch wirksamen Substanzen und Pflanzenpräparate. Die erhöhte Bioverfügbarkeit wird durch die Beschleunigung der Aufnahme im Verdauungstrakt sowie einen verlangsamten Abbau der Wirkstoffe erklärt (Srinivasan, 2007). Piperin inhibiert außerdem das humane P-Glykoprotein und CYP-3A4. Dadurch kommt es zur erhöhten Plasmakonzentrationen von z.B. Phenytoin oder Theophyllin bei Menschen (Bhardwaj et al., 2002).

#### 4. Problemstellung und Zielsetzung

GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren spielen eine zentrale Rolle in der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen synaptischer Erregung und Hemmung, und sind so ein wichtiges molekulares Target für zahlreiche Arzneistoffe. GABA<sub>A</sub> Rezeptoren werden nicht nur von synthetischen Wirkstoffen, sondern auch von zahlreichen Naturstoffen moduliert. Seit einigen Jahren wird am *Department für Pharmakologie und Toxikologie* der Universität Wien die Wirkung von verschiedenen Naturstoffen auf GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren erforscht. In Zusammenarbeit mit dem *Department für Pharmazeutische Wissenschaften* der Universität Basel wurde Piperin aus dem schwarzen Pfeffer (*Piper nigrum L., Piperaceae*) als hauptwirksamer Inhaltsstoff am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor charakterisiert (Zaugg et al., 2010). Da Piperin neben vielen anderen pharmakologischen Wirkungen auch antikonvulsiv wirkt (Pei, 1983), scheint die Weiterentwicklung der Struktur als mögliche Grundlage eines neuen Antiepileptikums vielversprechend.

In der vorliegenden Arbeit soll die Modulation GABA-induzierter Chloridströme durch rekombinante  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren durch eine Auswahl von XX neuen Piperinderivaten mit dem Ziel untersucht werden, sowohl die Wirksamkeit (engl.: efficacy,  $E_{max}$ ), als auch die Wirkstärke (engl.: potency, angegeben als halbmaximale Wirkstoffkonzentration  $EC_{50}$ ) der Leitstruktur Piperin ( $E_{max}$  301,9 ± 26,5%;  $EC_{50}$  52,4 ± 9,4 µM; Zaugg et al., 2010) durch Derivatisierung zu optimieren.

Vor der Untersuchung der Derivate sollten GABA-Konzentrations-Wirkungs-Kurven erstellt und eines  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptors unter Verwendung eines Benzodiazepins erarbeitet werden. Ausgewählte Derivate des Piperins (MC-12, MC-20, MC-73, MC-74, MC-79 und MC-80) zeigten in einem vorab durchgeführten Screening am genannten Rezeptorsubtyp mittlere Potenzierungen GABA-induzierter Cl<sup>-</sup>-Ströme ( $I_{GABA}$ ) von 50 – 252 %. Zur näheren Charakterisierung und Ermittlung von  $E_{max}$  und  $EC_{50}$  werden Konzentrations-Wirkungs-Kurven an *Xenopus laevis* Oozyten unter Verwendung des *Fast Perfusion Systems* (Baburin et al., 2006) erstellt und mittels *Origin7.0 Software* ausgewertet. Die so ermittelten Werte sollen einerseits mit den bekannten Daten zu Piperin, andererseits mit den beiden hochwirksamen Derivaten MC-64 und MC-66 verglichen werden.

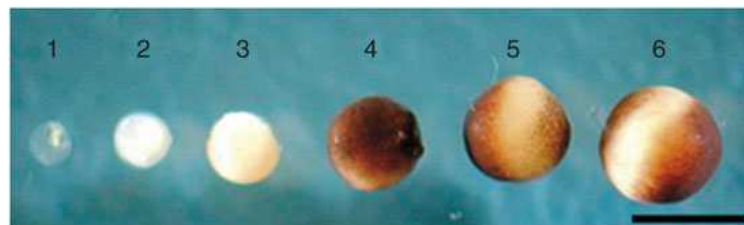
## 5. Materialien und Methoden

### 5.1. Materialien und Software

**Tabelle 3.** Im Zuge der Diplomarbeit verwendete Materialien und Software.

Material/Software	Hersteller
<i>Xenopus laevis</i> Frösche	NASCO, USA
TURBO TEC O1C amplifier	npi electronics
TECAN Miniprep 60	Tecan, Österreich
Borsilikat-Glaskapillaren	Harvard Apparatus, GB
Robosoft	Robosoft Corporation, USA
Clampfit 9.2	Axon Instruments Inc., USA
Origin 7.0	OriginLab Corporation, USA
CorelDRAW X5	Corel Corporation, Kanada
Tricain (Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoessäureethylesters; MS-222)	Sigma, Österreich
Collagenase 1A	Sigma, Österreich
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	Sigma, Österreich
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Österreich
GABA	Sigma, Österreich
KCl	Sigma, Österreich
Penicilin/Streptomycin (100U/ml)	Sigma, Österreich
OR2 (82,5mM NaCl, 2mM KCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O, 5mM HEPES)	alle: Sigma, Österreich
ND96 (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM MgCl <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O, 1mM CaCl <sub>2</sub> , 5mM HEPES)	alle: Sigma, Österreich
Piperin	Sigma, Österreich
Piperin Derivate	Prof. Erker, Universität Wien
Diazepam	Sigma, Österreich

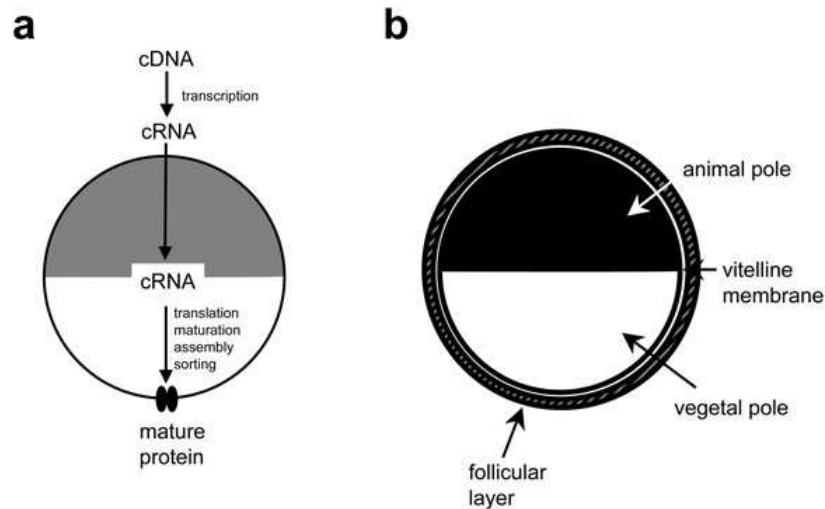
Im Jahr 1971 entdeckten Gurdon et al. die Eignung von *Xenopus laevis* (Afrikanischer Krallenfrosch) Oozyten als Expressionssystem insbesondere von Membranproteinen. In den Oozyten erfolgt die Transformation genetischer Information zum jeweiligen Protein, dessen Funktion und Modulation der Wirkung so untersucht werden können. *Xenopus* Oozyten dienen vorrangig als Modellsystem zur Untersuchung von Ionenkanälen und Membranrezeptoren. Bei erwachsenen weiblichen Fröschen erfolgt die Entwicklung der Oozyten gleichzeitig in sechs Stufen, wobei sich in den Ovarien hauptsächlich Oozyten der Stufen V und VI befinden. Diese sind große kugelförmige Zellen mit einem Durchmesser von 1,1 – 1,2 mm und weisen ein charakteristisches Erscheinungsbild auf (**Abb. 21**).



**Abb. 21.** Entwicklungsstadien I – VI der *Xenopus laevis* Oozyten (Allen et al., 2007)

Die Zelle ist in eine dunkle (bräunlich bis schwarze) (animalischer Pol, „animal pole“) und eine helle (weiße bis gelbliche) (vegetativer Pol, „vegetal pole“) Hemisphäre unterteilt. Der animalische Pol ist aufgrund der höheren Konzentration von Melatonin dunkel gefärbt und enthält den Zellkern. Die Eizelle ist von unterschiedlichen Schichten zellulären und nicht zellulären Gewebes umgeben. Direkt an die Plasmamembran anliegend befindet sich die sogenannte Dottermembran, welche die nicht zelluläre fibröse Schicht darstellt (Siegel und Minier, 2005).





**Abb. 22.** Schematische Darstellung des Expressionsprozesses eines exogenen Proteins in *Xenopus* Oozyten (a). Schematische Darstellung einer *Xenopus* Eizelle im Entwicklungsstadium V oder VI (b) (Bianchi und Driscoll, 2006).

## 5.2. Präparation der *Xenopus laevis* Oozyten

Die weiblichen *Xenopus laevis* Frösche (NASCO, USA) wurden zunächst 15 Minuten lang in einer 0,2% Tricain-Lösung (MS-222; Methansulfonsäuresalz des 3-Aminobenzoesäureethylesters) anästhesiert. Danach wurde die Bauchdecke mit einem kleinen Schnitt geöffnet, das Follikelgewebe mit Hilfe einer Pinzette entnommen und in eine Petrischale mit OR2-Lösung (82,5mM NaCl, 2mM KCl,

1mMMgCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O, 5mM HEPES; pH=7,5) übergeführt. Es sollte nicht das gesamte

Follikelgewebe entfernt werden, um die Regeneration der Oozyten zu gewährleisten (Siegel und Minier, 2005). Anschließend wurde das Follikelgewebe mechanisch zerkleinert und die Follikelmembran enzymatisch entfernt. Dazu wurden die Oozyten für ca. 90 Minuten in einer 2 mg/ml Collagenase-Lösung (Collagenase Typ 1A, Sigma, Deutschland; in OR2-Lösung ) inkubiert (Khom et al., 2006). Da Calcium

durch Aktivierung unspezifischer Proteasen toxisch wirkt (Goldin, 1992, wurden die Oozyten vor und nach der Collagenase-Behandlung gründlich mit OR2-Lösung gewaschen, bevor sie in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltige ND96-Lösung (90mM NaCl, 1mM KCl, 1mM  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 1mM  $\text{CaCl}_2$ , 5mM HEPES; pH=7,4) übergeführt werden konnten. Dadurch

wurden einerseits die abgetrennte Membran, und andererseits Reste von Enzymen entfernt. Abschließend wurden die am besten für die Mikroinjektion geeigneten Oozyten selektiert.

### **5.3. Vorbereitung der cRNA**

Poly(A+)cRNA-Transkriptase von linearisierter cDNA wurden in pCMV Vektor (p: Plasmid; CMV: Promotor, der in diesem Konstrukt verwendet wurde) kloniert. Die cDNAs, die für die einzelnen Untereinheiten kodierten, wurden in DEPC-behandeltem (Diethylpyrocarbonat) destilliertem Wasser verdünnt (1:10).

### **5.4. Mikroinjektion von cRNA**

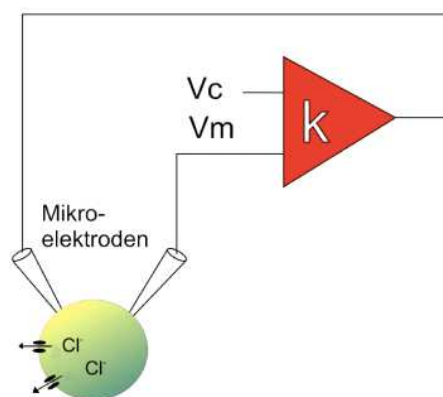
Vor der Injektion wurden die einzelnen cRNAs, die die verschiedenen Untereinheiten zur Bildung von  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren kodieren, im Verhältnis 1:1:10 gemischt. Mithilfe eines pneumatischen Injektionsgerätes wurden jeweils etwa 10–50 nl der RNA-Mischung in die Oozyten injiziert. Die erfolgreiche Injektion wurde durch deutliche Vergrößerung der Zellen kontrolliert. Nach der Injektion wurden die Oozyten für 24 Stunden bei einer Temperatur von 18 °C in ND96-Lösung mit Antibiotikum (100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin) inkubiert, und konnten anschließend für die Messungen verwendet werden.

## 5.5. Messlösungen

Die zu untersuchenden Substanzen wurden als Stammlösungen mit einer Konzentration von 100 mM in 100% DMSO (Dimethylsulfoxid) hergestellt. Für die Messungen wurden diese mit ND96-Lösung auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt. Die GABA-Kontrolllösung ( $c = 1 \text{ mM}$ ) wurde jeden Tag frisch zubereitet, ebenso die einzelnen Testlösungen. Die zu untersuchenden Piperin-Derivate (MC-12, MC-20, MC-66, MC-64, MC-73, MC-74, MC-79 und MC-80) wurden im Bereich von 1 – 300  $\mu\text{M}$  charakterisiert. Für Diazepam und Piperin wurden Konzentrationen von 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,3  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  und 300  $\mu\text{M}$  verwendet.

## 5.6. 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik

Der Versuchsaufbau der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik von *Xenopus laevis* Oozyten ist in **Abb. 23** schematisch dargestellt.



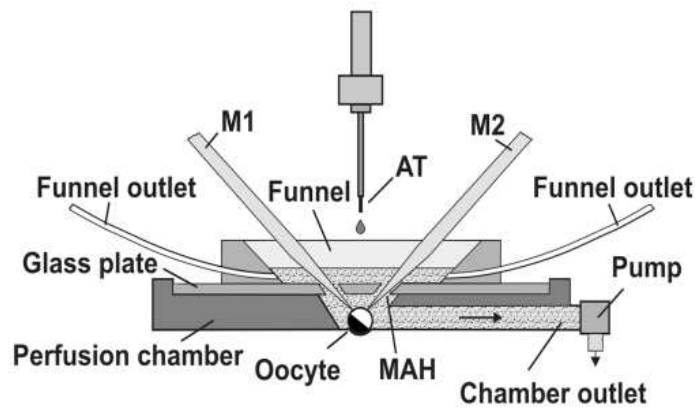
**Abb. 23.** Schematische Darstellung des Messprinzips der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien)

Die Versuchsanordnung besteht aus zwei intrazellulären Elektroden. Die erste intrazelluläre Elektrode (voltageelectrode =  $V_m$ , Potentialelektrode) dient zur Messung des transmembranären Potentials. Die zweite intrazelluläre Elektrode (currentelectrode =  $V_c$ ) injiziert den um das Haltepotential zu erreichen bzw. konstant zu halten benötigten Strom (Kompensationsstrom) in den Oozyten. Ein

Rückkopplungsverstärker (TURBO TEC 01C amplifier, npi electronics) misst die Abweichung des tatsächlichen zum benötigten Potential (Haltepotential). Er erzeugt einen Kompensationsstrom, der dem Chloridstrom durch die Membran entspricht. (Binachi und Driscoll, 2006). Die zum Messen verwendeten Mikroelektroden (Borsilikat-Glasskapillaren, Harvard Apparatus, England) werden mit 3M KCl-Lösung gefüllt und weisen einen elektrischen Widerstand von 1 – 3 M $\Omega$  auf. Ein Silberdraht, überzogen mit einer dünnen Schicht von AgCl<sub>2</sub>, erlaubt die Transmission der Signale von der KCl-Lösung zum Rückkopplungsverstärker. Alle Experimente der vorliegenden Diplomarbeit wurden bei einem Haltepotential (holding potential) von –70 mV durchgeführt.

## 5.7. Perfusionssystem

Die Messungen werden in einer modifizierten Messkammer unter Verwendung des "Fast Perfusion System" (Baburin et al., 2006; **Abb. 24**) durchgeführt, wobei die Messkammer ein Füllvolumen von etwa 15  $\mu$ l umfasst und von einer Glasplatte bedeckt ist. Zwei Mikroelektroden werden durch zwei schräg stehende Einlässe mit einem Durchmesser von unter 1 mm seitlich zum Oozyt eingeführt. Über der Glasplatte befindet sich ein trichterförmiger Behälter („funnel“), in den die Testlösungen appliziert werden. Weiters besitzt der Trichter seitliche Auslässe, durch welche die applizierte Lösung zum gegebenen Zeitpunkt wieder abgesaugt wird. Zusätzlich empfiehlt es sich, die Kammer und den Trichter vor jedem neuen Experiment gründlich mit ND96 zu spülen, um etwaige Verunreinigungen und Probenrückstände zu entfernen. Der Oozyt wird in einer zylindrischen Haltevorrichtung, die in den Boden der Teflonkammer eingebaut ist, platziert. Der Zylinder ist von einem Spalt umgeben, der, zusätzlich zu den seitlichen Auslässen der Kammer, zum Abfluss der Proben- und Waschlösungen dient. Durch die Haltevorrichtung wird der Oozyt stabilisiert und zudem durch exakte Positionierung der Mikroelektroden fixiert. Weiters trägt die vertikale Probenapplikation zur mechanischen Stabilität der Zelle bei, die wie andere Parameter die Bewegungen des Oozyten in der Halterung minimiert (Baburin et al., 2006).



**Abb. 24.** Schematische Darstellung der Mikroperfusionskammer  
(Baburin et al., 2006)

## 5.8. Verwendete Software

Die Applikation der Lösungen während der Messungen wurde durch einen automatischen Pipettierroboter (*TECAN Miniprep 60*) durchgeführt, der über das Programm *Robosoft* gesteuert wurde. Die Aufzeichnungen der Ionenströme erfolgte mittels *Clampfit9.2* Software. Die Dosis-Wirkungskurven wurden mithilfe von *Origin7.0* erstellt und die gezeigten Abbildungen wurden anhand der gesammelten Daten mit *CorelDRAW X5* erstellt.

## 6. Ergebnisse

Im der vorliegenden Diplomarbeit wurden alle Experimente bei konstanter und geringer GABA-Konzentration durchgeführt werden. Daher wurden im Vorfeld GABA-Dosis-Wirkungskurven erstellt und die Parameter  $EC_{5-10}$  und  $EC_{50}$  ermittelt. Die beiden Werte wurden als Kontrolle für die Berechnung der Wirkstärke der Modulatoren verwendet.

Unter  $EC_{5-10}$  bzw.  $EC_{50}$  versteht man jene Konzentration bei der 5 – 10 % bzw. 50 % des maximalen GABA-Effektes ausgelöst wird. 1 mM GABA wurde als Maximalstrom ( $I_{max} = 100\%$ ) festgelegt und die dosisabhängig ansteigenden Effekte nach folgender Formel berechnet:

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

Anhand der erhaltenen Daten wurde mithilfe von *Origin7.0* eine sigmoidale Kurve durch die Datenpunkte gelegt und die Werte  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  sowie der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) berechnet.

Die Auswertung der Modulation der GABA-induzierten Chlorid-Ströme durch den  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor durch das jeweilige Piperinderivat erfolgte unter Verwendung der folgenden Formel:

$$\text{Modulation } I_{GABA}(\%) = \left( \frac{I_{compound} * 100}{I_{control}} \right) - 100$$

$I_{GABA}$  .....GABA-induzierter Chlorid-Strom

$I_{compound}$  .....durch das Derivat modulierter Chlorid-Strom

$I_{control}$  .....GABA-Kontrollstrom

Die so erhaltenen Datenpunkte wurden, wie zur Erstellung von GABA-Dosis-Wirkungskurven, sigmoidal gefittet und die Parameter  $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  und  $n_H$  mittels *Origin7.0* berechnet.

## 6.1. Pharmakologie von $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren

### 6.1.1 GABA-Konzentrations-Wirkungskurve für $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ Rezeptoren

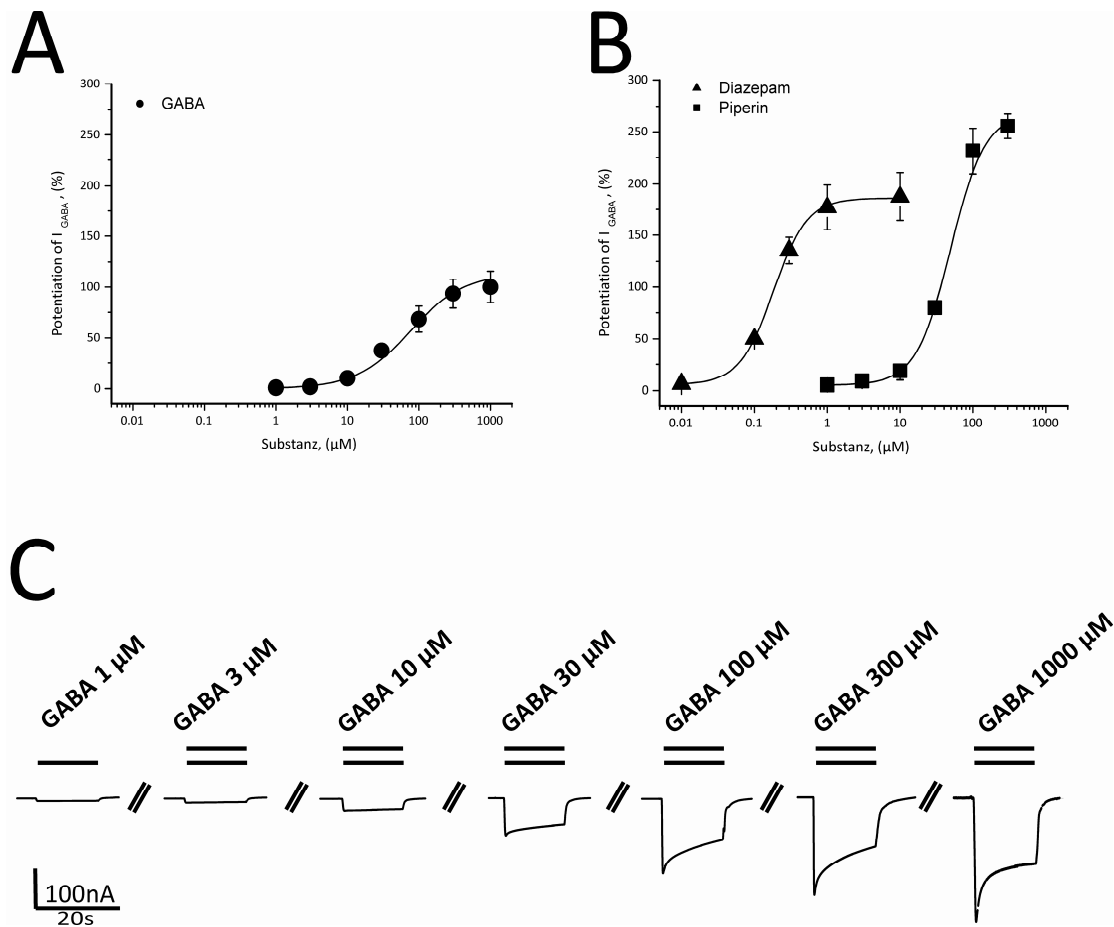
Wie in **Abb. 25 A** gezeigt, führte die Applikation verschiedener Konzentrationen von GABA auf *Xenopus laevis* Oozyten, die  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren exprimierten, zu messbaren Chloridströmen. Diese nahmen in Abhängigkeit von der jeweiligen Konzentration zu. Erste Ströme waren bereits bei einer Konzentration von  $\geq 1 \mu\text{M}$  zu beobachten, während das Maximum bei 1 mM auftrat. Nach Normierung der gemessenen Amplituden auf den Maximalstrom wurden die Datenpunkte in ein Koordinatensystem übertragen und durch die Punkte eine sigmoidale (Hill-Gleichung) Kurve gelegt. So konnte für  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren eine  $EC_{50}$  von  $36,8 \pm 5,5 \mu\text{M}$  bestimmt werden. Die  $EC_{5-10}$  dagegen lag zwischen 3 und 7  $\mu\text{M}$ .

### 6.1.2 Modulation von $I_{\text{GABA}}$ durch Piperin und Diazepam

Wie in **Abb. 25 B** dargestellt, potenzierte Piperin  $I_{\text{GABA}}$  durch Rezeptoren bestehend aus  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  –Untereinheiten ab Konzentrationen  $\geq 1 \mu\text{M}$ . Die Potenzierung war konzentrationsabhängig und erreichte ein Maximum bei Konzentration  $\geq 100 \mu\text{M}$  ( $EC_{50} = 47,1 \pm 4,8 \mu\text{M}$ ; max. Potenzierung ( $E_{\text{max}}$ ) =  $281,4 \pm 11,1 \%$ ).

Ebenso kam es zu einer konzentrationsabhängigen Potenzierung von  $I_{\text{GABA}}$  durch Co-applikation einer GABA  $EC_{3-7}$  und der in **Abb. 25 B** gezeigten Konzentrationen des bekannten  $\text{GABA}_A$  Rezeptor-Modulators Diazepam. Hier konnten erste, signifikante Effekte bereits bei Konzentrationen  $\geq 0,1 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Saturation trat bei Konzentrationen  $\geq 3 \mu\text{M}$  auf. Die maximale Potenzierung von  $I_{\text{GABA}}$  betrug  $186,1 \pm 18,7 \%$  und die  $EC_{50}$  lag bei  $181,8 \pm 3,2 \mu\text{M}$ .

Im Folgenden findet sich die graphische Darstellung aller untersuchten Derivate am  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ - $\text{GABA}_A$ -Rezeptor einschließlich repräsentativer Chlorid-Ströme. Jeder gezeigte Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von mindestens drei Oozyten von zwei verschiedenen Fröschen.



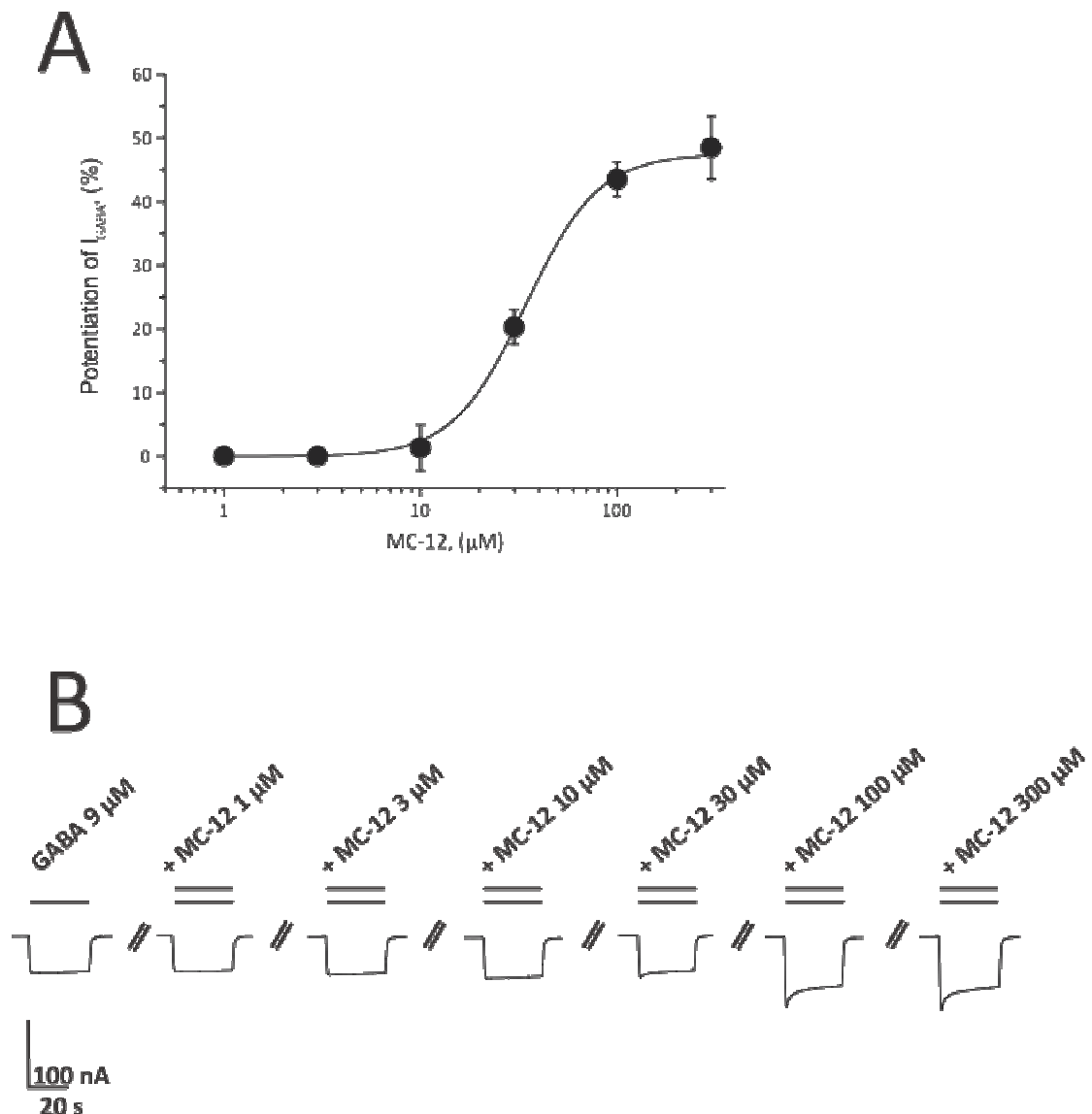
**Abb. 25.** Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von (▲) Diazepam, (■) Piperin und (●) GABA an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (A, B). Repräsentative GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (C).



## 6.2. Modulation von $I_{GABA}$ durch Piperinderivate

### 6.2.1 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-12

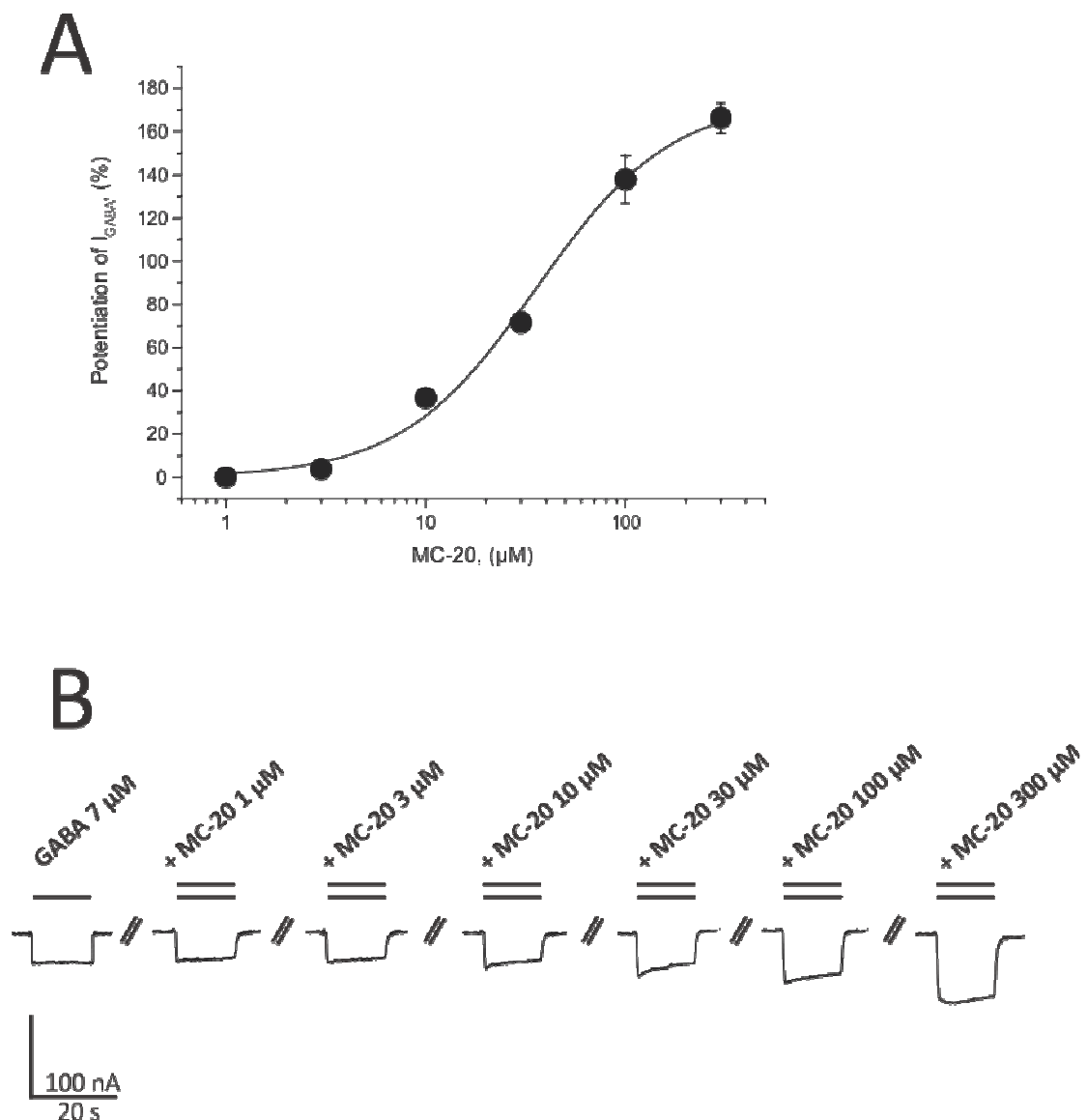
Wie in **Abb. 26** gezeigt, modulierte MC-12  $I_{GABA}$  bei einer  $EC_{5-10}$ . Erste signifikante Effekte traten bei einer Konzentration von  $>10 \mu\text{M}$  auf. Die maximale Potenzierung wurde bei  $300 \mu\text{M}$  und betrug  $47,49 \pm 4,67 \%$  beobachtet. Die  $EC_{50}$  von MC-12 lag bei  $34,3 \pm 5,6 \mu\text{M}$ .



**Abb. 26.** Dosis-Wirkungskurve von MC-12 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

## 6.2.2 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-20

In **Abb. 27** wird die konzentrationsabhängige Modulation von  $I_{GABA}$  bei einer  $EC_{5-10}$  durch MC-20 gezeigt. Erst signifikante Effekte konnten hier erst ab Konzentrationen  $\geq 10 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Saturation trat bei einer Konzentration von  $300 \mu\text{M}$  auf. Die maximale Potenzierung von  $I_{GABA}$  betrug  $175,0 \pm 9,6 \%$ . Der halbmaximale Effekt wurde bei  $35,7 \pm 4,9 \mu\text{M}$  ausgelöst.

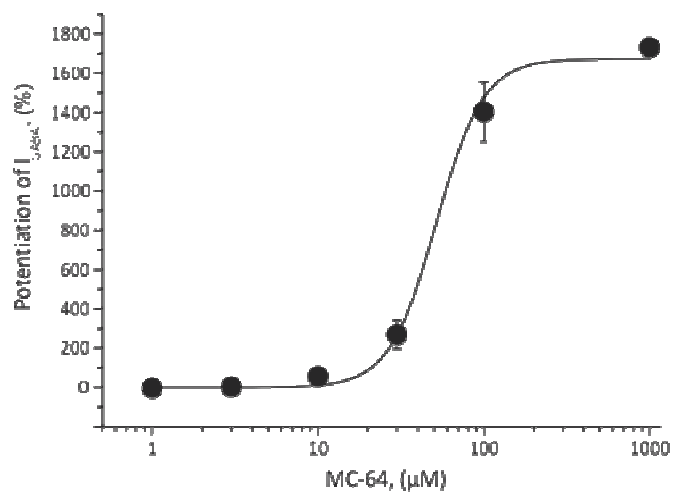


**Abb. 27.** Dosis-Wirkungskurve von MC-20 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2s}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

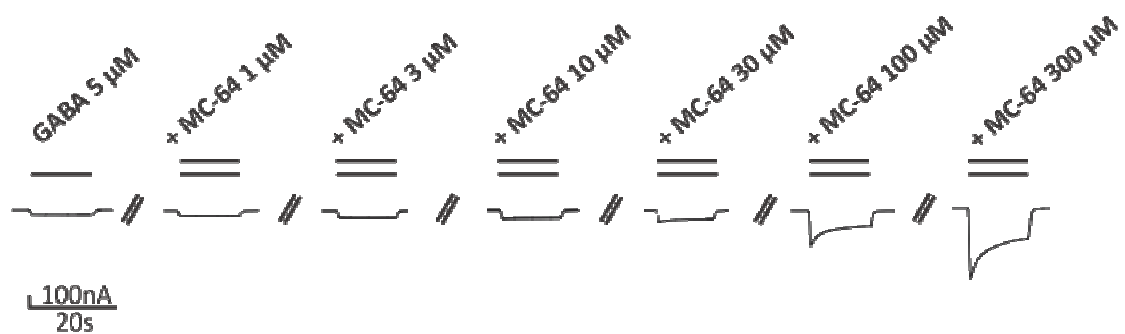
### 6.2.3 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-64

In **Abb. 28** ist die Potenzierung der  $I_{GABA}$  bei einer  $EC_{5-10}$  durch den Derivat MC-64 gezeigt. MC-64 potenzierte  $I_{GABA}$  signifikant ab Konzentrationen  $\geq 10 \mu M$ , die maximale Potenzierung wurde bei  $300 \mu M$  gemessen und betrug  $1673,1 \pm 146,3 \%$ . Die  $EC_{50}$  lag bei  $51,7 \pm 9,5 \mu M$ .

**A**



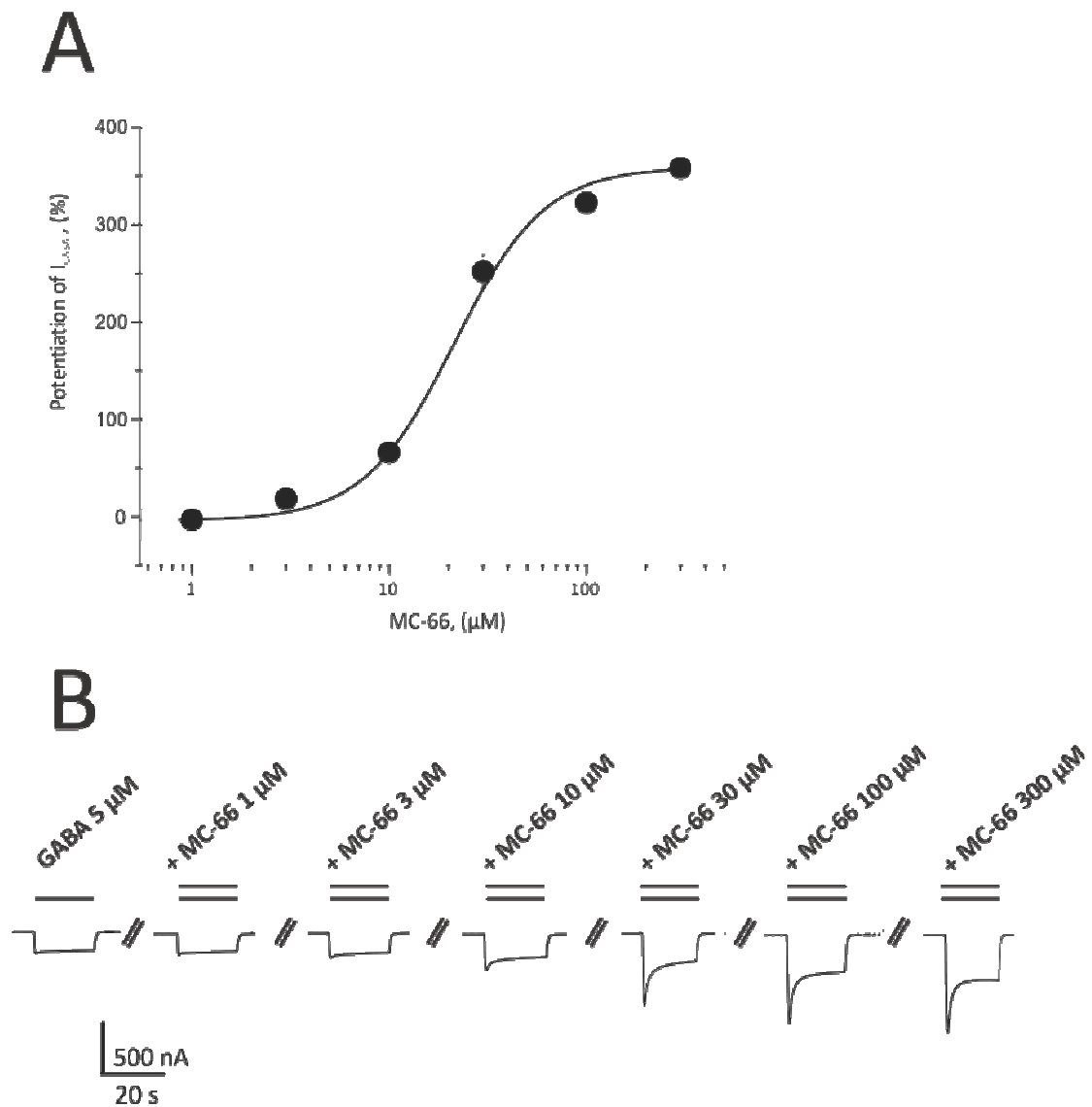
**B**



**Abb. 28.** Dosis-Wirkungskurve von MC-64 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

## 6.2.4 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-66

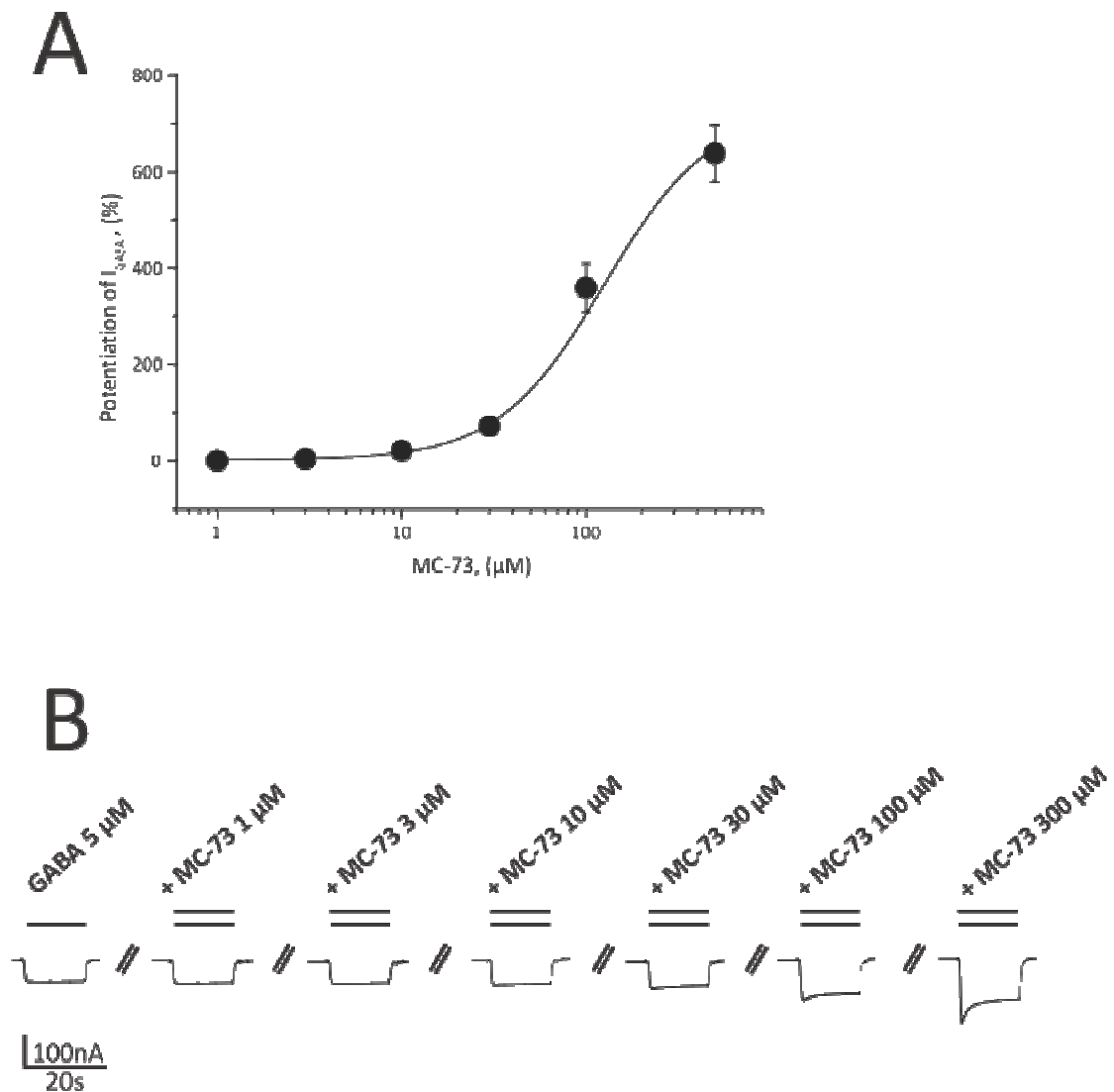
Wie in **Abb. 29** dargestellt, konnte der erste, signifikante Effekt von MC-66 bei  $10 \mu\text{M}$  beobachtet werden. Die Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren durch MC-66 erreichte ihr Maximum bei  $300 \mu\text{M}$  und lag bei  $359,1 \pm 3,6 \%$ ; die  $EC_{50}$  lag bei  $21,4 \pm 1,4 \mu\text{M}$ .



**Abb. 29.** Dosis-Wirkungskurve von MC-66 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

## 6.2.5 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-73

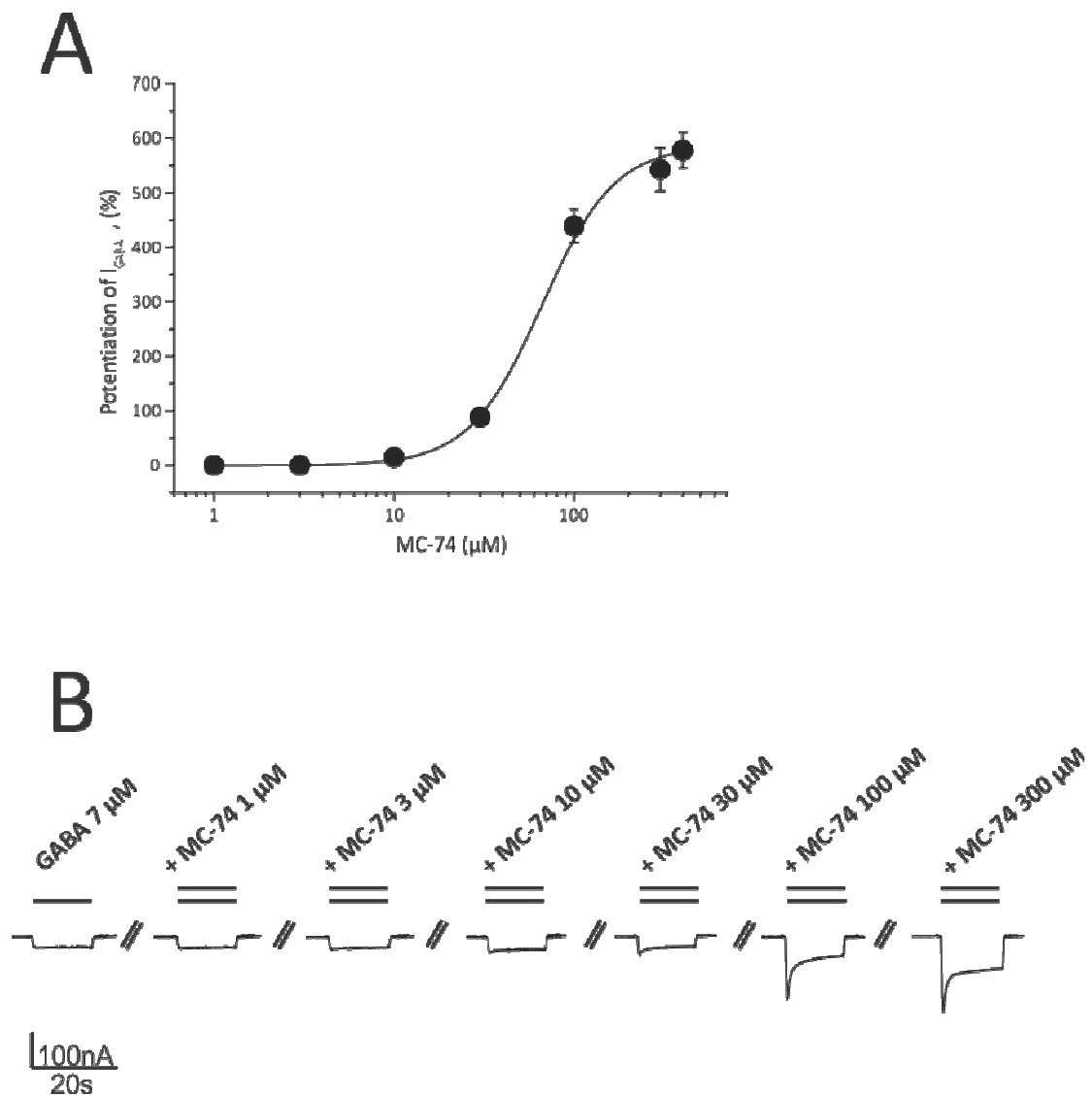
Die erste, signifikante Modulation von  $I_{GABA}$  durch **MC-73** konnte erst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Die maximale Potenzierung einer GABA-EC<sub>5-10</sub> Konzentration betrug  $729,2 \pm 101,0 \%$ , der halbmaximale Effekt wurde durch  $125,5 \pm 35,5 \mu\text{M}$  ausgelöst.



**Abb. 30.** Dosis-Wirkungskurve von MC-73 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

## 6.2.6 Modulation von $I_{GABA}$ durch MC-74

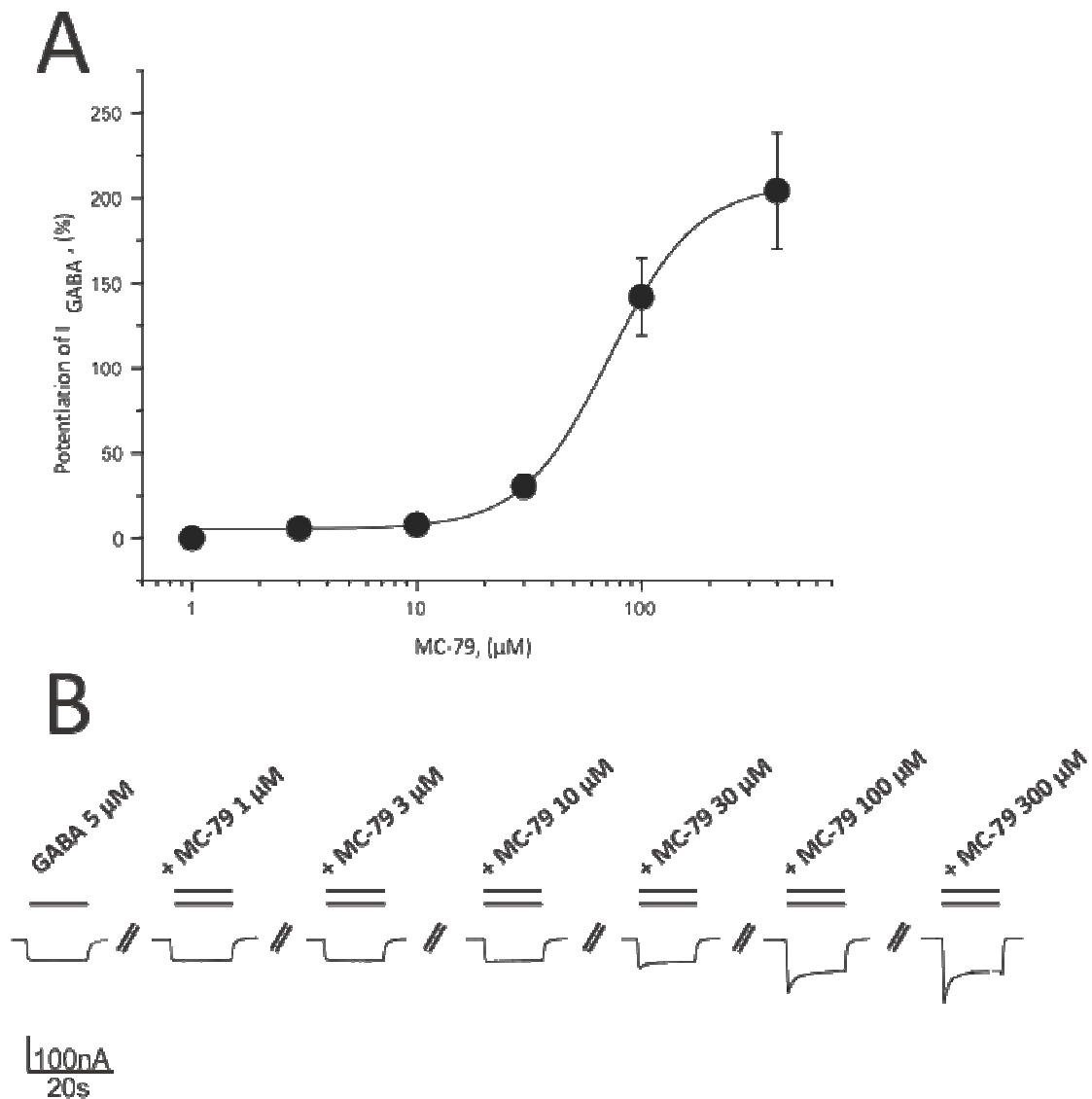
Wie in **Abb. 31** dargestellt, konnte der erste, signifikante Effekt bei 30  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Die Modulation von  $I_{GABA}$  durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$  Rezeptoren durch MC-74 erreichte ihr Maximum bei 300  $\mu\text{M}$  und lag bei  $587,0 \pm 30,2 \%$ ; die  $EC_{50}$  lag bei  $66,2 \pm 6,7 \mu\text{M}$ .



**Abb. 31.** Dosis-Wirkungskurve von MC-74 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).

## 6.2.7 Modulation von $I_{\text{GABA}}$ durch MC-79

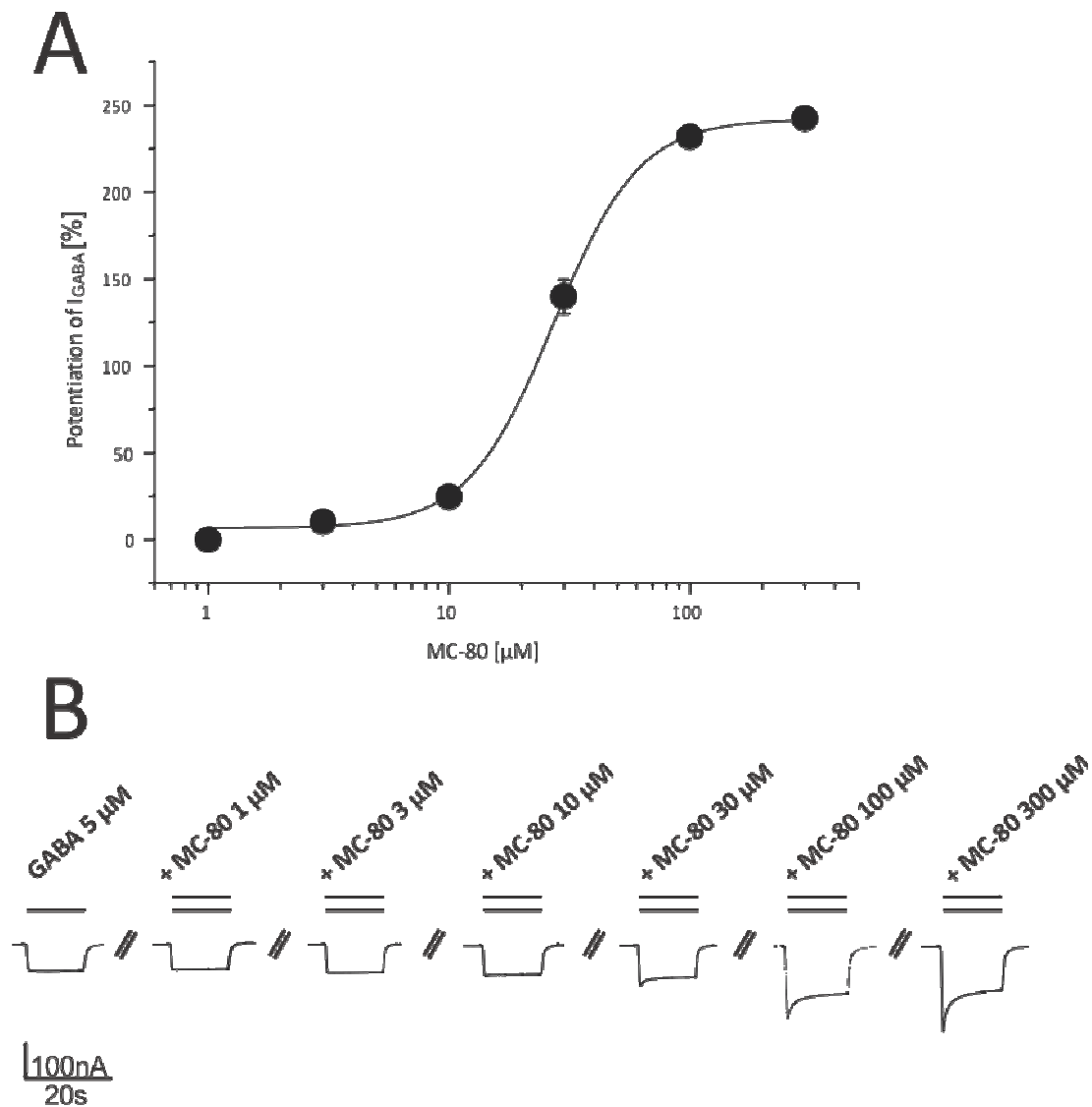
Bei MC-79 trat die erste signifikante Potenzierung von  $I_{\text{GABA}}$  bei 30  $\mu\text{M}$  auf. Die höchste Potenzierung wurde bei 300  $\mu\text{M}$  gemessen und betrug  $208,3 \pm 37,2 \%$ . Der halbmaximale Effekt ( $\text{EC}_{50}$ ) wurde von  $72,2 \pm 19,1 \mu\text{M}$  ausgelöst.



**Abb. 32.** Dosis-Wirkungskurve von MC-79 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B).

## 6.2.8 Modulation von $I_{\text{GABA}}$ durch MC-80

In **Abb. 33** ist die Potenzierung von  $I_{\text{GABA}}$  bei einer  $\text{EC}_{5-10}$  durch MC-80 gezeigt. Erste signifikante Effekte traten bei einer Konzentration von  $>10 \mu\text{M}$  auf. Saturation wurde bei Konzentrationen  $\geq 100 \mu\text{M}$  erreicht. Die maximale Potenzierung von  $I_{\text{GABA}}$  betrug  $242,1 \pm 5,3 \%$ , die  $\text{EC}_{50}$  lag bei  $27,2 \pm 1,9 \mu\text{M}$ .



**Abb. 33.** Dosis-Wirkungskurve von MC-80 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (**A**). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (**B**).



**Tabelle 4.** Zusammenfassung der Daten aus den Dosis-Wirkungskurven (**Abb. 25 – 33**) der einzelnen Derivate an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Gezeigt werden die Daten zu Efficacy ( $E_{max}$ ), Potency ( $EC_{50}$ ) und der Hill-Koeffizient ( $n_H$ ) der Derivate MC-12, -20, -64, -66, -73, -74, -80 im Vergleich zur Grundstruktur Piperin

Derivat	$E_{max}$ (%)	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$n_H$	Anzahl d. Experimente (n)
<b>Piperin</b>	281,4 ± 11,1	47,1 ± 4,8	2,0 ± 0,2	7
<b>MC-12</b>	47,49 ± 4,67	34,3 ± 5,6	2,4 ± 1,0	11
<b>MC-20</b>	175,0 ± 9,6	35,7 ± 4,9	1,3 ± 0,1	10
<b>MC-64</b>	1673,1 ± 146,3	51,7 ± 9,5	3,1 ± 0,8	12
<b>MC-66</b>	359,1 ± 3,6	21,4 ± 1,4	1,9 ± 0,2	12
<b>MC-73</b>	729,2 ± 101,0	125,5 ± 35,5	1,5 ± 0,2	9
<b>MC-74</b>	587,0 ± 30,2	66,2 ± 6,7	2,2 ± 0,2	11
<b>MC-79</b>	208,3 ± 37,2	72,2 ± 19,1	2,2 ± 0,5	13
<b>MC-80</b>	242,1 ± 5,3	27,2 ± 1,9	2,4 ± 0,3	12

## 7. Diskussion

Der GABA<sub>A</sub>-Rezeptor wird, zusätzlich zu den bekannten und in der Klinik verwendeten Arzneistoffen, von zahlreichen Naturstoffen moduliert. Dazu zählen zum Beispiel das Flavonoid Apigenin aus der Echten Kamille (*Chamomilla recutita*, Asteraceae) (Johnston, 2005) oder die im Baldrian (*Valeriana officinalis*, Valeriaceae) vorkommende Valerensäure (Khom et al., 2006).

Naturstoffe stellen aufgrund ihres, im Vergleich zu den klassisch eingesetzten synthetischen Wirkstoffen, vorteilhaften Nebenwirkungsprofil interessante Scaffolds für die Entwicklung neuer Arzneistoffe dar. In den letzten Jahren wurden aus der Volksheilkunde (z.B. TCM, Kampo) bekannte Drogen vermehrt auf ihre Wirkung am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor untersucht. Zaugg et al. konnten 2010 Piperin, das Hauptalkaloid aus dem schwarzen Pfeffer (*Piper nigrum*, Piperaceae), als positiven GABA<sub>A</sub>-Rezeptormodulator charakterisieren und als vielversprechende Grundstruktur zur Derivatisierung vorschlagen.

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden ausgewählte Derivate des Piperins hinsichtlich der Modulation von GABA-induzierte Chloridströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren untersucht. Dazu wurden die drei Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und der Effekt aus  $I_{GABA}$  mit Hilfe der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik untersucht.

Der  $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptor ist der am häufigsten im ZNS vorkommende GABA<sub>A</sub>-Rezeptorsubtyp, weshalb die Derivate an dieser Untereinheitenkombination untersucht wurden. Wie von Zaugg et al. (2010) veröffentlicht, potenziert Piperin GABA-induzierte Chloridströme um  $301,9 \pm 26,5$  % bei einer EC<sub>50</sub> von  $52,4 \pm 9,4$   $\mu$ M. Nachdem diese Ergebnisse bestätigt werden konnten (**Abb. 25**), wurden die Derivate MC-12, MC-20, MC-64, MC-66, MC-73, MC-74, MC-79 und MC-80 im Vergleich zu Piperin am Rezeptor charakterisiert (**Abb. 26 – 33**, Zusammenfassung aller Ergebnisse in **Tabelle 4**).

Aus der Reihe von 8 getesteten Derivaten zeigte das Derivat MC-64 hinsichtlich des maximalen Effekts die größte Wirksamkeit (**Abb. 28**). Die strukturellen

Veränderungen des Moleküls wirkten sich positiv auf die maximale Potenzierung aus ( $E_{\max} = 1673.0 \pm 146.3 \%$ ), zeigten jedoch hinsichtlich der Potenz des Derivats keinerlei Effekte ( $EC_{50} = 51.7 \pm 9.5 \mu\text{M}$ ). Zusätzlich konnte ein weiteres Derivat, MC-66, mit einer  $E_{\max} = 359.1 \pm 3.6 \%$  als stärker wirksam als Piperin charakterisiert werden. Die Veränderungen der chemischen Struktur führten in diesem Fall, im Gegensatz zu MC-64, ebenfalls zu einer verbesserten Potenz der Substanz ( $EC_{50} = 21.4 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ). Die verbleibenden 6 untersuchten Derivate lieferten maximale Potenzierungen unterhalb der des Piperins, ebenso konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich ihrer  $EC_{50}$  Werte beobachtet werden (**Tabelle 4**).

Im Hinblick auf die vermutete Untereinheitenabhängigkeit des Piperins erscheint die nähere Charakterisierung der beiden Derivate MC-64 und MC-66 hinsichtlich möglicher  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Untereinheitenselektivität interessant. Dazu sollten weiterführende Studien durchgeführt werden.

Piperin moduliert, abgesehen vom  $GABA_A$ -Rezeptor, in hohem Maße auch sogenannte Schärferzeptoren, die Vanilloid-Rezeptoren Typ 1 (TRPV1, transient receptor potential receptor V1) (Okumuara et al., 2010). Da die Aktivierung dieser Kationenkanäle im weiteren Verlauf der Drug Discovery eines Antiepileptikums zweifelsohne eine unerwünschte Nebenwirkung darstellt, bleibt zu untersuchen in welchem Ausmaß die entdeckten Derivate mit diesem Subtyp des Vanilloid-Rezeptors interagieren.

Die Ergebnisse der durchgeführten elektrophysiologischen Untersuchungen legen nahe, dass verschiedenen Modifikationen des Grundmoleküls einerseits zu gesteigerter therapeutischer Wirksamkeit, andererseits zu erhöhter Wirkstärke führen. Durch Kombination dieser beiden Strategien könnten so neue Derivate synthetisiert werden, die nicht nur höhere maximale Potenzierung von GABA-induzierten Chloridströmen ermöglichen, sondern auch bereits in weit niedrigeren Konzentrationen Effekte am  $GABA_A$ -Rezeptor auslösen. Diese Erkenntnisse sollten in künftigen Untersuchungen weiter bearbeitet werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass im Rahmen dieser Diplomarbeit im Zuge der Untersuchung von acht Piperinderivaten am  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Subtyp des  $GABA_A$ -

Rezeptors mittels Zweimikroelektroden-Spannungsklemmtechnik zwei stärker wirksame Derivate identifiziert werden konnten. Die gesammelten Daten der sechs weiteren Derivate legen zusammen mit den Ergebnissen der beiden Hits die weitere Untersuchung der Struktur-Wirkungs-Beziehung der Piperinderivate nahe.

## 8. Abkürzungsverzeichnis

3-APS	3-Aminopropansulfonsäure
Abb.	Abbildung
AchBP	Acetylcholin Rezeptor bindendes Protein
Ais	Axon-initiales Segment
APA	American Psychiatric Association
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BDZ	Benzodiazepin(e)
CAE	Childhood Absence Epilepsy
CCK	Cholecystokinin
cDNS	zyklische Desoxyribonukleinsäure
Cys-Loop	Cystein-Disulfidbrücke
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLPFC	Dorso-lateraler präfrontaler Kortex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DS	Dravet Syndrome
EC <sub>50</sub>	Halbmaximale Wirkkonzentration (Potency, in $\mu\text{M}$ )
EEG	Elektroenzephalogramm
E <sub>max</sub>	maximaler Effekt (Efficacy, in %)
FS	Febrile Seizures
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GAD	Glutamin-Decarboxylase
GAD	Generalized Anxiety Disorder
GAT1	GABA-Transporter
GEFS+	Generalized Epilepsy with Fibrile Seizures+
GPRG	G-protein gekoppelter Rezeptor
HEK	Human Embryo Kidney Cells
HWZ	Halbwertszeit

ICES..... International Classification of Epileptic Seizures  
 I<sub>GABA</sub> ..... GABA-induzierter Chlorid-Strom  
 ILAE..... International League Against Epilepsy  
 I<sub>max</sub>..... maximale Stromamplitude  
 IUPHAR..... International Union of Pharmacology  
 JME..... Juvenile Myoclonic Epilepsy  
 KCC2 ..... K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-Co-Transporter 2  
 LD<sub>50</sub>..... Halbmaximale lethale Dosis (lethal dose, in μM)  
 LGIC ..... Ligand Gated Ion Channel  
 MAH ..... Microelectrod Access Holes  
 mRNA ..... Messenger Ribonukleinsäure  
 nAChR ..... nikotinischer Acetylcholinrezeptor  
 n<sub>H</sub>..... Hill-Koeffizient  
 NMD ..... Nonsense-mediated mRNA Decay  
 NMDA..... N-Methyl-D-Aspartat  
 NREM ..... Non Rapid Eye Movement (Sleep)  
 o.ä.....oder ähnliches  
 OCD ..... Obsessive compulsive Disorder  
 PD ..... Panic Disorder  
 PTSD ..... Post-traumatic Stress Disorder  
 PV ..... Parvalbumin  
 REM..... Rapid Eye Movement (Sleep)  
 SAD ..... Social Anxiety Disorder  
 TRPA1 ..... Transient Receptor Potential Receptor Typ A1  
 ZNS ..... Zentralnervensystem

## 9. Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.</b> Aufbau einer Nervenzelle (Mariana Ruiz Villarreal, 2007).....	10
<b>Abb. 2.</b> Aktionspotential einer Nervenzelle. (uni.carlo-michaelis.de) .....	12
<b>Abb. 3.</b> Chemische Struktur der 4-Aminobuttersäure.....	14
<b>Abb. 4.</b> GABA Stoffwechsel (Karlsons Biochemie und Pathobiochemie, 2005) .....	15
<b>Abb. 5.</b> GABA <sub>A</sub> -, GABA <sub>B</sub> - und GABA <sub>ρ</sub> -Rezeptor(GABA <sub>C</sub> -Rezeptor) (Owens und Kriegstein, 2002) .....	15
<b>Abb. 6.</b> Überblick über die bekannten GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Untereinheiten (modifiziert, aus Nutt, 2006) .....	18
<b>Abb. 7.</b> Pentame, tetrame und trimere Cys-Loop-Rezeptoren (Collingridger et al., 2009) .....	19
<b>Abb. 8.</b> Schematische Darstellung eines GABA <sub>A</sub> Rezeptors (Belelli and Lambert, 2005). .....	19
<b>Abb. 9.</b> Schematischer Aufbau einer GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Untereinheit (Goetz et al., 2007) .....	20
<b>Abb. 10.</b> Häufigkeit der bekannten GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Subtypen (Nutt, 2006) .....	22
<b>Abb. 11.</b> Loops A – F im GABA <sub>A</sub> -Rezeptor (Marlock und Czajkowski, 2011) .....	23
<b>Abb. 12.</b> GABA- und Benzodiazepin-Bindungsstellen am GABA <sub>A</sub> -Rezeptor (Richter et al., 2012) .....	24
<b>Abb. 13.</b> Schematische Darstellung phasischer und tonischer GABAerger Inhibition (Goetz et al., 2007).....	27
<b>Abb. 14.</b> Lokalisation der verschiedenen epilepsierelevanten Mutationen am GABA <sub>A</sub> -Rezeptor (Macdonald et al., 2010) .....	36
<b>Abb. 15.</b> Die $\alpha_1/\gamma_2$ -Schnittstelle am GABA <sub>A</sub> -Rezeptor (Hanson und Czajkowski, 2008) .....	26
<b>Abb. 16.</b> Strukturformel von Flumazenil (Barnard et al., 1998) .....	41
<b>Abb. 17.</b> Stereomere des Etomidats (Tomlin et al., 1998) .....	44
<b>Abb. 18.</b> Muscimol (Barnard et al., 1998).....	49
<b>Abb. 19.</b> Piper nigrum (Köhler's Medizinalpflanzen, 1897).....	52
<b>Abb. 20.</b> Piperin (Srinivasan, 2007) .....	52
<b>Abb. 21.</b> Entwicklungsstadien I – VI der Xenopus laevis Oozyten (Allen et al., 2007) .....	56
<b>Abb. 22.</b> Schematische Darstellung des Expressionsprozesses eines exogenen Proteins in Xenopus Oozyten (a). Schematische Darstellung einer Xenopus Eizelle im Entwicklungsstadium V oder VI (b) (Bianchi und Driscoll, 2006).....	57
<b>Abb. 23.</b> Schematische Darstellung des Messprinzips der 2-Mikroelektroden-Spannungsklemmtechnik (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Wien).....	59
<b>Abb. 24.</b> Schematische Darstellung der Mikroperfusionskammer (Baburin et al., 2006) .....	61
<b>Abb. 25.</b> Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von (▲) Diazepam, (■) Piperin und (●) GABA an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA <sub>A</sub> Rezeptoren (B).....	64
<b>Abb. 26.</b> Dosis-Wirkungskurve von MC-12 an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA <sub>A</sub> Rezeptoren (B). .....	65

- Abb. 27.** Dosis-Wirkungskurve von MC-20 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 66
- Abb. 28.** Dosis-Wirkungskurve von MC-64 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 67
- Abb. 29.** Dosis-Wirkungskurve von MC-66 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 68
- Abb. 30.** Dosis-Wirkungskurve von MC-73 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 69
- Abb. 31.** Dosis-Wirkungskurve von MC-74 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 70
- Abb. 32.** Dosis-Wirkungskurve von MC-79 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 71
- Abb. 33.** Dosis-Wirkungskurve von MC-80 an  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -Rezeptoren (A). Repräsentative modulierte GABA-induzierte Chlorid-Ströme durch  $\alpha_1\beta_2\gamma_{25}$ -GABA<sub>A</sub> Rezeptoren (B). 72



## 10. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.</b> GABA <sub>A</sub> -Rezeptor-Fehlfunktionen verursacht durch Mutationen (Abkürzungen s. Abkürzungsverzeichnis) (überarbeitet nach Macdonald et al., 2010) .....	35
<b>Tabelle 2.</b> Antiepileptische Arzneimittel und ihr Wirkmechanismus (bearbeitet, aus Das et al., 2012).....	37
<b>Tabelle 3.</b> Im Zuge der Diplomarbeit verwendete Materialien und Software.....	55
<b>Tabelle 4.</b> Zusammenfassung der Daten aus den Dosis-Wirkungskurven (Abb. 25 – 33) der einzelnen Derivate an $\alpha_1\beta_2\gamma_{2S}$ -GABA <sub>A</sub> -Rezeptoren.....	73

## 11. Literaturverzeichnis

**Akk, G**, Steinbach JH. Structural studies of the actions of anesthetic drugs on the  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptor. *Anesthesiology*. **2011** Dec;115(6):1338-48.

**Akk, G**, Li P, Bracamontes J, Wang M, Steinbach JH. Pharmacology of structural changes at the GABA(A) receptor transmitter binding site. *Br J Pharmacol*. **2011** Feb;162(4):840-50.

**Akk, G**, Covey DF, Evers AS, Steinbach JH, Zorumski CF, Mennerick S. The influence of the membrane on neurosteroid actions at GABA(A) receptors. *Psychoneuroendocrinology*. **2009** Dec;34 Suppl 1:S59-66.

**Allen, TD**, Rutherford SA, Murray S, Sanderson HS, Gardiner F, Kiseleva E, Goldberg MW, Drummond SP. A protocol for isolating *Xenopus* oocyte nuclear envelope for visualization and characterization by scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy (TEM). *Nat Protoc*. **2007**;2(5):1166-72.

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

**Barnard, EA**, Skolnick P, Olsen RW, Mohler H, Sieghart W, Biggio G, Braestrup C, Bateson AN, Langer SZ. International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function. *Pharmacol Rev*. **1998** Jun;50(2):291-313.

**Baumann, SW**, Baur R, Sigel E. Individual properties of the two functional agonist sites in GABA(A) receptors. *J Neurosci*. **2003** Dec 3;23(35):11158-66.

**Belelli, D**, Lambert JJ. Neurosteroids: endogenous regulators of the GABA(A) receptor. *Nat Rev Neurosci*. **2005** Jul;6(7):565-75.

**Belelli, D**, Casula A, Ling A, Lambert JJ. The influence of subunit composition on the interaction of neurosteroids with GABA(A) receptors. *Neuropharmacology*. **2002** Sep;43(4):651-61.

**Belelli, D**, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Walker MC, Cope DW. Extrasynaptic GABAA receptors: form, pharmacology, and function. *J Neurosci*. **2009** Oct 14;29(41):12757-63.

**Bergen, JM**, Smith DC. A review of etomidate for rapid sequence intubation in the emergency department. *J Emerg Med*. **1997** Mar-Apr;15(2):221-30.

**Bettler B**, Tiao JY. Molecular diversity, trafficking and subcellular localization of GABAB receptors. *Pharmacol Ther*. **2006** Jun;110(3):533-43.

**Bhardwaj, RK**, Glaeser H, Becquemont L, Klotz U, Gupta SK, Fromm MF. Piperine, a major constituent of black pepper, inhibits human P-glycoprotein and CYP3A4. *J Pharmacol Exp Ther*. **2002** Aug;302(2):645-50.

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

**Boileau, AJ**, Newell JG, Czajkowski C. GABA(A) receptor beta 2 Tyr97 and Leu99 line the GABA-binding site. Insights into mechanisms of agonist and antagonist actions. *J Biol Chem*. **2002** Jan 25;277(4):2931-7.

**Boileau, AJ**, Kucken AM, Evers AR, Czajkowski C. Molecular dissection of benzodiazepine binding and allosteric coupling using chimeric gamma-aminobutyric acidA receptor subunits. *Mol Pharmacol*. **1998** Feb;53(2):295-303.

**Bormann, J**. The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci*. **2000** Jan;21(1):16-19.

**Bowery, NG**, Enna SJ. gamma-aminobutyric acid(B) receptors: first of the functional metabotropic heterodimers. *J Pharmacol Exp Ther.* **2000** Jan;292(1):2-7. Review. Erratum in: *J Pharmacol Exp Ther* 2000 Apr;293(1)

**Bowery, NG**, Doble A, Hill DR, Hudson AL, Shaw JS, Turnbull MJ. Baclofen: a selective agonist for a novel type of GABA receptor proceedings. *Br J Pharmacol.* **1979** Nov;67(3):444P-445P.

**Bowery, NG**, Hudson AL. gamma-Aminobutyric acid reduces the evoked release of [3H]-noradrenaline from sympathetic nerve terminals [proceedings]. *Br J Pharmacol.* **1979** May;66(1):108P.

**Buckingham, SD**, Biggin PC, Sattelle BM, Brown LA, Sattelle DB. Insect GABA receptors: splicing, editing, and targeting by antiparasitics and insecticides. *Mol Pharmacol.* **2005** Oct;68(4):942-51.

**Charych, EI**, Liu F, Moss SJ, Brandon NJ. GABA(A) receptors and their associated proteins: implications in the etiology and treatment of schizophrenia and related disorders. *Neuropharmacology.* **2009** Oct-Nov;57(5-6):481-95.

**Chebib, M**, Johnston GA. GABA-Activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology. *J Med Chem.* **2000** Apr 20;43(8):1427-47.

**Chen, ZW**, Olsen RW. GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function. *J Neurochem.* **2007** Jan;100(2):279-94.

**Collingridge, GL**, Olsen RW, Peters J, Spedding M. A nomenclature for ligand-gated ion channels. *Neuropharmacology.* **2009** Jan;56(1):2-5.

**Cromer, BA**, Morton CJ, Parker MW. Anxiety over GABA(A) receptor structure relieved by AChBP. *Trends Biochem Sci.* **2002** Jun;27(6):280-7.

- Davies, M.** The role of GABAA receptors in mediating the effects of alcohol in the central nervous system. *J Psychiatry Neurosci.* **2003** Jul;28(4):263-74.
- D'Hooge, R,** Pei YQ, Raes A, Lebrun P, van Bogaert PP, de Deyn PP. Anticonvulsant activity of piperine on seizures induced by excitatory amino acid receptor agonists. *Arzneimittelforschung.* **1996** Jun;46(6):557-60.
- D'Hulst, C,** Atack JR, Kooy RF. The complexity of the GABAA receptor shapes unique pharmacological profiles. *Drug Discov Today.* **2009** Sep;14(17-18):866-75.
- Das, N,** Dhanawat M, Shrivastava SK. An overview on antiepileptic drugs. *Drug Discov Ther.* **2012** Aug;6(4):178-93.
- Duessel, S,** Heuertz RM, Ezekiel UR. Growth inhibition of human colon cancer cells by plant compounds. *Clin Lab Sci.* **2008** Summer;21(3):151-7.
- Eckle, VS,** Hucklenbruch C, Todorovic SM. [What do we know about anesthetic mechanisms?: hypnosis, unresponsiveness to surgical incision and amnesia]. *Anaesthesist.* **2009** Nov;58(11):1144-9.
- Ehlen, JC,** Paul KN. Regulation of light's action in the mammalian circadian clock: role of the extrasynaptic GABAA receptor. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* **2009** May;296(5):R1606-12.
- Forman, SA.** Clinical and molecular pharmacology of etomidate. *Anesthesiology.* **2011** Mar;114(3):695-707.
- Forth, W.** et al. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.* In: Elsevier GmbH. Urban und Fischer Verlag, München. **2009**; S.105-135;253-269;276-280;283-291;1113.

**Gable, RS.** Comparison of acute lethal toxicity of commonly abused psychoactive substances. *Addiction*. **2004** Jun;99(6):686-96.

**Glykys J, Mody I.** Activation of GABAA receptors: views from outside the synaptic cleft. *Neuron*. **2007** Dec 6;56(5):763-70.

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

**Goldin, AL.** Maintenance of *Xenopus laevis* and oocyte injection. *Methods Enzymol*. **1992**;207:266-79.

**Gonzalez-Burgos, G, Fish KN, Lewis DA.** GABA neuron alterations, cortical circuit dysfunction and cognitive deficits in schizophrenia. *Neural Plast*. **2011**;2011:723184.

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

**Hanson, SM, Czajkowski C.** Structural mechanisms underlying benzodiazepine modulation of the GABA(A) receptor. *J Neurosci*. **2008** Mar 26;28(13):3490-9.

**Hänsel R, Sticher O, Steinegger E,** *Pharmakognosie - Phytopharmazie*, Springer Verlag, Berlin Heidelberg **1999**

**Henschel, O, Gipson KE, Bordey A.** GABAA receptors, anesthetics and anticonvulsants in brain development. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. **2008** Apr;7(2):211-24.

**Hevers, W, Lüddens H.** The diversity of GABAA receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABAA channel subtypes. *Mol Neurobiol*. **1998**

Aug;18(1):35-86.

**Hill-Venning, C**, Belelli D, Peters JA, Lambert JJ. Subunit-dependent interaction of the general anaesthetic etomidate with the gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Br J Pharmacol*. **1997** Mar;120(5):749-56.

**Hlavackova, L**, Urbanova A, Ulicna O, Janega P, Cerna A, Babal P. Piperine, active substance of black pepper, alleviates hypertension induced by NO synthase inhibition. *Bratisl Lek Listy*. **2010**;111(8):426-31.

**Höld, KM**, Sirisoma NS, Ikeda T, Narahashi T, Casida JE. Alpha-thujone (the active component of absinthe): gamma-aminobutyric acid type A receptor modulation and metabolic detoxification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2000** Apr 11;97(8):3826-31.

**Huang SH**, Duke RK, Chebib M, Sasaki K, Wada K, Johnston GA. Bilobalide, a sesquiterpene trilactone from *Ginkgo biloba*, is an antagonist at recombinant alpha1beta2gamma2L GABA(A) receptors. *Eur J Pharmacol*. **2003** Mar 7;464(1):1-8.

**Im, MS**, Hamilton BJ, Carter DB, Im WB. Selective potentiation of GABA-mediated Cl<sup>-</sup> current by lanthanum ion in subtypes of cloned GABA<sub>A</sub> receptors. *Neurosci Lett*. **1992** Sep 14;144(1-2):165-8.

**Johnston, GA**. GABA(A) receptor channel pharmacology. *Curr Pharm Des*. **2005**;11(15):1867-85.

**Johnston, GA**. GABA<sub>C</sub> receptors: relatively simple transmitter-gated ion channels? *Trends Pharmacol Sci*. **1996** Sep;17(9):319-23.

**Jones-Davis, DM**, Macdonald RL. GABA(A) receptor function and pharmacology in epilepsy and status epilepticus. *Curr Opin Pharmacol*. **2003** Feb;3(1):12-8.

**Karlson, P.** et al., *Karlsons Biochemie und Phatobiochemie*. Thieme Verlag, Stuttgart. **2005**. Auflage 15; S. 720.

**Khatri, A,** Weiss DS. The role of Loop F in the activation of the GABA receptor. *J Physiol*. **2010** Jan 1;588(Pt 1):59-66.

**Khatri, A,** Sedelnikova A, Weiss DS. Structural rearrangements in loop F of the GABA receptor signal ligand binding, not channel activation. *Biophys J*. **2009** Jan;96(1):45-55.

**Khom, S,** Strommer B, Ramharter J, Schwarz T, Schwarzer C, Erker T, Ecker GF, Mulzer J, Hering S. Valerenic acid derivatives as novel subunit-selective GABAA receptor ligands - in vitro and in vivo characterization. *Br J Pharmacol*. **2010** Sep;161(1):65-78.

**Khom, S,** Baburin I, Timin E, Hohaus A, Trauner G, Kopp B, Hering S. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA(A) receptors: molecular mechanism and subunit specificity. *Neuropharmacology*. **2007** Jul;53(1):178-87.

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

**Kim, HJ,** Baburin I, Khom S, Hering S, Hamburger M. HPLC-based activity profiling approach for the discovery of GABAA receptor ligands using an automated two microelectrode voltage clamp assay on *Xenopus* oocytes. *Planta Med*. **2008** Apr;74(5):521-6.

**Kirschbaum C.** *Biopsychologie von A bis Z*. Springer berlin Heidelberg Verlag. **2008**. S. 30-31.



- Koulen, P**, Brandstätter JH, Kröger S, Enz R, Bormann J, Wässle H. Immunocytochemical localization of the GABA(C) receptor rho subunits in the cat, goldfish, and chicken retina. *J Comp Neurol.* **1997** Apr 21;380(4):520-32.
- Korpi, ER**, Kuner T, Seeburg PH, Lüddens H. Selective antagonist for the cerebellar granule cell-specific gamma-aminobutyric acid type A receptor. *Mol Pharmacol.* **1995** Feb;47(2):283-9.
- Korpi, ER**, Sinkkonen ST. GABA(A) receptor subtypes as targets for neuropsychiatric drug development. *Pharmacol Ther.* **2006** Jan;109(1-2):12-32.
- Korpi, ER**, Gründer G, Lüddens H. Drug interactions at GABA(A) receptors. *Prog Neurobiol.* **2002** Jun;67(2):113-59.
- Koski, A**, Ojanperä I, Vuori E. Alcohol and benzodiazepines in fatal poisonings. *Alcohol Clin Exp Res.* **2002** Jul;26(7):956-9.
- Kullmann, DM**, Ruiz A, Rusakov DM, Scott R, Semyanov A, Walker MC. Presynaptic, extrasynaptic and axonal GABAA receptors in the CNS: where and why? *Prog Biophys Mol Biol.* **2005** Jan;87(1):33-46.
- Le Marchand, L.** Cancer preventive effects of flavonoids--a review. *Biomed Pharmacother.* **2002** Aug;56(6):296-301.
- Lewis, DA**, Cho RY, Carter CS, Eklund K, Forster S, Kelly MA, Montrose D. Subunit-selective modulation of GABA type A receptor neurotransmission and cognition in schizophrenia. *Am J Psychiatry.* **2008** Dec;165(12):1585-93.
- Lewis, DA**, González-Burgos G. Neuroplasticity of neocortical circuits in schizophrenia. *Neuropsychopharmacology.* **2008** Jan;33(1):141-65.

**Lisman, JE**, Coyle JT, Green RW, Javitt DC, Benes FM, Heckers S, Grace AA. Circuit-based framework for understanding neurotransmitter and risk gene interactions in schizophrenia. *Trends Neurosci.* **2008** May;31(5):234-42.

**Löw, K**, Crestani F, Keist R, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Rüllicke T, Bluethmann H, Möhler H, Rudolph U. Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety. *Science.* **2000** Oct 6;290(5489):131-4.

**Lüscher, B**, Shen Q, Sahir N. The GABAergic deficit hypothesis of major depressive disorder. *Mol Psychiatry.* **2011** Apr;16(4):383-406.

**Macdonald, RL**, Kang JQ, Gallagher MJ. Mutations in GABAA receptor subunits associated with genetic epilepsies. *J Physiol.* **2010** Jun 1;588(Pt 11):1861-9.

**Marder, M**, Paladini AC. GABA(A)-receptor ligands of flavonoid structure. *Curr Top Med Chem.* **2002** Aug;2(8):853-67.

**Mathie, A**, Sutton GL, Clarke CE, Veale EL. Zinc and copper: pharmacological probes and endogenous modulators of neuronal excitability. *Pharmacol Ther.* **2006** Sep;111(3):567-83.

**Matta, JA**, Cornett PM, Miyares RL, Abe K, Sahibzada N, Ahern GP. General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2008** Jun 24;105(25):8784-9.

**Möhler, H**. The GABA system in anxiety and depression and its therapeutic potential. *Neuropharmacology.* **2012** Jan;62(1):42-53.

**Möhler, H**. GABA(A) receptor diversity and pharmacology. *Cell Tissue Res.* **2006** Nov;326(2):505-16.

- Möhler, H**, Fritschy JM, Rudolph U. A new benzodiazepine pharmacology. *J Pharmacol Exp Ther.* **2002** Jan;300(1):2-8.
- Morlock, EV**, Czajkowski C. Different residues in the GABAA receptor benzodiazepine binding pocket mediate benzodiazepine efficacy and binding. *Mol Pharmacol.* **2011** Jul;80(1):14-22.
- Müller-Esterl, W.** *Biochemie.* In: Elsevier GmbH. Spektrum Akademischer Verlag, München. **2004**; Seite 377-391
- Mutschler, E.** *Arzneimittelwirkungen-Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.* In: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart. **2008**; S.143-159;203-210;291-293;307-317.
- Narahashi, T**, Ma JY, Arakawa O, Reuveny E, Nakahiro M. GABA receptor-channel complex as a target site of mercury, copper, zinc, and lanthanides. *Cell Mol Neurobiol.* **1994** Dec;14(6):599-621.
- Nutt, D.** GABAA receptors: subtypes, regional distribution, and function. *J Clin Sleep Med.* **2006** Apr 15;2(2):S7-11.
- Okumura, Y**, Narukawa M, Iwasaki Y, Ishikawa A, Matsuda H, Yoshikawa M, Watanabe T. Activation of TRPV1 and TRPA1 by black pepper components. *Biosci Biotechnol Biochem.* **2010**;74(5):1068-72.
- Olsen, RW**, Sieghart W. GABA A receptors: subtypes provide diversity of function and pharmacology. *Neuropharmacology.* **2009** Jan;56(1):141-8.
- Olsen, RW**, Sieghart W. International Union of Pharmacology. LXX. Subtypes of gamma-aminobutyric acid(A) receptors: classification on the basis of subunit composition, pharmacology, and function. Update. *Pharmacol Rev.* **2008** Sep;60(3):243-60.

**Olsen, RW**, Hanchar HJ, Meera P, Wallner M. GABAA receptor subtypes: the "one glass of wine" receptors. *Alcohol*. **2007** May;41(3):201-9.

**Owens, DF**, Kriegstein AR. Is there more to GABA than synaptic inhibition? *Nat Rev Neurosci*. **2002** Sep;3(9):715-27.

**Pei, YQ**. A review of pharmacology and clinical use of piperine and its derivatives. *Epilepsia*. **1983** Apr;24(2):177-82.

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

**Reddy, DS**. Neurosteroids: endogenous role in the human brain and therapeutic potentials. *Prog Brain Res*. **2010**;186:113-37.

**Remschmidt, H**, Thieisen F. *Schizophrenie*. Springer Verlag Deutschland, **2011**. S. 14.

**Richter, L**, de Graaf C, Sieghart W, Varagic Z, Mörzinger M, de Esch IJ, Ecker GF, Ernst M. Diazepam-bound GABAA receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nat Chem Biol*. **2012** Mar 25;8(5):455-64.

**Roehrs, T**, Roth T. Insomnia Pharmacotherapy. *Neurotherapeutics*. **2012** Sep 14. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22976558.

**Rudolph, U**, Crestani F, Benke D, Brünig I, Benson JA, Fritschy JM, Martin JR, Bluethmann H, Möhler H. Benzodiazepine actions mediated by specific gamma-aminobutyric acid(A) receptor subtypes. *Nature*. **1999** Oct 21;401(6755):796-800.

- Rudolph, U**, Knoflach F. Beyond classical benzodiazepines: novel therapeutic potential of GABAA receptor subtypes. *Nat Rev Drug Discov.* **2011** Jul 29;10(9):685-97.
- Sander, T**, Frølund B, Bruun AT, Ivanov I, McCammon JA, Balle T. New insights into the GABA(A) receptor structure and orthosteric ligand binding: receptor modeling guided by experimental data. *Proteins.* **2011** May;79(5):1458-77.
- Sasaki, K**, Hatta S, Haga M, Ohshika H. Effects of bilobalide on gamma-aminobutyric acid levels and glutamic acid decarboxylase in mouse brain. *Eur J Pharmacol.* **1999** Feb 19;367(2-3):165-73.
- Sauer, O.**, Weilemann S. *Drogen: Eigenschaften-Wirkungen-Intoxikationen.* Schlütersche Verlag, **2001** S. 67.
- Saxena, NC**, Neelands TR, MacDonald RL. Contrasting actions of lanthanum on different recombinant gamma-aminobutyric acid receptor isoforms expressed in L929 fibroblasts. *Mol Pharmacol.* **1997** Feb;51(2):328-35.
- Sieghart, W**, Sperk G. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Curr Top Med Chem.* **2002** Aug;2(8):795-816.
- Sieghart, W**, Fuchs K, Tretter V, Ebert V, Jechlinger M, Höger H, Adamiker D. Structure and subunit composition of GABA(A) receptors. *Neurochem Int.* **1999** May;34(5):379-85.
- Sigel, E**, Minier F. The *Xenopus* oocyte: system for the study of functional expression and modulation of proteins. *Mol Nutr Food Res.* **2005** Mar;49(3):228-34.
- Silbernagl und Lang**, *Taschenatlas der Pathophysiologie.* Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart. 1998, **2005**

- Srinivasan, K.** Black pepper and its pungent principle-piperine: a review of diverse physiological effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* **2007**;47(8):735-48.
- Steimer, T.** The biology of fear- and anxiety-related behaviors. *Dialogues Clin Neurosci.* **2002** Sep;4(3):231-49.
- Szabadi, E.** Drugs for sleep disorders: mechanisms and therapeutic prospects. *Br J Clin Pharmacol.* **2006** Jun;61(6):761-6.
- Tomlin, SL,** Jenkins A, Lieb WR, Franks NP. Stereoselective effects of etomidate optical isomers on gamma-aminobutyric acid type A receptors and animals. *Anesthesiology.* **1998** Mar;88(3):708-17.
- Tretter V,** Mukherjee J, Maric HM, Schindelin H, Sieghart W, Moss SJ. Gephyrin, the enigmatic organizer at GABAergic synapses. *Front Cell Neurosci.* **2012**;6:23.
- Unwin, N.** Refined structure of the nicotinic acetylcholine receptor at 4A resolution. *J Mol Biol.* **2005** Mar 4;346(4):967-89.
- Uusi-Oukari, M,** Korpi ER. Regulation of GABA(A) receptor subunit expression by pharmacological agents. *Pharmacol Rev.* **2010** Mar;62(1):97-135.
- Vijayakumar, RS,** Surya D, Nalini N. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep.* **2004**;9(2):105-10.
- Viola, H,** Wasowski C, Levi de Stein M, Wolfman C, Silveira R, Dajas F, Medina JH, Paladini AC. Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects. *Planta Med.* **1995** Jun;61(3):213-6.

**Volk, DW**, Pierri JN, Fritschy JM, Auh S, Sampson AR, Lewis DA. Reciprocal alterations in pre- and postsynaptic inhibitory markers at chandelier cell inputs to pyramidal neurons in schizophrenia. *Cereb Cortex*. **2002** Oct;12(10):1063-70.

**Walker, DL**, Toufexis DJ, Davis M. Role of the bed nucleus of the stria terminalis versus the amygdala in fear, stress, and anxiety. *Eur J Pharmacol*. **2003** Feb 28;463(1-3):199-216.

**Wallner, M**, Hanchar HJ, Olsen RW. Low-dose alcohol actions on alpha4beta3delta GABAA receptors are reversed by the behavioral alcohol antagonist Ro15-4513. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2006** May 30;103(22):8540-5.

**Wattanathorn, J**, Chonpathompikunlert P, Muchimapura S, Priprem A, Tankamnerdthai O. Piperine, the potential functional food for mood and cognitive disorders. *Food Chem Toxicol*. **2008** Sep;46(9):3106-10.

**Zaugg, J**, Baburin I, Strommer B, Kim HJ, Hering S, Hamburger M. HPLC-based activity profiling: discovery of piperine as a positive GABA(A) receptor modulator targeting a benzodiazepine-independent binding site. *J Nat Prod*. **2010** Feb 26;73(2):185-91.

**Zwanzger, P**, Rupprecht R. Selective GABAergic treatment for panic? Investigations in experimental panic induction and panic disorder. *J Psychiatry Neurosci*. **2005** May;30(3):167-75.

## 12. Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

<b>Name</b>	<b>Mihaela CONER</b>
<b>Geburtsdatum</b>	19. Juni 1985
<b>Geburtsort</b>	Bjelovar, Kroatien

### Ausbildung

---

<b>Juli 2011 – Dezember 2011</b>	Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Wien
<b>März 2005 – Juli 2012</b>	Diplomstudium der Pharmazie, Universität Wien
<b>Oktober 2004 – Januar 2005</b>	Universitätslehrgang Vorstudienlehrgang, Wien
<b>2000 – 2004</b>	Gymnasium Bjelovar mit Auszeichnung
<b>1994 – 2000</b>	Musikschule „Vatroslav Lisinski“, Bjelovar

### Praktika

---

<b>Juli 2009</b>	Erste kroatische Privatapotheke „Coner“, Bjelovar
<b>August 2008</b>	Erste kroatische Privatapotheke „Coner“, Bjelovar
<b>Juli 2007</b>	Erste kroatische Privatapotheke „Coner“, Bjelovar