

Liganden des Benzodiazepin-Rezeptors

Studien über Benzodiazepine in pflanzlichen Gewebe sowie über Hispidulin

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Dominique Kavvadias

aus Tichau/Polen

Würzburg 2003

Eingereicht am:
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des öffentlichen Promotionskolloquiums:
Doktorurkunde ausgehändigt am:

Meiner Familie

Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand im Zeitraum von Januar 1999 bis Juli 2002 am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. P. Schreier. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des interessanten Themas, die engagierte fachliche Betreuung und seine mir stets gewährte Unterstützung.

Den Herren Prof. Dr. P. Riederer und Prof. Dr. H. Beckmann von der Psychiatrischen Klinik danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit im Rahmen des ‚Würzburger Benzodiazepin-Forschungsverbundes‘. Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Sand für die engagierte Betreuung und seine große Hilfsbereitschaft. Herrn Dr. T. Tatschner danke ich für die Präparation des Hirngewebes.

Den Herren Prof. Dr. F.-C. Czygan und Dr. A. A. Abou-Mandour (Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie) danke ich für die Erarbeitung steriler Pflanzenproben und die fachliche Unterstützung. Herrn Prof. Dr. G. Bringmann (Institut für Organische Chemie) gilt mein Dank für die Bereitstellung des Isotopenlabors; Herrn Priv. Doz. Dr. W. Schwab sei auch an dieser Stelle für hilfreiche Diskussionen gedankt.

Herrn Prof. Dr. E. Sigel vom Institut für Pharmakologie der Universität Bern danke ich für die Durchführung der Studien an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren im *Xenopus laevis*-Modell.

Herrn Prof. Dr. W.-D. Rausch vom Institut für Medizinische Chemie der Veterinärmedizinischen Universität Wien danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen der Experimente an der Mongolischen Wüstenrennmaus. Für die Bereitstellung der Tiere danke ich Herrn Dr. H.-A. Boehme vom Leibniz-Institut für Neurobiologie in Magdeburg.

Herrn Prof. Dr. G. Toth (Institut für Organische und Analytische Chemie, Budapest) gilt mein Dank für tatkräftige Unterstützung bei der Auswertung der NMR-Spektren.

Für die tatkräftige Mitarbeit im Rahmen der Fortgeschrittenen-Praktika danke ich Petra Reihl, Stefanie Lubitz und Vanessa Monschein, die an der Isolierung Benzodiazepin-Rezeptor-aktiver Liganden beteiligt waren.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie und insbesondere bei Bernd für vielfältige Unterstützung und den Rückhalt während des Studiums und der Promotionszeit ganz herzlich bedanken.

Schließlich danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Unterstützung dieses Forschungsprojektes.

Publikationsliste

1. Veröffentlichungen

- [1] Kavvadias, D., Abou-Mandour, A. A., Czygan, F.-C., Beckmann, H., Sand, P., Riederer, P. und Schreier, P. (2000). "Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracunculus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**: 290-5.
- [2] Kavvadias, D., Monschein, V., Sand, P., Riederer, P. und Schreier, P. (2003). "Constituents of sage (*Salvia officinalis* L.) with *in vitro* affinity to human brain benzodiazepine receptor." *Planta Med.*, im Druck.
- [3] Sand, P., Kavvadias, D., Feineis, D., Riederer, P., Schreier, P., Kleinschnitz, M., Czygan, F.-C., Abou-Mandour, A., Bringmann, G. und Beckmann, H. (2000). "Naturally occurring benzodiazepines: current status of research and clinical implications." *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **250**: 1-9.
- [4] Sand, P., Kleinschnitz, M., Vogel, P., Kavvadias, D., Schreier, P. und Riederer, P. (2001). "Naturally occurring benzodiazepines may codetermine chronotypes." *J. Neural Transm.* **108**: 747-53.
- [5] Kavvadias, D., Sand, P., Riederer, P., Richling, E. und Schreier, P. (2003). „Flavonoids and the central nervous system. The anxiolytic flavone hispidulin.“ Proceedings des Symposium der DFG-Senatskommission für Lebensmittelsicherheit (SKLM) „Functional Food: Safety Aspects“ vom 5. bis 7. Mai 2002 in Karlsruhe, im Druck.

2. Posterbeiträge

- [1] Kavvadias, D., Sand, P., Riederer, P., Richling, E. und Schreier, P. (2002). „Flavonoids and the central nervous system. The anxiolytic flavone hispidulin.“ Symposium der DFG-Senatskommission für Lebensmittelsicherheit (SKLM) „Functional Food: Safety Aspects“ vom 5. bis 7. Mai 2002 in Karlsruhe.
- [2] Kavvadias, D., Sand, P., Riederer, P., Richling, E. und Schreier, P. (2002). „Flavonoide und ihre Bedeutung für das Zentralnervensystem als natürliche Liganden des GABA_A/Benzodiazepinrezeptors.“ 31. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt am Main.

Inhalt

Verzeichnis der Abkürzungen.....	1
Zusammenfassung	5
Summary	10
1 Einleitung	15
2 Kenntnisstand.....	18
2.1 Therapeutischer Einsatz, Chemie und Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine.....	18
2.2 Eigenschaften, Aufbau und Wirkmechanismus des GABA _A - Rezeptorkomplexes	22
2.3 Liganden des BZD-R und ihre pharmakologischen Profile	24
2.4 Zusammensetzung und Einteilung der GABA _A -Rezeptorkomplexe.....	26
2.5 Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine.....	33
2.6 Endogene Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R.....	36
2.6.1 β -Carboline	36
2.6.2 Peptide	37
2.7 Biologische Funktion der BZD-R-Liganden	39
2.7.1 Hepatische Enzephalopathie	39
2.7.2 Angst und Epilepsie.....	40
2.7.3 Gedächtnisleistung und Lernprozesse.....	41
2.7.4 Schlaf.....	41
2.8 Synthetische Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R	41
2.9 Pflanzliche Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R	42

2.9.1	Flavonoide	44
2.9.2	Diterpene	48
3	Ergebnisse und Diskussion	50
3.1	Untersuchungen zum Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine.....	50
3.1.1	Nachweis von BZD-R-Liganden-Aktivität in steril kultivierten Pflanzen.....	53
3.1.1.1	Untersuchungen der Bindungsaktivitäten am BZD-R im Radio- rezeptorbindungsassay (RRA)	54
3.1.1.2	Untersuchung bindungsaktiver Probenextrakte mittels LC-MS/MS	57
3.1.1.2.1	Etablierung eines SRM-Experimentes zur Identifizierung ausgewählter Benzodiazepine	58
3.1.1.2.2	Reinigung und Vorfraktionierung BZD-R-Liganden-aktiver Extrakte	59
3.1.1.2.3	SRM-Screening aktiver HPLC-Fractionen.....	60
3.2	Untersuchung von Heilkräuterextrakten auf das Vorkommen von BZD-R-Liganden	63
3.3	Isolierung und Charakterisierung von BZD-R-Liganden aus Salbei (<i>Salvia officinalis</i> L.)	65
3.4	Charakterisierung von Flavonderivaten mittels ESI_{pos}-MS/MS	76
3.5	Struktur-Wirkungsstudie mit Flavonoiden am humanen zentralen BZD-R	81
3.6	Synthese von Hispidulin	89
3.6.1	Methoden der Flavonsynthese.....	89
3.6.2	Methoden der Hispidulin-Synthese	90
3.7	<i>In vitro</i>-Bindungsstudien mit Hispidulin und Apigenin an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren	96
3.7.1	Untersuchung der Wirkung von Hispidulin und Apigenin auf das Membranpotential.....	96
3.7.2	Untersuchung der Subtypenselektivität von Hispidulin	100

3.8	Untersuchungen zur antiepileptischen Wirkung von Hispidulin	102
3.8.1	Bedeutung des GABA-ergen Systems in der Epilepsie	102
3.8.2	Epilepsiemodell der Mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil)	104
3.8.3	Beschreibung der Gerbilpopulation und der Anfälle	106
3.9	Synthese von 2-¹⁴C-Hispidulin	110
4	Experimentalteil	113
4.1	Material	113
4.1.1	Chemikalien	113
4.1.2	Untersuchungsmaterial	113
4.1.2.1	Kalluskulturen und pflanzliche Regenerate	113
4.1.2.2	Pflanzendrogen	114
4.1.3	Adsorptionsmaterial	114
4.1.4	Dünnschichtchromatographie (DC)	114
4.2	Geräte	115
4.2.1	Radiorezeptorbindungsassay (RRA)	115
4.2.2	Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)	115
4.2.3	Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)	116
4.2.4	Elektronenstoss-Ionisierung-Massenspektrometrie (EIMS)	117
4.2.5	Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting; LSC)	117
4.2.6	Kernresonanzspektroskopie (NMR)	118
4.2.7	Sonstige Geräte	118
4.3	Methoden	119
4.3.1	Radiorezeptorbindungsassay (RRA)	119
4.3.1.1	Reagenzien	119
4.3.1.2	Durchführung	120
4.3.2	Identifizierung natürlicher Benzodiazepine in sterilen, pflanzlichen Kalluskulturen und Regeneraten	121

4.3.2.1	Probenvorbereitung und Fraktionierung	121
4.3.2.2	Screening mittels HPLC-ESI _{pos} -MS/MS (DAU- und SRM-Modus)	122
4.3.3	Screening pflanzlicher Drogen auf Liganden des BZD-R	122
4.3.4	Isolierung und Charakterisierung von BZD-R-Liganden aus Salbeiblättern (<i>Salvia officinalis</i> L.)	123
4.3.5	Mehrstufigensynthese von Hispidulin.....	127
4.3.5.1	Synthese von Baustein 1	127
4.3.5.1.1	2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1)	127
4.3.5.1.2	2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon (2)	127
4.3.5.1.3	4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon (3)	128
4.3.5.1.4	4-Benzyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (4) (Elb's Persulfat-Oxidation)	128
4.3.5.1.5	4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (5).....	129
4.3.5.2	Synthese von Baustein 2	130
4.3.5.2.1	4-Benzyloxybenzoesäure (6)	130
4.3.5.2.2	4-Benzyloxybenzoesäurechlorid (7)	130
4.3.5.3	Kondensations-, Umlagerungs- und Zyklisierungsreaktion zum Flavon.....	131
4.3.5.4	Selektive Demethylierung an C-5 und Entfernung von Schutzgruppen.....	131
4.3.6	Untersuchungen der Bindungsprofile von Hispidulin und Apigenin an rekombinanten GABA _A -Rezeptoren.....	132
4.3.6.1	Präparation der Oozyten aus <i>Xenopus laevis</i>	132
4.3.6.2	Injektion der cRNA in <i>Xenopus laevis</i> -Oozyten.....	132
4.3.6.3	2-Elektroden-Spannungsklemme („voltage clamp“-Methode).....	133
4.3.7	Untersuchung der Wirkung von Hispidulin im Epilepsie-Modell mit der Mongolischen Wüstenrennmaus (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	133
4.3.7.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	133
4.3.7.2	Anfallskontrolle	134
4.3.7.3	Herstellung des Futters und Verfütterung	135
4.3.8	Synthese von 2- ¹⁴ C-Hispidulin.....	135

5	Literatur.....	138
	Lebenslauf	161
	Erklärung.....	163

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Alanin
Å	Ångström
AM-Medium	Nährmedium nach Abou-Mandour
β -CCB	β -Carbolin-3-carbonsäure-n-butylester
β -CCE	β -Carbolin-3-carbonsäureethylester
β -CCM	β -Carbolin-3-carbonsäuremethylester
BE	Bindungsäquivalente
BZD	Benzodiazepin(e)
BZD-R	Benzodiazepin-Rezeptor
BZD-R ₁ / BZD-R ₂	Benzodiazepin-Rezeptor Typ 1/2
bzw.	beziehungsweise
C	Cystein
CH ₂ Cl ₂	Dichlormethan
CHCl ₃	Chloroform
Cl ⁻	Chloridion(en)
CoMFA	Comparative molecular field analysis
CoMSIA	Comparative molecular similarity index analysis
COSY	Correlated spectroscopy NMR
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
δ	chemische Verschiebung
D	Asparaginsäure
2,4-D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DAD	Photo-Diodenarray-Detektor
DAU	daughter (Tochterion)
DBI	diazepam binding inhibitor
dest.	destilliert
DC	Dünnschichtchromatographie
DCDZ	Deschlordiazepam
d.h.	das heißt
DI	diazepam insensitive
DMCM	6,7-Dimethyl-4-ethyl- β -carbolin-3-carbonsäuremethylester

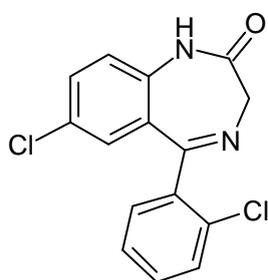
dpm	Zerfälle pro Minute
DZ	Diazepam
E	Glutaminsäure
EIA	Enzymimmunoassay
ESI	Elektrospray-Ionisierung
etc.	<i>et cetera</i> , und so weiter
EtOAc	Ethylacetat
eV	Elektronenvolt
F	Phenylalanin
G	Glycin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GABA _A -R	GABA-Rezeptor (Typ A)
GABA-T	GABA-Transaminase
GAD	Glutamatdecarboxylase
Glu	Glucose
h	Stunde(n)
H	Histidin
HAc	Essigsäure
HE	Hepatische Enzephalopathie
HMBC	heteronuclear multiple bond correlation
HMQC	heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
HQSAR	hologram quantitative structure activity relationship
HRGC	Kapillargaschromatographie
HWZ	Halbwertszeit
Hz	Hertz
IC ₅₀	inhibitory concentration at 50 % (50 %-ige Inhibierung)
IES	β -Indolessigsäure
i.d.	Innendurchmesser
i-DZ	iso-Diazepam
i.e.	<i>id est</i> , that is
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
J	Kopplungskonstante

K	Lysin
kDa	Kilodalton
K _i	Bindungskonstante
Kin	Kinetin
l	Liter
LSC	Flüssigszintillationszählung (liquid scintillation counting)
LZ	Lorazepam
M	Methionin
m-CPBA	m-Chlorperoxybenzoesäure
MeCN	Acetonitril
MeOH	Methanol
min	Minute(n)
mRNA	„messenger“-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometrie
MS-Medium	Nährmedium nach Murashige und Skoog
MS/MS	Tandemmassenspektrometrie
m/z	Masse/Ladungs-Verhältnis
N-DD	N-Desmethyldiazepam
NES	α-Naphthylelessigsäure
NMR	Kernresonanzspektroskopie
ODN	Octadecaneuropeptid
<i>off.</i>	<i>officinalis</i>
OXZ	Oxazepam
P	Prolin
ppm	parts per million
PTZ	Pentetrazol
Q	Glutamin
QSAR	quantitative structure activity relationship
R	Arginin
RIA	Radioimmunoassay
RDA	Retro-Diels-Alder
Ro 15-1788	Flumazenil
RP	reversed phase (Umkehrphase)
RP-C18	reversed phase (Umkehrphase) mit C ₁₈ -Alkylresten

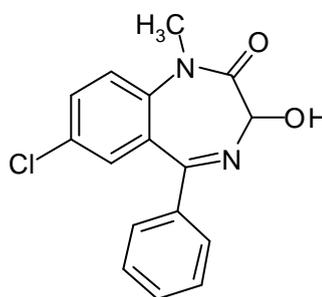
RRA	Radiorezeptorbindungsassay
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Serin
SAR	Struktur-Wirkungs-Beziehung (structure activity relationship)
S.E.M.	Standardabweichung
SRM	selected reaction monitoring
sp.	Spezies
ssp.	Subspezies
s.u.	siehe unten
T	Thymin
t _R	Retentionszeit
TBPS	tert.-Butylbicyclophosphorothionat
TFA	Trifluoressigsäure
TTN	Triakontatetraneuropeptid
u.a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Valin
vgl.	vergleiche
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
Zea	Zeatin
ZNS	Zentralnervensystem

Zusammenfassung

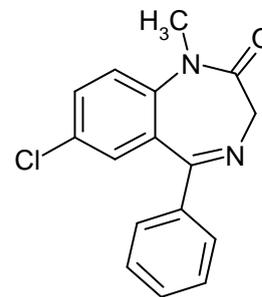
Im Rahmen dieser Arbeit wurden Liganden des zentralen Benzodiazepin-Rezeptors (BZD-R) aus pflanzlichen Geweben untersucht. Der erste Teil war dem Studium „natürlicher“ Benzodiazepine (BZD) gewidmet. Deren Vorkommen ist vielfach belegt; an ihrer Biogenese sind möglicherweise Mikroorganismen beteiligt. Es war nun zu prüfen, ob BZD auch unter Sterilbedingungen, d.h. nach Ausschluss mikrobieller Aktivität auftreten können. Hierzu wurden steril kultivierte pflanzliche Kalli und Regenerate, unter anderem von Kartoffelkraut und Estragon untersucht. Methanolische Extrakte wurden auf ihre Aktivität am zentralen BZD-R im Radiorezeptorbindungsassay (RRA) geprüft und mittels Festphasenextraktion bzw. präparativer HPLC-Fraktionierung gereinigt. Nach erneuter Prüfung im RRA erfolgte die Analyse aktiver Fraktionen mit Hilfe der on-line HPLC-ES_{pos}-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-ES_{pos}-MS/MS) im SRM-Modus. Auf diese Weise gelang es, die BZD Delorazepam und Temazepam in Sterilkulturen von Estragon (*Artemisia dracunculus*), sowie Diazepam und Temazepam in Kartoffelkraut (*Solanum tuberosum*), nachzuweisen.



Delorazepam



Temazepam



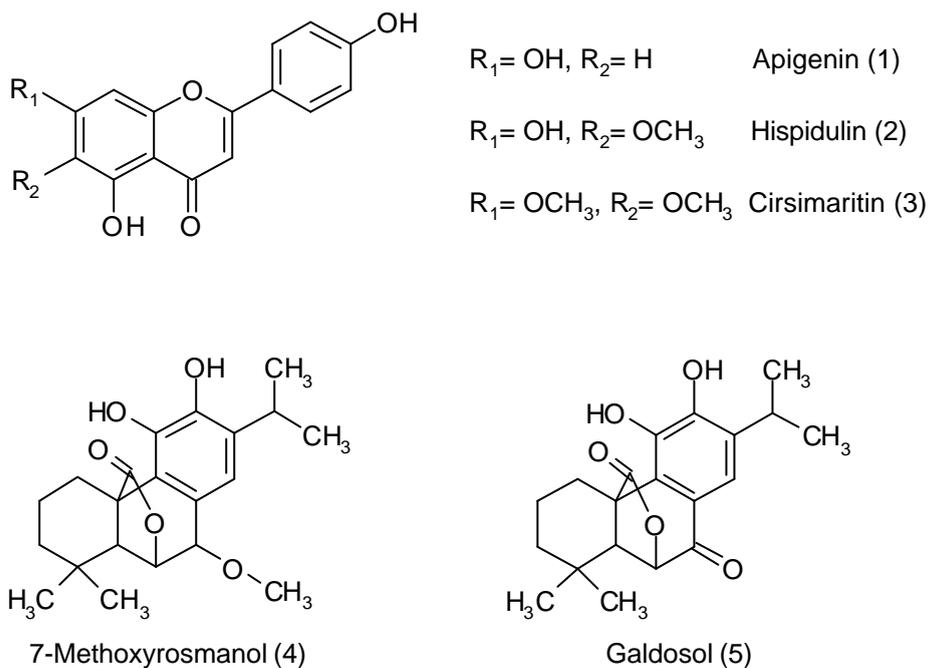
Diazepam

Benzodiazepingehalte von 20-200 ng/g in Estragon (Delorazepam: 100-200 ng/g; Temazepam: 20-30 ng/g) und 60-450 ng/g in Kartoffelkraut (Temazepam: 100-450 ng/g; Diazepam: 60-70 ng/g) wurden ermittelt. Die Identifizierung von BZD in steril kultivierten Kalli und Regeneraten lieferte damit den erstmaligen Beweis für eine *de novo*-Entstehung dieser Verbindungen in pflanzlichem Gewebe.

Der zweite Teil der Arbeit war der Suche nach natürlichen Nicht-BZD-artigen Liganden des BZD-R gewidmet. Hierzu wurden methanolische Extrakte verschiedener in der Volksmedizin als Sedativa und Antikonvulsiva genutzter Pflanzen im RRA auf BZD-R-Aktivität getestet. Die höchsten Aktivitäten zeigten Extrakte aus Salbei (*Salvia*

officinalis), Damiana (*Folia Damianae*)- und Weißdornblättern (*Crataegus*), Grünhafer (*Avena sativa*), Mistel (*Herba visci alba*) und Estragonkraut (*Herba dracunculii*).

Für die Isolierung von Nicht-BZD-artigen Liganden wurde der Salbeiblätterextrakt (*Salvia officinalis* L.) ausgewählt. In einer RRA-begleiteten chromatographischen Fraktionierung des Extraktes wurden fünf aktive Komponenten, drei Flavone und zwei Diterpene, isoliert. Die BZD-R-aktiven Flavone wurden als Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) (1), Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) (2) und Cirsimaritin (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) (3) identifiziert. Bei den diterpenoiden BZD-R-Liganden handelte es sich um 7-Methoxyrosmanol (4) und Galdosol (5). Hispidulin (2) sowie die Diterpene (4) und (5) erwiesen sich mit IC_{50} -Werten von 1.3, 7.2 und 0.8 μ M als die BZD-R-aktivsten Komponenten. Apigenin (1) und Cirsimaritin (3) zeigten mit IC_{50} -Werten von 30 bzw. 350 μ M geringere Affinitäten zum BZD-R.

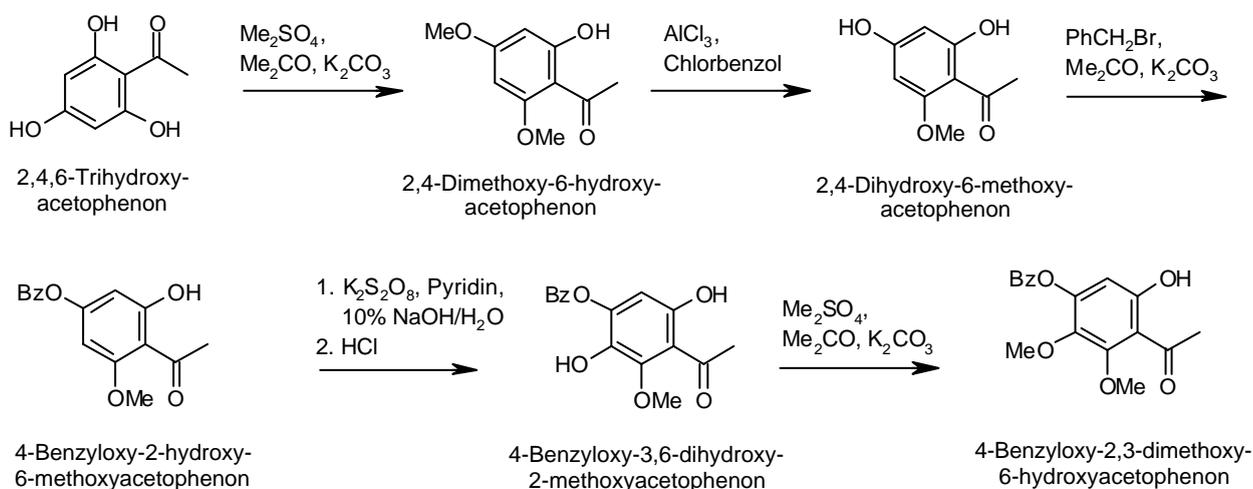


Trotz ihrer hohen strukturellen Ähnlichkeit zeigten die isolierten Flavone starke Unterschiede in der Affinität zum BZD-R. Um die Bindungsstärken von Flavonderivaten zu vergleichen und die für die Bindung am humanen BZD-R günstigsten strukturellen Eigenschaften zu ermitteln, wurden mehrere Flavon- (und vergleichsweise auch Flavonol-, Flavanon- und Isoflavon-Derivate) mittels RRA untersucht und die Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Die Affinität zum Rezeptor ließ sich bei Flavonol-Derivaten weder durch eine Hydroxy-, noch durch eine Methoxygruppe an Position C-3 erhöhen.

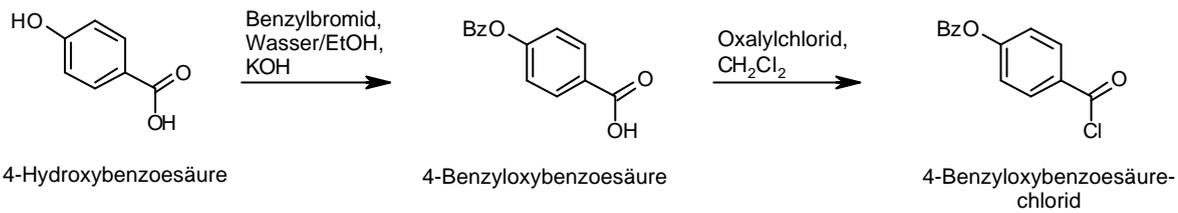
Die untersuchten Flavanone und Isoflavone zeigten keine oder nur sehr geringe Bindungsaktivität ($IC_{50} \geq 0,1$ mM). Die C-6-Methoxylierung bei Flavonen führte zu einer starken Aktivitätszunahme; die Methylierung der Hydroxygruppe an Position C-7 verringerte die Affinität zum BZD-R. Weiterhin wurde der in der Literatur beschriebene, negative Einfluss großer Substituenten an Position C-4' am Beispiel von Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) und Acacetin (5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon) bestätigt.

Die hohe BZD-R-Aktivität von Hispidulin im RRA veranlasste uns, Untersuchungen zum pharmakologischen Profil sowie zur *in vivo*-Wirksamkeit dieser Substanz durchzuführen. Da die Isolierung aus pflanzlichem Material sehr zeit- und materialaufwendig ist, wurde Hispidulin durch chemische Synthese bereitgestellt. Diese erfolgte in Anlehnung an die Baker-Venkataraman-Methode aus 4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon und 4-Benzyloxybenzoesäurechlorid. Die Ausgangssubstanzen wurden in getrennten Syntheserouten, ausgehend von 2,4,6-Trihydroxyacetophenon und 4-Hydroxybenzoesäure, hergestellt. Danach wurde der Benzylester aus dem Acetophenon- und dem Säurechlorid-Baustein gebildet. Der Ester wurde nach Baker-Venkataraman zum 1,3-Diketon in basischem Milieu umgelagert. Das 1,3-Diketon zyklisierte unter Säure- und Hitze einwirkung zum Flavon, das zur gleichzeitigen Entfernung der Schutzgruppen und der labilen C-5-Methylgruppe mit 1 M BCl_3 -Lösung bei etwa -70 °C behandelt worden ist.

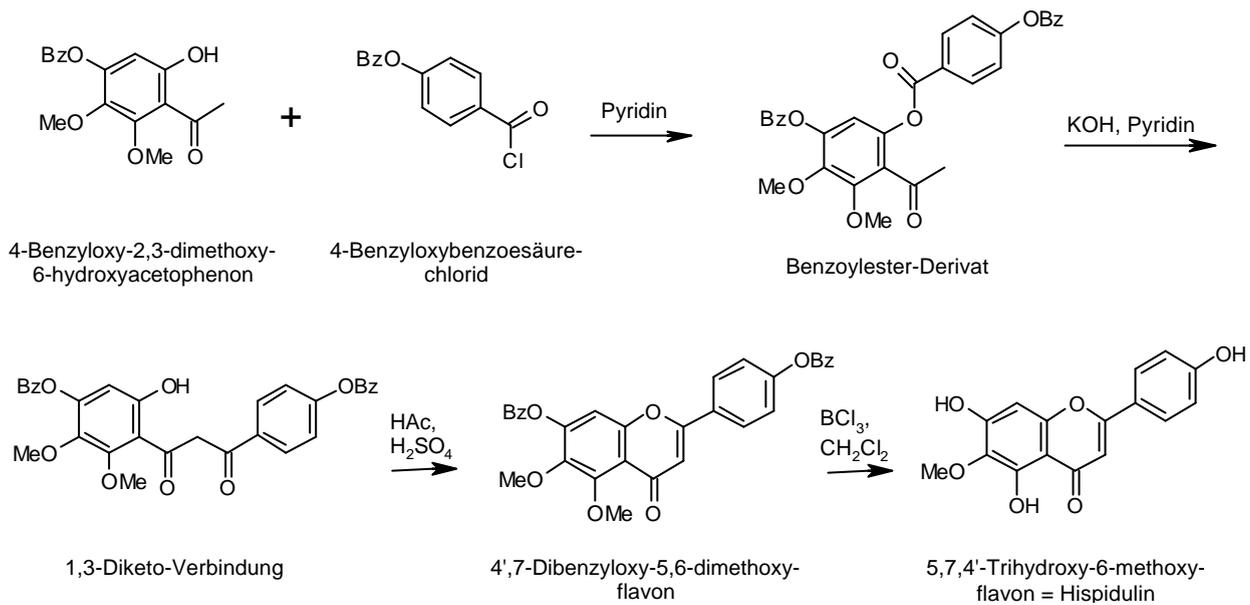
A. Herstellung von 4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon



B. Herstellung von 4-Benzyloxybenzoesäurechlorid



C. Hispidulinsynthese aus dem Acetophenon- und dem Säurechlorid-Baustein



Mit dem chemisch synthetisierten Hispidulin erfolgten Studien zu dessen pharmakologischen Eigenschaften an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren im *Xenopus laevis* Oozyte-Modell. Hispidulin zeigte an allen untersuchten Rezeptor-Subtypen ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$, $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_2\gamma_2$) bereits in Konzentrationen ab 50 nM eine stark positive Stimulation des GABA-induzierten Ionenstromes. Maximale relative Stimulation wurde bei einer Konzentration von 10 μM erreicht, bei der Hispidulin 24 % der maximalen Diazepam-Wirkung aufwies. Da Hispidulin einen mit BZD-Agonisten vergleichbaren, jedoch geringeren Einfluss auf die GABA-induzierten Ströme zeigte, wurde das pharmakologische Profil als partiell agonistisch charakterisiert.

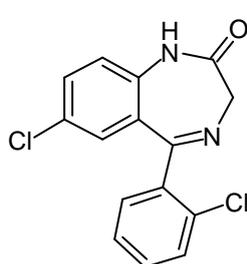
Agonistisch wirkende Substanzen zeigen *in vivo* antiepileptische Effekte. Die weiteren Studien waren daher auf den Nachweis einer *in vivo*-Wirksamkeit von Hispidulin ausgerichtet. Das Modell der Mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil, *Meriones unguiculatus*) ist ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung epileptiformer Krämpfe

und wird eingesetzt, um die Wirkung potentieller Antiepileptika zu untersuchen. Es bot uns die Möglichkeit, erste *in vivo*-Studien mit Hispidulin durchzuführen. Hierzu sind mittelschwere bis schwere Anfälle mit einer Häufigkeit von etwa 90 % induziert worden. Nach siebentägiger Verfütterung von Hispidulin (10 mg/kg KG pro Tag) und Diazepam (2 mg/kg KG pro Tag) (als Positivkontrolle) wurde sowohl in der Hispidulin-, als auch in der Positivkontrollgruppe eine Reduzierung schwerer Anfälle auf 30 bzw. 25 % beobachtet. Hispidulin zeigte *in vivo* eine mit Diazepam vergleichbare antikonvulsive Wirkung und damit das Potential eines möglichen Antiepileptikums.

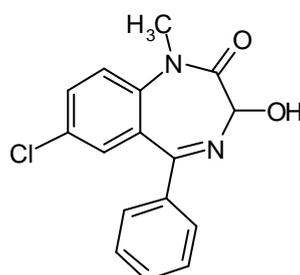
Als Grundlage einer zukünftigen Untersuchung der pharmakokinetischen Verteilung wurde [2-¹⁴C]-Hispidulin nach der Baker-Venkataraman-Methode synthetisiert. Die Radiomarkierung wurde durch Einsatz von ¹⁴C-markiertem Benzoesäurechlorid realisiert, das aus 250 µCi 4-Hydroxy-¹⁴COOH-benzoesäure (spezifische Aktivität: 55 mCi/mmol) erhalten wurde. Das Endprodukt wurde mit einer Gesamtradioaktivität von 9 µCi erhalten und steht mit einer spezifischen Aktivität von 67,5 µCi/mmol (0,225 µCi/mg) für Tierexperimente zur Verfügung.

Summary

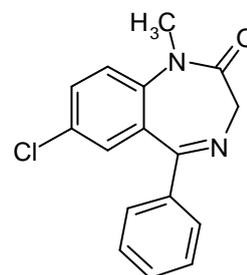
In this study, ligands of the central benzodiazepine receptor (BZD-R) from plant tissues were investigated. The activity of the first part was devoted to investigations of “natural” benzodiazepines (BZD). Their occurrence has been observed in several studies; potentially, microorganisms contribute to their biogenesis. It was the aim of our studies to clarify whether BZD can be formed under sterile conditions, i.e. excluding any microbial activity. Thus, plant cell tissues and cell regenerates of *Solanum tuberosum* and *Artemisia dracunculus*, cultivated under sterile conditions, were checked for their binding affinity to the BZD-R. For this purpose, methanolic extracts were purified by solid phase extraction and preparative HPLC. Fractions with a significant displacing potency in the BZD radio receptor binding assay (RRA) were studied for their content of selected BZD by on-line HPLC-electrospray-tandem mass spectrometry (HPLC-ESI_{pos}-MS/MS) in the ‘selected reaction monitoring’ (SRM) mode. Using this technique, delorazepam and temazepam were found in the extract of *Artemisia dracunculus* cell tissue, whereas *Solanum tuberosum* herb contained diazepam and temazepam.



delorazepam



temazepam

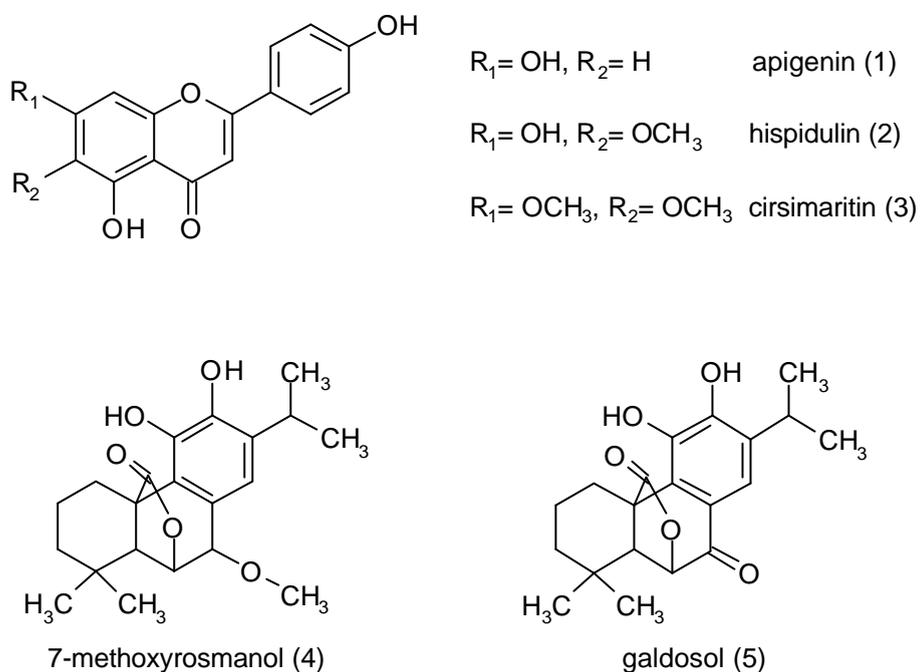


diazepam

BZD contents ranging from 20 to 200 ng/g in *Artemisia dracunculus* (delorazepam: 100-200 ng/g; temazepam: 20-30 ng/g) and from 60 to 450 ng/g in *Solanum tuberosum* (temazepam: 100-450 ng/g; diazepam: 60-70 ng/g) were found. Our experiments therefore provide the first evidence for *de novo* formation of BZD in plant tissue.

The second part of our work comprised studies on novel natural non-BZD-like ligands of the BZD-R. Thus, methanolic extracts from several plant species were screened for their activity in the RRA. We focused our interest on plants which are known for their sedative and anticonvulsive effects and, thus used in folkloric medicine. High affinities were observed in methanolic extracts from leaves of *Salvia officinalis*, *Folia damiana*, *Crataegus*, *Avena sativa*, *Herba visci albi* and *Herba dracunculi*.

The extract from *Salvia officinalis* L. was chosen for subsequent RRA guided analyses. After several chromatographic purification steps, three flavones and two abietane diterpenes functioning as BZD-R active components were separated. The BZD-R active flavones were identified as apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone) (1), hispidulin (5,7,4'-trihydroxy-6-methoxyflavone) (2) and cirsimaritin (5,4'-dihydroxy-6,7-dimethoxyflavone) (3). The two diterpenes were characterized as 7-methoxyrosmanol (4) and galdosol (5). Hispidulin (2), 7-methoxyrosmanol (4) and galdosol (5) showed the strongest binding activities to the BZD-R with IC_{50} values of 1.3, 7.2 and 0.8 μ M, respectively. The affinities measured for apigenin (1) and cirsimaritin (3) were lower, revealing IC_{50} values of 30 and 350 μ M, respectively.

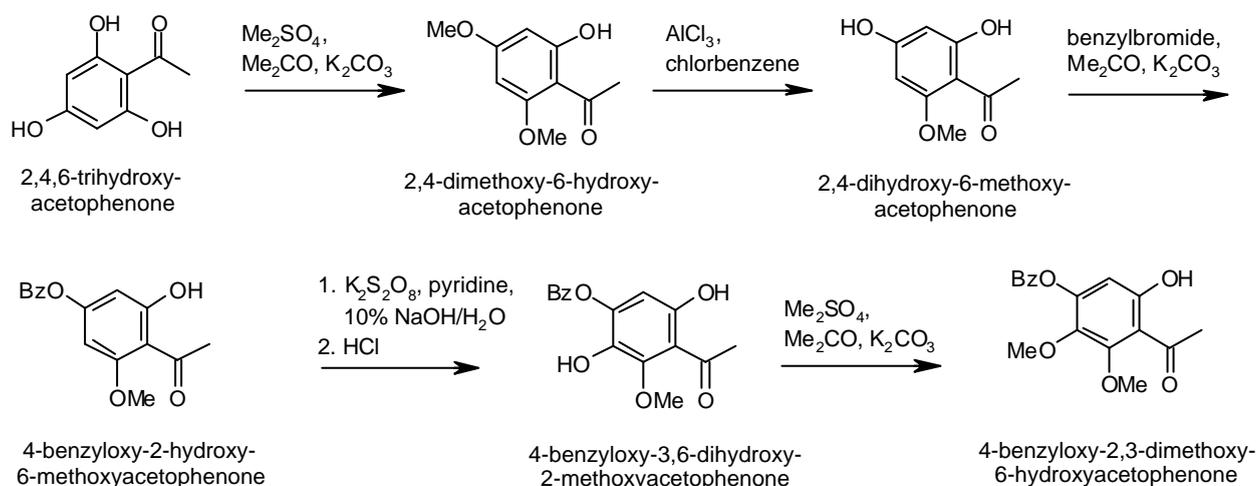


Despite their high structural similarity, the isolated flavones showed remarkable differences in their affinity to the BZD-R. In order to compare the binding activities of flavone derivatives and to investigate the linkage between structural properties and binding activities, we studied several flavones (and flavonol, flavanone as well as isoflavone derivatives) in the RRA, and subsequently, compared the results with literature data. Neither an hydroxy nor a methoxy group at position C-3 increased the affinity of flavonol derivatives to the receptor. The flavanones and isoflavones under study showed no detectable or very low binding activities ($IC_{50} \geq 0,1$ mM). Methoxylation of flavones at position C-6 led to a high increase of activity; methylation of the hydroxy group at position C-7 decreased the binding affinity to the BZD-R. The examples of apigenin (5,7,4'-trihydroxyflavone) and acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone)

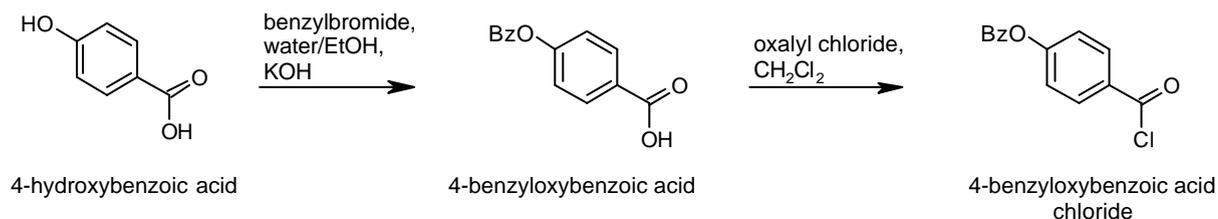
confirmed the negative influence of large groups at position C-4' as described in the literature.

The high BZD-R activity of hispidulin in the RRA prompted us to investigate its pharmacological profile and *in vivo* efficiency. As the isolation from plant material is very time- and material-consuming, we provided hispidulin by chemical synthesis. This was realized in accordance with the method of Baker-Venkataraman, starting with 4-benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenone and 4-benzyloxybenzoic acid chloride. Reactants were prepared in separate routes from 2,4,6-trihydroxyacetophenone and 4-hydroxybenzoic acid, respectively. The benzoyl ester was built from the acetophenone and acid chloride component and rearranged to the corresponding 1,3-diketone under basic conditions. The 1,3-diketone cyclized to the flavone in the presence of acid and heat. In the last step, the protection groups and the labile C-5-methoxy group were removed by reaction with 1 M BCl_3 solution at $-70\text{ }^\circ\text{C}$.

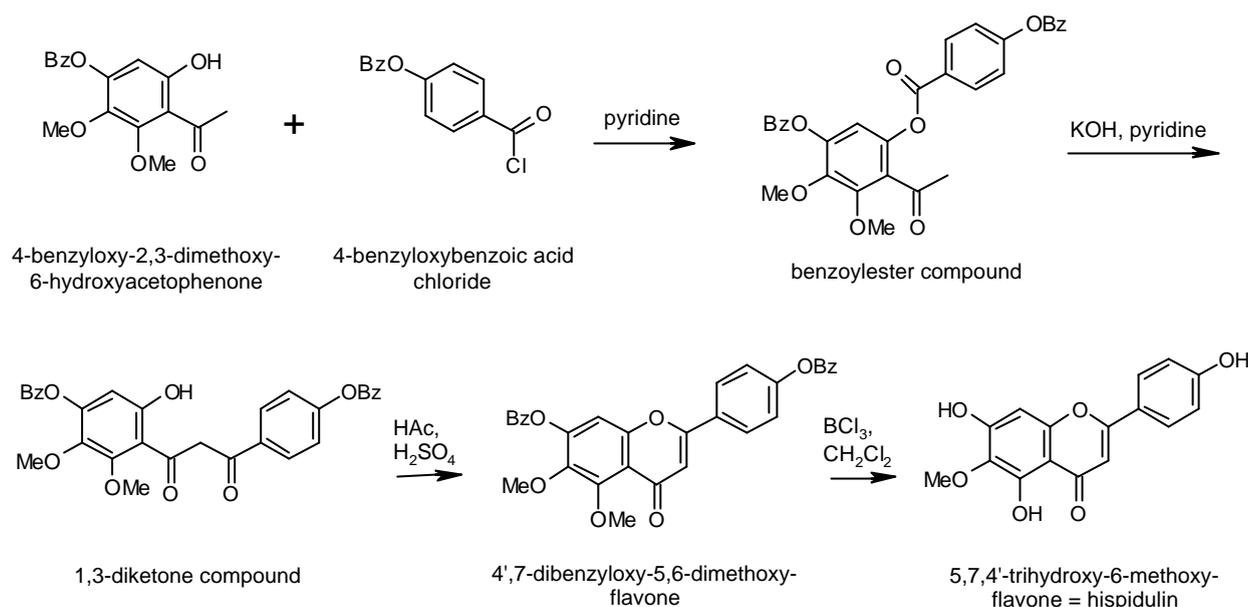
A. Preparation of 4-benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenone



B. Preparation of 4-benzyloxybenzoic acid chloride



C. Hispidulin synthesis from acetophenone and acid chloride compound



Chemically synthesized hispidulin was investigated for its pharmacological properties with recombinant GABA_A receptors in the *Xenopus laevis* oocyte model. Substance concentrations of 50 nM and higher strongly stimulated the GABA-induced chloride ion influx at all receptor subtypes ($\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$, $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ and $\alpha_6\beta_2\gamma_2$). Maximum relative stimulation was achieved with 10 μM hispidulin. At this concentration, hispidulin showed 24 % of the maximum diazepam efficiency. Hispidulin therefore showed positive modulation of the GABA_A receptor with lower efficiency compared to BZD. The pharmacological profile was thus characterized as partially agonistic.

Consequently, further studies were focused on the *in vivo* efficacy of hispidulin. BZD agonists show antiepileptic effects *in vivo*. The mongolian gerbil model (*Meriones unguiculatus*) is a natural animal model to investigate epileptic seizures and effects of potential antiepileptics. It provided the possibility for a first *in vivo* experiment with hispidulin to simultaneously detect its biological relevance and *in vivo* efficiency. Strong seizures were induced in about 90 % of the animals. After oral application of hispidulin (10 mg/kg body weight per day; test group) and diazepam (2 mg/kg body weight per day; positive control group) for seven days, both groups showed reduction of strong seizures to 30 and 25 %, respectively. Hispidulin revealed anticonvulsive *in vivo* effects, which were comparable to diazepam. It therefore exhibits the potential of a putative antiepileptic drug.

To determine in future its pharmacokinetic distribution, [2-¹⁴C]-labelled hispidulin was synthesized according to the method of Baker-Venkataraman. Radio-labelling was realized by introducing ¹⁴C-labelled benzoic acid chloride, which was obtained from 250 μCi 4-hydroxy-¹⁴COOH-benzoic acid (specific activity: 55 mCi/mmol). The total activity of the product was 9 μCi. Thus, it can be used for animal experiments with a specific activity of 67,5 μCi/mmol.

1 Einleitung

Die enorme Leistungsfähigkeit seines Gehirns versetzt den Menschen in die Lage, Vorgänge in der Umwelt zu erkennen und zu beeinflussen. Aufgebaut ist das menschliche Gehirn aus unzähligen Nervenzellen, den sogenannten Neuronen. Diese Zellen verarbeiten in komplexen Kommunikationsprozessen eine Vielzahl von Informationen, psychische und physische Bedürfnisse, Emotionen und andere mentale Vorgänge. Die interneuronale Kommunikation erfolgt dabei vorwiegend an hoch spezialisierten Kontaktstellen, die als chemische Synapsen bezeichnet werden. Für die Signalübertragung sind vor allem Neurotransmitter zuständig, die von der präsynaptischen Zelle aus Vesikeln ausgeschüttet werden und durch Bindung an spezielle Rezeptoren ein Signal an die postsynaptische Zelle weitergeben (Dieck und Gundelfinger, 1999).

Im Zentralnervensystem (ZNS) existieren verschiedene Neurotransmitter, die als Liganden an dazugehörige Rezeptoren binden. Sind diese Rezeptoren integrale Bestandteile von Kanalproteinen, führt die Ligand-Rezeptor-Bindung zu einer schnellen Öffnung von Ionenkanälen und zu einer schnellen Signalübertragung. Bei den schnellen Neurotransmitter/Rezeptor-Systemen unterscheidet man zwischen aktivierend bzw. erregend wirkenden und inhibitorisch bzw. hemmend wirkenden Systemen.

Der Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (GABA), das Decarboxylierungsprodukt von Glutaminsäure, wirkt in etwa einem Drittel aller Synapsen und ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im ZNS der Vertebraten (Teuber *et al.*, 1999; Smith, 2001). Er bindet an Chloridionenkanal-regulierende Rezeptoren des GABA_A-Rezeptortyps, die hauptsächlich in den GABA-Synapsen vorkommen. Das GABA-erge System sorgt hier für eine schnelle synaptische Inhibierung. Es spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der neuronalen Erregbarkeit.

Die GABA-erge Inhibierung hat eine enorme physiologische Bedeutung. Eine zentrale Blockierung dieses Systems mit geeigneten Agenzien kann zu Nervosität, Angstzuständen, Konvulsionen oder im Extremfall zum Tod führen. Es zeigt sich, dass die Aufrechterhaltung eines Gleichgewichts zwischen erregenden und hemmenden Signalen, u.a. für Mechanismen, die der Angst, dem Schlaf und dem Gedächtnis zugrunde liegen, von essentieller Bedeutung ist (Hevers und Lüddens, 1998). Das GABA-erge System beeinflusst ferner Appetit, Blutdruck, Herzrate, Temperatúrausgleich, Lokomo-

tion, Muskelrelaxation, Stress sowie die Reaktion auf Alkohol und andere zentralnervös wirksame Substanzen (Hevers und Lüddens, 1998; Smith, 2001).

Eine Reihe von klinischen Erkrankungen wie Epilepsie, Angst, Schlafstörungen und Alkoholismus, werden mit der Funktion des GABA_A- und speziell des Benzodiazepin-Rezeptors (BZD-R) in Verbindung gebracht (Hevers und Lüddens, 1998; Smith, 2001). Der BZD-R gehört zu den am intensivsten untersuchten modulatorischen Bindungsstellen innerhalb des GABA_A-Rezeptorkomplexes. Von besonderem Interesse sind neben strukturellen Eigenschaften endogene Liganden dieses Rezeptors. Man hat vermutet, dass endogen nachgewiesene Benzodiazepine (BZD), die als Agonisten des BZD-R inhibierende Mechanismen verstärken, die Entwicklung von Angst, Epilepsie und Konzentrationsschwächen beeinflussen können (Sand *et al.*, 2000). Da aber die endogene Bildung dieser Verbindungen bis jetzt nicht bewiesen wurde und diese Stoffe auch in Nahrungspflanzen gefunden wurden, wird angenommen, dass sie über die Nahrungskette in den menschlichen Organismus gelangen (Wildmann *et al.*, 1987; Unseld *et al.*, 1989; Graf, 1990; Klotz, 1991; Grassi *et al.*, 1998; Kavvadias *et al.*, 2000).

Angsterkrankungen gehören zu den häufigsten psychischen Störungen. Neben psychosozialen Problemen verursachen sie hohe ökonomische Schäden. Man unterscheidet verschiedene Formen der Angststörungen: generalisierte Angsterkrankungen, Panikstörungen, Phobien und posttraumatische Stresserkrankungen (Rudolph und Möhler, 2000). Die neuronalen Mechanismen, die pathologischen Angstzuständen zugrunde liegen, sind nur im Ansatz bekannt (Rudolph und Möhler, 2000). Vermutet wird eine Beeinträchtigung der hemmenden Neurotransmission durch GABA (Rudolph und Möhler, 2000). In der letzten Dekade konnten Fortschritte in der Molekularbiologie wesentlich zum Verständnis der Pharmakologie des BZD-R beitragen (Teuber *et al.*, 1999). Damit wurde die Grundlage für die Entwicklung von selektiv wirkenden, hochaktiven Arzneimitteln geschaffen. In der klinischen Therapie von Angsterkrankungen spielen Arzneimittel aus der BZD-Gruppe, die ihre Wirkung durch Bindung an den BZD-R ausüben, eine herausragende Rolle. Trotz der guten therapeutischen Einsatzmöglichkeiten der BZD konzentriert sich die aktuelle Forschung darauf, neue, selektive Wirkstoffe zu finden. Hintergründe sind das Suchtpotential sowie das breite Wirkungs- und damit auch Nebenwirkungsspektrum der BZD. Gefragt sind vor allem angstlösende oder antikonvulsive Eigenschaften eines partiellen Agonisten, um Angsterkrankungen bzw. Epilepsien ohne sedative und muskelrelaxierende Nebenwirkungen besser behandeln zu können (Kunovac und Stahl, 1995; Teuber *et al.*, 1999).

Der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung natürlicher BZD wird zunehmend Aufmerksamkeit geschenkt (Sand *et al.*, 2000). In diesem Zusammenhang interessiert besonders die Frage ihres natürlichen Vorkommens und ihrer Herkunft. Ein Ziel dieser Arbeit war es, die *de novo*-Synthese von BZD in Pflanzen zu belegen und eine mikrobielle Beteiligung hierbei auszuschließen. Der Nachweis sollte mittels instrumentell-analytischer Methoden durch Detektion relevanter BZD in steril kultivierten Pflanzenproben erbracht werden.

Neben den BZD sind auch einige Nicht-BZD-artige Liganden des BZD-R bekannt, z.B. β -Carboline und Flavone. Vor dem Hintergrund möglicher klinischer Anwendungen war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, neue pflanzliche Wirkstoffe zu isolieren und ihre Eigenschaften mit Hilfe von *in vitro*- und *in vivo*-Modellen zu untersuchen.

2 Kenntnisstand

2.1 Therapeutischer Einsatz, Chemie und Wirkungsmechanismus der Benzodiazepine

Substanzen mit dämpfender Wirkung auf das ZNS besitzen unterschiedliche chemische Strukturen. Trotz ihrer strukturellen Vielfalt besitzen sie die gemeinsame Eigenschaft, die Aktivitäten im ZNS zu dämpfen und dadurch dosisabhängig Angstlösung, Sedierung, Schlaf, Bewusstlosigkeit, Narkose und sogar Koma zu erzeugen (Julien, 1997). Man teilt sie in fünf Gruppen ein: Barbiturate, Nicht-Barbiturat-Schlafmittel, Narkosemittel, Ethanol und Benzodiazepine (Abb. 1).

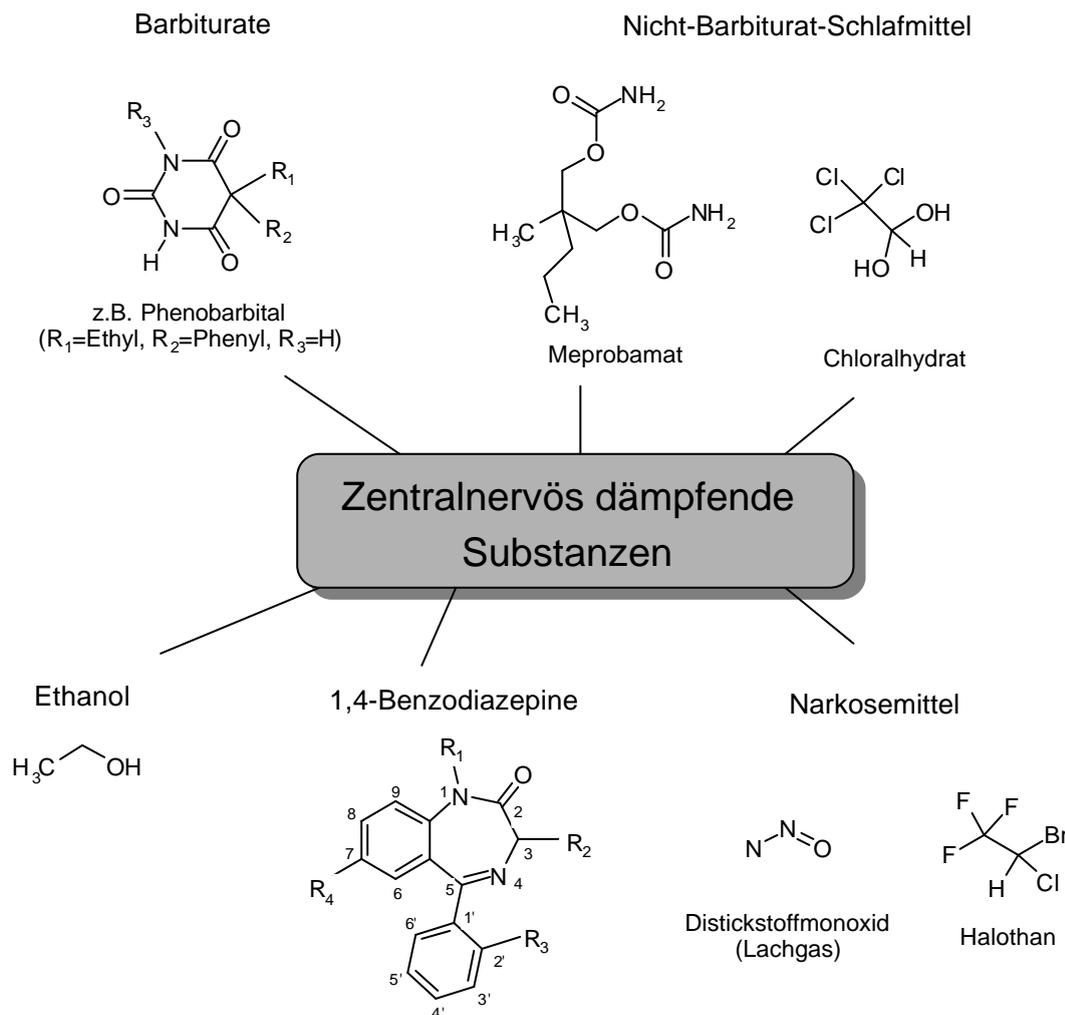
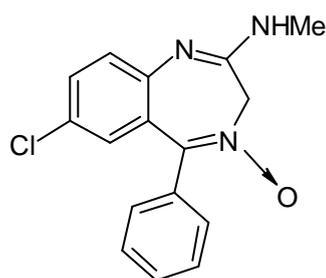


Abb. 1 Zentralnervös dämpfende Substanzen, Einteilung nach Julien (1997)

Die Barbiturate stellten von 1912 bis etwa 1960 das Fundament der Therapie von Angst- und Schlafstörungen dar. In dieser Zeit kam es zu zahlreichen Todesfällen wegen falscher Dosierung, verbreiteter Abhängigkeit, häufigem Missbrauch und schweren Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und in Verbindung mit übermäßigem Alkoholkonsum. Die Gruppe der Nicht-Barbiturat-Schlafmittel beinhaltet einige Vertreter aus der Gruppe der Carbaminsäureester (z.B. Meprobamat) und der Aldehyde (z.B. Chloralhydrat). Die fehlende selektive ZNS-Wirkung und die bereits erwähnten Nachteile der Barbiturattherapie führten dazu, dass die Anwendung von Barbituraten und Nicht-Barbiturat-Sedativa in den letzten Jahren stark zurückgegangen ist (Julien, 1997).

Benzodiazepine (BZD) werden als Anxiolytika (Tranquilizer) der „zweiten Generation“ bezeichnet (Julien, 1997). Sie zählen zu den am häufigsten verordneten Psychopharmaka und gelten als Therapeutika der Wahl, wenn es um die Behandlung von akuten Angstzuständen geht. Dabei handelt es sich nicht um die „normale“ Angst, die zu unserem täglichen Leben gehört, sondern um Angstzustände, die den Menschen ohne erkennbaren Anlass überwältigen und so zur Erkrankung werden. Die Geschichte der BZD begann mit ihrer erstmaligen Synthese im Jahre 1957 durch den Schweizer Chemiker L. Sternbach. Nach der Einführung von Librium[®] (Chlordiazepoxid) im Jahre 1960 hat Ihr Einsatz, hauptsächlich in Form von anxiolytischen (angstlösenden), antiepileptischen, hypnotischen, antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Medikamenten, rasch zugenommen.

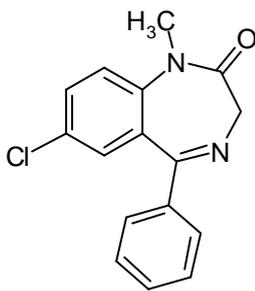


Chlordiazepoxid (Librium[®])

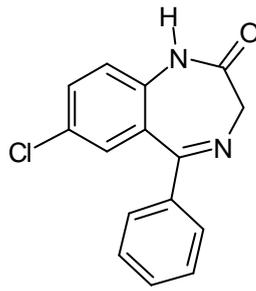
Im Laufe der Jahre wurden viele Varianten mit dem strukturellen Grundprinzip der Entdeckung Sternbachs erarbeitet. Sie sind charakterisiert durch ein kondensiertes Ringsystem aus einem Benzolring und einem zwei N-Atome enthaltenden Siebenring. Ihre Wirkung ist an den intakten Siebenring, der mit einem aromatischen Ring kondensiert ist, sowie an die Lactam-Struktur gebunden (Mutschler, 1996). Dabei kann der Benzolring durch einen Thiophenring ersetzt werden. Anstelle des Benzolringes in

5-Stellung kann ein Pyridylrest eingesetzt werden (Auterhoff *et al.*, 1999). Die meisten als Arzneimittel eingesetzten BZD (Abb. 2) leiten sich von Diazepam bzw. von dessen Metabolit, dem N-Desmethyldiazepam (N-DD), ab und werden je nach ihrer Halbwertszeit (HWZ) oder der HWZ ihres aktiven Metaboliten in lang wirksame (HWZ > 24 h), mittellang wirksame (HWZ = 5-24 h) und kurz wirksame BZD (HWZ < 5 h) eingeteilt (Julien, 1997; Auterhoff *et al.*, 1999).

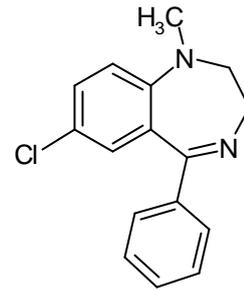
Lang wirksame Benzodiazepine



Diazepam (Valium®)

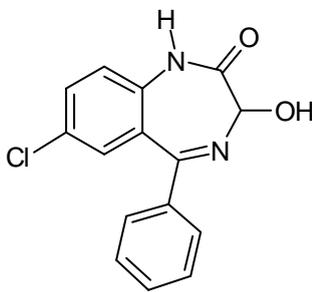


N-Desmethyldiazepam (N-DD)

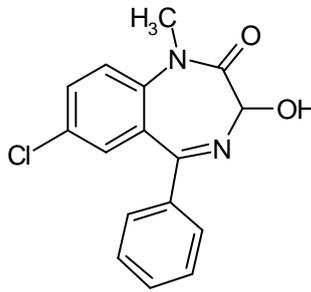


Medazepam (Rudotel®)

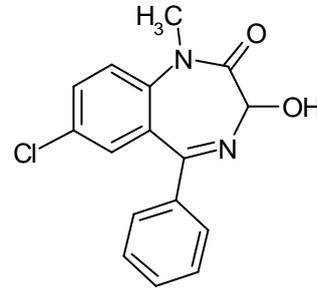
Mittellang wirksame Benzodiazepine



Oxazepam (Adumbran®)

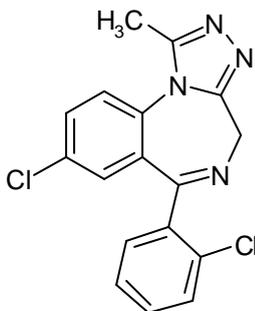


Temazepam (Neodorm®)

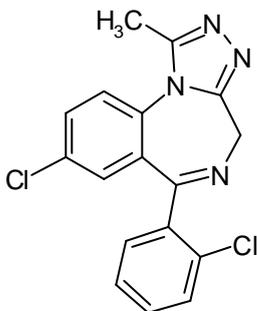


Lorazepam (Tavor®)

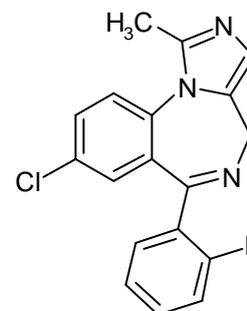
Kurz wirksame Benzodiazepine



Alprazolam (Tafil®)



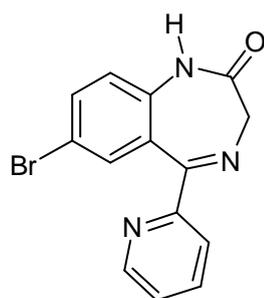
Triazolam (Halcion®)



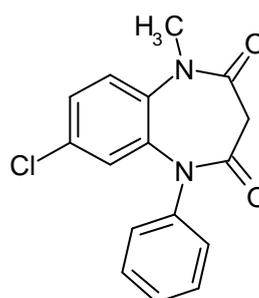
Midazolam (Dormicum®)

Abb. 2 Strukturen einiger 1,4-Benzodiazepine (Julien, 1997; Roth und Fenner, 2000)

Aus den Strukturen der eingesetzten BZD wird deutlich, dass nur geringfügige Änderungen am Molekül vorgenommen wurden. Zu den Ausnahmen gehören BZD der Triazolo- (Triazolam, Alprazolam) und Imidazo-Gruppe (Midazolam), bei denen ein zusätzlicher Ring eingeführt wurde (Abb. 2). Im Bromazepam wurde der übliche Phenylrest durch einen Pyridyl-Rest ersetzt. Clobazam ist das einzige 1,5-Benzodiazepin, das analoge Wirkung zu den 1,4-Benzodiazepinen aufweist (Mutschler, 1996).



Bromazepam (Durazaniil®)



Clobazam (Frisium®)

Substanzen der BZD-Gruppe sind meist stark lipophile Verbindungen mit niedriger Molekularmasse (200-300 g/mol). Als Feststoffe lassen sie sich gut in lipophilen bis polaren organischen Lösungsmitteln wie Methanol oder Ethanol lösen. Die verwendeten Benzodiazepine werden häufig als Basen eingesetzt. Nach oraler Verabreichung werden sie schnell und gut resorbiert. Höchstkonzentrationen im Plasma werden bereits nach einer bis zwei Stunden erreicht (Forth *et al.*, 1996). Diese allgemein gut verträgliche Substanzgruppe erreicht aufgrund ihrer guten Lipidlöslichkeit schnell das Gehirn und wirkt schon in sehr geringen Dosen ab 0,1 mg (Oelschläger, 1988). BZD entfalten ihre Wirkung durch Bindung an eine spezifische Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor, den Benzodiazepin-Rezeptor (BZD-R). Die Funktion des BZD-R sowie der Wirkungsmechanismus der BZD werden in den Abschnitten 2.2 und 2.3 beschrieben.

Die meisten lang wirksamen BZD (z.B. Diazepam) werden in der Leber oxidativ am Stickstoff dealkyliert (z.B. zu N-DD) und nachfolgend in 3-Stellung hydroxyliert (z.B. zu Oxazepam). Durch Konjugation an Glucuronsäure werden die hydroxylierten Verbindungen inaktiviert und über die Niere ausgeschieden (Forth *et al.*, 1996). Die entstehenden Metabolite N-DD, Temazepam und Oxazepam sind noch pharmakologisch wirksam und haben ähnliche Wirkungen wie die Ausgangssubstanzen. Vor allem das N-DD kann aufgrund seiner langen HWZ (30-90 h) im Körper akkumulieren und über einen längeren Zeitraum wirken. Es ist bekannt, dass mit zunehmendem Lebensalter die Halbwertszeiten von nicht-hydroxylierten Verbindungen sogar noch weiter ansteigen.

Kurz wirksame BZD (z.B. Triazolam) werden dagegen direkt zu unwirksamen Produkten abgebaut (Mutschler, 1996).

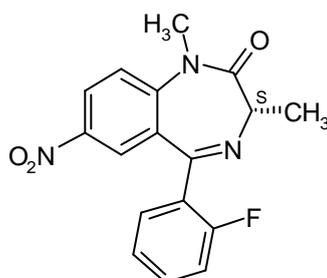
BZD zeigen *in vivo* vielfältige Aktivitäten. Alle BZD wirken anxiolytisch, antikonvulsiv, muskelrelaxierend und sedierend (Auterhoff *et al.*, 1999). Je nach Wirkstoff tritt die eine oder andere Wirkung mehr oder weniger in Erscheinung. Entsprechend ihrer überwiegenden pharmakotherapeutischen Wirkung werden sie deshalb für verschiedene Indikationen empfohlen. So werden Oxazepam und Lorazepam als mittellang wirkende Anxiolytika eingesetzt. Diazepam, Chlordiazepoxid, Medazepam und N-DD gelten dagegen als lang wirkende Tranquillanzien. Panikattacken und Phobien werden häufig mit Alprazolam behandelt (Julien, 1997). Während Diazepam und Lorazepam als Antikonvulsiva bei der Therapie von Epilepsie Anwendung finden, wird Triazolam als Hypnotikum eingesetzt (Roth und Fenner, 2000). Leider ist es nicht möglich, von den erwähnten Wirkungen selektiv zu profitieren. In der Angst- und Epilepsitherapie ist dosisabhängig zugleich mit Koordinationsstörungen (Ataxie) und Sedierung zu rechnen. Weiterhin zählen Konzentrationsschwächung, Verstärkung von Alkohol- und Barbiturat-effekten, die bei chronischer Gabe entstehende Toleranzentwicklung und das vielfach dramatisierte Suchtpotential nach langer Einnahme hoher Dosen zu den limitierenden Faktoren der Anwendung von BZD (Teuber *et al.*, 1999).

Mehr als 20 verschiedene BZD werden klinisch angewendet (Julien, 1997). Die Vorteile der BZD liegen in ihrer robusten therapeutischen Wirkung bei gleichzeitiger niedriger Toxizität (Teuber *et al.*, 1999). Rund 38 Millionen Packungen Schlaf- und Beruhigungsmittel wurden in Deutschland im Jahr 1999 verkauft. Etwa 65 % aller Tagesdosierungen von rezeptpflichtigen Schlafmitteln entfallen auf BZD (Glaeske, 2001). Ihr Marktanteil lag damit im Jahr 1999 bei etwa 4 % aller verordneten Schlafmittel und Tranquilizer (Glaeske, 2001).

2.2 Eigenschaften, Aufbau und Wirkmechanismus des GABA_A-Rezeptorkomplexes

Im Jahre 1975 wurde erstmals vermutet, dass Benzodiazepine (BZD) durch positive Modulation der GABA-ergen Inhibierung im ZNS wirken (Haefely *et al.*, 1975). Der erste Einblick in die Wirkungsweise dieser Substanzen gelang zwei Jahre später, als die Existenz des Benzodiazepin-Rezeptors (BZD-R), einer hochspezifischen Bindungsstelle

für ^3H -Benzodiazepine im ZNS von Wirbeltieren gezeigt wurde (Möhler und Okada, 1977; Braestrup und Squires, 1977). Eine besonders hohe Dichte an BZD-R konnte im cerebralen Kortex, Hypothalamus, Cerebellum, Mittelhirn, Hippocampus und im Striatum nachgewiesen werden (Möhler und Okada, 1977). Mit Hilfe markierter Modellsubstanzen (B10(+)-Ro 11-6896 und B10(-)-Ro 11-6893) hat man nachgewiesen, dass die Bindung an den Rezeptor stereoselektiv vonstatten geht (Deutsch *et al.*, 1987).



B10(+)-Ro 11-6896
(BZD-R-aktives Enantiomer)

Nachdem der BZD-R bereits 1985 von Haefely und Mitarbeitern mittels monoklonaler Antikörper identifiziert und eine gleichzeitige Bindung von BZD und GABA am isolierten Protein festgestellt worden war, wurde eine enge Kopplung der BZD-Bindungsstelle mit dem GABA_A -Rezeptor postuliert (Haefely *et al.*, 1985). In der Folge wurde die allosterische Kopplung der drei Komponenten, des Chloridionenkanals, des GABA_A - und des BZD-Rezeptors, in einem gemeinsamen Komplex nachgewiesen und als GABA_A/BZD -Rezeptor bezeichnet (Chang *et al.*, 1981; Olsen, 1981; Sigel und Barnard, 1984).

Später wurde festgestellt, dass der Rezeptorkomplex eine pentamere Struktur besitzt und aus transmembranen Untereinheiten, einem zentralen Chloridionen- (Cl^-) -Kanal (Abb. 3) und mehreren Bindungsstellen, u.a. für GABA, BZD und Barbiturate, besteht (Olsen und Tobin, 1990). Als Ergebnis zahlreicher Bindungsstudien sind mittlerweile zehn weitere Bindungsstellen beschrieben worden, welche die Funktion des Cl^- -Kanals modulieren können. Der Rezeptorkomplex besitzt demzufolge weitere Bindungsstellen für Ethanol, Steroide, Anästhetika, Furosemide, Zink und Picrotoxine (Johnston, 1996; Barnard *et al.*, 1998). Viele dieser Bindungsstellen wurden durch Punktmutationsstudien lokalisiert.

Die fünf Untereinheiten bilden zusammen eine rosettenartige Struktur. Die beteiligten Proteine weisen dabei regional unterschiedliche Expressionsmuster auf. Jede der fünf Rezeptoruntereinheiten besteht aus vier helikalen transmembranen Domänen, aus einer extrazellulären, großen, hydrophilen N-terminalen und einer ebenfalls extrazellu-

lären, aber kurzen C-terminalen Region. Jede zweite der transmembranen Domänen trägt zur Ausbildung des Cl^- -Kanals bei (Hevers und Lüddens, 1998; Teuber *et al.*, 1999).

Die Bindung von GABA führt zur Öffnung des Kanals und somit zu einem gesteigerten Cl^- -Fluss. Abhängig von dem jeweiligen transmembranen Cl^- -Gradienten und dem vorliegenden Membranpotential, kann der Cl^- -Fluss in die Zelle oder aus der Zelle erfolgen. In einigen (seltenen) Fällen wird eine erregende Wirkung von GABA durch Depolarisierung der Membran beobachtet. Am häufigsten kommt es jedoch zu einem Cl^- -Einstrom in die Zelle und somit zur Hyperpolarisierung der Membran. Die Folge ist eine reduzierte neuronale Erregbarkeit (Barnard *et al.*, 1998).

2.3 Liganden des BZD-R und ihre pharmakologischen Profile

Die Liganden der BZD-Bindungsstelle wirken als positive allosterische Modulatoren (Agonisten, z.B. Diazepam) und verstärken die Wirkung von GABA. Andererseits können sie als negative allosterische Modulatoren (inverse Agonisten, z.B. DMCM) die GABA-Wirkung abschwächen. Beide Effekte werden durch neutrale allosterische Modulatoren (Antagonisten, z.B. Flumazenil = Ro 15-1788) aufgehoben. Diese besetzen die Rezeptoren, ohne Einfluss auf die GABA-induzierten Ströme zu nehmen (Abb. 3) (Johnston, 1996).

BZD wirken als Agonisten des BZD-R. Ihre Bindung führt, mechanistisch betrachtet, zu einer allosterischen Modifikation des gesamten Komplexes und zu einer erhöhten Öffnungsfrequenz der Cl^- -Kanäle sowie einem größeren Cl^- -Einstrom in die postsynaptische Zelle (Abb. 3). Die Hyperpolarisierung der Membran wird verstärkt und die Signalübertragung und Erregbarkeit der Neuronen vermindert. Die alleinige Bindung von BZD vermag jedoch den Cl^- -Kanal nicht zu öffnen. Die BZD-R-vermittelte Wirkung wird demnach nur in Verbindung mit der GABA-Bindung eintreten. Aus diesem Grund sind die beobachteten Änderungen im GABA-induzierten Cl^- -Strom ein Maß für die Wirkungsstärke der BZD-R-Liganden.

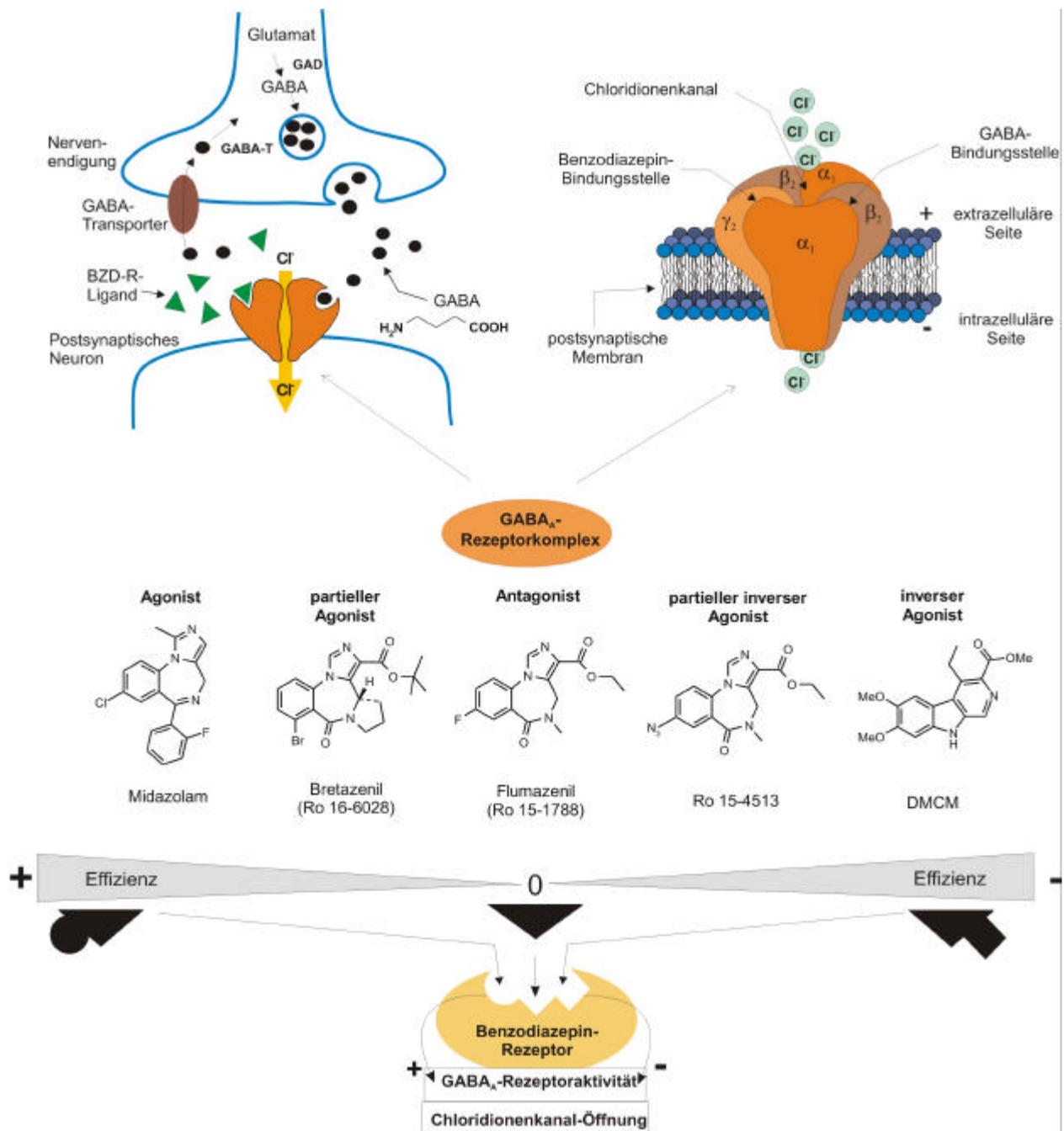


Abb. 3 Schema einer γ -Aminobuttersäure (GABA)-ergen Synapse mit dem GABA_A-Rezeptor-Komplex und Darstellung des Ligandenspektrums der Benzodiazepin (BZD)-Bindungsstelle (Johnston, 1996; Barnard *et al.*, 1998)

Haefely und Mitarbeiter konnten bereits die am BZD-R angreifenden Wirkstoffe in Agonisten, Antagonisten und inverse Agonisten differenzieren (Haefely *et al.*, 1985). BZD-R-Agonisten wirken u.a. anxiolytisch und antikonvulsiv, inverse Agonisten dagegen anxiogenisch, prokonvulsiv, promnestisch und stimulierend. Stoffe mit Wirkun-

gen von anxiolytisch, sedativ, über muskelrelaxierend, antikonvulsiv bis amnestisch gelten als reine Agonisten. Zu den typischen reinen Agonisten zählen Chlordiazepoxid, Diazepam, Lorazepam, Alprazolam und andere klassische BZD. Im Bezug auf die Wechselwirkungen mit dem Rezeptor zeigen reine Agonisten eine maximale positive modulatorische Aktivität, d.h. maximale Rezeptoraktivierung, bezogen auf die Rezeptorbesetzung. So konnte für Diazepam eine 25 %-ige Steigerung des Cl^- -Stroms bei einer 35 %-igen Rezeptorbesetzung beobachtet werden (Teuber *et al.*, 1999).

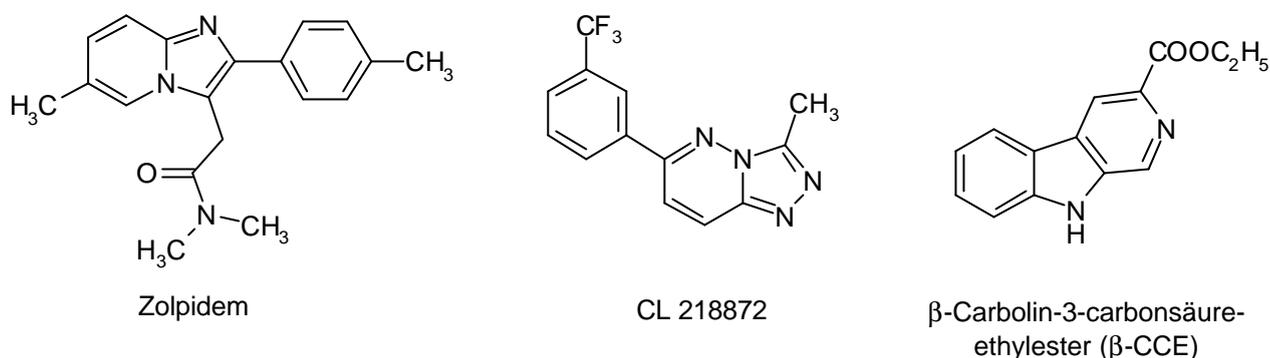
Das therapeutische Potential inverser Agonisten ist, mit Ausnahme der Therapie von Gedächtnisstörungen (z.B. Alzheimer Demenz), weniger gefragt, als das der partiellen Agonisten (Kunovac und Stahl, 1995).

Wirkstoffe mit dem Profil partieller Agonisten besitzen nur zum Teil die gleichen Eigenschaften wie die klassischen BZD. Obwohl ihre Bindungsaffinitäten zum BZD-R mit denen der reinen Agonisten vergleichbar sein können, ist die pharmakologische Wirkung nicht in allen Aspekten vergleichbar mit der Wirkung der reinen Agonisten. Ziel ist nun, Stoffe zu finden, die zwar anxiolytisch wirken, aber nicht zu Sedierung, Amnesie und Sucht führen.

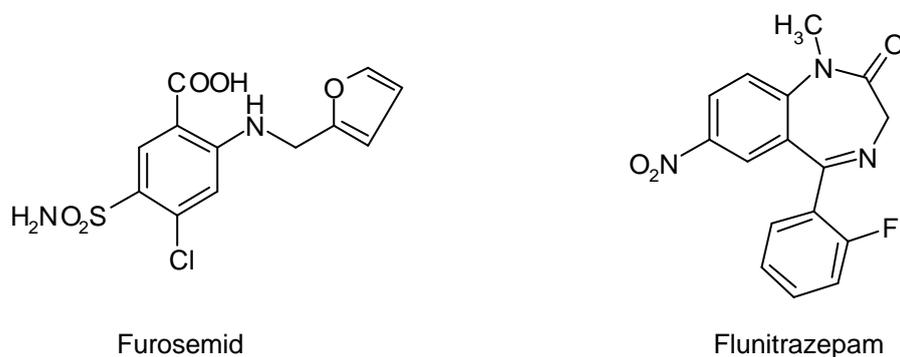
2.4 Zusammensetzung und Einteilung der GABA_A -Rezeptorkomplexe

Das GABA_A /BZD-Rezeptorpentamer ist funktionell und strukturell heterogen. Ursprünglich erfolgte die Klassifizierung primär auf funktioneller Grundlage, insbesondere der Affinität zu diversen Benzodiazepinen und Nicht-Benzodiazepin-artigen Substanzen (Barnard *et al.*, 1998). Rezeptoren mit hoher Affinität zu klassischen Benzodiazepinen (BZD) wurden dem Typ I (BZD- R_1) zugeordnet, solche mit niedriger Affinität dem Typ II (BZD- R_2). Die BZD- R_1 sind der häufigste Typ im Gehirn der Säuger und dominieren vor allem im Cerebellum (Gardner *et al.*, 1993). Die Rezeptoren des BZD- R_2 -Typs ließen sich dagegen nur in wenigen Gehirnregionen, so im Hippocampus und Striatum, sowie im Rückenmark vermehrt detektieren (Gardner *et al.*, 1993). Mit den Rezeptoren des BZD- R_1 -Typs wurden mehr angstlösende, mit denen des BZD- R_2 -Typs dagegen mehr antikonvulsive, muskelrelaxierende und sedativ-hypnotische Wirkungen verbunden. Eine Reihe Nicht-BZD-artiger Liganden, wie das Imidazopyridin Zolpidem, das Triazolo-

pyridazin CL 218872 und das β -Carbolin β -CCE, zeigen bevorzugt Bindungsaffinitäten zum BZD-R₁ (Teuber *et al.*, 1999).

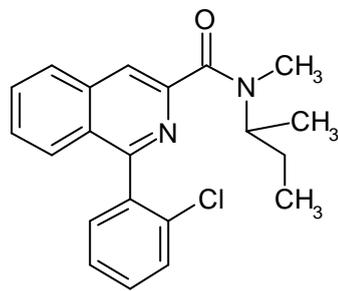


Wie sich in der Folge erwiesen hat, lassen einzelne BZD-R₁-selektive Liganden, darunter das Zolpidem, *in vivo* jedoch teilweise auch sedative Effekte erkennen (Zhang *et al.*, 1995). Zusätzlich wurden weitere Rezeptortypen nachgewiesen, die keine Affinität zu den klassischen Benzodiazepinen zeigten, jedoch sehr hohe Affinität ($K_i \leq 20$ nM) zu dem Imidazobenzodiazepin ³H-Ro 15-4513 (Abb. 3) besaßen (Möhler *et al.*, 1997). Die Liganden dieser Diazepam-insensitiven (DI)-Rezeptoren unterdrückten einige biochemische, neurochemische und symptomatische Effekte von Ethanol. Als schwacher, aber DI-Rezeptor-selektiver Ligand wurde das Furosemid identifiziert (Teuber *et al.*, 1999). DI-Rezeptoren wurden vor allem im Cerebellum (25-30 %), in geringerer Konzentration auch in den übrigen Gehirnregionen (0-5 %) gefunden (Zhang *et al.*, 1995). Ebenfalls interessant erschien die Tatsache, dass das klassische BZD Flunitrazepam am DI-Rezeptor invers-agonistische Effekte ausübte. Am BZD-R₇ Typ wirkte es dagegen als voller Agonist (Hauser *et al.*, 1997).

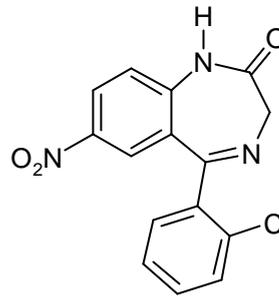


Abzugrenzen von zentralen BZD-R sind Bindungsstellen im peripheren Gewebe, die ebenfalls Affinität zu einzelnen BZD aufweisen. Sie besitzen gänzlich andere pharmakologische Eigenschaften (Braestrup und Nielsen, 1980) und können z.B. durch Insensitivität gegenüber Clonazepam und Flumazenil (Abb. 3) von den zentralen Rezeptorstellen unterschieden werden (Möhler und Richards, 1981). Diese „peripheren“

BZD-R, die im Gegensatz zu den zentralen BZD-R nicht mit dem GABA_A-R assoziiert sind, können selektiv durch Isochinolincarboxamide (z.B. Pk 11195) markiert werden.



Pk 11195



Clonazepam

Da man mittlerweile die „peripheren“ Rezeptoren auch in Gliazellen des Gehirns und in den peripheren Geweben, vor allem in der mitochondrialen Fraktion, nachgewiesen hat, wird heute zum Teil die Bezeichnung „BZD-R vom mitochondrialen Typ“ gebraucht (Woods und Williams, 1996). Geringere Mengen dieses Rezeptors wurden auch in den Plasmamembranen von Herz-, Leber- und Blutzellen gefunden (Teuber *et al.*, 1999). Allgemein wird davon ausgegangen, dass „periphere“ BZD-R an der Steroidbiosynthese über den intramitochondrialen Cholesteroltransport beteiligt sind (Teuber *et al.*, 1999).

Eine differenzierte Betrachtungsmöglichkeit der zentralen BZD-R ergibt sich aus neueren Erkenntnissen über den molekularen Aufbau des GABA_A-Rezeptorkomplexes. Diese haben frühere Einteilungen relativiert und durch Untersuchungen an rekombinanten Rezeptoren auch funktionell näher definiert. Dementsprechend basiert auch die aktuelle Nomenklatur und Klassifizierung auf der Pentamer-Struktur des GABA_A-Rezeptors. Bis heute wurden bei Säugetieren über 17 verschiedene Untereinheiten identifiziert und kloniert (Hevers und Lüddens, 1998). Die charakterisierten Proteineinheiten mit einer durchschnittlichen Molmasse von etwa 50 kDa wurden sechs verschiedenen Genfamilien (α_{1-6} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ und ρ_{1-3}) zugeordnet (Hevers und Lüddens, 1998). Zwischen den Proteineinheiten verschiedener Familien besteht eine etwa 30-40 %-ige Sequenzübereinstimmung, innerhalb einer Gruppe beträgt diese etwa 70-80 % (Hevers und Lüddens, 1998). Unter Berücksichtigung weiterer Expressionsvarianten (Splice-Formen) besteht der zentrale GABA_A-Rezeptor aus mindestens 20 verschiedenen Untereinheiten (Barnard *et al.*, 1998).

Ungeachtet der enormen Vielfalt möglicher Kombinationen scheint sich die native Rezeptorpopulation nur aus wenigen Isoformen zusammensetzen. Man vermutet, dass weniger als 150 Rezeptor-Subtypen *in vivo* auftreten. Von diesen machen nur

etwa zehn mehr als 95 % der GABA_A-Rezeptorpopulation im Säugergehirn aus (Davies *et al.*, 1998). Mit einer Häufigkeit von 43 % ist der $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptor die am häufigsten anzutreffende Isoform im menschlichen Gehirn, gefolgt von $\alpha_2\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_3\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_5\beta_3\gamma_2$ (McKernan und Whiting, 1996; Chebib und Johnston, 2000). Die $\alpha_2\beta_3\gamma_2$ - und die $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Isoformen stellen zusammen etwa 75-85 % der Diazepam-sensitiven Rezeptoren im ZNS eines Erwachsenen. Homooligomere GABA_A-Rezeptorsubtypen kommen *in vivo* nicht vor (Stephenson, 1995). Man geht davon aus, dass mindestens eine α -, eine β - und eine γ -Einheit nötig sind, um einen auf natürliche Weise funktionierenden GABA_A-Rezeptor zu bilden (Stephenson, 1995; McKernan und Whiting, 1996; Davis *et al.*, 1998). Die Stöchiometrie nativer Rezeptoren ist noch weitgehend unbekannt. Die meisten vorgestellten Modelle bestehen entweder aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit (Chang *et al.*, 1996), oder aus zwei α -, einer β - und zwei γ -Untereinheiten (Benke *et al.*, 1994; Davies *et al.*, 1998). Nach Mossier *et al.* wird die γ_1 -Untereinheit nie mit der γ_2 - oder γ_3 -Untereinheit koexprimiert (1994). Rezeptoruntereinheiten aus der δ - und ε -Familie werden im ZNS seltener vorgefunden (Barnard *et al.*, 1998).

Aus dem Vergleich funktioneller und struktureller Informationen zum BZD-Rezeptorkomplex hat sich ableiten lassen, dass der α -Untereinheit für die pharmakologischen Eigenschaften des Rezeptors besondere Bedeutung zukommt. Während die Rezeptoren mit α_1 -Untereinheit dem zu Zolpidem hoch affinen BZD-R₁-Typ zugeordnet werden, zählen die α_2 -, α_3 - oder α_5 -haltigen Subtypkombinationen zum BZD-R₂-Typ. Innerhalb dieses Typs können wiederum Kombinationen mit mittlerer (α_2 und α_3) und sehr geringer Affinität (α_5) zu Zolpidem unterschieden werden (Smith, 2001).

Diazepam und andere klassische BZD aktivieren gleichermaßen Rezeptoren, die α_1 , α_2 , α_3 oder α_5 enthalten (Wieland *et al.*, 1992; Benson *et al.*, 1998). Im Gegensatz dazu werden α_4 - und α_6 -haltige Rezeptoren (z.B. $\alpha_4\beta_2\gamma_2$, $\alpha_6\beta_2\gamma_2$) als Diazepam-insensitiv (= DI) bezeichnet.

Die regionale Verteilung der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten im Gehirn wurde u.a. mit Hilfe spezifischer Antiseren gegen die jeweilige Untereinheit untersucht. Demnach enthalten die zentralen GABA_A-Rezeptorkomplexe zu über 60 % die α_1 -Untereinheit (Fritschy und Möhler, 1995). α_1 -Typ-Rezeptoren sind insbesondere im Bulbus olfactorius, Neocortex, Hippocampus, Thalamus, Cerebellum und in geringer Konzentration im Striatum vorzufinden (Abb. 4) (Rudolph *et al.*, 1999). Die α_2 -

Untereinheiten sind dagegen in limbischen Strukturen wie dem Hippocampus und dem cerebralen Kortex sowie im Striatum verbreitet. Eine hohe Dichte an α_2 -Rezeptoren wird hier vor allem in den Pyramidenzellen an funktionell wichtigen Stellen wie den initialen Segmenten von Axonen erregender Nervenzellen vorgefunden. Die α_3 -haltigen Komplexe werden bevorzugt in GABA-ergen Neuronen des Thalamus exprimiert und zwar in Strukturen des retikulären Aktivierungssystems (Rudolph *et al.*, 1999).

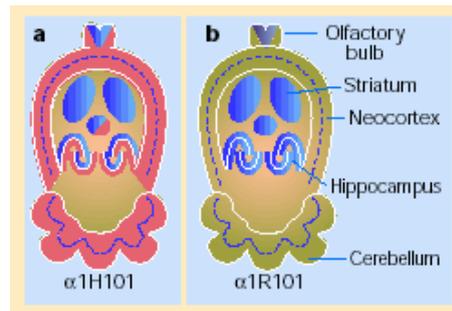


Abb. 4 Verteilung von BZD-R im Gehirn der Maus (schematisch, axiale Ansicht). a) Benzodiazepin-sensitive GABA_A-Rezeptoren einer normalen Maus (Wildtyp); α_1 -haltige Rezeptoren sind rot, α_2 -, α_3 - und α_5 -haltige Rezeptoren blau dargestellt. Andere Hirnregionen im Striatum enthalten überwiegend α_1 -freie Rezeptoren. b) Gehirn von α_1 (R101H)-mutierten Mäusen, die ausschließlich Rezeptoren mit Benzodiazepin-sensitiven α_2 -, α_3 - und α_5 -Untereinheiten exprimieren (Rudolph *et al.*, 1999; Wisden und Stephens, 1999)

Jede Hirnregion besitzt ein eigenes, typisches Expressionsmuster (Tab. 1). So untersuchte die Arbeitsgruppe um Quirk das Vorkommen von α - und γ -Untereinheiten im Cerebellum und bezifferte den Anteil von $\alpha_6\beta_x\gamma_2$ -Subtypen auf 36 %, gefolgt von 28 % $\alpha_1\beta_x\gamma_2$ -, 23 % $\alpha_6\beta_x\delta$ -, 8 % $\alpha_2\beta_x\gamma_1$ - und 5 % $\alpha_3\beta_x\gamma_2$ -Kombinationen (Quirk *et al.*, 1994).

Tabelle 1 Vorkommen und Eigenschaften wichtiger GABA_A-Rezeptorsubtypen (McKernan und Whiting, 1996; Smith, 2001; Barnard *et al.*, 1998)

Subeinheiten				Subtyp	Vorkommen im ZNS	Bindungseigenschaften*
α ₁		β ₂	γ ₂	α ₁ β ₂ γ ₂	Hippocampus und Kortex (Interneurone); cerebrale Purkinjezellen; Hypothalamus (<i>Nucleus opticus</i>)	α ₁ β _n γ ₂ besitzen hohe Affinität zu klassischen BZD und zu Zolpidem; = BZD-R ₁ -Typ
α ₁		β ₃	γ ₂	α ₁ β ₃ γ ₂		
α ₁		β ₂		α ₁ β _{2/3} γ ₂		
α ₁		β ₂	δ	α ₁ β ₂ δ	Thalamus (Relay-Neurone)	insensitiv gegenüber BZD, hohe Affinität zu Zink
α ₂		β ₃	γ ₂	α ₂ β ₃ γ ₂	Hippocampus (Pyramiden- und <i>Gyrus dentatus</i> -Granulosazellen); Hypothalamus (<i>Nucleus opticus</i>)	niedrigere Affinität zu klassischen BZD und β-Carbolinen, sowie 10-fach geringere Affinität zu Zolpidem und CL 218872 im Vergleich zu α ₁ -Rezeptoren; = BZD-R ₂ -Typ
α ₂		β _{2/3**}		α ₂ β _{2/3} γ ₂		
α ₃		β _{2/3**}	γ ₂	α ₃ β _{2/3} γ ₂	Hippocampus und Thalamus (Retikuläre Strukturen)	Eigenschaften der typischen BZD-R ₂
α ₄		β _n		α ₄ β _n δ	Thalamus und Hippocampus (<i>Gyrus dentatus</i>) und Striatum	insensitiv gegenüber BZD; Affinität zu Flumazenil und Bretazenil; = „diazepam insensitive“ (DI)-Rezeptoren
α ₄		β _n	δ			
α ₅		β ₃	γ ₂	α ₅ β ₃ γ ₂	Hippocampus (Pyramidenzellen); <i>Olfactorus bulbis</i> ; Hypothalamus (<i>Nucleus opticus</i>)	hohe Affinität zu klassischen BZD-Agonisten; insensitiv gegenüber Imidazopyridinen; hohe Selektivität bestimmter 8-Acetylenimidazobenzodiazepine (inverse Agonisten); = BZD-R ₂ -Typ
α ₆		β _{2/3}	γ ₂	α ₆ β _{2/3} γ ₂	Cerebellum (Granulosazellen)	insensitiv gegenüber BZD außer Bretazenil; einige Antagonisten wie Flumazenil und Ro 15-4513 zeigen das Profil inverser Agonisten, DMCM Antagonisten
α ₆		β _{2/3}	δ	α ₆ β _{2/3} δ		hochsensitiv gegenüber Zink und insensitiv gegenüber allen BZD
α ₆	α ₁	β _{2/3}		α ₆ α ₁ β _{2/3} γ ₂		kombiniert Eigenschaften von α ₆ β _{2/3} γ ₂ und α ₁ β _n γ ₂
α ₁	α ₃		γ ₂	-	Cerebellum (Golgi-Typ II-Zellen)	-
α ₁	α ₂		γ ₂	-	Motoneurone (hypoglossale Nuklei)	-
	α ₂		γ ₂	-	Motoneurone (<i>Nucleus ambiguus</i>)	-

*Die beschriebenen Eigenschaften hat man für die in der Spalte „Subtyp“ dargestellten ko-exprimierten Rekombinanten beobachtet, die Stöchiometrie wurde in den meisten Fällen nicht bestimmt.

**Der verwendete Antikörper vermochte zwischen β₂ und β₃ nicht zu differenzieren (Barnard *et al.*, 1998).

Die Bindungsstelle für Agonisten und Antagonisten des GABA_A-Rezeptors befindet sich auf der Kontaktfläche und den N-terminalen, extrazellulären Domänen der α - und der β -Untereinheiten (Teuber *et al.*, 1999).

Der BZD-R ist die am intensivsten untersuchte modulatorische Bindungsstelle des GABA_A-Rezeptorkomplexes. Zu seiner Ausbildung tragen α - und γ -Untereinheiten bei (Sigel und Buhr, 1997). Zwar befindet sich die BZD-Bindungsstelle auf der Schnittstelle beider Untereinheiten (Abb. 3), doch ist ihre genaue Lokalisierung noch unbekannt. GABA_A-Rezeptoren mit jeweils zwei Einheiten dieser Genfamilie enthalten auch zwei BZD-R (Sigel und Buhr, 1997; Smith, 2001). Die Expression von mindestens zwei (α , γ) der drei (α , β , γ) Subeinheiten ist nötig, um einen funktionellen BZD-R zu erhalten. Um das volle Wirkungsspektrum nativer BZD-responsiver GABA_A-Rezeptoren zu entfalten, müssen α , β und γ koexprimiert werden (Barnard *et al.*, 1998). Unter den letzteren ist besonders die γ_2 -Untereinheit für die pharmakologische Wirkung der BZD essentiell (Prichett *et al.*, 1989; Graham *et al.*, 1996).

Wieland und Mitarbeiter identifizierten im Jahre 1992 Histidin (α_1 -H¹⁰¹) als wichtige Komponente der BZD-Bindungstasche. Diese Aminosäure interagiert entweder mit dem N-Atom des Benzodiazepingerüsts (Duncalfe *et al.*, 1996) oder mit dem der Kernstruktur der Liganden eng anliegenden Phenylrest (McKernan *et al.*, 1998). In DR-Rezeptoren, die α_4 - oder α_6 -Untereinheiten enthalten, befindet sich an der Position 101 Arginin anstelle von Histidin ($\alpha_{4/6}$ -R¹⁰¹). Die Affinität zu Diazepam kann durch gezielte einfache Punktmutation innerhalb des α_4 - und α_6 -Segments und den so verursachten Austausch dieser Aminosäuren ($\alpha_{4/6}$ R101H) wieder hergestellt werden (Wieland *et al.*, 1992). Durch die Punktmutationen α_1 Y159S und α_1 Y209S wurde die Diazepam-Wirkung beeinträchtigt und die ³H-Ro 15-1788-Bindung völlig eliminiert (Amin *et al.*, 1997). Dagegen machten sich die Substitutionen α_1 Y161A und α_1 T206A in einer dreifachen Steigerung der Diazepam-Wirkung bemerkbar (Buhr *et al.*, 1996; Buhr *et al.*, 1997 c). Das bedeutet, dass die Positionen 101, 159, 161, 206 und 209 auf der Seite der α_1 -Einheit an der Ligandenbindung direkt beteiligt sind. Als weitere für die Ligandenselektivität des BZD-R wichtige Komponente konnte α_1 -S²⁰⁴ identifiziert werden. Durch Punktmutation der dem α_1 -S²⁰⁴ entsprechenden Aminosäure in der α_5 -Subeinheit hat man eine bemerkenswerte Affinität zu Zolpidem hergestellt (Renard *et al.*, 1999). Unter den Aminosäuren, die auf der γ -Seite Einfluss auf die Bindungs-

eigenschaften der BZD-R-Liganden ausüben, hat man γ F77, γ M130 und γ T142 identifiziert (Mihik *et al.*, 1994; Buhr *et al.*, 1997 a; Buhr und Sigel, 1997 b). Die genannten Aminosäuren befinden sich in fünf verschiedenen Regionen des Protein-komplexes, die jedoch auch nebeneinander lokalisiert sein können. Eine entsprechende dreidimensionale Darstellung dieser Reste liegt noch nicht vor (Buhr *et al.*, 1997 c).

Die Strategie der Punktmutationen liefert in den meisten Fällen keine Hinweise dafür, ob die veränderte Aminosäure direkt an der Ligandenbindung beteiligt ist oder nur die Konformation des Rezeptors allosterisch verändert wird, was einen indirekten Einfluss auf die Ligandenbindung bewirkt.

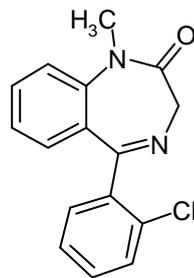
Die zuletzt entdeckte ϵ -Untereinheit kann mit α - und β -Untereinheiten nur Rezeptoren bilden, die gegenüber Benzodiazepinen unempfindlich sind (Davies *et al.*, 1997; Whiting *et al.*, 1997). Die drei ρ -Untereinheiten sind lediglich in der Retina zu finden (Cutting *et al.*, 1991; Cutting *et al.*, 1992; Ogurusu und Shingai, 1996). Sie werden nicht mit den α - und β -Untereinheiten koexprimiert und bilden stets Homopentamere (Shimada *et al.*, 1992).

Die physiologische Aktivität von Agonisten und inversen Agonisten des BZD-R resultiert aus der Bindung an eine oder mehrere Rezeptor-Isoformen. Die physiologische Funktion der meisten Subtypen und die Bedeutung unterschiedlicher regionaler Verteilungsmuster im Gehirn ist noch weitgehend unklar. Man weiß aber, dass durch die fehlende Spezifität vieler Liganden das breite Wirkungsspektrum der Wirkstoffe, z.B. auch der BZD, zustande kommt. Ziel aktueller Forschungsanstrengungen ist es, durch die Entwicklung von Substanzen mit selektiver Bindung an nur einen Subtyp ein verbessertes klinisches Profil zu erhalten und damit spezifische Behandlungsstrategien zu ermöglichen.

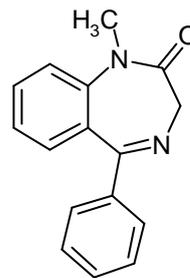
2.5 Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine

Der Entdeckung der spezifischen BZD-Rezeptoren folgte die Untersuchung ihrer physiologischen Relevanz. Ein gesteigertes Interesse an der Identifizierung von endogenen Rezeptor-Liganden wurde vor allem im Zusammenhang mit der Behandlung zahlreicher Störungen im ZNS geweckt. Vor allem die Frage, warum die Evolution einen Rezeptor für BZD, also vorab rein synthetische Produkte geschaffen hat, fokussierte die

Forschungsbemühungen auf die Suche nach endogenen Rezeptormodulatoren, die auch in den Hirnstoffwechsel der Säuger eingreifen. Eine überraschende Entdeckung machten im Jahre 1986 Sangameswaren und Mitarbeiter, indem sie BZD aus Rinderhirn isolierten (Sangameswaren *et al.*, 1986). Anfängliche Zweifel über das natürliche Vorkommen von BZD sind durch vergleichbare Ergebnisse mehrerer Gruppen, u.a. aus der Schweiz, Argentinien, Deutschland und aus den Vereinigten Staaten beseitigt worden (Wildmann *et al.*, 1987; Medina *et al.*, 1988). BZD wurden im Jahre 1990 auch in Gehirnproben identifiziert, die in den 40er Jahren, also noch vor der ersten BZD-Synthese, präpariert und konserviert worden waren (Klotz, 1990). Eine Kontamination mit industriellen Substanzen war somit eindeutig auszuschließen. Insbesondere wurden auch Strukturen wie iso-Diazepam und Deschlordiazepam, die nicht vermarktet oder therapeutisch eingesetzt wurden, in Pflanzen gefunden (Wildmann *et al.*, 1988 a; Unseld *et al.*, 1989).



iso-Diazepam



Deschlordiazepam

So gelang der Nachweis von BZD in pflanzlichen Nahrungsmitteln wie Kartoffeln, Weizen, Reis, Sojabohnen, Kirschen, Mais, Pilzen, Linsen und Weintrauben (Wildmann *et al.*, 1988 a; Wildmann, 1988 b; Unseld *et al.*, 1989; Klotz, 1991; Grassi *et al.*, 1998). In den letzten zehn Jahren wurden mindestens neun verschiedene 1,4-Benzodiazepine in den unterschiedlichsten natürlichen Quellen nachgewiesen (Tab. 2).

Der Nachweis von BZD in landwirtschaftlichen Produkten führte zu der Hypothese, dass sich diese über die Nahrungskette anreichern. Anders als beim Opioidrezeptor, bei dem endogen synthetisierte Liganden identifiziert wurden, wird allgemein für BZD-R-Liganden eine xenobiotische Herkunft diskutiert. Inwieweit letztere in der Nahrung oder der mikrobiellen Flora im Darm zu suchen ist, bleibt zu beantworten (Unseld *et al.*, 1989; Unseld *et al.*, 1990; Mullen *et al.*, 1997). Die Hypothese einer möglichen Biosynthese durch Mikroorganismen wird durch den Nachweis potentieller Vorstufen in der Pilzkultur von *Penicillium cyclopium* (Luckner, 1984) und im Rinderpansen (Medina *et al.*, 1991) gestützt. Beide Spezies, Pflanzen und Mikroorganismen, wären insbesondere in der

Lage, z.B. *via* Chlorperoxidase-Reaktion eine Chlorierung von organischen Molekülen durchzuführen (Gribble, 1998).

Tabelle 2 Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine

biolog. Material	Gehalt in ng/g	natürliche Benzodiazepine	Literatur
Gehirn (Rind) Gehirn (Ratte)	6 - 600 5 - 10	N-DD	Sangameswaran und De Blas, 1985; Sangameswaren <i>et al.</i> , 1986
Gehirn (Ratte) Kartoffeln Weizen	0,2 - 6 0,04 - 0,1 1,6 - 4,4	N-DD, DZ u.a. N-DD, DZ, LZ u.a. N-DD, DZ, DCDZ, i-DZ	Wildmann <i>et al.</i> , 1987 Wildmann <i>et al.</i> , 1988 a
Kuhmilch Gehirn (Rind, Ratte)	0,5 - 2,0 2	DZ-BE	Medina <i>et al.</i> , 1988
Sojabohnen, Mais, Reis, Linsen Gehirn (Mensch, Frosch, Ratte, etc.) Humanplasma	0,003 - 0,05 0,005 - 0,51 0,003 - 0,01	N-DD, DZ	Unselde <i>et al.</i> , 1989
Liquor (Mensch)	1,0*	DZ-BE	Rothstein und Olasmaa, 1990
Rattenhirn	5 - 10	N-DD, DZ	Basile <i>et al.</i> , 1990
Weintrauben, -laub	0,001 - 0,1	N-DD, DZ, OXZ	Graf, 1990
Urin, Plasma, Serum, Liquor (Mensch)	> 900	DZ-BE	Mullen <i>et al.</i> , 1990
Kirschen	0,025	DZ	Klotz, 1991
Humanmilch Humanplasma	1,91* 2,20 - 2,54*	DZ-BE DZ-BE	Peña <i>et al.</i> , 1991
Gehirn (Ratte)	~ 0,13	DZ-BE	Piva <i>et al.</i> , 1991
Erboden, Humus	0,002	DZ-BE	Paladini <i>et al.</i> , 1992
Serum (Mensch) Muttermilch (Mensch)	0,001 - 0,032 2,6 - 8	N-DD, DZ, OXZ DZ-BE	Dencker <i>et al.</i> , 1992
Tomaten, Weizen, Olivenöl Kartoffeln	0,16 - 3,15 0,06 - 0,97	DZ-BE OXZ-BE	Grassi <i>et al.</i> , 1997 Grassi <i>et al.</i> , 1998

N-DD: N-Desmethyldiazepam; DZ: Diazepam; DCDZ: Deschlordiazepam; LZ: Lorazepam; iDZ: iso-Diazepam; OXZ: Oxazepam, BE: Bindungsäquivalente;

* ng/ml

Die deutlichen Konzentrationsunterschiede in den vermessenen humanen und tierischen Proben (Gehirn, Muttermilch) spiegeln möglicherweise die unterschiedliche Exposition mit BZD diätetischen Ursprungs wider.

Die in Tab. 2 aufgeführten „natürlichen“ BZD sind überwiegend mittels massenspektroskopischer Techniken identifiziert worden. Zum Einsatz kamen die Gaschromatographie-Massenspektrometrie (HRGC-MS) (Wildmann *et al.*, 1988 a; Wildmann, 1988 b; Unseld *et al.*, 1989; Graf, 1990; Unseld *et al.*, 1990; Duthel *et al.*, 1992; Basile *et al.*, 1994) und immunochemische Methoden wie der Radioimmunoassay (RIA) (Medina *et al.*, 1988; Medina *et al.*, 1991; Peña *et al.*, 1991; Piva *et al.*, 1991; Paladini *et al.*, 1992), der Radiorezeptorassay (RRA) (Dencker und Johansson, 1990; Mullen *et al.*, 1990; Olasmaa *et al.*, 1990; Dencker *et al.*, 1992) und der Enzymimmunoassay (EIA) (Grassi *et al.*, 1997; Grassi *et al.*, 1998).

Vor diesem Hintergrund wurde vorgeschlagen, den Begriff der „endogenen“ BZD in „natürliche“ BZD abzuwandeln, bis der Nachweis einer endogenen Synthese gelungen ist (Dasarathy und Mullen, 1998).

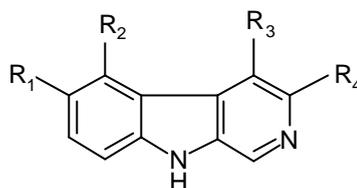
2.6 Endogene Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R

Die Entdeckung „natürlicher“ BZD initiierte weitere Untersuchungen zum Vorkommen endogener Liganden in tierischen und pflanzlichen Geweben. Zahlreiche bindungsaktive Nicht-Benzodiazepin-artige Verbindungen (= Endozepine) sind identifiziert worden. Einige Peptide (Alho *et al.*, 1985; Costa und Guidotti, 1991), Purine (Asano und Spector, 1978; Skolnick *et al.*, 1978), ungesättigte Fettsäuren (Sieghart, 1995), Nicotinamide (Möhler *et al.*, 1979; Braestrup und Nielsen, 1980), Steroide (Paul und Purdy, 1992; Sieghart, 1994) und β -Carboline (De Robertis *et al.*, 1988) zeigten Aktivität am BZD-R. Die Affinitäten der identifizierten Substanzen waren jedoch meist um mehrere Größenordnungen geringer als die der BZD. Für Steroide wird eine eigene Bindungsstelle am GABA_A-Rezeptor angenommen.

2.6.1 β -Carboline

β -Carboline gehören zu den am besten untersuchten Nicht-Benzodiazepin-artigen Liganden. Diese Substanzklasse umfasst reine Agonisten (z.B. ZK 93423), partielle

Agonisten (z.B. Abecarnil), Antagonisten (z.B. ZK 93426) und reine inverse Agonisten (β -CCE, β -CCB) (Teuber *et al.*, 1999; Chapouthier und Venault, 2001).



β-Carboline	R₁	R₂	R₃	R₄
ZK 93423	OBz	H	CH ₂ OCH ₃	COOC ₂ H ₅
ZK 91296	H	OBz	CH ₂ OCH ₃	COOC ₂ H ₅
Abecarnil	OBz	H	CH ₂ OCH ₃	COOCH(CH ₃) ₂
ZK 93426	H	OCH(CH ₃) ₂	CH ₃	COOC ₂ H ₅
β -CCM	H	H	H	COOCH ₃
β -CCE	H	H	H	COOC ₂ H ₅
β -CCB	H	H	H	COOC ₄ H ₉

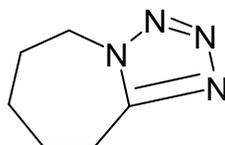
Das anfangs als endogener Ligand angesehene β -CCE wurde bald als Artefakt identifiziert. Es folgte der aus Rinderhirn isolierte β -Carboline-3-carbonsäurebutylester (β -CCB), bei dem man eine Korrelation zwischen seiner Konzentration und dem Stresslevel fand (Gardner *et al.*, 1993; Polc, 1995). Solange jedoch der Biosyntheseweg dieser Liganden nicht geklärt ist, bleibt der endgültige Beweis für die endogene Entstehung, wie auch im Falle der BZD, aus. Die Akkumulierung aus exogenen Quellen, wie aus der Nahrung oder der Mikroflora, ist auch hier zu diskutieren.

2.6.2 Peptide

Besonderes Augenmerk auf dem Sektor endogener BZD-R-Liganden verdienen die Polypeptide. Einige von ihnen, die endogen vorkommen, zeigen eine moderate Affinität zum BZD-R. Im Jahr 1985 beschrieben Alho *et al.* die Isolierung eines BZD-R-aktiven Neuropeptids aus Rattenhirn. Das als „diazepam-binding inhibitor“ (= DBI) bezeichnete Peptid bestand aus 104 Aminosäureresten und enthielt zwei identische Octadecapeptide mit folgender Aminosäuresequenz: NH₂-QATVGDVNTDRPGLLDLK-OH (Alho *et al.*, 1985). Weiterhin wurde folgende Sequenz für die 52 der 104 Aminosäuren ermittelt: (52)TQPTDEEMLFYSHFKQATVGDVNTDRPGLLDLKGKXIMKTYVEKVEELK KKY-OH (104) (Alho *et al.*, 1985). Das DBI und seine kleineren Fragmente, das Octadecaneuropeptid (ODN = DBI[f33-50], NH₂-QATVGDVNTDRPGLLDLK-OH) und das

Triakontatetraneuropeptid (TTN = DBI-[f17-50], NH₂-TQPTDEEMLFIYSHFKQATVGDV-NTDRPGLLDLK-OH), werden zusammen mit GABA in Neuronen, wo sie freigesetzt werden, vorgefunden (Alho *et al.*, 1985; Costa und Guidotti, 1991; Polc, 1995). Sie sind im Gehirn unterschiedlich stark verbreitet. Die höchsten Konzentrationen an DBI wurden in Hypothalamus, Amygdala, Cerebellum und in einigen Regionen von Thalamus, Hippocampus und Kortex gefunden. Auch in peripheren Geweben, wie Leber, Testis, Duodenum und Adrenalkortex, vor allem in Zelltypen, die den peripheren BZD-R enthalten, wurden hohe Konzentrationen an DBI, ODN und TTN detektiert (Costa und Guidotti, 1991). Die Rezeptoraktivität des DBI ist mit einem IC₅₀-Wert von etwa 4 µM angegeben worden. Die beiden Peptide ODN und TTN besitzen die gleiche Bindungsaktivität wie die DBI-Vorstufe. Im Rahmen von *in vivo*-Experimenten konnten jedoch nur invers-agonistische, Angst-auslösende Eigenschaften des DBI und seiner Fragmente nachgewiesen werden. DBI zeigte sogar Epilepsie-auslösende Wirkung. Miclo *et al.* erhielten in hydrolytischen *in vitro* Versuchen ein anderes DBI-Fragment (DBI-[f73-82]), das anxiolytische Aktivität im Rattenversuch besaß. Die Entstehung dieses Fragmentes *in vivo* ist jedoch spekulativ (Miclo *et al.*, 2001).

Interessant war auch die Entdeckung eines bindungsaktiven Peptids in der Kuhmilch (Miclo *et al.*, 2001), die seit langer Zeit als schlafförderndes und beruhigend wirkendes Lebensmittel gilt. Eine mögliche Erklärung lieferten Miclo und Mitarbeiter im Jahr 2001. Sie isolierten ein Peptid aus Milchcasein, das neben Bindungsaktivität *in vitro* auch anxiolytische Aktivität *in vivo* aufwies. Das betreffende Peptid entstand durch Hydrolyse von α_{s1}-Casein durch Trypsin, die einzige Protease des Gastrointestinaltraktes, die sowohl bei Neugeborenen, als auch bei Erwachsenen vorkommt. In der Studie wurden vorrangig tryptische Hydrolysate des α_{s1}-Caseins untersucht. Die mit Pentetrazol (PTZ) induzierten Krampfanfälle in Ratten ließen sich mit den Hydrolyseprodukten inhibieren.



Pentetrazol

Man beobachtete auch eine angstlösende Wirkung im „elevated plus maze“-Test und im „conditioned defensive burying“-Experiment. Das Wirkprofil entsprach dem eines reinen Agonisten wie Diazepam. Ein Peptid, das α-Caseozepin (α_{s1}-casein-[f91-100]), ist als

BZD-R-aktive Komponente mit einem IC_{50} -Wert von 88 μ M aus dem Hydrolysat isoliert worden. Das Peptid zeigte *in vivo* antikonvulsive und anxiolytische Wirkung, die trotz der geringeren *in vitro* Bindungsaktivität, aus bisher ungeklärten Gründen im *in vivo*-Experiment sogar das Zehnfache der Diazepam-Wirkung erreicht hat. Das α -Casozeplin zeigte keine Nebeneffekte und auch keine Affinität zum peripheren Rezeptor (Miclo *et al.*, 2001). Die Resultate von Miclo *et al.* führen zu der Annahme, dass das α -Casozeplin aus der Kuhmilch und entsprechende Analoga aus anderen Spezies als exogene Liganden des BDZ-R in Frage kommen und einen wichtigen Faktor in der Regulation von Angstzuständen bei Neugeborenen darstellen können (Miclo *et al.*, 2001).

2.7 Biologische Funktion der BZD-R-Liganden

Die Aufnahme therapeutischer BZD-Dosen von 5-10 mg führt zu einer Konzentration im Gehirn von 3-30 ng/g (Unsold *et al.*, 1989). Die in Gehirnproben ohne vorausgegangene BZD-Einnahme detektierten natürlichen Mengen entsprechen diesem Konzentrationsbereich (Tab. 2).

Die amnestischen Effekte therapeutischer Benzodiazepine sind bekannt und in einigen Fällen, wie in den posttraumatischen Therapien, sogar erwünscht. Ob auch endogen vorhandene BZD-R-Liganden amnestische Wirkung haben können, ist bisher nicht untersucht worden.

2.7.1 Hepatische Enzephalopathie

Deutliche Hinweise für eine pathophysiologische Bedeutung endogener BZD liefern Studien mit an hepatischer Enzephalopathie (HE) erkrankten Personen sowie mit HE-Tiermodellen. Das Krankheitsbild der HE, einer Folgeerkrankung des Leberversagens, wird von Vigilanzstörungen, Verwirrtheit, Orientierungsverlust und Somnolenz begleitet. Im Verlauf der HE hat man einen hohen Anstieg der Konzentration von N-Desmethyldiazepam und Diazepam in der Cerebrospinalflüssigkeit, dem Serum und im Gehirn unbehandelter Patienten beobachtet (Olasmaa *et al.*, 1990; Basile *et al.*, 1994). Avallone und Mitarbeiter berichteten von einer Akkumulierung endogener BZD in Verbindung mit dem Auftreten der Leberzirrhose, unabhängig von der Erkrankung an HE (Avallone *et al.*, 1998). Es wird jedoch postuliert, dass diese Substanzen durch

Verstärkung der GABA-ergen Neuroinhibierung zur Pathogenese der HE beitragen (Basile *et al.*, 1990; Basile *et al.*, 1994). Man vermutet, dass durch eine akute oder chronische Leberinsuffizienz die „Clearance“ von Stoffwechselprodukten verschlechtert wird, wodurch es auch zur Intoxikation mit Rezeptoragonisten kommt. Eine Akkumulation der BZD aus der Nahrung oder aus der Synthese im Darm wäre eine mögliche Erklärung hierfür (Dasarathy und Mullen, 1998). In autoradiographischen Untersuchungen wurde während der HE eine 30 %-ige Besetzung der Rezeptoren beobachtet (Basile *et al.*, 1990). Die Symptome lassen sich bei durchschnittlich 60 % der Patienten mit Rezeptor-Antagonisten mildern oder aufheben (Sand *et al.*, 2000).

2.7.2 Angst und Epilepsie

Die Rolle der endogenen BZD bei der Entstehung von Angst und Epilepsie konnte bisher nicht geklärt werden. Änderungen in der natürlichen Konzentration endogener BZD könnten zu pathologischer Angst und Epilepsie führen. Beide Erkrankungen werden mit BZD-Pharmaka erfolgreich behandelt. Daraus lässt sich eine Beteiligung des GABA-ergen Mechanismus an der Pathogenese beider Erkrankungen ableiten. Denkbar ist, dass ein Defizit an natürlichen BZD-R-Liganden die Entstehung einiger Angst- und Epilepsie-Formen begünstigt.

Als mögliche Funktion endogener BZD-R-Liganden wird unter anderem die Bewältigung von Angst- und Stresszuständen vorgeschlagen (Leonard, 1994). Es wäre möglich, dass sich die Wirkung erst nach einem stressbedingten Ausschütten der endogenen BZD-R-Liganden entfaltet (Izquierdo und Medina, 1991). Besondere Aufmerksamkeit wurde den limbischen Regionen (z.B. Amygdala) gewidmet. Ihre Beteiligung an der Vermittlung anxiolytischer Effekte der BZD ist bekannt. Regionale Änderungen in der Immunoreaktivität gegenüber BZD-R-Liganden wurden in diesen Regionen bei unbehandelten Tieren in Abhängigkeit vom Angstgrad beobachtet und als ein Indiz für endogene Kompensationsmechanismen gewertet (Wolfman *et al.*, 1991; Da Cunha *et al.*, 1992).

2.7.3 Gedächtnisleistung und Lernprozesse

„Endogene“ BZD sind vermutlich bereits in geringsten Konzentrationen wirksam. Aus zahlreichen Studien lässt sich ableiten, dass GABA_A-Rezeptoren auch Gedächtnisleistung und Lernprozesse beeinflussen (Izquierdo und Medina, 1991; Wolfman *et al.*, 1991; Da Cunha *et al.*, 1992). Agonisten wie BZD setzen bekanntermaßen die Lernfähigkeit und das Gedächtnisvermögen im ZNS herab (Izquierdo und Medina, 1991). Während laufender Habituations- und Lernprozesse wurden aber im Gehirn von unbehandelten Tieren regionale Änderungen in der BZD-Immunoreaktivität beobachtet (Izquierdo und Medina, 1991; Wolfman *et al.*, 1991; Da Cunha *et al.*, 1992). Hieraus ist auf eine Partizipation natürlicher Rezeptorliganden an amnestischen Prozessen geschlossen worden. Eine systematische Untersuchung der Gedächtnisleistung in Abhängigkeit von der „endogenen“ BZD-Konzentration im menschlichen Organismus steht noch aus.

2.7.4 Schlaf

Schlafstörungen könnten durch einen Mangel an geeigneten GABA-ergen Agonisten entstehen. Auch in relevanten hypothalamischen Kerngebieten stellt GABA den wichtigsten Neurotransmitter dar (Strecker *et al.*, 1999). Neuere Studien zeigten keine Korrelation zwischen dem natürlichen BZD-Spiegel im Serum gesunder Freiwilliger und dem Schlaf-Wach-Rhythmus (Sand *et al.*, 1998; Sand *et al.*, 2000). In eigenen Untersuchungen bei periodischer Hypersomnie waren dagegen ausschließlich innerhalb von Krankheitsepisoden erhöhte BZD-Spiegel im Serum nachweisbar (Ayalon *et al.*, unveröffentlichte Daten). Weitere Untersuchungen sind nötig, um einen möglichen Einfluss endogener BZD-R-Liganden auf die Schlaffunktion zu untersuchen.

2.8 Synthetische Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R

Die Liganden der BZD-Bindungsstelle umfassen nicht nur BZD, sondern auch andere Verbindungen, deren Strukturen breit gefächert sind.

Unter den synthetischen Derivaten der β -Carboline (Cox *et al.*, 1998), der Imidazo[1,5-a]chinoxaline (Jacobsen *et al.*, 1996; Mickelson *et al.*, 1996; Jacobsen *et al.*, 1999), der N-Benzylindol-3-ylglyoxylamide (Da Settimo *et al.*, 1996; Da Settimo *et al.*, 1998), der N'-Phenylindol-3-ylglyoxylhydrazide (Da Settimo *et al.*, 1998) und der Pyrazolo[4,3-c]chinolin-3-one (Savini *et al.*, 2001) finden sich Substanzen, deren Wirkungen von agonistisch über partiell agonistisch bis invers-agonistisch reichen. Eine Übersicht über einige der bisher synthetisierten Strukturen mit BZD-R-Aktivität ist in Abb. 5 gezeigt.

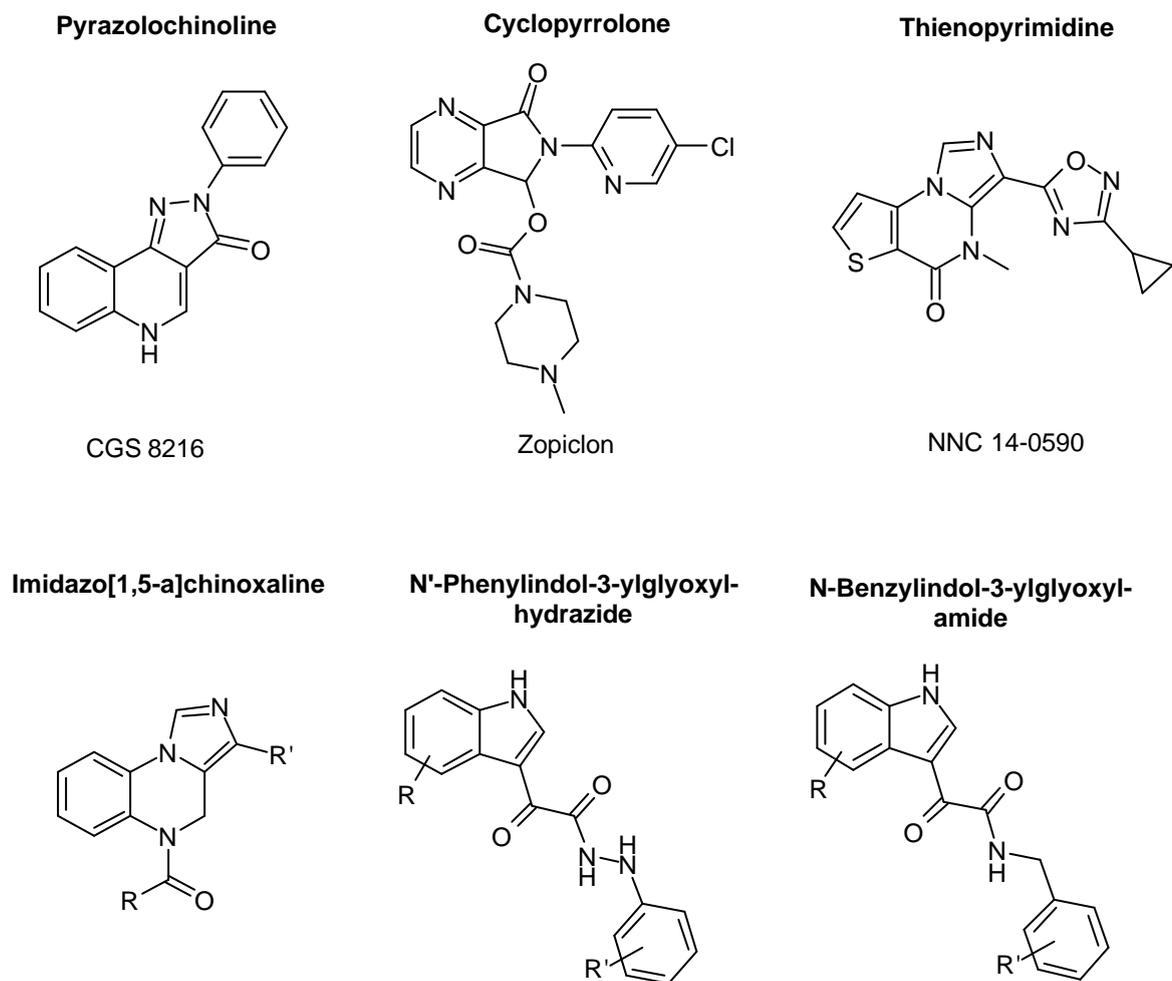


Abb. 5 Auswahl synthetischer BZD-R-Liganden

2.9 Pflanzliche Nicht-Benzodiazepin-artige Liganden des BZD-R

Viele Heilpflanzen werden seit Jahrhunderten traditionell als beruhigende und schlaffördernde Mittel in der Volksmedizin verwendet. Die für die Wirkung verantwortlichen

Substanzen sind dennoch bis auf wenige Ausnahmen weitgehend unbekannt. Ausgehend von der Anwendung in der Volksmedizin und basierend auf den Ergebnissen von Tierexperimenten besitzen Arzneipflanzen ein reiches Potential für die Entdeckung von neuen, biologisch und pharmakologisch aktiven Substanzen. Unter den spasmolytisch und sedativ wirkenden Pflanzen sind Johanniskraut (*Hypericum perforatum*), Melisse (*Melissa officinalis*), Baldrian (*Valeriana officinalis*), echte Kamille (*Chamomilla recutita*), Hopfen (*Humulus lupulus*), Passionsblume (*Passiflora incarnata*) und Pfefferminze (*Mentha piperita*) am bekanntesten. Im Rahmen der Charakterisierung natürlich vorkommender BZD-R-Liganden wurden neben einigen Vertretern der Kaffeesäure-Derivate (Marder *et al.*, 1996 b), der Furanocumarine (Bergendorff *et al.*, 1997) und der Diterpene vor allem die Flavonoide untersucht. Abb. 6 zeigt Beispiele von Verbindungen bisher isolierter Substanzklassen, aus welchen man BZD-R-Liganden identifiziert hat (Teuber *et al.*, 1999).

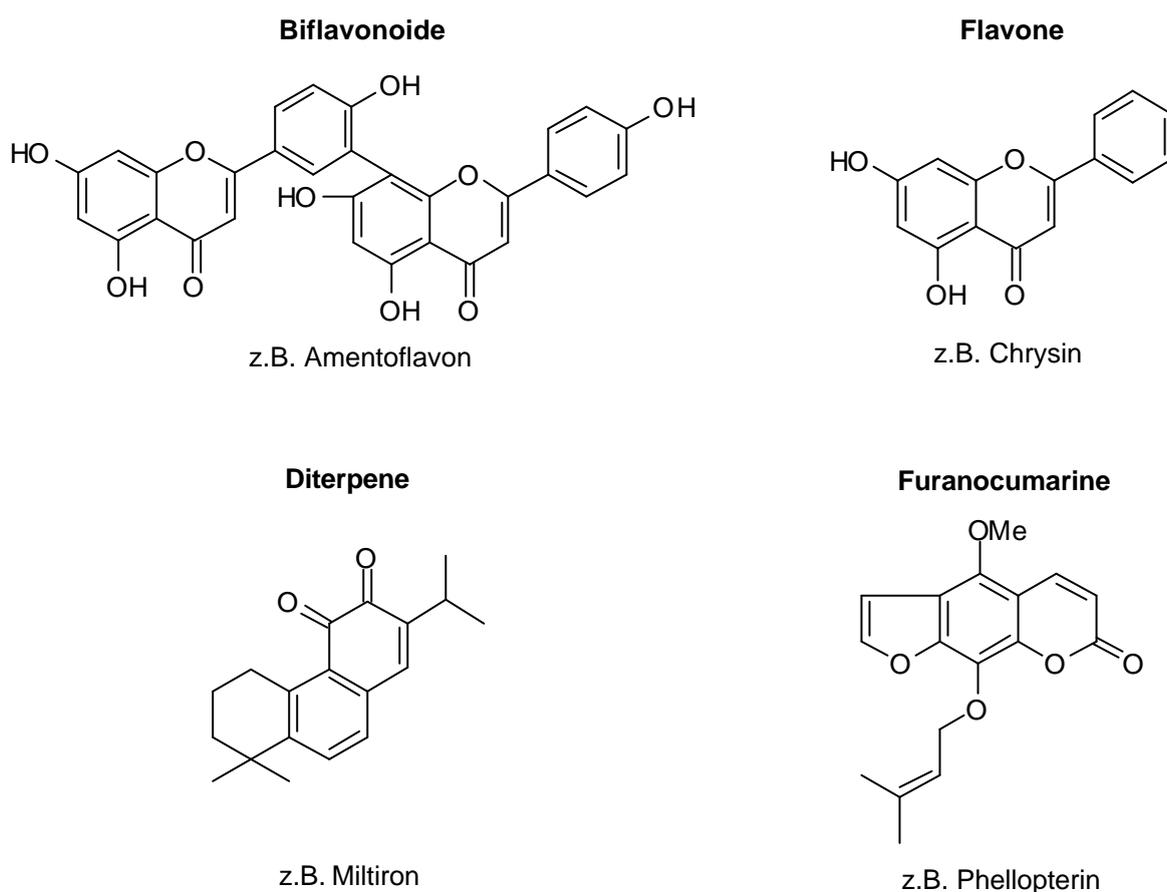
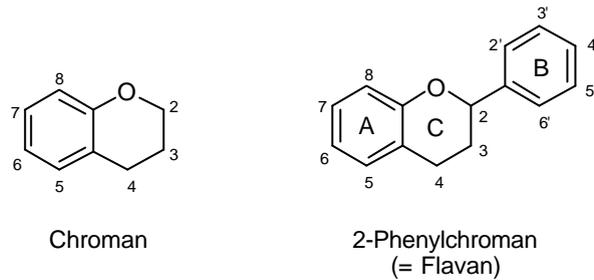


Abb. 6 Auswahl von Strukturen natürlicher Nicht-Benzodiazepin-artiger Liganden des BZD-R

2.9.1 Flavonoide

Flavonoide kommen in allen höheren Pflanzen als Farbstoffe vor. In höheren Mengen werden sie vor allem in Früchten, im Gemüse, in Nüssen, in Samen, im Tee und im Wein vorgefunden. Sie stellen somit wichtige Bestandteile der menschlichen Nahrung dar (Halliwell und Gutteridge, 1999). Das Grundgerüst der Flavonoide, das 2-Phenylchroman (= Flavan), leitet sich vom Chroman ab.



Je nach Oxidationsgrad an den Kohlenstoffatomen C-2, C-3 und C-4 unterscheidet man folgende Flavonoid-Klassen: Flavan-3-ole, Flavan-3,4-diole, Flavanone, Flavanonole, Flavone, Flavonole und Anthocyanidine (Abb. 7). Die 2,3-Dihydroverbindungen werden als Flavane, solche mit einer zusätzlichen Oxogruppe in 4-Stellung als Flavanone bezeichnet. Eine Hydroxylierung in 3-Stellung führt zu Flavan-3-olen (= Catechinen) bzw. zu Flavanonolen oder Flavanolen. Aus Flavan-3-olen erhält man durch Oxidation Anthocyanidine, die ihrerseits weiter zu Flavonolen oxidierbar sind.

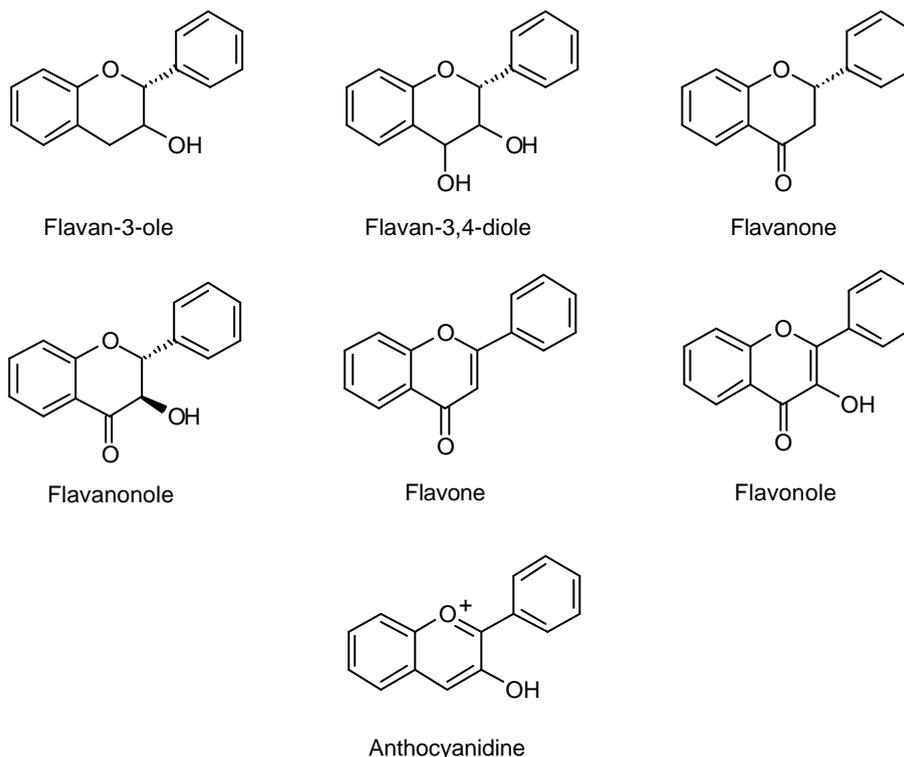


Abb. 7 Ausgewählte Flavonoid-Klassen

Flavone stellen neben den Flavonolen die größte Gruppe der bekannten Flavonoide dar. Am häufigsten ist der Ring A mit zwei OH-Gruppen an C-5 und C-7 substituiert. Diese liegen entweder frei oder verestert bzw. glykosidiert vor. Der B-Ring ist häufig an C-4' hydroxyliert oder methoxyliert. Während Substitutionen an den C-Atomen 3', 4' und 5' ebenfalls häufig vorkommen, sind sie an C-2' und C-6' selten. In Tab. 3 sind ausgewählte Beispiele aufgelistet.

Tabelle 3 Substitutionsmuster einiger Flavone und Flavonole

Name	OH an C-	OCH ₃ an C-
Chrysin	5, 7	-
Apigenin	5, 7, 4'	-
Genkwanin	5, 4'	7
Acacetin	5, 7	4'
Luteolin	5, 7, 3', 4'	-
Scutellarein	5, 6, 7, 4'	-
Pectolinarigenin	5, 7	6, 4'
Salvigenin	5	6, 7, 4'
Wogonin	5, 7	8
Baicalein	5, 6, 7	-
Skullcapflavon II	5, 6'	6, 7, 8, 2'
Quercetin	3, 5, 7, 4'	-
Tangeretin	-	5, 6, 7, 8, 4'

Die entzündungshemmenden und antiviralen Eigenschaften der Flavonoide sind schon lange bekannt. Als Enzyminhibitoren können sie die Affinität der Monoaminoxidase (Medina *et al.*, 1998), der HIV-1-Proteinase (Nakane und Ono, 1990) und der Tyrosin-Kinase (Cushman *et al.*, 1991) hemmen. Epidemiologische Studien haben ergeben, dass eine flavonoidreiche Diät mit einem verminderten Risiko der Entstehung von Krebs und Herzerkrankungen verbunden ist. Die antikanzerogenen Effekte vieler Flavonoide konnten sowohl in Zellkulturstudien, als auch in Tierexperimenten gezeigt werden (Halliwell und Gutteridge, 1999). Diese Wirkung wird darauf zurückgeführt, dass Flavonoide durch ihre phenolische Struktur als Antioxidantien Radikale abfangen können. Man vermutet, dass sie durch Abfangen reaktiver Sauerstoff-Spezies wie des Superoxidanions (O₂⁻), der Hydroxyl- und der Peroxyradikale die Entstehung von

Herzerkrankungen, Arteriosklerose und Krebs verhindern können (Halliwell und Gutteridge, 1999). Die starke antioxidative Wirkung der Flavonoide wurde in den letzten Jahren im Rahmen zahlreicher *in vitro*-Studien intensiv untersucht. Dabei ist bei einigen Flavonoiden eine starke Inhibierung der Lipidperoxidation von biologischen Membranen festgestellt worden (Harborne und Williams, 2000). Als strukturelle Voraussetzung für die Fähigkeit zur Elektronenabgabe werden ua. die Planarität des Moleküls sowie die Anwesenheit der 2,3-Doppelbindung in Konjugation zur 4-Oxogruppe angenommen. Flavonoide mit 3',4'-Dihydroxy-Catecholstruktur haben sich als stärkste Antioxidantien herausgestellt. Weiterhin hat man erkannt, dass die erhöhte antioxidative Wirkung von *o*-Dihydroxyflavonoiden durch Chelatbildung mit Metallionen (z.B. Eisen und Kupfer), die als Promotoren der Reaktionen freier Radikale gelten, zustande kommt (Harborne und Williams, 2000; Youdim *et al.*, 2002).

Effekte von Flavonoiden auf das zentralnervöse System waren bis in die frühen 90er Jahre nicht bekannt (Medina *et al.*, 1998). Epidemiologische Studien belegten, dass flavonoidreiche Extrakte (z.B. *Ginkgo biloba* und Ginseng) neuroprotektive Eigenschaften bei altersbedingter Demenz entfalten, vor allem bei neuronalen Störungen der Gedächtnis- und Lernfunktionen (Youdim *et al.*, 2002). Neuere *in vitro*-Studien zeigten weiterhin, dass einige Flavonoide (z.B. Quercetin, Catechin) bei bestimmten Zelllinien neuronalen Phenotyps den Wasserstoffperoxid-induzierten Zelltod hemmen und so vor oxidativer Schädigung schützen (Wang und Joseph, 1999; Yao *et al.*, 2001). Ob diese Wirkung durch die antioxidativen Effekte zustande kommt oder an andere zelluläre Mechanismen gebunden ist, konnte noch nicht eindeutig belegt werden.

Auf dem Gebiet der GABA-ergen Modifizierung stieg das Interesse an den natürlich vorkommenden polyzyklischen Komponenten pflanzlicher Herkunft mit der Isolierung von Amentoflavon (Abb. 6) aus dem Pflanzenextrakt von Karmeliter Geist[®] an. Diese kommerziell erhältliche alkoholische Tinktur aus verschiedenen Pflanzen wird in der Volksmedizin bei Angstzuständen und Epilepsie sowie als Sedativum verwendet. Als potentieller Wirkstoff wurde bereits 1988 eine hochaffine Verbindung aus der Biflavonoidklasse identifiziert. Mit einem IC₅₀-Wert von 6 nM ist *in vitro* eine mit Diazepam vergleichbare Wirkung beobachtet worden. Allerdings konnte nach i.v. Applikation im Tiermodell keine Rezeptorbindung *in vivo* festgestellt werden. Man vermutet, dass eine zu schnelle Metabolisierung oder eine unzureichende Penetration über die Blut-Hirn-Schranke für die fehlende *in vivo*-Wirkung verantwortlich ist (Nielsen *et al.*, 1988).

In Rezeptorstudien isolierte man weitere Flavonoide aus Pflanzen, die in der Volksmedizin für ihre sedativen und relaxierenden Effekte bekannt sind. Bezüglich der Affinität zum BZD-R stellten Flavone die bedeutendste Gruppe dar.

Als erste monoflavonoide Komponente mit spezifischer Bindung am BZD-R und *in vivo*-Aktivität ist im Jahre 1990 Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon) in der Passionsblume (*Passiflora coerulea*) identifiziert worden (Medina *et al.*, 1990). Da Chrysin fähig war, die Pentetrazol (PTZ)-induzierten Krämpfe im Mausmodell zu inhibieren, war es möglich, die antikonvulsiven Effekte *in vivo* nachzuweisen (Gardner *et al.*, 1993). Die angstlösende Wirkung *in vivo* war mit der von Diazepam vergleichbar (Medina *et al.*, 1997).

Weitere Untersuchungen führten zur Isolierung von Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon) als BZD-R-aktive Komponente von Kamillenblüten (*Matricaria recutita*) (Viola *et al.*, 1995) und dem weißen Beifuß (*Artemisia herba alba*) (Shen *et al.*, 1993). In Analogie zur *in vitro*-Aktivität ($K_i = 4 \mu\text{M}$) wurde im Mausmodell mit Hilfe standardisierter Verhaltenstests bei niedrigen Dosen eine klare anxiolytische Wirkung ohne muskelrelaxierende Effekte beobachtet. (Viola *et al.*, 1995). Die minimale effektive Dosis im „elevated plus maze“-Test betrug 3 mg/kg (i.p.). Milde Sedierung wurde erst ab 10 mg/kg (i.p.) festgestellt. In einer großen Anzahl von Trainingstests zeigten weder Chrysin noch Apigenin amnestische Wirkungen (Salgueiro *et al.*, 1997).

Diese Entdeckungen haben die Suche nach noch aktiveren Liganden mit anxiolytischen Eigenschaften beschleunigt, so dass in den folgenden Jahren vermehrt von der *in vitro*-Interaktion des BZD-R mit Flavonen berichtet wurde (Hui *et al.*, 2000; Ai *et al.*, 1997). Die höchsten Bindungsaffinitäten im nM-Maßstab wurden bei halbsynthetischen Produkten, vor allem bei bromierten und nitrierten Flavonen erhalten (Wolfman *et al.*, 1996; Medina *et al.*, 1998). Für viele dieser halbsynthetischen Derivate (z.B. 6,3'-Dinitroflavon, 6-Brom-3'-nitroflavon, 6,3'-Dibromflavon, 6-Nitro-3'-bromflavon) liegen Ergebnisse von *in vivo*-Studien vor, die ihre anxiolytische Wirkung mit nur wenigen Nebeneffekten belegen (Medina *et al.*, 1998; Viola *et al.*, 2000).

Einige Naturstoffe dieser Klasse, hauptsächlich methoxylierte Flavone, zeigten ebenfalls hohe Bindungsaffinitäten im niedrigen μM -Bereich (Häberlein *et al.*, 1994; Marder *et al.*, 1996 a). In der Wurzel von chinesischem Helmkraut (*Scutellaria baicalensis*) hat man das Skullcapflavon als aktivstes Flavon ($\text{IC}_{50} = 0,36 \mu\text{M}$) neben Wogonin ($\text{IC}_{50} = 3,0 \mu\text{M}$), Baicalein ($\text{IC}_{50} = 10,1 \mu\text{M}$) und Scutellarein ($\text{IC}_{50} = 21,0 \mu\text{M}$) identifiziert. Glykosidisch gebundene Derivate wie das Baicalin (Glu-7-Baicalein) zeigten

wesentlich geringere Bindungsaktivitäten ($IC_{50} = 137,1 \mu\text{M}$) als ihre korrespondierenden Aglykone (Liao *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 2000). Verbindungen aus den übrigen Substanzklassen der Flavonoide, wie die Flavanone und Flavonole, zeigten *in vitro* ebenfalls keine oder nur sehr geringe Affinität zum BZD-R (Häberlein *et al.*, 1994).

Trotz der im Vergleich zu Diazepam oft niedrigeren *in vitro*-Affinitäten hat man bei einigen Repräsentanten der Flavone (Flavon, Chrysin, Apigenin, 6,3'-Dinitroflavon, 6-Bromo-3'-nitroflavon, Wogonin) anxiolytische Wirkungen in Tierverhaltenstests beobachtet und zum Teil bereits patentiert (Cassels *et al.*, 1995; Paladini und Medina, 1998; Hui *et al.*, 2002). Neben den angstlösenden Eigenschaften wurden keine oder nur wenige myorelaxierende, sedative und amnestische Nebenwirkungen beobachtet, so dass das pharmakologische Profil dieser Flavone als das von partiellen Agonisten eingestuft werden konnte (Wolfman *et al.*, 1994; Salgueiro *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1998; Hui *et al.*, 2002). Bis jetzt ist nicht zweifelsfrei gezeigt worden, ob die beobachteten Wirkungen durch direkte Bindung der oral applizierten Flavone am BZD-R zustande kommen. Auch eine durch Metabolite oder durch Folgereaktionen im Organismus ausgelöste Wirkung wäre denkbar, vor allem weil fast keine oder nur sehr spärliche Informationen zur Adsorption, zur pharmakologischen Verteilung und zur Blut-Hirn-Schranke-Gängigkeit der betreffenden Flavonderivate vorhanden sind. Die ersten Hinweise für eine *in vivo*-Relevanz von Flavonen als neuroaktive Substanzen lieferte eine Studie von Datla *et al.* (2001). Bei Untersuchungen der neuroprotektiven Eigenschaften des natürlichen Flavonderivats Tangeretin (4',5,6,7,8-Pentamethoxyflavon) konnte man nach oraler Applikation eindeutig die Blut-Hirn-Schranke-Gängigkeit dieser Substanz im Tiermodell beweisen. Signifikante Mengen dieses methoxylierten Flavons wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in verschiedenen Hirnregionen detektiert (Datla *et al.*, 2001). Ob auch weniger lipophile Derivate die Blut-Hirn-Barriere überqueren können und sich entsprechend ihrer Wirkungsprofile nur in bestimmten Hirnbereichen anreichern, muss durch entsprechende Studien belegt werden.

2.9.2 Diterpene

Die Substanzklasse der Diterpene (Abb. 6) ist eine weitere wichtige Gruppe natürlicher BZD-R-Liganden. Bereits Anfang der 90er Jahre wurden diterpenoide Chinone (Tanshinone) als aktive Komponenten in der chinesischen Salbei-Wurzel (Danshen, *Salvia miltiorrhiza*) identifiziert (Chang *et al.*, 1990). Der aktivste Vertreter dieser

Gruppe, Miltiron (Abb. 6), besitzt einen IC_{50} -Wert von $0,3 \mu M$. Nach oraler Gabe im Tiermodell zeigte Miltiron die partiell agonistische Wirkung eines Tranquilizers ohne muskelrelaxierende Effekte (Lee *et al.*, 1991). Nach chronischer Applikation beobachtete man weder ein Suchtpotential, noch eine Abhängigkeitsreaktion. In einer anschließend durchgeführten Struktur-Wirkungsstudie wurde der Einfluss des Isopropyl-Restes, sowie des Ringes A untersucht. Der Ring A stellte sich als essentiell für das Vorhandensein einer Bindungsaktivität heraus, wobei die Ringerweiterung zu einem 7-er oder 8-er Ring tolerabel erschien. Die Entfernung der Isopropyl-Gruppe resultierte dagegen in einer um das 70-fache geringeren Affinität, die jedoch durch Einführung einer Methylgruppe wieder hergestellt werden konnte (Chang *et al.*, 1991). Bis heute wurden keine weiteren *in vivo*-Untersuchungen zur Wirkung von Diterpenen an zentralnervösen Inhibierungsmechanismen veröffentlicht. Auf diesem Gebiet bedarf es weiterer Grundlagenforschung.

Die dargestellte Situation zeigt, dass sowohl BZD-artige, als auch Nicht-BZD-artige Liganden des BZD-R in der Natur weit verbreitet sind. Die Bindung an den BZD-R und somit ein Eingriff in die neuronalen Prozesse inhibitorischer Mechanismen kann sowohl bei der Entstehung als auch bei der Therapie einiger zentralnervöser Erkrankungen des Menschen von großer Bedeutung sein.

Die „natürliche“ Herkunft der BZD und vor allem ihre endogene Entstehung in Pflanzen konnte bisher nicht gezeigt werden. Die Klärung dieser Frage war eine Schlüsselaufgabe dieser Arbeit. Durch Kombination eines biologischen Testsystems mit instrumentell-analytischen Methoden sollte das Vorkommen von BZD in steril kultivierten Pflanzen untersucht werden. Auf diese Weise sollte die pflanzliche *de novo*-Synthese dieser Substanzen belegt und eine mikrobielle Beteiligung hierbei ausgeschlossen werden.

Eine weitere Zielsetzung bestand darin, unter den Nicht-BZD-artigen Liganden neuartige, natürliche Liganden mit dem pharmakologischen Profil eines partiellen Agonisten zu identifizieren. Bekannte pflanzliche Sedativa sollten mittels eines Radiorezeptorbindungsassays auf BZD-R-Aktivität untersucht werden. Anschließend sollten die für die Aktivität verantwortlichen Wirkstoffe isoliert und mittels *in vitro*- und *in vivo*-Modellen am BZD-R charakterisiert werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Untersuchungen zum Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine

„Natürliche“ BZD hat man in zahlreichen pflanzlichen Nahrungsquellen nachgewiesen, so z.B. in der Kartoffel, im Getreide und in verschiedenen Gemüsearten (Wildmann *et al.*, 1988 a; Unseld *et al.*, 1989). Eine Kontamination mit industriell produzierten Benzodiazepinderivaten wurde mehrmals ausgeschlossen (vgl. Abschnitt 2.5). Über die Biosynthese in pflanzlichen Geweben liegen bislang keine Informationen vor. Als grundlegend erschien die Frage, ob Pflanzen selbst Benzodiazepine synthetisieren können, oder ob diese Substanzen aus dem Stoffwechsel von Mikroorganismen stammen.

Im Rahmen von Untersuchungen zu endogenen Strukturanaloga der BZD wies die Existenz von Cyclopeptin (Abb. 8), einem BZD ohne Diazepam-analoger Wirkung, auf eine Vorstufensynthese durch Mikroorganismen hin. Man postulierte, dass diese Substanz, die durch den Pilz *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium* aus Anthranilsäure und L-Phenylalanin gebildet wurde, eine Zwischenverbindung der biochemischen *de novo*-Synthese von 1,4-Benzodiazepinen darstellt (Bringmann, 1992).

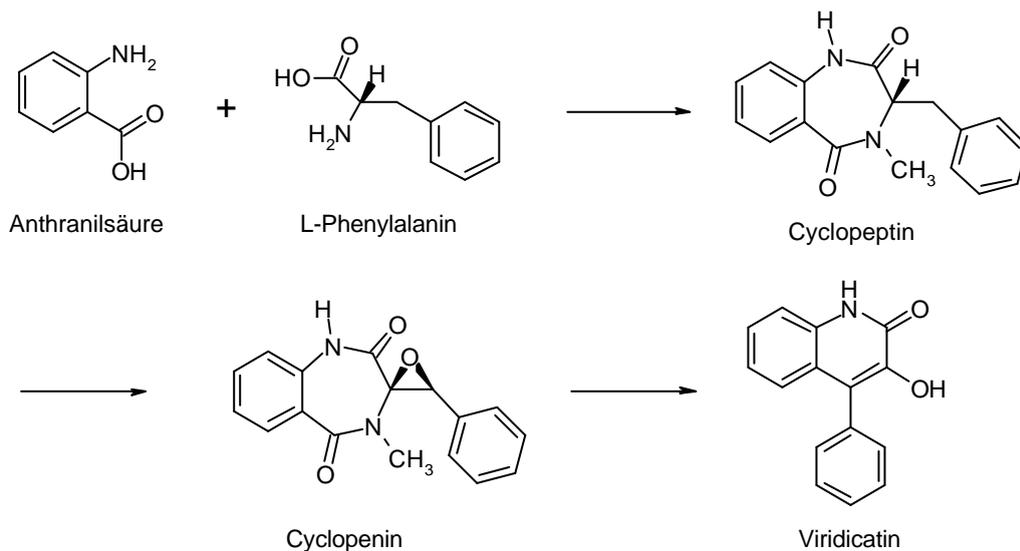


Abb. 8 Bildung von Cyclopeptin und Viridicatin durch *Penicillium* Spezies (Bringmann, 1992)

Cyclopeptin gilt als Vorstufe von Viridicatin, das neben einem weiteren Metaboliten, dem Cyclopenin, in *Penicillium sp.* vorgefunden wurde (Bringmann, 1992). Da Viridicatin, mit Ausnahme eines Stickstoffatoms zwischen C-3 und C-4, bereits das für die Entstehung Diazepam-analoger BZD nötige Strukturgerüst besitzt, wurde es als Schlüsselsubstanz der natürlichen BZD-Synthese vermutet (Bringmann, 1992). Ausgehend von dieser etablierten *in vivo*-Bildung von Viridicatin haben Bringmann und Mader (1995) auf der Basis von bekannten biochemischen Umsetzungen zwei mögliche Biosynthesewege in Mikroorganismen vorgeschlagen (Abb. 9).

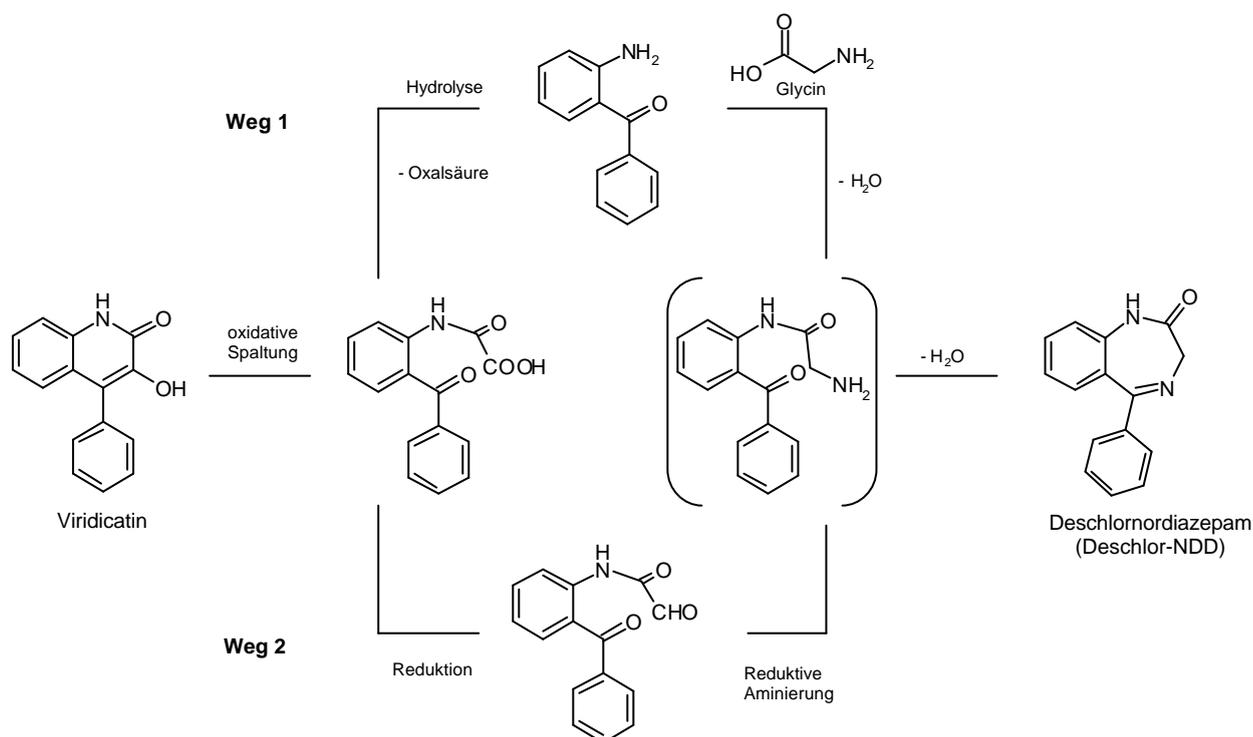


Abb. 9 Theorie zur Biosynthese „natürlicher“ Benzodiazepine in *Penicillium sp.* nach Bringmann und Mader (1995)

In Verfütterungsstudien gelang es Bringmann und Mader (1995), ein *in vivo* gebildetes 1,4-Benzodiazepin, das Deschlornordiazepam (= Deschlor-N-desmethyldiazepam), nach Applikation von 2-Aminobenzophenon und Glycin (Weg 1) in *Penicillium verrucosum var. verrucosum* nachzuweisen. Dementsprechend konnte in dieser Spezies eine zur industriellen Synthese analoge Entstehung BZD-artiger Verbindungen belegt werden. Es wurde weiterhin diskutiert, dass 2-Aminobenzophenon (Weg 1) nach oxidativer Spaltung und anschließender Hydrolyse von Viridicatin in Mikroorganismen vorliegen kann (Bringmann, 1992; Bringmann und Mader, 1995). Da die BZD aus den 2-Aminobenzophenon-Vorstufen nur in dem Stamm *Penicillium verrucosum var.*

verrucosum und nicht in den Stämmen *Penicillium verrucosum* var. *cyclopium*, *Penicillium cyclopium* SM72 sowie *Penicillium mali* gebildet worden waren, schloss man eine spontane nicht-enzymatische Kondensationsreaktion aus. Weiterhin wurde abgeleitet, dass die enzymatische Ausstattung der Mikroorganismen eine wichtige Rolle bei der Benzodiazepinentstehung habe. Weitere Untersuchungen sind nötig, um das natürliche Vorkommen und die Verfügbarkeit der entsprechenden 2-Aminobenzophenone zu prüfen (Bringmann und Mader, 1995).

Bisher gab es keine Hinweise dafür, dass die in pflanzlichen Geweben nachgewiesenen „natürlichen“ BZD durch rein pflanzliche Synthese entstehen. Um die Frage der mikrobiellen Beteiligung an dieser Biosynthese zu klären und damit einen weiteren Beitrag zur Theorie der Benzodiazepinherkunft zu leisten (Abb. 10), wurde das Vorkommen von BZD in steril kultivierten Pflanzen untersucht.

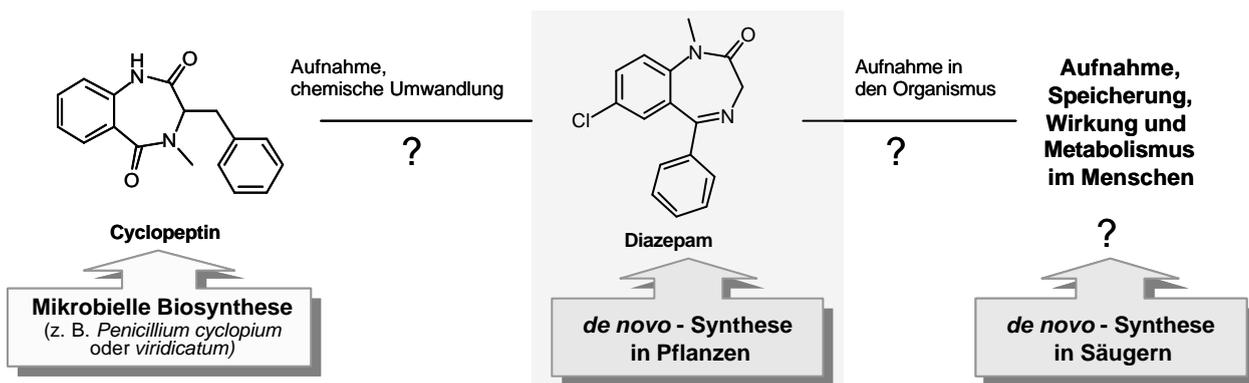


Abb. 10 Theorien zur Herkunft „natürlicher“ Benzodiazepine und ihre Aufnahme in den Säugetierorganismus (Izquierdo und Medina, 1993)

Den ersten Hinweis auf das Vorkommen von BZD oder anderen BZD-R-Liganden in Extrakten steril kultivierter Pflanzen sollten Untersuchungen der Bindungsaktivität im Radiorezeptorbindungsassay (RRA) liefern. Die Anwendung dieses sehr empfindlichen biologischen Tests ermöglichte eine schnelle Auswahl von Proben, die BZD-R-Liganden enthalten. Mittels empfindlicher analytischer Verfahren, wie der on-line Hochleistungsflüssigchromatographie/Elektrospray (ESI)-Tandemmassenspektroskopie (HPLC-ESI-MS/MS), sollten BZD in den bindungsaktiven Proben identifiziert werden.

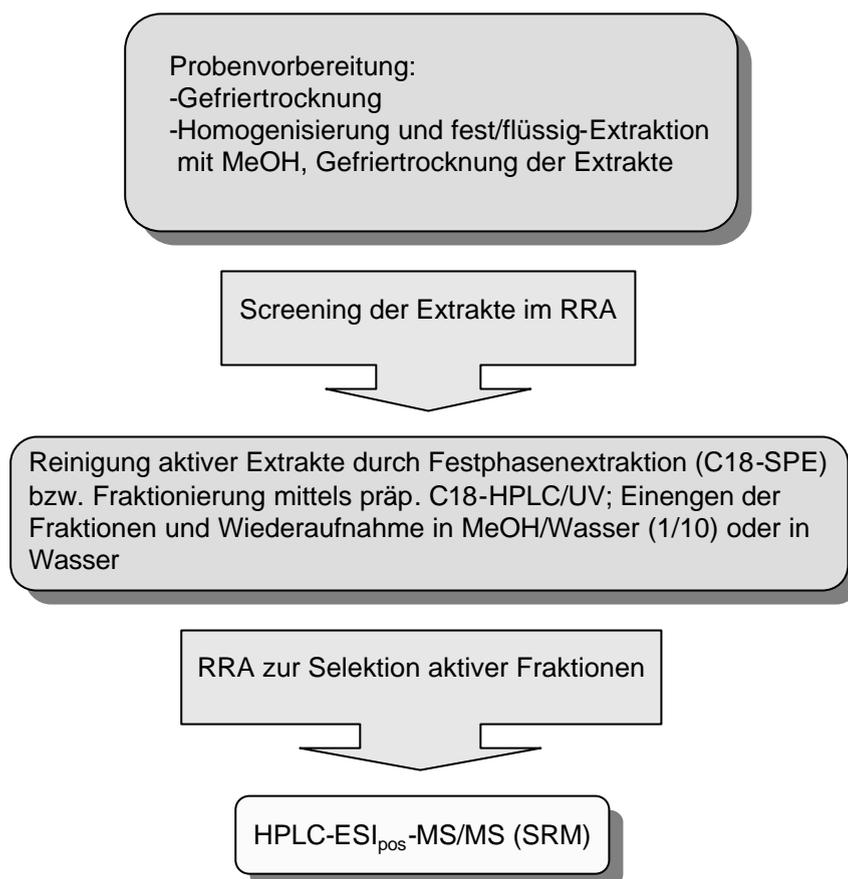


Abb. 11 Probenaufarbeitung zum Nachweis „natürlicher“ Benzodiazepine in steril kultivierten Pflanzenkalli und Regeneraten

3.1.1 Nachweis von BZD-R-Liganden-Aktivität in steril kultivierten Pflanzen

Um die mikrobielle Beteiligung bei der Entstehung „natürlicher“ Benzodiazepine auszuschließen, wurden Pflanzen verschiedener Spezies steril gezüchtet, u.a. Kartoffel (*Solanum tuberosum*), Tabak (*Nicotiana tabacum*), *Catharanthus roseus*, Weinraute (*Ruta graveolens*) und Estragon (*Artemisia dracuncululus*). Ausgehend von sterilen Explantaten wurden Pflanzenkalli ebenfalls unter sterilen und kontrollierten Klimabedingungen kultiviert. Aus den Kalli wurden zum Teil unter hormoneller Einwirkung sterile pflanzliche Regenerate hergestellt.

Die Anwesenheit natürlicher Liganden des BZD-R wurde bei Studien methanolischer Pflanzenextrakte mittels RRA überprüft. Diese Untersuchungen führten zu einer Vorauswahl an Pflanzenproben mit BZD-R-Aktivität (vgl. Tab. 4 und 5).

3.1.1.1 Untersuchungen der Bindungsaktivitäten am BZD-R im Radiorezeptorbindungsassay (RRA)

Der Radiorezeptorbindungsassay (RRA) ist eine sehr empfindliche Methode zum Nachweis von Rezeptorliganden. Dazu sind BZD-R in Form einer Membranpräparation aus humanem frontalem Kortex (*Cortex frontalis*) verwendet worden. Die zu untersuchende Probe wurde mit dieser Membranpräparation inkubiert. In der Probe eventuell vorhandene Liganden wurden kompetitiv durch einen spezifischen Radioliganden, ^3H -Flumazenil (Ro 15-1788), von den BZD-R verdrängt. Die im RRA eingesetzte Rezeptorenmenge wurde anhand der Proteinkonzentration in der verwendeten Membranpräparation eingestellt. Der Proteingehalt ist mittels Proteinassay (Bio-Rad) nach der Methode von Bradford bestimmt worden (Bradford, 1976). Er betrug in den durchgeführten RRA 0,4 bis 0,6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die kompetitive Verdrängung des in einer konstanten Konzentration eingesetzten Radioliganden (ca. 1 nM) wurde in Abhängigkeit von der Konzentration der untersuchten Probe gemessen (Verdünnungsreihe). Der noch an den Rezeptoren gebundene Radioligand wurde nach Filtration der Membranen mittels Szintillationsmessung bestimmt (Abb. 12). Aus den gemessenen Radioaktivitäten (in dpm) wurde unter Berücksichtigung der unspezifischen Bindung der Anteil des noch am Rezeptor spezifisch gebundenen Radioliganden berechnet. Die unspezifische Bindung an begleitende Proteine wurde durch die gesamte Verdrängung des Radioliganden von den Rezeptoren mittels eines hochkonzentrierten, unmarkierten Liganden (Clonazepam) bestimmt. Die Abhängigkeit der Radioligandenbindung von der Probenkonzentration wurde als sigmoide Bindungskurve graphisch dargestellt. Deren Wendepunkt stellte den IC_{50} -Wert (= 50 % inhibitory concentration) als charakteristische Messgröße der Bindungsaktivität dar. Die IC_{50} -Werte der untersuchten Proben entsprachen den Konzentrationen, die nötig waren, um 50 % des am Rezeptor gebundenen Radioliganden zu verdrängen.

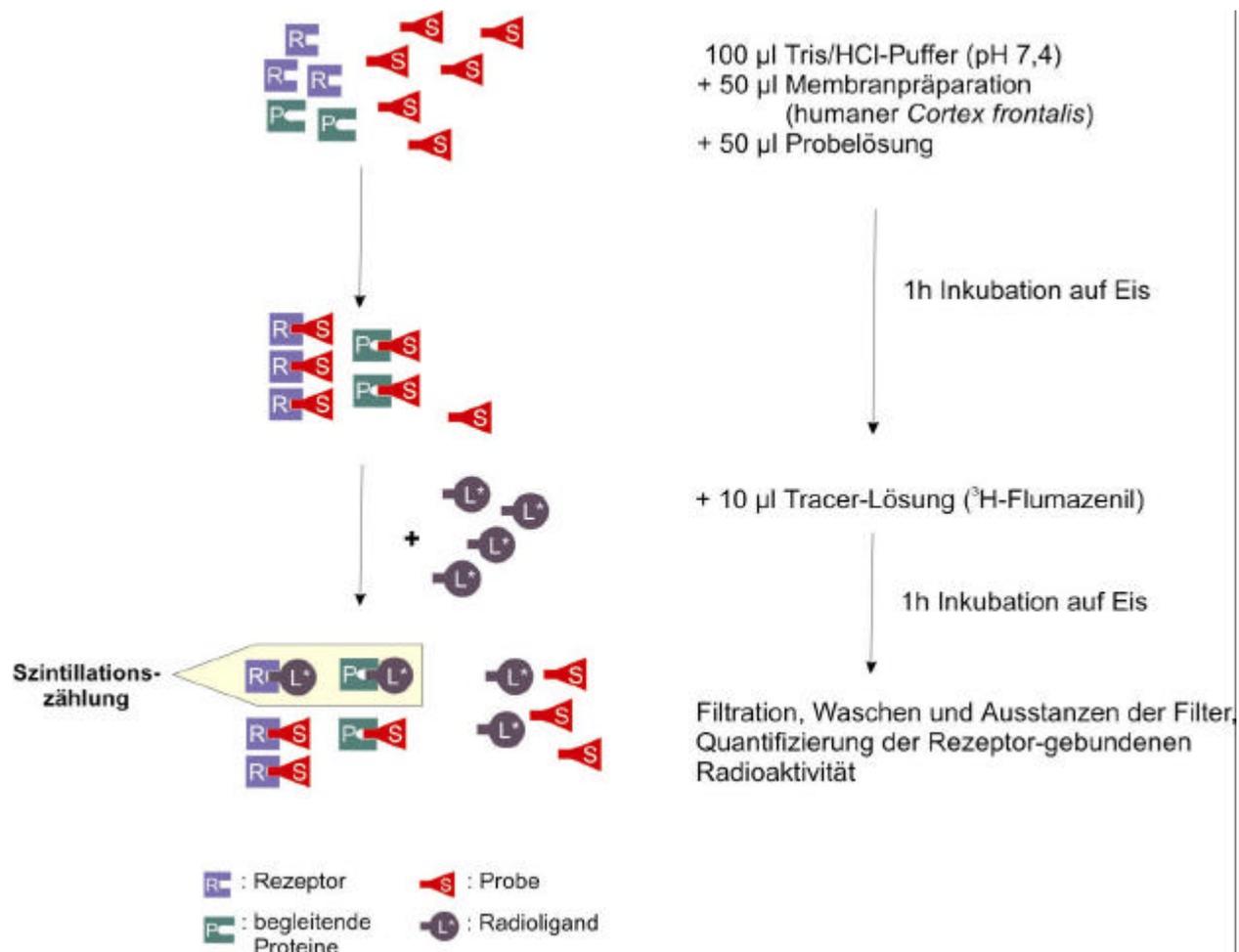


Abb. 12 Schematische Darstellung des verwendeten Radiorezeptorbindungsassays (RRA)

Insgesamt wurden mehr als 40 sterile Pflanzenproben auf BZD-R-Aktivität im RRA untersucht. In den Proben der Kalluskulturen und der Regenerate wurden unterschiedlich starke Bindungsaktivitäten beobachtet. Einige Extrakte zeigten keine Affinitäten zum BZD-R (Tab. 4 und 5).

Der methanolische Extrakt einer steril kultivierten Estragonkultur (*Artemisia dracuncululus*) zählte zu den aktivsten Proben. In Abb. 13 sind die Bindungskurven dieses Extraktes und der Positivkontrolle Clonazepam dargestellt. Die Bindungsstärken wurden mit IC_{50} -Werten von 7,0 $\mu\text{g/ml}$ für die Estragonkultur bzw. 0,2 ng/ml für Clonazepam bestimmt.

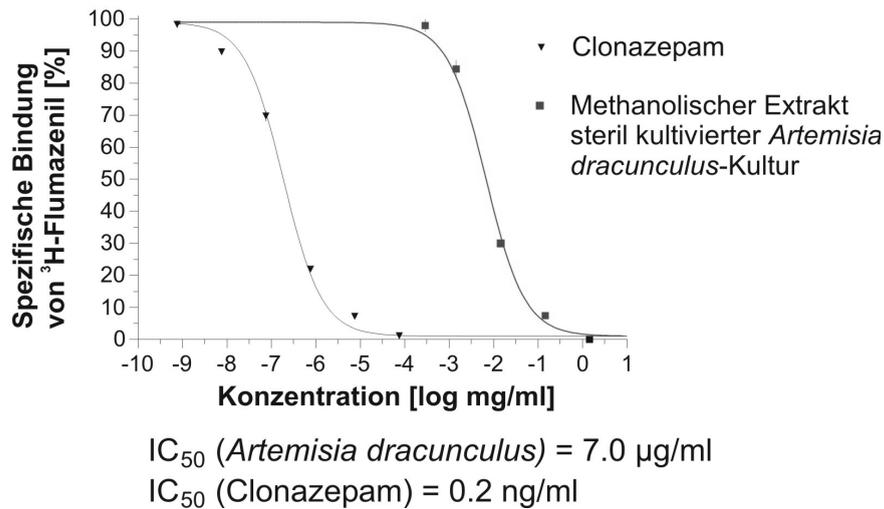


Abb. 13 Kompetitive Verdrängung von 3 H-markiertem Flumazenil von den BZD-R durch den methanolischen Extrakt des Estragonkallus bzw. durch Clonazepam (als Referenz)

Die Tabellen 4 und 5 fassen die Ergebnisse der Bindungsstudien mit sterilen Kulturen der Kartoffelpflanze *Solanum tuberosum* (Tab. 4) und mit Kulturen anderer Pflanzenarten (Tab. 5) zusammen. Tab. 5 enthält zum Teil IC_{50} -Werte der Eluate, die nach Reinigung der methanolischen Extrakte mittels C18-Festphasenextraktion erhalten wurden.

Tabelle 4 Bindungsaktivitäten methanolischer Extrakte steriler *Solanum tuberosum*-Kulturen am BZD-Rezeptor (Versuchsbedingungen in Abschnitt 4.3.2.1)

Probe	Anzahl der Proben	IC_{50} [mg/ml]
<i>Solanum tuberosum</i> -Kalli auf MS-Medien (ohne Elicitoren)	5 7	0,3 - 0,9 inaktiv*
Kartoffelkraut-Regenerate auf MS-Medien (ohne Elicitoren)	3	0,2 - 0,5
<i>Solanum tuberosum</i> -Kalli auf MS-Medien mit Kinetin-Zusatz (2-4 mg/ml)	3	inaktiv bei 2 mg/ml Hormon, 0,3 - 0,9 bei höherer Hormonkonz.
Regenerate auf MS-Medien mit Zeatin-Zusatz (0,1-2,0 mg/ml)	4	0,3 - 0,9
Regenerate auf MS-Medien mit 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure-Zusatz (0,1-32 mg/ml)	7	0,1 - 0,3 inaktiv bei 8 und 32 mg/ml Hormonkonz.

*inaktiv: $IC_{50} > 1$ mg/ml

Tabelle 5 Bindungsaktivitäten methanolischer Extrakte steril kultivierter Pflanzenkalli am BZD-R; die aufgelisteten IC₅₀-Werte wurden für jeweils eine Probe erhalten; in Klammern befinden sich die Nährmedienangaben (Hormonkonzentrationen in mg/l, Versuchsbedingungen in Abschnitt 4.3.2.1)

Kallusprobe	IC ₅₀ [mg/ml]
<i>Papaver somniferum</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	0,02
<i>Mentha spicata</i> (AM+0,3 Kin+6 2,4-D+2,0 IES+2,0 NES)	inaktiv**
Teufelskralle (MS+0,3 Kin+2,0 IES)	0,81
<i>Ruta graveolens</i> (AM+0,2 Kin+2,0 2,4-D+2,0 IES)	0,55
<i>Ruta graveolens</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	0,07*
<i>Nicotiana tabacum</i> (MS+0,3 Kin+2,0 IES)	0,02*
<i>Nicotiana tabacum</i> (MS+0,3 Kin+4,0 IES)	0,01*
<i>Duboisia myoporoides</i> (AM+0,2 Kin+2,0 2,4-D+2,0 IES)	0,31*
<i>Catharanthus roseus</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	inaktiv**
<i>Catharanthus roseus</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	0,19
<i>Artemisia dracunculus</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	0,01
<i>Salvia officinalis</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	inaktiv**
<i>Artemisia dracunculus</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	inaktiv**
<i>Peganum harmala</i> (AM+0,2 Kin+2,0 2,4-D+2,0 IES)	inaktiv**
<i>Chamomilla recutita</i> (MS+0,3 Kin+4,0 NES)	inaktiv**

* SPE-C18-Eluat; **inaktiv: IC₅₀ > 1 mg/ml

Aktivitätssteigerungen aufgrund von Hormonzusätzen in den Nährmedien wurden nicht beobachtet.

Das Screening der Bindungsaktivitäten der steril gezüchteten Pflanzenkulturen führte zur Identifizierung einiger aktiver Extrakte, die sich durch niedrige IC₅₀-Werte auszeichneten. Besonders starke Rezeptorbindung ist bei den Kulturen der Estragonpflanze (*Artemisia dracunculus*) und der Tabakpflanze (*Nicotiana tabacum*) festgestellt worden. Bei den Kartoffelproben wurden sowohl aktive als auch inaktive Extrakte erhalten.

3.1.1.2 Untersuchung bindungsaktiver Probenextrakte mittels LC-MS/MS

Die HPLC-Tandemmassenspektroskopie (LC-MS/MS) im „selected reaction monitoring“ (SRM)-Modus ist eine empfindliche und selektive Nachweismethode in der Spurenanalytik. Sie kann auch bei komplex zusammengesetzten Matrices angewendet werden. Als Ionisierungstechnik wird die Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus

(ESI_{pos}) eingesetzt, da sich BZD als stickstoffhaltige Verbindungen mit dieser Methode sehr gut ionisieren lassen (Kleinschnitz *et al.*, 1996). Nach Selektion und Stossaktivierung eines Elternions wird ein einziges Produktion detektiert, das bei der Fragmentierung gebildet wurde. Die Funktionsweise eines Tandemmassenspektrometers mit ESI_{pos}-Ionisierung ist in Abschnitt 3.4 näher beschrieben. Unter Berücksichtigung der chromatographischen Information (Retentionszeit) erhält man somit einen dreifachen analytischen Filter. Bei Einbeziehung authentischer Referenzproben ist die Gefahr falsch positiver Befunde sehr gering. SRM-Experimente können zeitabhängig durchgeführt werden, um die Empfindlichkeit zu erhöhen und die Nachweisgrenze weiter zu senken.

Der aktive Estragonkallus-Extrakt und die anderen aktiven Kartoffelgewebeextrakte wurden mittels LC-MS/MS-SRM auf das Vorkommen von BZD untersucht. Die Untersuchung der aktiven *Nicotiana tabacum*- und *Papaver somniferum*-Kalliextrakte scheiterte an den zu geringen zur Verfügung stehenden Materialmengen.

3.1.1.2.1 Etablierung eines SRM-Experimentes zur Identifizierung ausgewählter Benzodiazepine

Die bekanntesten BZD wurden als Referenzen ausgewählt und mittels HPLC-MS/MS-Technik untersucht. Nach Ermittlung der Retentionszeiten und der Fragmentierungsmuster mittels HPLC(C18)-ESI_{pos}-MS/MS ist die Trennung optimiert und ein zeitgeschaltetes SRM-Experiment durchgeführt worden (Abb. 14). Diese schnell durchführbare SRM-Screeningmethode erlaubte den Nachweis von sechs bekannten BZD innerhalb einer HPLC-Analyse.

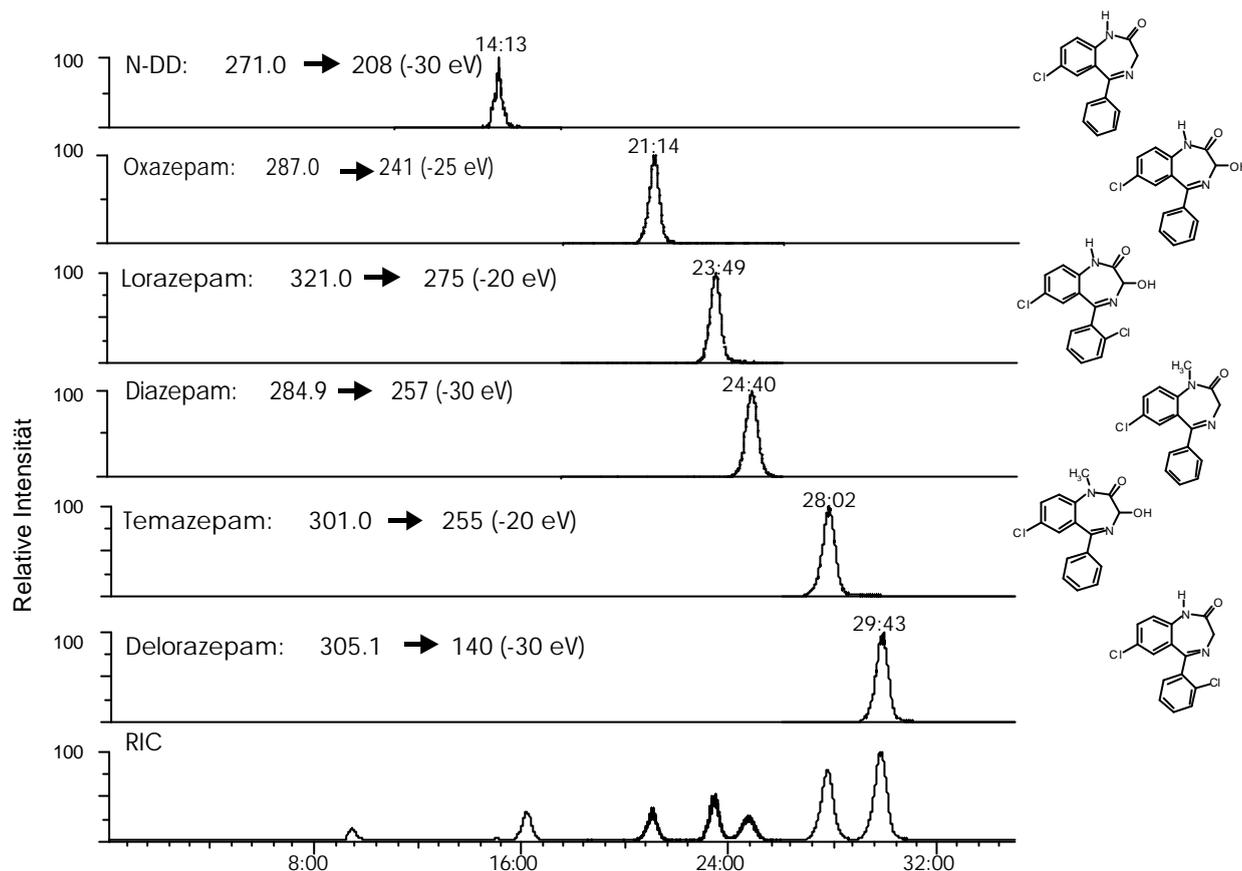


Abb. 14 HPLC-ESI_{pos}-SRM-Chromatogramm einer BZD-Referenzmischung. Die Chromatogramme zeigen die Produktionsspuren der Benzodiazepine mit den dazugehörigen detektierten Ionenpaaren und der Kollisionsenergie (in Klammern). RIC: Totalionenchromatogramm. HPLC: Säule: Knauer Eurospher 100 C-18 (100 x 2.0 mm, 5 µm), Fließmittel: H₂O/0,05 % Trifluoressigsäure (A) – Acetonitril (B), Gradient: 20-38 % B in 35 min, Fluss: 200 µl/min

3.1.1.2.2 Reinigung und Vorfraktionierung BZD-R-Liganden-aktiver Extrakte

Zur Konzentrierung der BZD und zur Eliminierung eventueller Matrixeinflüsse auf die Retentionszeiten in den SRM-Experimenten wurden die aktiven methanolischen Extrakte vor der LC-MS/MS-Analytik mittels Festphasenextraktion an C18-Material (SPE C18) gereinigt. Mit dieser Methode ließen sich jedoch nicht alle störenden Matrixbestandteile entfernen. Bessere Ergebnisse sind nach Vorfraktionierung mittels präparativer HPLC (Eurospher 100 RP-18, 250 x 16 mm, 5 µm) erzielt worden. Die SPE-Eluate bzw. die mittels präparativer HPLC gewonnenen Fraktionen wurden vor der LC-MS/MS-Analytik erneut auf ihren Gehalt an BZD-R-Liganden im RRA getestet.

Aktive Fraktionen wurden bei der präparativen HPLC-Trennung des Estragon (*Artemisia dracunculus*)- und des Kartoffelkraut (*Solanum tuberosum*)-Extraktes erhalten. Als repräsentatives Beispiel ist in Abb. 15 die Fraktionierung eines Estragonextraktes mit den zugehörigen, im RRA ermittelten Aktivitäten der Fraktionen dargestellt.

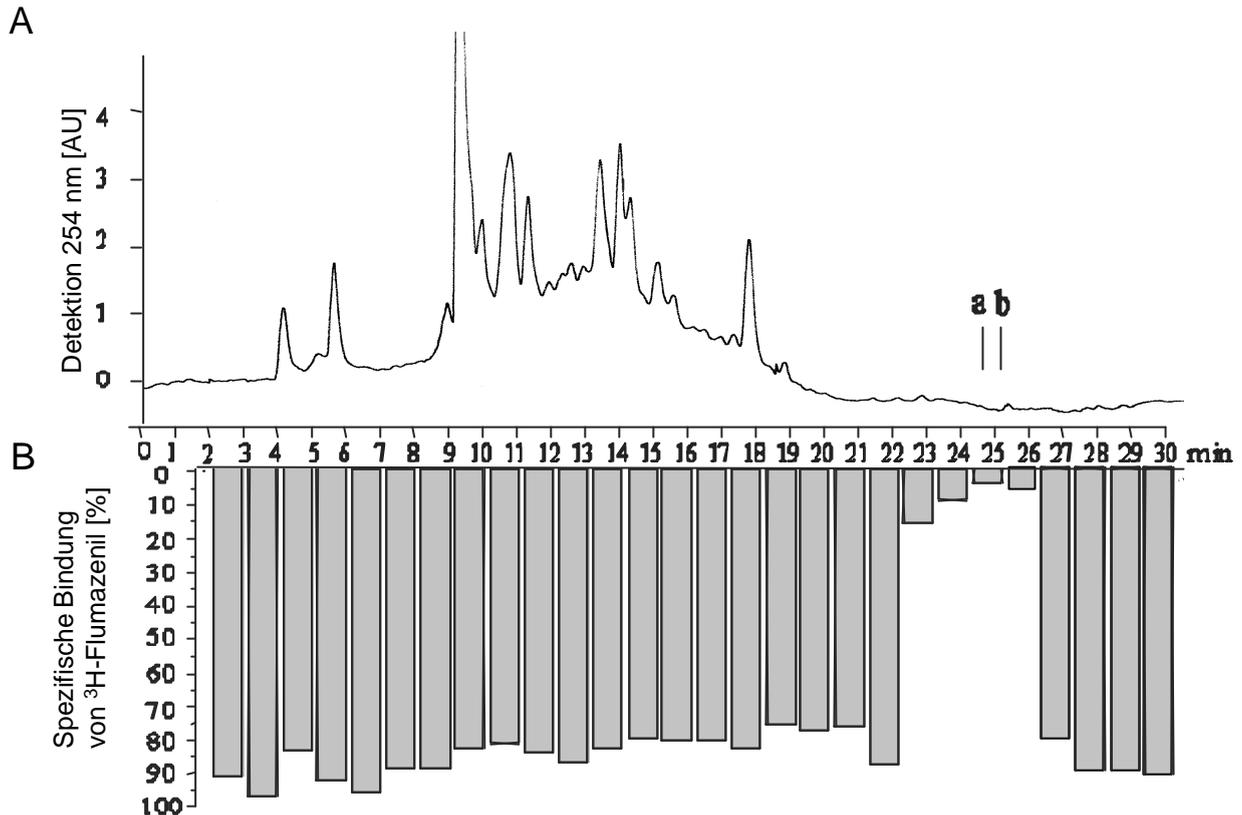


Abb. 15 Fraktionierung des methanolischen Estragon (*Artemisia dracunculus*)-Extraktes mittels präparativer RPC18-HPLC. A: Chromatogramm des HPLC-Laufes; B: Bindungsaktivitäten der gesammelten Fraktionen im RRA; Retentionszeiten (min) der Referenzen: Temazepam (a) 24:40 und Delorazepam (b) 25:10

3.1.1.2.3 SRM-Screening aktiver HPLC-Fractionen

Mittels SRM-Analytik sind in einigen Proben BZD nachgewiesen worden. In den Extrakten der Estragonkultur und der Kartoffelkrautprobe waren die vorliegenden Konzentrationen hoch genug, um Tochterionenexperimente durchzuführen. Auf diese Weise konnten Diazepam und Temazepam in den Regeneraten von Kartoffelkraut chromatographisch und massenspektroskopisch eindeutig nachgewiesen werden (Abb. 16 B und 17). In der Zellkultur von Estragon (*Artemisia dracunculus*) konnten die BZD

Delorazepam und Temazepam detektiert und anhand ihrer Massenspektren identifiziert werden (Abb. 16 A und 17). Die in den Tochterionenexperimenten erhaltenen, typischen Fragmentmuster (Abb. 17) bestätigten die positiven SRM-Nachweise.

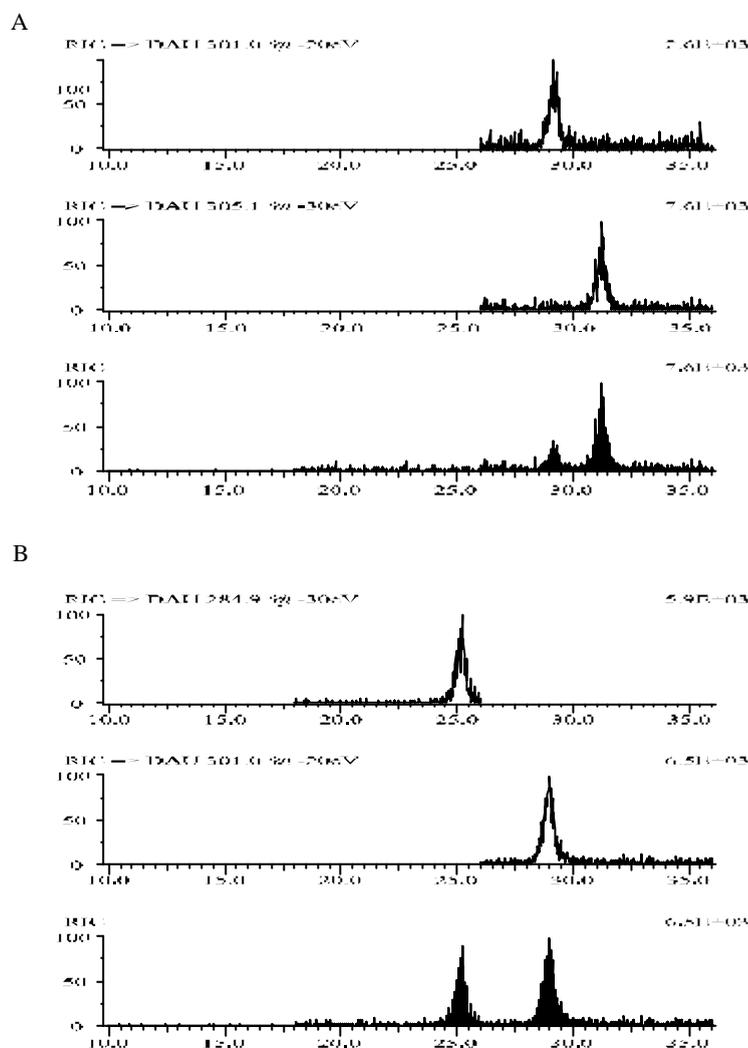


Abb. 16 SRM-Chromatogramme aktiver Estragon- (A) und Kartoffelkraut-Fractionen (B). Ausgewählte SRM-Spuren mit positiver Detektion von Temazepam (301)-, Delorazepam (305)- und Diazepam (285)-Ionenpaaren

Quantitative Bestimmungen mit Hilfe von SRM-Experimenten sind nicht unproblematisch, da die Reproduzierbarkeit von zahlreichen Parametern abhängt (Fließmittelzusammensetzung, Probenmatrix, Aerosolqualität, Tuning, usw.). Auch innerhalb einer Serie sind Schwankungen möglich. Die erhaltenen LC-MS/MS-Daten wurden deshalb lediglich zur Abschätzung der vorliegenden BZD-Gehalte herangezogen. Aus der im

RRA gemessenen Aktivität wurde ein Benzodiazepingehalt von 20-200 ng/g in Estragon (Delorazepam: 100-200 ng/g; Temazepam: 20-30 ng/g) und 60-450 ng/g in Kartoffelkraut (Temazepam: 100-450 ng/g; Diazepam: 60-70 ng/g) ermittelt.

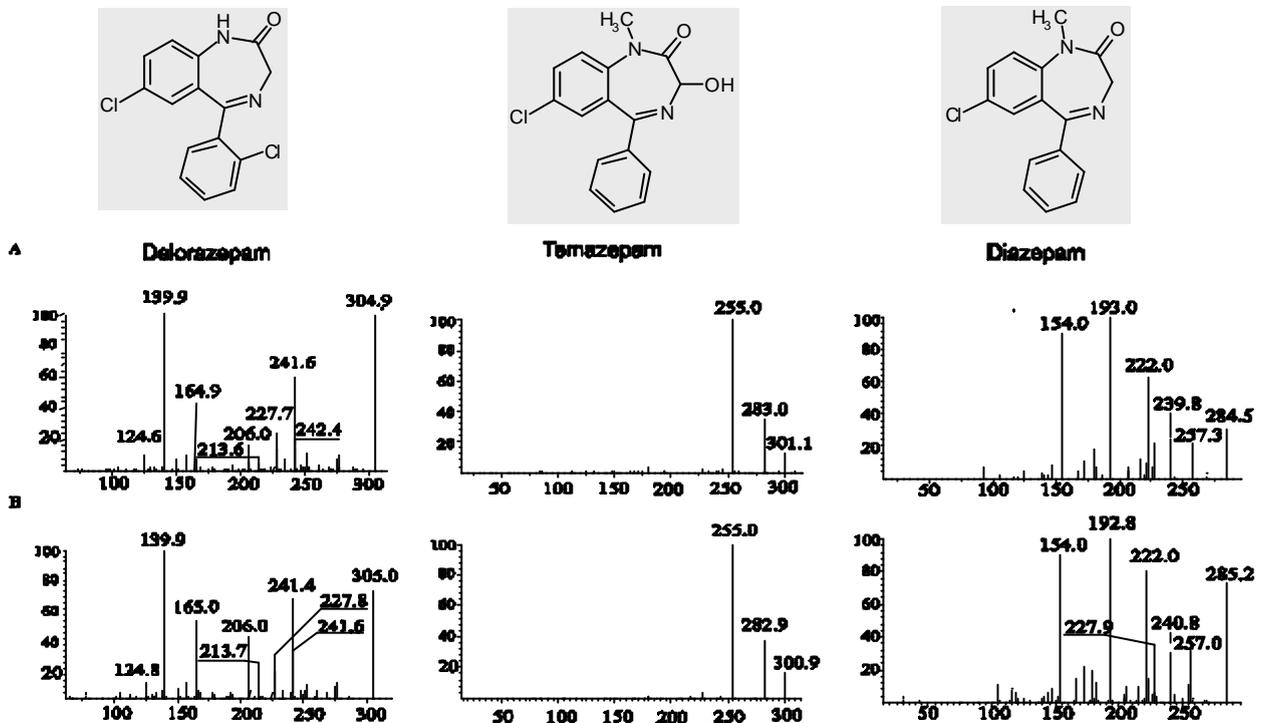


Abb. 17 Massenspektren der in sterilen Pflanzengeweben identifizierten Benzodiazepine Delorazepam, Temazepam, und Diazepam (A) und der entsprechenden Referenzsubstanzen (B)

Die Identifizierung von BZD in steril kultivierten Kallus- und Regenerat-Geweben beweist erstmals eine autonome *de novo*-Entstehung dieser Verbindungen in pflanzlichem Gewebe. Die Experimente können als Grundlage für die weitere Erforschung des pflanzlichen Biosyntheseweges dieser Wirkstoffgruppe herangezogen werden (Kavvadias *et al.*, 2000).

Mit diesen Ergebnissen wurde der Abschnitt zum Vorkommen „natürlicher“ Benzodiazepine abgeschlossen. Die weiteren Arbeiten konzentrierten sich zum einen auf die Untersuchungen der BZD-R-Liganden-Aktivität in volksmedizinisch genutzten Pflanzen, zum anderen auf die Isolierung der potentiellen Wirkstoffe aus BZD-R-aktiven Proben.

3.2 Untersuchung von Heilkräuterextrakten auf das Vorkommen von BZD-R-Liganden

Die Entdeckung natürlicher BZD-R-Liganden, die als Wirkstoffe zur selektiven Therapie zentralnervöser Störungen eingesetzt werden könnten, ist ein wichtiger Aspekt in der aktuellen Wirkstoffforschung. Bei den meisten sedativ und antikonvulsiv wirkenden Arzneipflanzen sind die für diese Wirkung verantwortlichen Bestandteile nicht bekannt. Um neue, am BZD-R wirksame Verbindungen zu identifizieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit handelsübliche getrocknete Blätter (bzw. Kräuter) verschiedener Pflanzen untersucht, von denen ihre beruhigende Wirkung in der Volksmedizin teilweise bekannt ist. Die Proben wurden aus dem Handel bezogen und nach einer methanolischen Extraktion auf Aktivität im RRA getestet. Die Aktivität der Extrakte wurde im RRA an Rezeptoren aus humanem *Cortex frontalis* untersucht. Die kompetitive Verdrängung eines spezifischen Radioliganden (^3H -Flumazenil, Ro 15-1788) in Abhängigkeit von der Konzentration der Proben diente zur Ermittlung der IC_{50} -Werte und somit zur Bestimmung der Rezeptoraffinität. Die IC_{50} -Werte der aktiven Extrakte bewegten sich im Bereich von 0,1 bis 1 mg/ml. In einigen Fällen ließ sich die Bindungsstärke durch eine Anreicherung an C18-Festphasen erhöhen. In Tab. 6 sind die Ergebnisse dieses Screenings zusammengefasst.

Die niedrigsten IC_{50} -Werte wurden bei den Extrakten aus Salbei-, Damiana- und Weißdornblättern, sowie bei Grünhafer, Mistel- und Estragonkraut festgestellt. Das bedeutete, dass diese Extrakte die höchsten Gehalte an BZD-R-Liganden aufwiesen oder die aktiveren Verbindungen enthielten und sich deshalb für die Isolierung potentieller BZD-R-Wirkstoffe am besten eigneten.

Tabelle 6 Bindungsaktivitäten von BZD-R-Liganden in methanolischen Extrakten aus Kräutern

Droge	IC ₅₀ [mg/ml]
Hopfenblüten, conc.	inaktiv*
Hopfendrüsen, <i>Glandulae lupuli</i> , gemahlen	inaktiv*
Hopfenblätter	0,63
Grünhafer, <i>Avenae sativa</i> , geschnitten	0,13
Salbeiblätter, <i>Folia Salviae off.</i> , conc.	0,12
Johanniskraut, <i>Herba Hyperici</i>	inaktiv*
Lavendelblüten, <i>Flores Lavandulae</i>	inaktiv*
Wermutkraut, <i>Herba absinthii</i> conc.,	0,17
Ginsengwurzel, <i>Radix Ginseng</i> , ostasiatisch	0,34
Damiana-Blätter, <i>Folia Damianae</i> conc.	0,10
Estragonkraut, <i>Herba dracunculi</i> conc.,	0,18
Mistelkraut, <i>Herba visci albi</i> , gemahlen	0,08
Weißdorn-Blätter, <i>Crataegus</i>	0,11
Melissen-Blätter, <i>Melisse off.</i>	inaktiv*
Bilsenkraut, <i>Hyoscyanus niger</i>	0,62
Eisenkraut, <i>Verbenae off.</i>	0,10
Schlafbeere, <i>Withania somnifera</i>	0,51
Orient. Mohn-Blätter, <i>Papaver orientalis</i>	0,91
Baldrian-Wurzel, <i>Valeriana off.</i>	inaktiv*
Baldrian-Blätter, <i>Valeriana off.</i>	0,73
Kava Kava-Blätter	0,17
Kava Kava-Trockenextrakt	0,26
<i>Symphytum off.</i>	0,34
<i>Ancistrocladus congolensis</i> , Ast	inaktiv*
Amerik. Klettertrompete, <i>Campsis radicans</i>	0,84

*inaktiv: IC₅₀ > 1 mg/ml

3.3 Isolierung und Charakterisierung von BZD-R-Liganden aus Salbei (*Salvia officinalis* L.)

Das Aktivitätsscreening pflanzlicher Extrakte zeigte eine hohe Affinität des Salbei-Extraktes (*Salvia officinalis* L.) zum BZD-R (vgl. Abschnitt 3.2). Die weiteren Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf die Isolierung und Charakterisierung von BZD-R-Liganden aus Salbei.

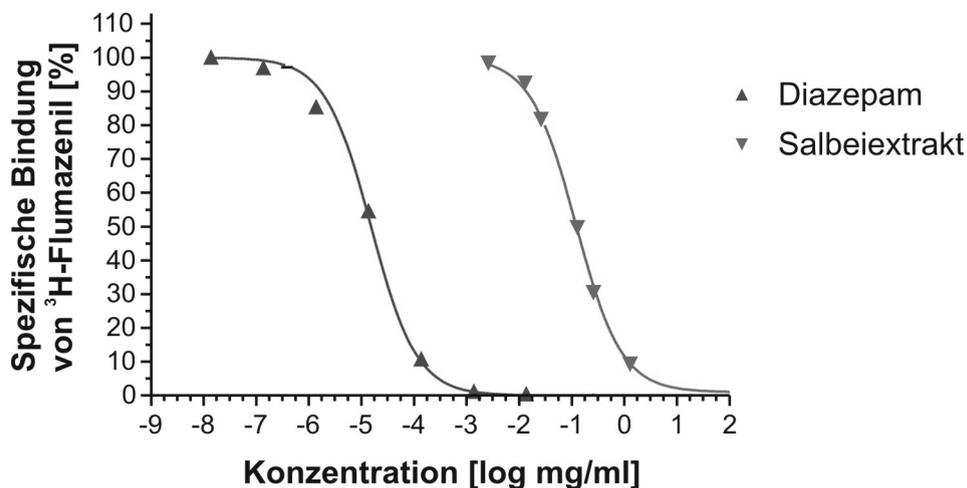
Echter Salbei (*Salvia officinalis* L.) gehört zur Familie der Lippenblütengewächse (Abb. 18). Die früher übliche Unterscheidung in die drei Subspezies *minor*, *major* und *lavandulifolia* gilt seit längerem als überholt (Wichtl, 2002). Diese Unterarten werden inzwischen als eigene Arten aufgefasst. Heute bezeichnet man die ssp. *minor* als *Salvia officinalis* L., die ssp. *major* als *Salvia grandiflora* ETL. (syn. *Salvia tomentosa* MILLER) und die ssp. *lavandulifolia* (VAHL) GAMS als *Salvia lavandulifolia* VAHL. Die letztgenannte liefert praktisch thujonfreie Blätter (Wichtl, 2002). Die von uns untersuchte Subspezies *Salvia officinalis* L. enthält α - und β -Thujon als Hauptkomponenten im ätherischen Öl.

Dem Salbei werden antibakterielle, fungistatische, virustatische, adstringierende, sekretionsfördernde und schweißhemmende Wirkungen zugesprochen (Wichtl, 2002). Er wird in vielen Erdteilen kultiviert und vor allem als aroma- und geschmacksgebende Komponente für kulinarische Zwecke verwendet.



Abb. 18 Salbei (*Salvia officinalis* L.)

Bereits Chipault (1952) berichtete von einer starken Hemmung der Lipidoxidation durch Salbei. Viele nichtflüchtige Verbindungen aus den Klassen der Diterpenoide, Triterpenoide und der Flavonoide sind in Würzburg bereits früher von Brieskorn und Mitarbeitern isoliert und charakterisiert worden (Brieskorn und Melchior, 1969; Brieskorn und Biechele, 1971; Brieskorn und Kapadia, 1979). Desweiteren ist die Salbeipflanze reich an flavonoiden und phenolischen Glykosiden (Lu und Yeap Foo, 2000). Da Salbei in der Volksmedizin auch bei nervösen Zuständen, Angst und Schlafstörungen eingesetzt wird, liegt der Bezug zur BZD-R-vermittelten Wirkung (vgl. Tab. 6) auf der Hand. Wie man aus der Bindungskurve des methanolischen Salbeiblätterextraktes (Abb. 19) ersehen kann, zeigte der Salbeiextrakt mit einem IC_{50} -Wert von etwa 0,12 mg/ml hohe Bindungsaktivität.



$$IC_{50} (\text{Diazepam}) = 1.5 \times 10^{-5} \text{ mg/ml} = 0.05 \mu\text{M}$$

$$IC_{50} (\text{Salbeiextrakt}) = 1.2 \times 10^{-1} \text{ mg/ml}$$

Abb. 19 Bindungskurven des methanolischen Salbeiblätterextraktes und von Diazepam (Referenz) am zentralen BZD-R, ermittelt im RRA durch Verdrängung des ³H-Flumazenils (³H-Ro 15-1788) von den Rezeptoren einer Membranpräparation aus humanem *Cortex frontalis*

Die Untersuchung des BZD-R-aktiven Salbeiblätterextraktes mittels HPLC/DAD zeigte ein komplexes Gemisch mit einem hohen Anteil von nur in geringen Konzentrationen vorliegenden Verbindungen (Abb. 20).

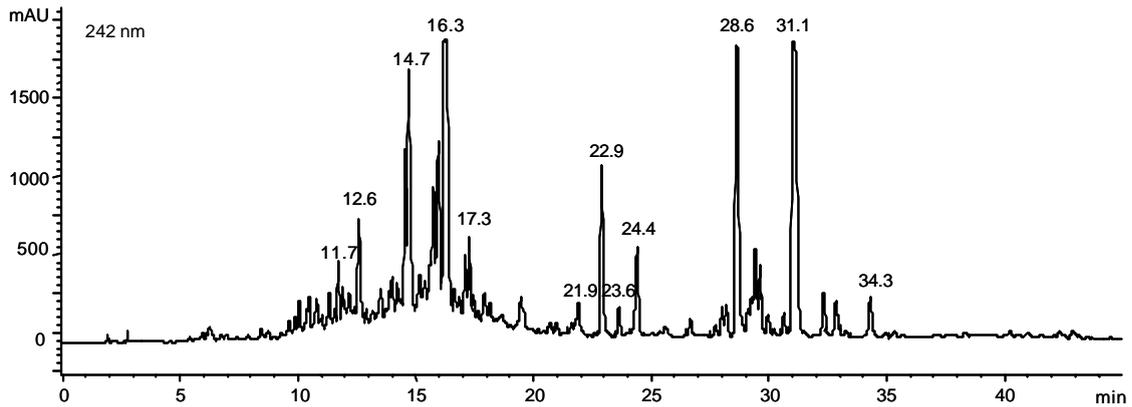


Abb. 20 HPLC-Chromatogramm (UV_{242 nm}) des methanolischen Salbeiblätterextraktes (Eurospher 100 RP18; H₂O/0,05 % TFA (A) - MeCN (B); 1-99 % B in 40 min; Fluss: 1 ml/min)

Zur Isolierung der für die Aktivität verantwortlichen Extraktkomponenten wurden mehrere Extraktions- und Chromatographieschritte angewendet (Abb. 21). Fraktionen, die sich in dem begleitenden RRA als aktiv erwiesen, wurden zur weiteren Auftrennung verwendet.

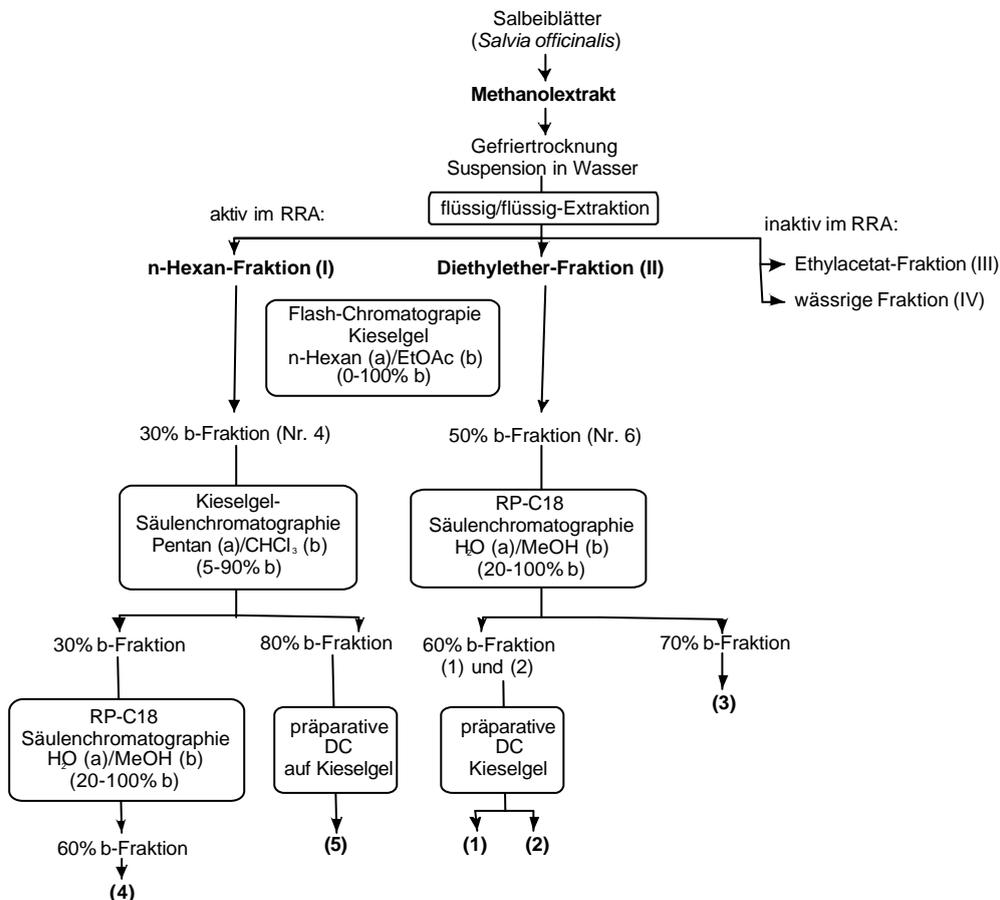


Abb. 21 RRA-kontrollierte Fraktionierung des methanolischen Salbeiblätterextraktes zur Isolierung von BZD-R-Liganden

Nach einer ersten Vortrennung des getrockneten und in Wasser suspendierten Extraktes mittels flüssig/flüssig-Extraktion wurden die erhaltenen Fraktionen, d.h. die n-Hexan-, die Diethylether-, die Ethylacetat- und die verbliebene Wasserphase, erneut auf das Vorhandensein von BZD-R-Liganden geprüft (Abb. 22). Dabei erwiesen sich die Diethylether- und die Hexanphase jeweils als BZD-R-aktiv. In Abb. 22 sind die Bindungsaktivitäten nach der Extraktion der wässrigen Extraktsuspension mit n-Hexan, Diethylether und Ethylacetat dargestellt. Wie aus der Graphik ersichtlich ist, bewirkten die Ethylacetat-Fraktion und der nach der Extraktion verbliebene wasserlösliche Rest keine kompetitive Verdrängung des ^3H -Flumazenil von den BZD-R. Dementsprechend waren in diesen Proben keine nennenswerten Affinitäten zum BZD-R vorhanden.

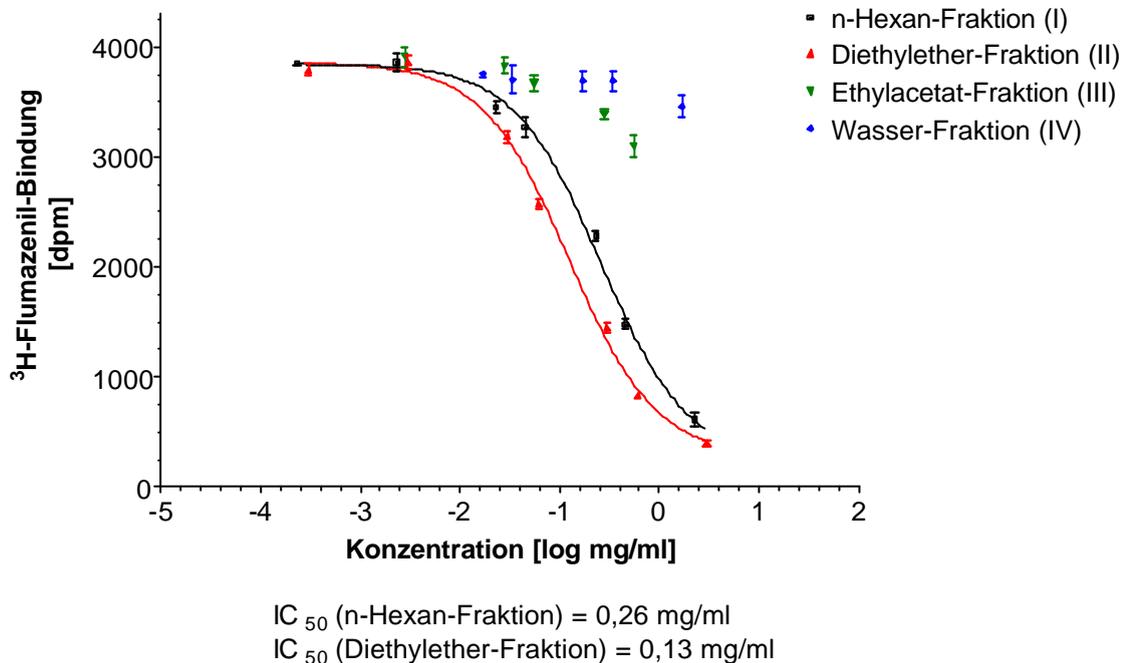


Abb. 22 Bindungsaktivitäten von Salbeixtrakt-Fractionen nach der flüssig/flüssig-Extraktion der wässrigen Suspension mit n-Hexan, Diethylether und Ethylacetat, dargestellt als kompetitive Verdrängung von ^3H -Flumazenil von den BZD-R aus humanem frontalem Kortex

Die beiden aktiven Fraktionen, die Diethylether- und die n-Hexan-Fraktion, wurden zur weiteren Vortrennung der enthaltenen Komponenten einer Flash-Chromatographie an Kieselgel unterworfen. Die erhaltenen Fraktionen aus beiden Trennungen wurden auf ihre Bindungsaktivität mittels RRA untersucht und untereinander verglichen. Diesmal wurden keine Bindungskurven der Mischungen aufgenommen, sondern nur Aliquote mit vergleichbaren Konzentrationen geprüft. Bei der Untersuchung der aus der n-Hexan-

Phase der Kieselgeltrennung stammenden zehn Fraktionen zeigte die vierte Fraktion (30 % EtOAc/n-Hexan-Eluat) die stärkste Verdrängung des Tracers (Abb. 23). Aus diesem Grund wurde diese Fraktion für die weitere Isolierung der BZD-R-aktiven Komponenten verwendet.

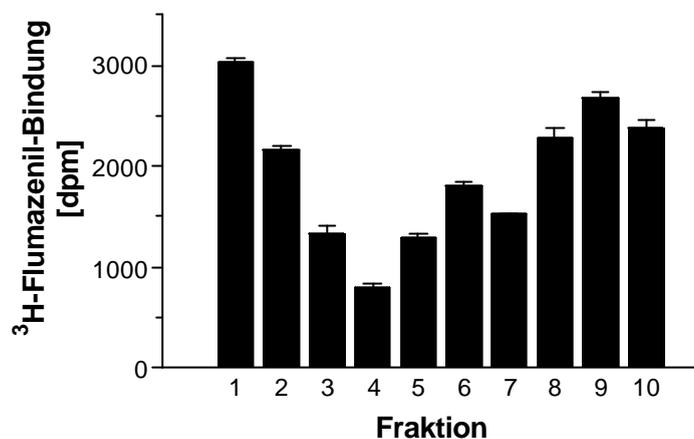


Abb. 23 RRA-Untersuchung der bei der Flash-Chromatographie an Kieselgel abgetrennten n-Hexan-Phase des Salbeiblätterextraktes. Dargestellt ist die kompetitive Verdrängung von ³H-Flumazenil von den BZD-R durch vergleichbare Konzentrationen (~ 0,2 - 0,4 mg/ml) der einzelnen Fraktionen

Die Diethylether-Phase der Kieselgeltrennung lieferte ebenfalls zehn Fraktionen, die im RRA untersucht worden sind. Als aktivste erwies sich hier die Fraktion Nr. 6 im 50 % EtOAc/n-Hexan-Eluat (Abb. 24).

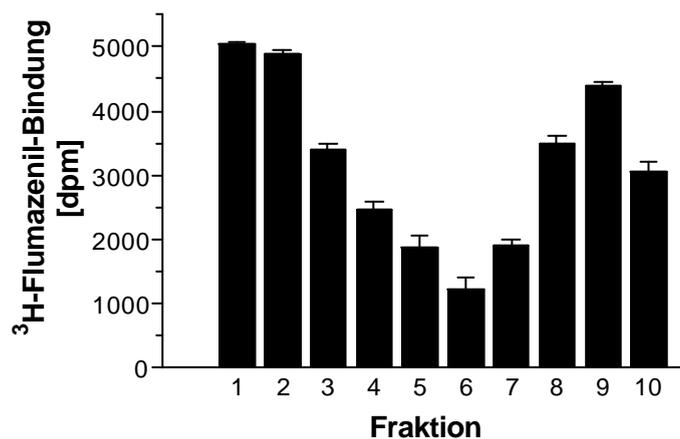


Abb. 24 RRA-Untersuchung der bei der Flash-Chromatographie an Kieselgel abgetrennten Diethylether-Phase des Salbeiblätterextraktes. Dargestellt ist die kompetitive Verdrängung von ³H-Flumazenil von den BZD-R durch vergleichbare Konzentrationen (~ 0,2 - 0,4 mg/ml) der einzelnen Fraktionen

Die dargestellten RRA-Ergebnisse (Abb. 23 und 24) wurden in zwei getrennten Experimenten erzielt. Dementsprechend war die Proteinkonzentration und somit die Rezeptorenmenge der eingesetzten Membransuspensionen unterschiedlich. Daraus ergab sich eine unterschiedliche Menge an ^3H -Flumazenil, die ohne Verdrängung, also in inaktiven Proben, an den BZD-R gebunden hat (2500-3000 bzw. 4500-5000 dpm). Aus diesem Grund zeigten die inaktiven Fraktionen der beiden Experimente unterschiedlich hohe ^3H -Flumazenil-Bindung. Ein Aktivitätsvergleich war deshalb nur innerhalb des jeweiligen RRA-Experimentes möglich.

HPLC/DAD-Untersuchungen der BZD-R-aktiven Fraktionen aus der Kieselgeltrennung zeigten, dass diese aus komplexen Stoffgemischen bestanden. An dieser Stelle war es also noch nicht möglich, die im RRA detektierte Aktivität bestimmten Komponenten zuzuordnen. Die Fraktion 4 der n-Hexan-Phase wurde weiter an Kieselgel aufgetrennt, die Fraktion 6 aus der Diethylether-Phase an RP18-Material (vgl. Abb. 21). Die bei diesen Trennungen erhaltenen BZD-R-aktiven Fraktionen wurden weiter entsprechend dem in Abb. 21 dargestellten Schema mittels Säulen- und Dünnschichtchromatographie bis zur völligen Reinheit der Komponenten aufgetrennt.

Zur Trennung der aktiven Fraktion aus der Diethylether-Phase an RP18-Material wurde Wasser/Methanol-Gemisch absteigender Polarität als Elutionsmittel verwendet. Nach der Untersuchung der erhaltenen Fraktionen mittels RRA wurde starke BZD-R-Aktivität in 60 % MeOH/Wasser-Eluaten festgestellt. Fraktionen in 70 % MeOH/Wasser-Eluaten zeigten geringere Affinität zum BZD-R. Die 60 % MeOH/Wasser-Fraktionen enthielten zwei Hauptkomponenten, die weiter mittels präparativer Dünnschichtchromatographie an Kieselgel voneinander getrennt worden sind. Die HPLC/DAD-Analyse ergab für die isolierten Substanzen Retentionszeiten von 21,9 min und 22,0 min (HPLC 1 in Abschnitt 4.2.2). Die weniger aktiven 70 % MeOH/Wasser-Eluate enthielten bereits nur eine Komponente mit der Retentionszeit von 24,4 min (HPLC 1 in Abschnitt 4.2.2).

Nach der ersten Untersuchung der isolierten aktiven Substanzen mittels HPLC/DAD und ESI_{pos} -MS konnte aufgrund der UV-Spektren und der Molekülmassen ausgeschlossen werden, dass es sich hierbei um die bereits in *Salvia guaranitica* identifizierten BZD-R-Liganden, das Cirsiol (3',4',5-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) und den Kaffeesäureethylester, handelte (Marder *et al.*, 1996 b). Die aktiven Verbindungen der Diethylether-Phase wurden vielmehr anhand ihrer UV-Maxima als Flavonderivate identifiziert (Abb. 25). Nach Auswertung der MS- (ESI_{pos} -MS/MS und EI-MS) und NMR-

Daten wurden die Flavone als Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon, 1), Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon, 2) und Cirsimaritin (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon, 3) charakterisiert (vgl. Abb. 26) und durch Vergleich mit bekannten Literaturwerten eindeutig identifiziert (Nakasugi und Komai, 1998). Abb. 25 zeigt die für Flavone typischen UV-Spektren von Hispidulin und Apigenin. Bestimmte Substituenten (vor allem an den Positionen C-5 und C-4') bewirken Verschiebungen der UV-Maxima. Das UV-Spektrum von Cirsimaritin war identisch mit dem von Hispidulin. Dieses konnte jedoch durch massen- und resonanzspektroskopische Analysen eindeutig von Hispidulin unterschieden werden. Die Untersuchung der Flavone mittels $ES|_{\text{pos}}$ -MS/MS wird in Abschnitt 3.4 beschrieben.

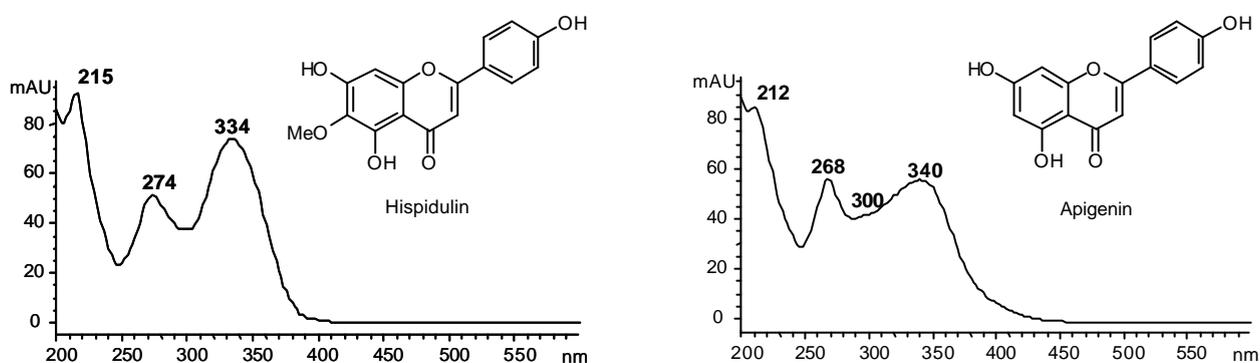


Abb. 25 UV-Spektren von Hispidulin und Apigenin

Die Aufarbeitung der *n*-Hexan-Phase führte zur Charakterisierung von zwei weiteren Rezeptor-aktiven Komponenten, diesmal aus der Substanzklasse der Diterpene.

Nach der säulenchromatographischen Trennung von Fraktion Nr. 4 aus der Flash-Chromatographie an Kieselgel mit Chloroform/Pentan-Gemisch als Elutionsmittel steigender Polarität wurden aktive Fraktionen in 30 % Chloroform/*n*-Pentan- und 80 % Chloroform/*n*-Pentan-Eluaten beobachtet. Die erstgenannten Fraktionen enthielten eine Hauptkomponente mit einer Retentionszeit von 27,8 min (HPLC 1 in Abschnitt 4.2.2). Die noch etwas verunreinigte Verbindung zeigte ein starkes UV-Maximum bei 208, ein schwaches Maximum bei 290, sowie eine Schulter bei ca. 228 nm. Der Vergleich mit UV-Maxima bekannter Diterpene brachte Hinweise dafür, dass es sich hierbei um eine diterpenoide Verbindung mit einem aromatischen Ring ohne weitere konjugierte Doppelbindungen handelte. Nach der anschließenden Aufreinigung an RP18-Material wurde diese Substanz im 60 % MeOH/Wasser-Eluat rein isoliert und mittels massen- und resonanzspektroskopischer Experimente charakterisiert. In massenspektrosko-

pischen Untersuchungen (ESI_{pos}-MS und EI-MS) wurde ein Molekulargewicht von 360 u ermittelt, wobei die Elektrospray-Ionisierung hauptsächlich das Acetonitril-Addukt $[M+MeCN+H]^+$ mit einem m/z von 402 lieferte. Die erste Interpretierung der erhaltenen Fragmentierungen lieferte keine klaren Informationen zur Struktur. Erst durch Vergleich der ermittelten UV-, NMR- und MS-Daten mit Literaturdaten von Takenaka *et al.* (1997) konnte die Verbindung eindeutig als 7-Methoxyrosmanol identifiziert werden (vgl. Abb. 26).

Die zweite diterpenoide Verbindung aus dem 80 % Chloroform/n-Pentan-Eluat mit einer Retentionszeit von 27,4 min (HPLC 1 in Abschnitt 4.2.2), die durch präparative dünnschichtchromatographische Aufreinigung der 80 % CHCl₃/n-Pentan-Fractionen erhalten wurde, zeigte im Vergleich zum 7-Methoxyrosmanol eine um 16 u kleinere Molekülmasse. Aufgrund der Verschiebung und der Intensitätszunahme der UV-Maxima (217, 243 und 303 nm) wurde eine zum aromatischen System zusätzliche konjugierte Doppelbindung vermutet. Die chemischen Verschiebungen der NMR-Spektren waren den Daten von 7-Methoxyrosmanol sehr ähnlich und wiesen auf eine verwandte Molekülstruktur hin. Zu den wenigen Unterschieden gehörte das H6-Singulett, das auf die Abwesenheit des im 7-Methoxyrosmanol vorhandenen H7-Protons hindeutete. Weiterhin war die hohe Verschiebung von H14 (7,67 ppm) mit dem anisotropen Effekt einer peri-positionierten Carbonylgruppe C(7)=O vereinbar. Auf das Vorhandensein einer neuen Carbonylgruppe deutete ein dafür typisches, zusätzliches Signal im ¹³C-NMR-Spektrum bei 189,5 ppm hin. Nach Interpretation der HH-Cosy-, DEPT-, HMQC- und HMBC-Daten wurde die Verbindung als Galdosol identifiziert (Abb. 26). Diese Ergebnisse wurden durch die kürzlich von Marrero *et al.* veröffentlichten NMR-Daten bestätigt (Marrero *et al.*, 2002).

Insgesamt wurden fünf BZD-R-aktive Verbindungen aus dem methanolischen Extrakt von Salbei (*Salvia officinalis* L.) isoliert. Die Verbindungen wurden als die Flavone Apigenin (1), Hispidulin (2) und Cirsimaritin (3) sowie als die Diterpene 7-Methoxyrosmanol (4) und Galdosol (5) identifiziert.

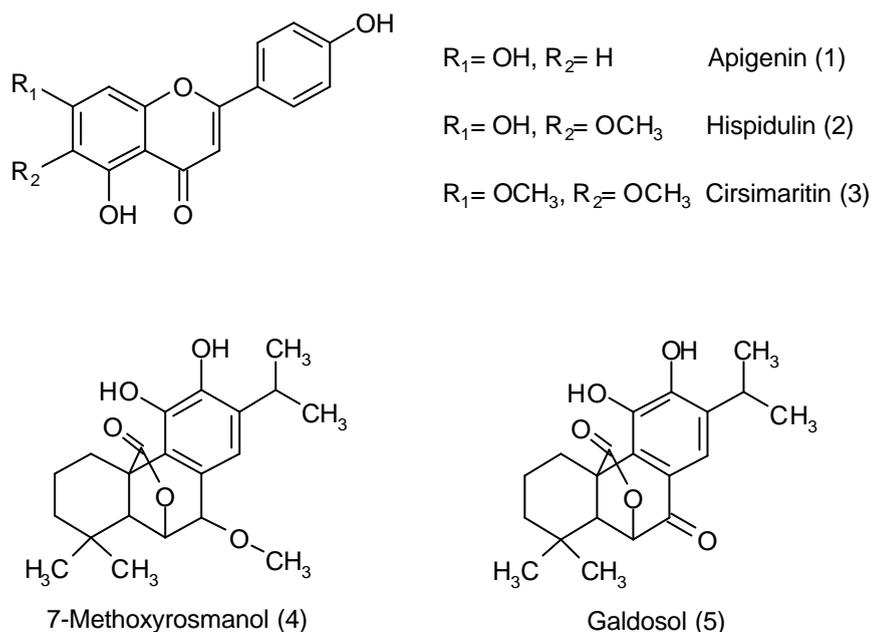


Abb. 26 Chemische Strukturen BZD-R-aktiver Inhaltsstoffe in Salbei (*Salvia officinalis* L.)

Die Rezeptoraffinitäten der identifizierten Substanzen wurden im RRA nach Ermittlung der Bindungskurven bestimmt und in Form von IC_{50} -Werten ausgedrückt (Tab. 7). Hispidulin und die beiden Diterpene, Galdosol und 7-Methoxyrosmanol, erwiesen sich mit IC_{50} -Werten von 1.3, 7.2 und 0.8 μM als die aktivsten Komponenten des Salbei und können somit als Hauptträger des *in vitro* ermittelten BZD-R-Bindungspotentials angesehen werden.

Tabelle 7 Bindungsaktivitäten von Salbei-Inhaltsstoffen am zentralen BZD-R (Diazepam = Positivkontrolle); IC_{50} -Werte wurden durch nicht-lineare Regressionsanalyse der Messwerte ermittelt und als Mittelwerte von Dreifachbestimmungen ausgedrückt (\pm S. E. M.)

Substanz	IC_{50} (μM) \pm S. E. M.
Apigenin (1)	30 ± 4
Hispidulin (2)	$1.3 \pm 0,2$
Cirsimaritin (3)	350 ± 37
7-Methoxyrosmanol (4)	$7.2 \pm 0,7$
Galdosol (5)	$0.8 \pm 0,1$
Diazepam	$0.05 \pm 0,01$

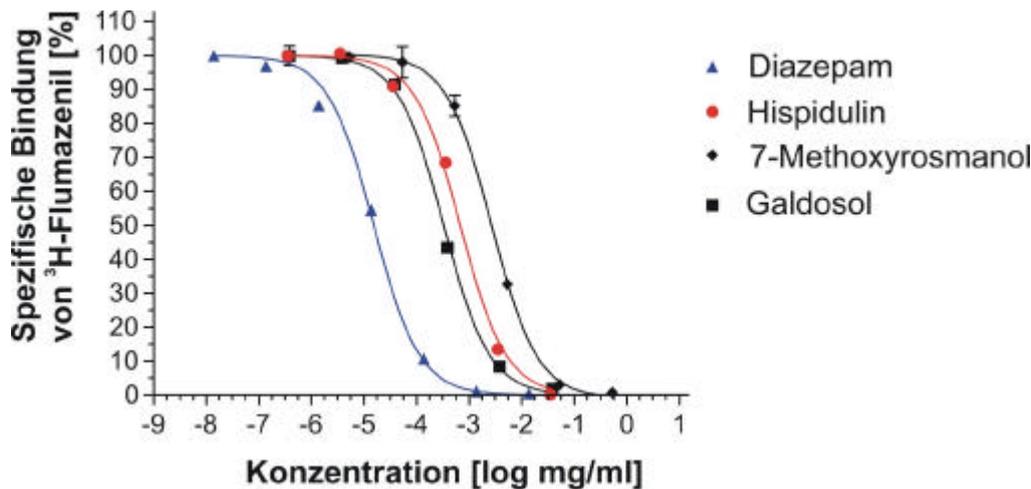


Abb. 27 Bindungskurven der Salbei-Inhaltsstoffe Hispidulin, 7-Methoxyrosmanol und Galdosol (Diazepam = Referenz)

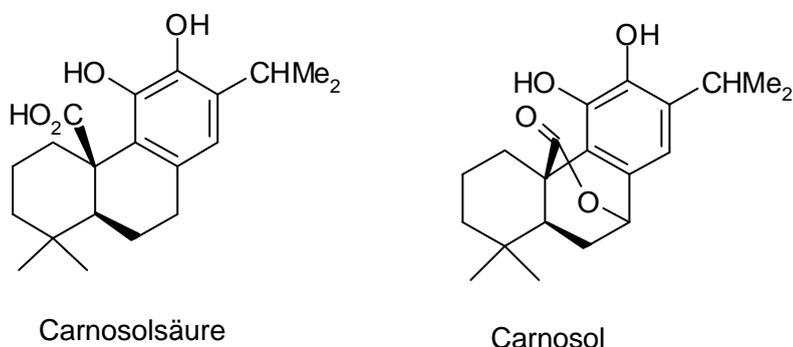
In Abb. 27 wurden die Bindungsaffinitäten der aktivsten Salbeikomponenten durch kompetitive Bindungskurven graphisch dargestellt. Die Kurven der untersuchten Verbindungen entsprechen in etwa der Bindungskurve des klassischen Benzodiazepins Diazepam, dessen Aktivität im Vergleich zu Galdosol nur um etwa den Faktor 20 höher ist.

Unter den identifizierten BZD-R-Liganden befinden sich drei Flavone. Hispidulin, die aktivste Komponente, ist in der Pflanzenwelt weit verbreitet. Dieses Flavon wurde bereits in zahlreichen *Eupatorium*- (*E. cannabinum*, *E. subhastatum*), *Ratiba*- (*R. columnifera*, *R. latipalearis*), *Centaurea*- (*C. phyllocephala*), *Artemisia*- (*A. giraldii*, *A. herba-alba*, *A. frigida*), *Baccharis*- (*B. gaudichaudiana*, *B. trimera*) und *Salvia*-Spezies (*S. officinalis*, *S. triloba*) nachgewiesen (Liu und Mabry, 1981; Twajj *et al.*, 1983; Ferraro *et al.*, 1987; Elema *et al.*, 1989; Rojas *et al.*, 1991; Fullas *et al.*, 1994; Nakasugi und Komai, 1998; Cui *et al.*, 1999; Tan *et al.*, 1999). Hispidulin wurde erstmals aus den Blättern von *Digitalis lanata* isoliert und war damals noch unter dem Namen Dinatin bekannt (Phadke *et al.*, 1967). Drei Jahre später wurde eine strukturidentische Verbindung in *Ambrosia hispida* entdeckt und als Hispidulin bezeichnet (Phadke *et al.*, 1967). Seitdem ist Hispidulin auf vielen Gebieten als wirksame Substanz aufgefallen, z.B. als Mittel zur Hemmung der Blutplättchenaggregation (Bourdillat *et al.*, 1988) und als effektives Agens zur Inhibierung des Wachstums verschiedener Pilzarten, z.B. *A. flavus*, *G. candidum*, *T. rubrum* und *E. floccosum* (Tan *et al.*, 1999). Weiterhin zählt Hispidulin zu den Inhibitoren der Lipidperoxidation (Chen *et al.*, 1990) sowie zu den

entzündungshemmenden Mitteln (Gil *et al.*, 1994). Die hepatoprotektiven Effekte der Substanz sind auf ihre stark antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen (Ferrandiz *et al.*, 1994). Bei *in vitro*-Zell- und Gewebekulturen sind krebspräventative Effekte beobachtet worden, die auf eine Inhibierung des Benzo[a]pyren-Metabolismus und somit auf die Hemmung der Entstehung von krebserzeugenden, an DNA-bindenden Metaboliten zurückzuführen sind (Liu *et al.*, 1992). Gegenüber bestimmten Krebszelllinien zeigte das Hispidulin zytotoxische Eigenschaften (Cui *et al.*, 1999). Im Ames-Test wurde weder Mutagenität noch Zytotoxizität nachgewiesen (Chulasiri *et al.*, 1992). Vielmehr hat man Hispidulin in einigen Untersuchungen als antimutagenes Agens gefunden (Chulasiri *et al.*, 1992).

Die Ligandeneigenschaften von Hispidulin, Cirsimaritin (Shen *et al.*, 1994) und Apigenin (Ai *et al.*, 1997) am BZD-R wurden bereits durch *in vitro*-Studien an Präparationen aus Rattenhirn beschrieben. Die IC_{50} -Werte der Substanzen lagen im niedrigen μM -Bereich. Für Apigenin wurden voneinander stark abweichende Bindungsaffinitäten beschrieben. Neuere Studienergebnisse (Avallone *et al.*, 2000) zeigen jedoch im Vergleich zu früheren Untersuchungen (Viola *et al.*, 1995) niedrigere Aktivitäten. Dies entspricht den Ergebnissen unserer Untersuchungen.

Auch einigen Diterpenen hat man neurosedative Wirkungen zugesprochen (Ma *et al.*, 1997). Unter den bekanntesten diterpenoiden BZD-R-Liganden befindet sich Miltiron, das aus der chinesischen Salbeiwurzel (*Salvia miltiorhiza*) isoliert wurde (vgl. Abschnitt 2.9.2). Bis heute isolierte man zwei Komponenten dieser Klasse aus *Salvia officinalis* L., die Carnosolsäure, sowie das Carnosol selbst, und identifizierte diese als *in vitro*-Liganden des BZD-R aus Rattenhirnmembranen (Rutherford *et al.*, 1992).



Die Affinitäten dieser Substanzen wurden mit IC_{50} -Werten von 33 μM für Carnosolsäure und 57 μM für Carnosol charakterisiert. Mit den beiden im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Diterpenen, 7-Methoxyrosmanol und Galdosol (Abb. 26), wurde die

Gruppe bekannter diterpenoider BZD-R-Liganden aus *Salvia*-Spezies um noch aktivere Substanzen erweitert. Daten zum Bindungsvermögen von 7-Methoxyrosmanol und Galdosol waren bisher nicht verfügbar.

Die erzielten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die identifizierten Komponenten Apigenin, Hispidulin, Cirsimaritin, 7-Methoxyrosmanol und Galdosol, die bereits als stark antioxidativ wirkende Salbei-Inhaltsstoffe charakterisiert worden sind (Miura *et al.*, 2002), auch zentralnervöse Effekte ausüben können. Diese Wirkung wurde auch für andere Flavone beschrieben (Paladini *et al.*, 1999). Weiterhin geben diese Ergebnisse Anlass für weitere Untersuchungen zur Ermittlung der Bioverfügbarkeit und der *in vivo*-Relevanz dieser Substanzen. Es wäre denkbar, dass diese potentiell „bioaktiven“ Inhaltsstoffe einen Beitrag zur Vorbeugung und Therapie zentralnervöser Erkrankungen leisten könnten.

3.4 Charakterisierung von Flavonderivaten mittels ESI_{pos}-MS/MS

Massenspektroskopische Methoden spielen eine wichtige Rolle bei der strukturselektiven Analyse der Bestandteile von Pflanzenextrakten. Die Kopplung von HPLC- und MS-Techniken mit geeigneten Ionisierungsmethoden erlaubt es, polare, höhermolekulare und damit nicht-flüchtige und thermolabile Verbindungen auch in komplexen Mischungen, wie sie in Naturstoffextrakten üblicherweise vorliegen, zu analysieren. Die hierzu oft eingesetzte Ionisierungstechnik der Elektrospray-Ionisierung (ESI) besitzt den Vorteil, dass die Analyten weitgehend zerstörungsfrei ionisiert werden und intakte Moleküle Aufschluss über ihre Molekülmasse geben. Das bei der chromatographischen Trennung erhaltene Eluat wird elektrostatisch zu einem Aerosol hochgeladener Tröpfchen zerstäubt. Die solvatisierten Analytenmoleküle werden vom Lösungsmittel befreit und dabei ionisiert. Eingeleitet wird dieser Prozess durch die angelegte Hochspannung (2-6 kV) zwischen der Probenkapillare und der beheizbaren Eingangskapillare des Massenspektrometers, die als Gegenelektrode dient. Ein Stickstoffstrom forciert die Zerstäubung und die Tröpfchenbildung. Auf dem Weg zur Gegenelektrode verdampft das Lösungsmittel und die Primärtröpfchen schrumpfen, bis die Ladungsdichte an ihrer Oberfläche ansteigt und die Coulombkraft (Ladungsabstoßung) die

Oberflächenspannung übersteigt. Nach der Ausbildung von Sekundärtröpfchen treffen einzelne Mikrotröpfchen mit jeweils einer einzelnen Ladung auf die beheizbare Kapillare. Um Probenmoleküle mittels ESI-Interface massenspektroskopisch untersuchen zu können, müssen sie bereits im HPLC-Eluat als Ionen vorliegen. Verbindungen mit nukleophilen funktionellen Gruppen oder Heteroatomen, die ein freies Elektronenpaar besitzen, lassen sich gut als protonierte Ionen in die Gasphase überführen. Der Einsatz starker Säuren (z.B. TFA) im Fließmittel begünstigt die Bildung protonierter Moleküle. Flavone und ihre 3-hydroxylierten Derivate (Flavonole) können mittels LC-MS/MS mit Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus analysiert werden. Im „full scan“-Modus beobachtet man protonierte Moleküle $[M+H]^+$ und Lösungsmittel-Addukte (z.B. $[M+H+MeCN]^+$).

Das HPLC-MS-System entfaltet seine höchste Leistungsfähigkeit in der Konfiguration eines Tandemmassenspektrometers (MS/MS). Diese liefert grundlegende Strukturinformationen zum Analyten. Als besonders leistungsfähig und robust hat sich der sogenannte Triple-Quadrupol-Massenspektrometer erwiesen (Abb. 28). Er besteht aus drei linear angeordneten Quadrupolen (Q_1 , Q_2 , Q_3). Q_1 und Q_3 dienen als frequenzmodulierte Massenanalysatoren. Q_2 dient als Stosskammer, in der ausgewählte, in Q_1 selektierte „Elternionen“ mit einem Stossgas (Argon) kollidieren und charakteristische Fragmente liefern. Diese werden in Q_3 detektiert.

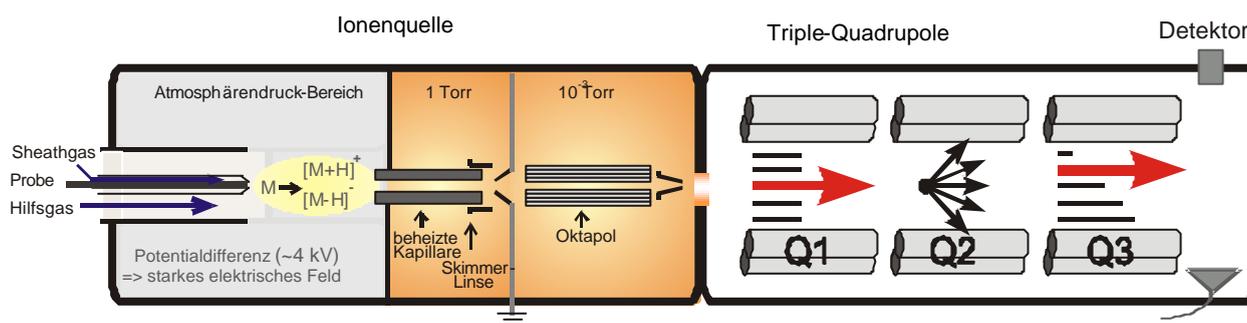


Abb. 28 Triple-Quadrupol-Massenspektrometer mit ESI-Ionisierung

In Tochterionenexperimenten (DAU) lassen sich die Elternionen der Flavonoide unter Stossaktivierung mit einer Energie zwischen -20 bis -40 eV fragmentieren. Bei den meisten Verbindungen werden Abspaltungen von Kohlenstoffmonoxid und teilweise von Wasser beobachtet. Zu den typischen Fragmenten der von uns untersuchten Flavone, Flavonole und Flavanone, gehörten Retro-Diels-Alder-Produkte (RDA-Produkte), die in

Abb. 29 als $[A]^+$ und $[B_1+H]^+$ bezeichnet sind. Das RDA-Fragment $[A]^+$ war meist Basispeak der Massenspektren (Tab. 8-10).

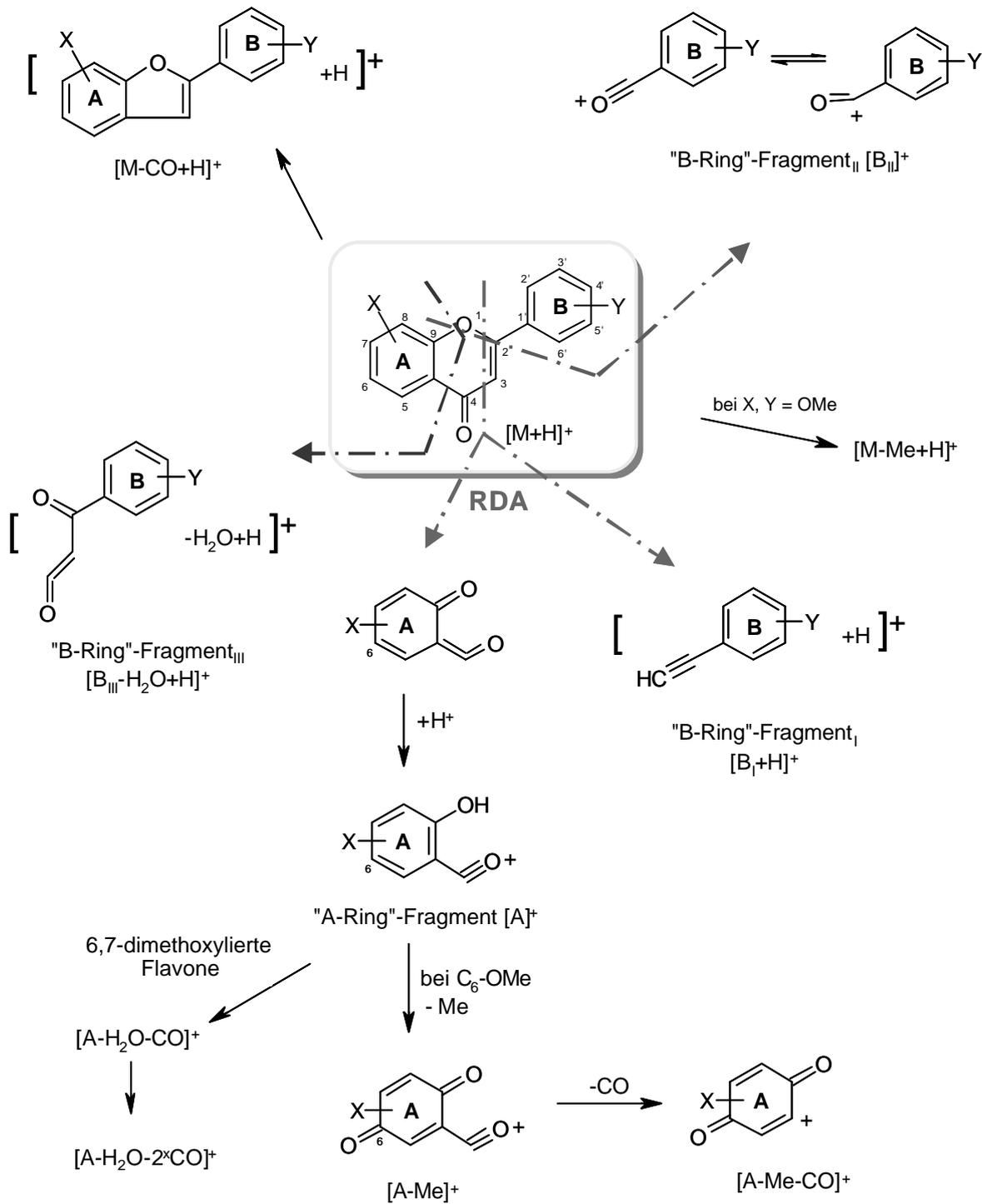


Abb. 29 Typische Fragmentierung bei der ESI_{pos}-MS/MS-Analytik von Flavonen (Bozdag *et al.*, 1999; Iinuma *et al.* 1984)

Tabelle 8 Charakteristische m/z -Fragmente in der ESI_{pos}-MS/MS-Analytik von Flavonen

Flavonderivat	Aktivierung [eV]	[M+H] ⁺	[A] ⁺	[B _I +H] ⁺	Weitere Fragmente
Flavon	-40	223 (10)	121 (30)	103 (35)	129 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 35); 93 (30); 77 ([B _{II} -CO] ⁺ , 100); 65 (40)
7-Hydroxyflavon	-40	239 (24)	137 (70)	103 (55)	211 ([M-CO+H] ⁺ , 2); 129 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 100); 93 (25); 81 (35); 77 ([B _{II} -CO] ⁺ , 25); 69 (52); 65 (42)
Chrysin (5,7-Dihydroxyflavon)	-40	255 (38)	153 (100)	103 (95)	237 (6); 209 (10); 129 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 35); 105 (95); 77 ([B _{II} -CO] ⁺ , 25); 69 (56); 67 (50)
Apigenin (5,7,4'-Trihydroxyflavon)	-40	271 (65)	153 (100)	119 (35)	243 ([M-CO+H] ⁺ , 40); 145 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 35); 121 ([B _{II}] ⁺ , 10); 91 (40)
Acacetin (5,7-Dihydroxy-4'-methoxyflavon)	-40	285 (5)	153 (20)	-	270 ([M-Me+H] ⁺ , 10); 242 ([M-Me-CO+H] ⁺ , 100)
Luteolin (5,7,3',4'-Tetrahydroxyflavon)	-40	287 (35)	153 (100)	135 (55)	241 (12); 161 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 20); 89 (25); 69 (25); 67 (35)
Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon)	-40	301 (15)	-	119 (15)	286 ([M-Me+H] ⁺ , 70); 258 ([M-Me-CO+H] ⁺ , 15); 168 ([A-Me] ⁺ , 100); 140 ([A-Me-CO] ⁺ , 35); 121 ([B _{II}] ⁺ , 20); 69 (25)
Cirsimaritin (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon)	-40	315 (8)	-	119 (25)	299 (10); 282 (39); 254 (100); 136 ([A-H ₂ O-CO] ⁺ , 65); 121 ([B _{II}] ⁺ , 15); 108 ([A-H ₂ O-2xCO] ⁺ , 40);
Nepetin (5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon)	-35	317 (1)	-	-	302 ([M-Me+H] ⁺ , 100); 168 ([A-Me] ⁺ , 90); 161 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 90); 145 (20)
Cirsiliol (5,3',4'-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon)	-35	331 (5)	-	-	315 (7); 298 (45); 270 (100); 136 ([A-H ₂ O-CO] ⁺ , 35); 108 ([A-H ₂ O-2xCO] ⁺ , 12)

Bei 6-methoxylierten Flavon-Derivaten wie Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) oder Nepetin (5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavon) kam es zu einem gleichzeitigen Verlust der Methylgruppe aus dem RDA-Fragment $[A]^+$. Dafür wurden $[A-Me]^+$ -Fragmente in hoher Konzentration beobachtet (vgl. Abb. 29). Im Falle von 6,7-dimethoxylierten Verbindungen wie Cirsimaritin (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) und Cirsiliol (5,3',4'-Trihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) zerfallen die RDA-Produkte $[A]^+$ direkt weiter unter Verlust von Wasser und Kohlenstoffmonoxid. Es konnten die Fragmente $[A-H_2O-CO]^+$ und $[A-H_2O-2 \times CO]^+$ in hohen Konzentrationen detektiert werden (Abb. 29). Das Fragmentierungsmuster und insbesondere die gebildeten RDA-Fragmente bzw. ihre Folgefragmente lieferten wichtige Hinweise zur Substitution der Flavone an den Ringen A und B. Bei der Untersuchung weiterer Flavonoidgruppen konnten diese Ergebnisse auch auf die Fragmentierungen von Flavonolen und Flavononen übertragen werden. Auch diese Flavonoid-Derivate fragmentierten überwiegend zu dem RDA-Produkt $[A]^+$ und lieferten somit wichtige Informationen zur Struktur.

In den Tabellen 8-10 sind die wichtigsten Fragmente und die bei den eingesetzten Stossenergien (Spalte 2) erhaltenen Intensitäten, teilweise mit den Interpretationen der gebildeten Fragmente, zusammengefasst.

Tabelle 9 Charakteristische m/z-Fragmente in der ESI_{pos}-MS/MS-Analytik von Flavonolen

Flavonolderivat	Aktivierung [eV]	$[M+H]^+$	$[A]^+$	Weitere Fragmente
Kämpferol (3,5,7,4'-Tetrahydroxyflavon)	-40	287 (18)	153 (100)	259 ($[M-CO+H]^+$, 10); 157 (28); 147 (24); 121 ($[B_{II}]^+$, 30); 108 (24); 105 (105); 93 ($[B_{II}-CO]^+$, 20); 69 (20)
Quercetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon)	-40	303 (24)	153 (100)	257 ($[M-CO-H_2O+H]^+$, 12); 229 (25); 201 (25); 183 (24); 137 ($[B_{II}]^+$, 52); 109 ($[B_{II}-CO]^+$, 70); 69 (30)
Morin (3,5,7,2',4'-Pentahydroxyflavon)	-40	303 (10)	153 (100)	229 (25); 219 (60); 205 (30); 161 (30); 37 (80); 121 (35); 111 (25); 109 ($[B_{II}-CO]^+$, 20); 69 (50);
Myricetin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavon)	-40	319 (8)	153 (100)	273 ($[M-CO-H_2O+H]^+$, 16); 245 (35); 217 (25); 137 (30); 111 (15)

Tabelle 10 Charakteristische m/z-Fragmente in der ESI_{pos}-MS/MS-Analytik von Flavanonen

Flavanonderivat	Aktivierung [eV]	[M+H] ⁺	[A] ⁺	Weitere Fragmente
Naringenin (5,7,4'-Trihydroxyflavanon)	-25	273 (12)	153 (100)	255 ([M-H ₂ O+H] ⁺ , 2); 147 ([B _{III} -H ₂ O+H] ⁺ , 48); 122 (4); 119 (20)
Hesperitin (5,7,3'-Trihydroxy-4'-methoxyflavanon)	-30	303 (8)	153 (100)	177 (44); 149 (12); 145 (30); 117 (8)
(+)Catechin (3,5,7,3',4'-Pentahydroxyflavanon)	-20	291 (12)	139 (100)	207 (20); 165 (30); 147 (30); 123 (70)
(-)Catechin (Epicatechin)	-20	291 (2)	139 (100)	207 (10); 165 (12); 147 (18); 123 (38)

Die Untersuchung des methanolischen Salbeiblätterextraktes führte zur Isolierung der Flavone Apigenin, Hispidulin und Cirsimaritin (vgl. Abschnitt 3.3). Trotz der hohen strukturellen Ähnlichkeit zeigten die isolierten Verbindungen starke Unterschiede in der Affinität zum BZD-R. Um die Aktivität des bezüglich seiner Bindungsstärke attraktivsten Flavons Hispidulin mit den Aktivitäten anderer Flavonderivate zu vergleichen und die für die Bindung am humanen BZD-R günstigsten strukturellen Eigenschaften aufzudecken, haben wir mehrere Flavonderivate im RRA untersucht. Die erzielten Ergebnisse werden nachfolgend zusammen mit einigen aus der Literatur bekannten Daten diskutiert.

3.5 Struktur-Wirkungsstudie mit Flavonoiden am humanen zentralen BZD-R

Im Rahmen der Entwicklung neuer Wirkstoffe spielen Studien zu qualitativen und quantitativen Struktur-Wirkungsbeziehungen (structure activity relationships = SAR) eine wichtige Rolle. Neben dem Ziel, Affinitätsunterschiede zum Rezeptor und somit Unterschiede in der biologischen Aktivität der Liganden aufzuklären, ist das Hauptan-

liegen, biologisch aktive Strukturen und Konformationen der Liganden zu ermitteln. Die Auswahl vielversprechender Kandidaten erspart oft aufwendige Synthesearbeiten. Nur diejenigen Strukturen, die nach den ermittelten SAR-Modellen als potentielle Wirkstoffe in Frage kommen, werden synthetisiert und weiteren Untersuchungen unterzogen.

Die aus Salbei isolierten Flavone Apigenin, Hispidulin und Cirsimaritin zeigten starke Unterschiede in der Bindungsaktivität am humanen BZD-R. Aus der Untersuchung weiterer, kommerziell erhältlicher Flavone, unter Einbeziehung bekannter Aktivitäten aus der Literatur, wurden zusätzliche Informationen zum Bindungsverhalten von Flavonoiden gewonnen. In Abb. 30 sind die Affinitäten unterschiedlicher Flavone unter Anwendung des „pharmacophore model“ nach Cook (Zhang *et al.*, 1995), auch unter Angabe von Literaturdaten, zusammengestellt.

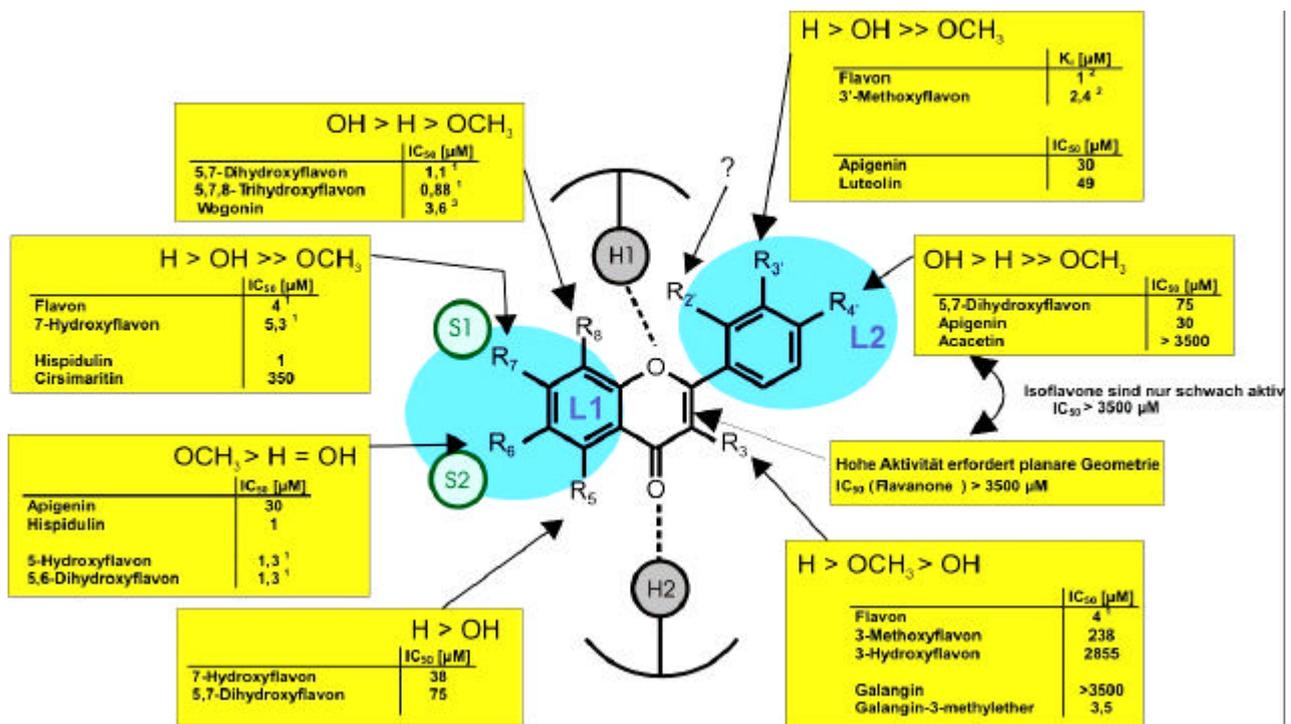


Abb. 30 Struktur-Affinitätsbeziehung von Flavonen (und einigen Flavonolen) am humanen zentralen BZD-R unter Einbeziehung des „pharmacophore model“ nach Cook. Als wichtige Bindungsstellen werden die H-Donatorstellen H₁ und H₂, die „lipophilen Taschen“ L₁ und L₂, sowie die Regionen mit repulsiv-sterischen Interaktionen S₁ und S₂ angenommen. Die IC₅₀-Werte wurden durch kompetitive Verdrängung von ³H-Flumazenil vom Rezeptor (in Dreifachbestimmungen) ermittelt. Die Durchführung des RRA erfolgte gemäß Kavvadias *et al.* (2000). Die gekennzeichneten Werte wurden der Literatur entnommen: ¹Ai *et al.*, 1997; ²Marder *et al.*, 2001; ³Hui *et al.*, 2000

Eine der ersten Studien zu Struktur-Wirkungsbeziehungen von Flavonoiden am zentralen BZD-R führten Häberlein *et al.* im Jahre 1994 durch. Bei den aus dem neuseeländischen Myrtengewächs *Myrtacea Leptospermum scoparium* Forst. isolierten, lipophilen Flavonoiden konnten bemerkenswerte Unterschiede in der Bindungsaffinität festgestellt werden. Als wichtiges Strukturelement für die Rezeptorbindung wurde der Abstand der OH-Gruppen zur C=O-Gruppe berechnet und der *in vitro* bestimmten Bindungsaffinität gegenübergestellt. Die Bindungsaffinitäten korrelierten mit der ermittelten Molekülgeometrie. Häberlein *et al.* (1994) konnten zeigen, dass die Aktivität am Rezeptor ansteigt, wenn die Substituenten der Flavone in der Aromatenebene liegen und am C-3 eine voluminöse Gruppe, wie die Methylgruppe, steht. Dementsprechend zeigte das von uns untersuchte 3-Methoxyflavon ($IC_{50} = 238 \mu\text{M}$) eine um mehr als den Faktor 10 höhere Aktivität als das an dieser Stelle hydroxylierte Derivat ($IC_{50} = 2855 \mu\text{M}$). Allerdings waren beide Substanzen weniger aktiv als das unsubstituierte Flavon ($K_i = 4 \mu\text{M}$) (Ai *et al.*, 1997). Folglich wird die Affinität zum Rezeptor weder durch eine Hydroxy-, noch durch eine Methoxygruppe an Position C-3 erhöht. Bestätigt wird diese Tatsache durch die Ergebnisse von Bindungsstudien von Galangin und 3-Methylgalangin. Hydroxygruppen an Position C-3 vermindern die Bindungsstärke erheblich. Eine Methoxygruppe an dieser Stelle ist zwar im Vergleich zu einer Hydroxygruppe nicht so aktivitätsmindernd, sie ist aber auch nicht bindungsfördernd, wenn man die Aktivität der Substanz mit der des Flavons vergleicht. Diese Ergebnisse bestätigen die Daten von „molecular modeling“-Analysen von Marder *et al.* (2001). Demnach soll eine Substitution an Position C-3 den Winkel zwischen dem B-Ring und dem bicyklischen System von etwa 25° auf 63° erhöhen. Auf diese Weise wird die Energie, die nötig ist, um Planarität der Moleküle zu erreichen, erhöht. Je nachdem, welche Substituenten sich an diesen Positionen befinden und welche sterischen und elektrischen Effekte überwunden werden müssen, ist dieser Energiebetrag unterschiedlich groß. In 3-substituierten Flavonen kann die für eine hohe Affinität erforderliche Planarität nur sehr schwer erreicht werden.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Häberlein *et al.* (1994) zeigten die Flavanone (Naringenin, Hesperitin, Catechin und Epicatechin) keine oder nur sehr geringe Bindungsaffinitäten ($IC_{50} \geq 0,1 \text{ mM}$). Begründet wird diese Tatsache durch die fehlende Doppelbindung zwischen den Kohlenstoffatomen C-2 und C-3 und die dadurch entstehende, gewinkelte Molekülstruktur (Häberlein *et al.*, 1994).

Die umfangreiche SAR-Datenmenge diverser Liganden aus verschiedenen Substanzklassen führte zur Entstehung mehrerer BZD-R/Wirkstoff-Modelle („pharmacophore model“). Die von uns untersuchte Flavonstruktur wurde in das einheitliche „pharmacophore model“ nach Cook eingebettet. Dieses Modell wurde im Jahr 1995 von Zhang und Mitarbeitern auf der Basis von Ergebnissen aus chemischen Synthesen, Radioligandenbindungsstudien und „Rezeptormapping“-Untersuchungen für den BZD-R entwickelt (Abb. 30) (Zhang *et al.*, 1995). Zum Aufbau trugen Daten von 136 Liganden aus zehn verschiedenen Substanzklassen bei. Berücksichtigt wurden nicht nur die relativen Bindungsaffinitäten, sondern auch die Wirkungseffizienz und das pharmakologische Profil der untersuchten Liganden (Agonismus, Antagonismus und inverser Agonismus). Weiterhin beinhaltet das Modell auch die Pharmakologie der erst später entdeckten Diazepam-insensitiven Rezeptorsubtypen. Das Modell nach Cook definiert mehrere Interaktionsstellen, die bei der Ligandenbindung eine bedeutende Rolle spielen und neben der Affinität auch das pharmakologische Profil bestimmen. Demnach teilen sich Agonisten, inverse Agonisten und Antagonisten dieselbe Bindungstasche. In dieser Gegend wurden eine H-Akzeptor (A_2)-, eine H-Donator (H_1)- und eine bifunktionelle H-Donator/Akzeptorstelle (H_2/A_3) als Bindungsorte identifiziert. Der H_1 - H_2 -Abstand beträgt ca. 6,7 Å. Die lipophilen Taschen L_1 , L_2 und L_3 sowie die Regionen mit repulsivsterischen Interaktionen S_1 , S_2 und S_3 wurden als affinitätsbestimmende Faktoren erkannt. Aus den Untersuchungen ergab sich, dass H_1 , H_2 und L_1 sowie L_2 und/oder L_3 für agonistische Wirkungen nötig sind. Für eine invers-agonistische Wirkung sind dagegen nur H_1 , L_1 und eventuell auch A_2 notwendig. Zusätzlich wurde für hoch affine Liganden eine fast planare Geometrie vorausgesetzt (Zhang *et al.*, 1995). Dieser Zusammenhang wurde zuvor bereits von Häberlein *et al.* erkannt (1994). In Abb. 31 ist die räumliche Einordnung von Diazepam im „pharmacophore model“ nach Cook mit den bereits erwähnten Interaktionsstellen dargestellt.

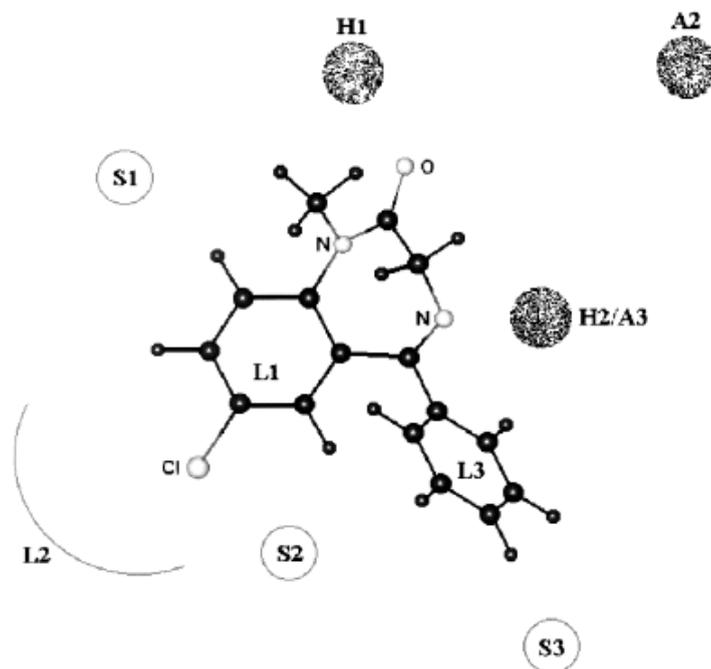
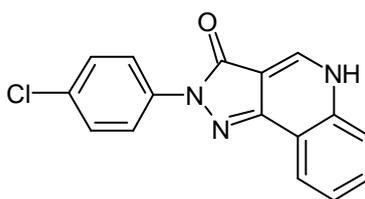


Abb. 31 Diazepam, eingebettet in das „pharmacophore model“ des BZD-R nach Cook. H_1 und A_2 sind H-Donator- bzw. H-Akzeptorstellen. H_2/A_3 stellt eine bifunktionelle H-Donator/Akzeptorstelle dar. L_1 , L_2 und L_3 sowie S_1 , S_2 und S_3 sind lipophile Taschen bzw. Regionen sterischer Wechselwirkungen (Zhang *et al.*, 1995)

Bei der Aufstellung des Modells von Cook wurden Flavonoide nicht berücksichtigt. Dekermendjian wendete das Modell erstmals auf 21 verschiedene Flavonderivate an (Dekermendjian *et al.*, 1999). Dabei wurde ein Agonist der Pyrazolochinolin-Klasse (CGS-9896) als Schablone für die Anordnung der Flavone in der BZD-R-Bindungstasche verwendet.



CGS-9896

Kürzlich hat auch die Arbeitsgruppe um Marder, die sich seit 1989 mit der Bindungsaffinität und den *in vivo*-Wirkungen von natürlichen und synthetischen Flavonoiden beschäftigt, das Modell von Cook auf etwa 120 Flavonoide angewendet (Abb. 32) (Marder *et al.*, 2001). Diesmal wurde Diazepam als Vorlage für die Lage der Flavone in der BZD-R-Tasche verwendet. Als eine der wichtigsten Interaktionsstellen stellte sich die Carbonylgruppe der Flavone heraus. Diese sollte der Ketogruppe am C2- oder N4-Atom im Diazepam-Ring entsprechen. Als H-Akzeptorstelle nahm sie die

im Cook-Modell dargestellte H₁- oder H₂-Position ein. Auch die Aromatizität des B-Ringes ist eine für die Rezeptorbindung notwendige Eigenschaft (Marder *et al.*, 2001).

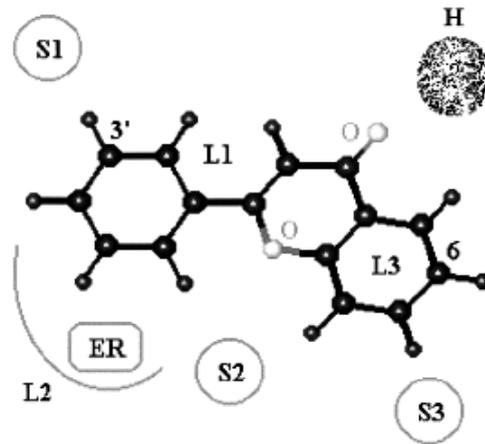


Abb. 32 Flavonmolekül, eingebettet in das „pharmacophore model“ der Flavonoidbindungsstelle des BZD-R (Marder *et al.*, 2001)

Unsere Untersuchungen lieferten weitere Hinweise dafür, dass die räumliche Anordnung des B-Ringes eine wichtige Rolle spielt. Da die geprüften Isoflavone kaum oder nur sehr geringe Affinitäten zeigten, ist eine Phenylgruppe in C2-Position Voraussetzung für ein gutes Bindungsvermögen.

Als besonders relevante Strukturstellen der Flavone haben sich in den Studien von Huang *et al.* (2001) die Substituenten an den Positionen C-6 und C-3' herausgestellt. In einer quantitativen SAR-Studie (QSAR) wurden elektrische Wechselwirkungen als wichtige Parameter erkannt. Die Substituenten an den C-Atomen C-6 bzw. C-3' füllen nach Marder *et al.* die lipophilen Taschen L₃ bzw. L₂. Die Größe des 3'-Substituenten ist für die Aktivität entscheidend. Zu große Reste sind für diese Bindung ungeeignet (Huang *et al.*, 2001). In unserer Testreihe führte die C6-Substitution ebenfalls zu einer starken Aktivitätszunahme, wie der Vergleich von Hispidulin (6-methoxyliertes Derivat von Apigenin) und Apigenin verdeutlicht (Abb. 30).

Unter Berücksichtigung der Bindungsaffinität von Cirsimaritin (4',5-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) scheint die Methylierung an Position C7 keinen positiven Beitrag zur Affinität zu leisten. Vielmehr wird die starke Aktivitätsabnahme gegenüber Hispidulin (4',5,7-Trihydroxy-6-methoxyflavon) vermutlich durch sterische Interaktionen mit S₃

hervorgerufen. Dies macht sich nach Huang *et al.* vor allem bei längeren Kohlenwasserstoffresten bemerkbar (2001).

Zusammenfassend stellen H_2 , L_2 und L_3 die wichtigsten Ankerpunkte der Bindung von Flavonen an den BZD-R dar. Eine zweite H-Donator- (H_1) und H-Akzeptorstelle (A_2) konnte von Marder *et al.* nicht gefunden werden. Diese Autoren postulierten dafür eine weitere Interaktionsstelle, d.h. eine elektronenreiche Region (ER), die sich im Bereich der lipophilen Tasche L_2 befindet (Abb. 32). Somit würde es zu einer stärkeren Bindung kommen, wenn elektronenziehende Gruppen wie NO_2 an der Position C-3' die Elektronendichte des B-Ringes erniedrigen, oder sich in Position C-5' befinden und mit ER interagieren. Aufgrund elektrostatischer Abstoßung sind auch elektronenreiche Gruppen an Position C-4' nicht vorteilhaft (Marder *et al.*, 2001).

Das von Huang *et al.* mit Hilfe von CoMFA-, CoMSIA- und HQSAR-Techniken unter Berücksichtigung der elektrostatischen Potentiale aufgestellte 3D-QSAR-Modell soll laut Aussagen der Autoren Bindungsaffinitäten zahlreicher Flavonoide voraussagen können (Huang *et al.*, 2001). In diesem Modell werden zusätzliche Interaktionen hydrophober und elektrostatischer Natur vorgeschlagen (Abb. 33). Die Bedeutung von großen und/oder negativ geladenen Substituenten an Position C-6 konnte mit diesem Modell bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass Atome mit niedriger Elektronendichte an Position C-3' die Affinität erhöhen. Große oder negativ geladene Gruppen an den Positionen C-5 und C-7 sowie große Substituenten an den Positionen C-4' und C-5' sind für die Bindung am BZD-R nicht vorteilhaft (Huang *et al.*, 2001). Der negative Einfluss durch große Substituenten an Position C-4' konnte von uns am Beispiel von Apigenin (4',5,7-Trihydroxyflavon) und Acacetin (4'-Methoxy-5,7-dihydroxyflavon) bestätigt werden. Die bei Acacetin gemessene Rezeptoraffinität hat durch die Größe der C-4'-Substitution im Vergleich zu Apigenin um einen Faktor von über 1000 abgenommen (IC_{50} Apigenin: 30 μM und IC_{50} Acacetin: 3500 μM).

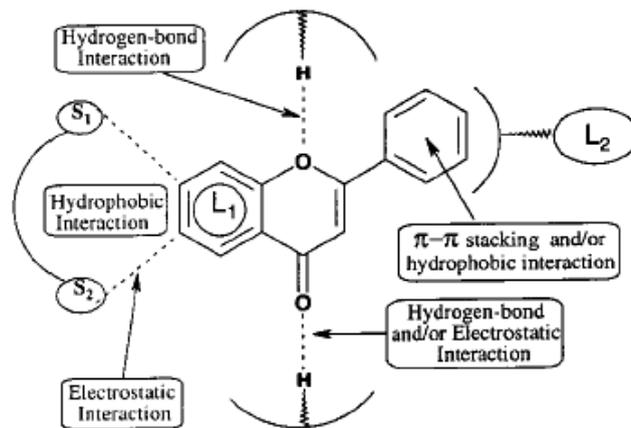


Abb. 33 Schematische Darstellung der möglichen Interaktionen zwischen den Flavonoiden und dem BZD-R nach Huang *et al.* (2001)

Einen Einfluss auf die Strukturgeometrie und somit auf die Bindungsaktivität der Flavone haben auch Substitutionen an den Positionen C-2' und C-6', die einen Winkel von 58° zwischen dem B-Ring und dem bicyklischen System stabilisieren. Ähnlich wie es bereits im Falle von C-3-Substituenten diskutiert wurde, wird dadurch die für das Erreichen der Molekülplanarität nötige Energie erhöht. Je nachdem, welche Substituenten sich an diesen Positionen befinden und welche sterischen und elektrischen Effekte überwunden werden müssen, ist diese Energie unterschiedlich hoch und die Rezeptoraffinität entsprechend niedrig (Huang *et al.*, 2001). Da uns keine 2'- bzw. 6'-substituierten Flavone zur Verfügung standen, konnten wir diesen Parameter nicht weiter untersuchen. Aus dem gleichen Grund wurde auch die C8-Substitution nicht genauer betrachtet.

Die neuesten SAR-Studien fokussieren Subtyp-selektive Liganden, um die Synthese spezifischer Verbindungen zu ermöglichen und die biologischen Effekte der einzelnen Rezeptorsubtypen besser zu verstehen. Unterschiede wurden bereits in der Größe der lipophilen Taschen L_2 und L_3 der sechs verschiedenen rekombinanten Rezeptoruntereinheiten (α_{1-6}) erkannt. Die weiteren Forschungsarbeiten auf dem Gebiet der SAR-Studien werden sich vermutlich auf die Entwicklung Subtyp-selektiver Modelle konzentrieren.

Die Rezeptorbindungsstudien mit den aus Salbei isolierten Komponenten haben gezeigt, dass Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) einen hoch aktiven Liganden des BZD-Rezeptors darstellt. Diese Ergebnisse waren Anlass dafür, weitere Untersuchungen zum pharmakologischen Profil von Hispidulin (vgl. Abschnitt 3.7) sowie zur *in vivo*-Wirksamkeit (vgl. Abschnitt 3.9) zu initiieren. Da die Isolierung aus pflanzlichem Material sehr zeit- und materialaufwendig ist, sollten die für weitere Studien benötigten Substanzmengen durch synthetische Arbeiten zur Verfügung gestellt werden. Nach mehreren Vorversuchen wurde eine mehrstufige Synthese von Hispidulin etabliert.

3.6 Synthese von Hispidulin

3.6.1 Methoden der Flavonsynthese

Aufgrund ihrer zahlreichen biologischen Aktivitäten rücken Flavone zunehmend in das Blickfeld medizinischer Anwendungen. Da die Isolierung aus pflanzlichen Quellen oft sehr aufwendig ist und nur geringe Mengen liefert, wurden in den letzten Jahren zahlreiche Methoden für ihre Synthese entwickelt. Zu den bekanntesten gehören die Allan-Robinson- (Allan und Robinson, 1924) und die Baker-Venkataraman-Synthese (Baker, 1933; Mahal und Venkataraman, 1934), aber auch Synthesen über Chalkone (Iinuma *et al.*, 1984; Hoshino *et al.*, 1986) und *via* intramolekularer Wittig-Strategie (Hercouet *et al.*, 1982; Le Floc'h und Lefeuvre, 1986) sind bekannt.

Die Baker-Venkataraman-Methode (Abb. 34) wird als günstigste Möglichkeit der Flavonsynthese erachtet und wurde bis heute am häufigsten eingesetzt. Sie basiert auf der Kondensation eines 2-Hydroxyacetophenons mit einem Säurechlorid zum Benzoyl-ester. Dieser wird anschließend einer baseninduzierten intramolekularen Claisen-Kondensation, die auch als Baker-Venkataraman-Umlagerung bezeichnet wird, ausgesetzt. Das so gebildete 1,3-Diketon zyklisiert bei Einwirkung von Hitze und starker Säure unter Wasserabspaltung zum Flavon. Methoden, die eine Flavonsynthese in einem Schritt ermöglichen, sind nur auf bestimmte Edukte, wie die 2,6-Dihydroxyacetophenone, beschränkt (Bois *et al.*, 1999).

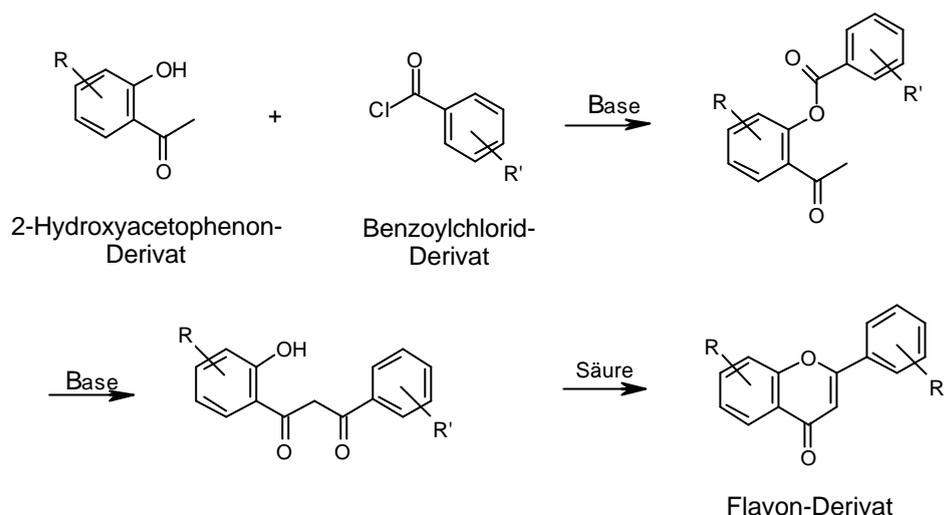


Abb. 34 Prinzip der Flavonsynthese nach Baker-Venkatarman (Baker, 1933)

Das gewünschte Substitutionsmuster des Flavonproduktes muss bereits in den beiden Edukten der Baker-Venkatarman-Synthese festgelegt werden. Vor allem bei komplex substituierten Flavonen mit mehreren Methoxy- und Hydroxygruppen stellt die Verfügbarkeit bzw. die Synthese der beiden Edukte einen limitierenden Faktor dar. Die Acetophenonbausteine, die den Ring A des Flavons bilden, werden oftmals in mehrstufigen Synthesen dargestellt. Zusätzlichen Aufwand erfordern Hydroxygruppen, die während der Synthese geschützt werden müssen, um Nebenreaktionen zu vermeiden und nur die erwünschten Stellungsisomere zu erhalten.

3.6.2 Methoden der Hispidulin-Synthese

Hispidulin (5,7,4'-Trihydroxy-6-methoxyflavon) wurde erstmals im Jahre 1967 von Phadke *et al.* synthetisiert. Als Ausgangsstoff diente 2,4,6-Trihydroxy-3-methoxyacetophenon, das aus Iretol (1,3,5-Trihydroxybenzol) hergestellt und in der Baker-Venkatarman-Reaktion mit *p*-Nitrobenzoylchlorid umgesetzt worden ist. Die Nitrogruppe wurde nach Bildung des Flavongerüsts zur Amino- und schließlich zur OH-Gruppe reduziert. Da Iretol heute nicht mehr kommerziell vertrieben wird und in aufwendigen, relativ gefährlichen Synthesestufen hergestellt werden müsste, erscheint dieser Weg nicht mehr als vorteilhaft. Aus diesem Grund wurde für Hispidulin ein neuer Syntheseweg aus den Edukten 2,4,6-Trihydroxy-3-methoxyacetophenon und 4-Hydroxybenzoesäure entwickelt.

In der ersten Synthesestufe sollte der benötigte Baustein 2,4,6-Trihydroxy-3-methoxyacetophenon aus 2,4,6-Trihydroxyacetophenon durch Einführung einer Methoxygruppe synthetisiert werden (Abb. 35). Die Einführung der Methoxygruppe kann durch selektive Bromierung und anschließende Substitution des Bromatoms durch eine Methylatgruppe erreicht werden. Die geplante Bromierung wurde erfolgreich an der gewünschten Position durchgeführt. Dagegen war der zweite beabsichtigte Schritt nicht erfolgreich. Statt der Bromsubstitution wurde lediglich die Rückgewinnung des Ausgangsstoffes beobachtet.

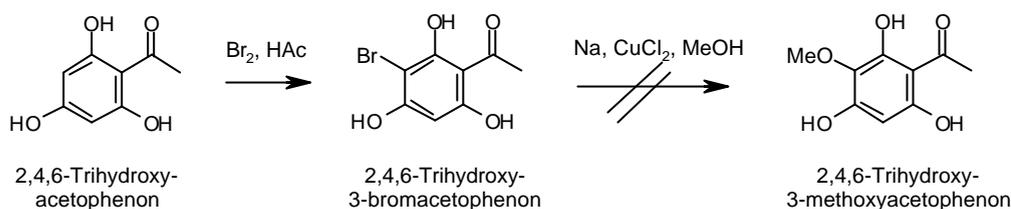


Abb. 35 Schema der geplanten Synthese von 2,4,6-Trihydroxy-3-methoxyacetophenon

Bei der Reaktion von 2,4,6-Trihydroxy-3-methoxyacetophenon mit dem Benzoylsäurechlorid-Derivat kann als Nebenprodukt auch das andere Stellungsisomer, 5,7-Dihydroxy-8-methoxyflavon, entstehen (Abb. 34). Seine Bildung erniedrigt die schon relativ geringen Ausbeuten an Hispidulin. Ein weiterer Nachteil dieser Methode besteht darin, dass die Stellungsisomere aufgrund ihrer ähnlichen Eigenschaften nur sehr schlecht voneinander zu trennen sind. Für eine selektive Synthese von Hispidulin wurde in Analogie zur Synthese von anderen 5,7-Dihydroxy-6-methoxyderivaten das 2,3-Dimethoxy-4,6-dihydroxyacetophenon und das 4-Hydroxybenzoesäurechlorid verwendet (Farkas und Strelisky, 1970). Um Nebenreaktionen zu vermeiden, mussten die Hydroxygruppen an den Positionen C-4 des Acetophenons und des Säurebenzoylchlorids geschützt vorliegen. Am Ende der Synthese waren die Schutzgruppen und die Methylgruppe am C-5 des Flavons zu entfernen. Eine Demethylierung von mehrfach methoxylierten Flavonen kann selektiv an der C-5-Position mit AlCl_3 oder mit AlBr_3 in Acetonitril erreicht werden (Abb. 37). Die selektive Demethylierung an C-5-OMe verläuft bei 6-methoxylierten Flavonen sogar noch einfacher als bei Flavonen mit nicht oxidierten C-6-Atomen und erreicht bei einigen bereits beschriebenen Derivaten Ausbeuten von 100 % (Horie *et al.*, 1987).

Osorio-Olivares *et al.* (1999) beschrieben die Synthese von 5,7-Dimethoxy-6-hydroxyflavon. Die in dieser Arbeit erzielten hohen Ausbeuten wurden durch die Verwendung

einer Phosphoranzwischenstufe erreicht (Abb. 37). Diese bildete mit dem entsprechenden Benzoylchlorid in nur zwei Stufen das gewünschte Flavon mit einer Gesamtausbeute von 77 % (Osorio-Olivares *et al.*, 1999). Diese Methode war auch ohne den zusätzlichen Aufwand einer Schutzgruppeneinführung am Ring A-Baustein durchführbar (Abb. 37). Die für die Hispidulin-Synthese benötigte Phosphoranzwischenstufe sollte analog zu den Arbeiten von Osorio-Olivares *et al.* aus dem geeigneten Derivat nach dem in Abb. 36 dargestellten Schema hergestellt werden. Ausgehend von Vanillin wurde eine Bromierung in Essigsäure durchgeführt (Lam *et al.*, 1996). Das gebildete, reine, 5-bromierte Isomer wurde durch Methylierung der Hydroxygruppe mit Dimethylsulfat zu 5-Brom-3,4-dimethoxybenzaldehyd umgesetzt. Im nächsten Schritt wurde die Carbonylgruppe von 5-Brom-3,4-dimethoxybenzaldehyd in einer Baeyer-Villiger-Oxidation mit Hilfe von m-Chlorperoxybenzoesäure (m-CPBA) zur Hydroxygruppe umgewandelt (Barrero *et al.*, 1998). Analog zu den Arbeiten von Lam *et al.* (1996) konnte auf das entstandene Phenol die Substitutionsreaktion des Bromatoms durch eine Hydroxygruppe erfolgreich angewendet werden (Ausbeute ca. 30 %). Die Reaktion fand im Autoklaven bei 210 °C in wässriger 10 %-iger KOH-Lösung und mit Kupfer als Katalysator statt (Lam *et al.*, 1996). Die entstandene Verbindung ist durch Vergleich der NMR-spektroskopischen Daten eindeutig als 4,5-Dimethoxy-1,3-dihydroxybenzol identifiziert und charakterisiert worden (Li *et al.*, 2000).

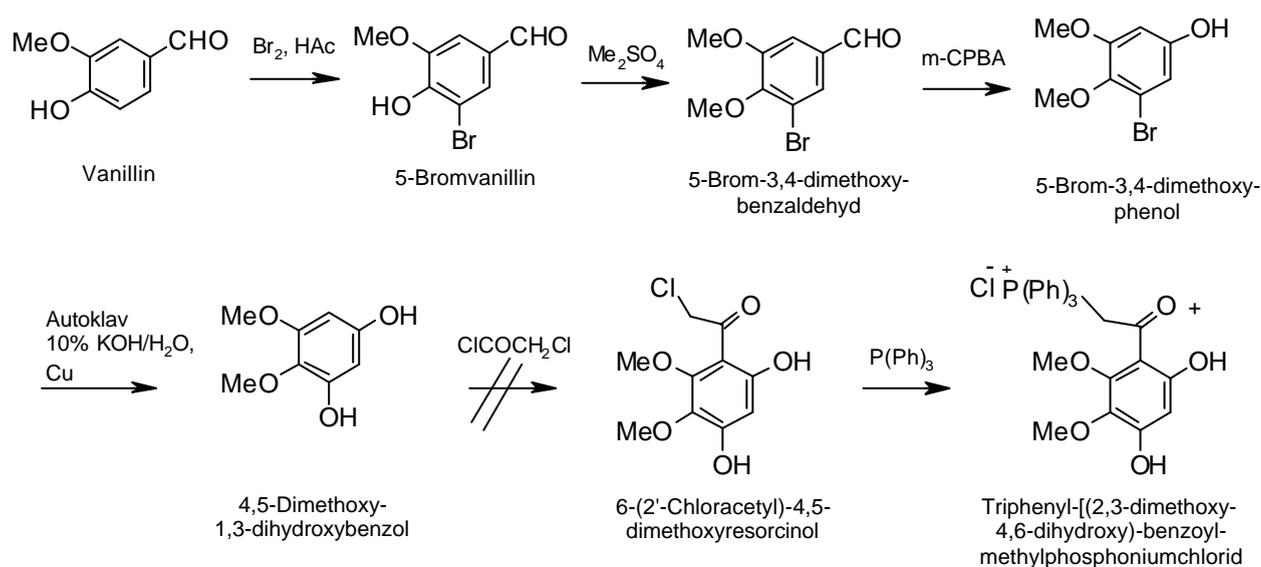


Abb. 36 Syntheschema der Phosphoranzwischenstufe für die Herstellung von Hispidulin nach Osorio-Olivares *et al.* (1999)

Die Darstellung der Acetophenonverbindung erfolgte in der fünften Stufe durch Bildung eines Chloracylesters und Umlagerung der chlorierten Acylgruppe an den Benzolring. Bei dieser Acylierungsreaktion (Fries-Umlagerung) werden *o*- und *p*-Hydroxyphenylketone aus Phenylestern durch intramolekulare Migration der Acylgruppe erhalten. Die Umlagerung der Acylgruppe wird durch mindestens äquimolare Mengen Lewis-Säuren, wie z.B. Aluminiumchlorid, katalysiert. Bei Reaktionen, die bei Raumtemperatur stattfinden, wird eine hohe *p*-Selektivität, bezogen auf die vorhandene OH-Gruppe, erhalten. Die Acylierung erfolgte analog zu der für die Acylierung von Resorcinol etablierten Methode, nach der ausschließlich das *p*-Produkt entsteht (Tsien und Furuta, 2000). Anders als erwartet wurde im Acylierungsschritt, vermutlich aus sterischen Gründen, ausschließlich das *o*-Isomer gebildet. In den folgenden Stufen würde dieses Isomer nicht zum Hispidulin, sondern zum Cirsimaritin führen. Aus Gründen der Vollständigkeit ist die mit der Phosphoranzwischenstufe geplante Syntheseroute nach Osario-Olivares in Abb. 37 dargestellt.

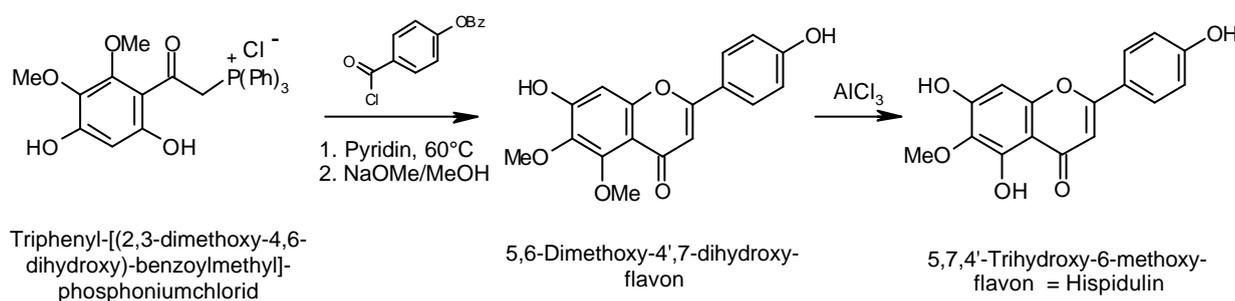


Abb. 37 Schema der geplanten Hispidulinsynthese nach der Methode von Osario-Olivares *et al.* (1999)

Eine weitere Möglichkeit der Darstellung des geeigneten Acetophenon-Bausteines zur Synthese der 5,7-Dihydroxy-6-methoxyflavonderivate wurde von Farkas und Strelisky (1970) im Rahmen der Synthese von Pectolarigenin (5,7-Dihydroxy-4',6-dimethoxyflavon) und 4',6-Dimethoxy-3',5,7-trihydroxyflavon vorgestellt. Ausgangsstoff der Synthese war 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon, das zwar nicht kommerziell verfügbar, aber leicht synthetisierbar ist. Zur Adaption dieser Methode haben wir, ausgehend von Phloroacetophenon (2,4,6-Trihydroxyacetophenon), in nahezu quantitativer Umsetzung mit Dimethylsulfat, zunächst 2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon synthetisiert (Abb. 38) (Srivastava und Srivastava, 1987). Dieses wurde anschließend, ohne weitere Aufreinigung, einer selektiven Demethylierung mit AlCl_3 in

Nitrobenzol unterzogen. Das in einer Ausbeute von etwa 60 % gebildete 2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon wurde nach entsprechender Aufarbeitung in fast reiner Form erhalten und mit Benzylbromid quantitativ zum 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon umgesetzt (Srivastava und Srivastava, 1987).

Die Einführung einer zusätzlichen Hydroxygruppe an Position C-5 des Acetophenons erfolgte mittels Elb's Persulfat-Oxidation. Bei dieser bereits seit 1893 bekannten Reaktion können Phenole mit Persulfaten, wie z.B. Kalium- oder Ammoniumpersulfat, zu dihydroxylierten Aromaten umgesetzt werden. Es wird ein ionischer Mechanismus angenommen, der mit einem Angriff des Persulfats auf die OH-Gruppe beginnt und von einer intra- oder intermolekularen Umlagerung gefolgt wird. Als Intermediat entsteht ein Hydroxyphenylsulfatester, der anschließend durch Säure hydrolysiert wird. Die dabei freiwerdende Hydroxygruppe befindet sich hauptsächlich in der *p*-Stellung zu der bereits vorhandenen OH-Gruppe. Die *o*-Isomere entstehen in sehr geringen Mengen, vor allem wenn die *p*-Stellung besetzt ist. Die erzielten Ausbeuten an dem erwünschten Produkt liegen bei ca. 30 % und die Produkte werden ohne aufwendige Aufreinigung in reiner Form erhalten (Sethna, 1951). Die Durchführung der Elb's Oxidation erfolgte analog zu den Arbeiten von Baker *et al.* (1939). Die Reaktion fand im wässrigen Milieu statt, so dass die Löslichkeit des relativ lipophilen 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenons durch Zusatz geringer Mengen von Pyridin erhöht werden musste.

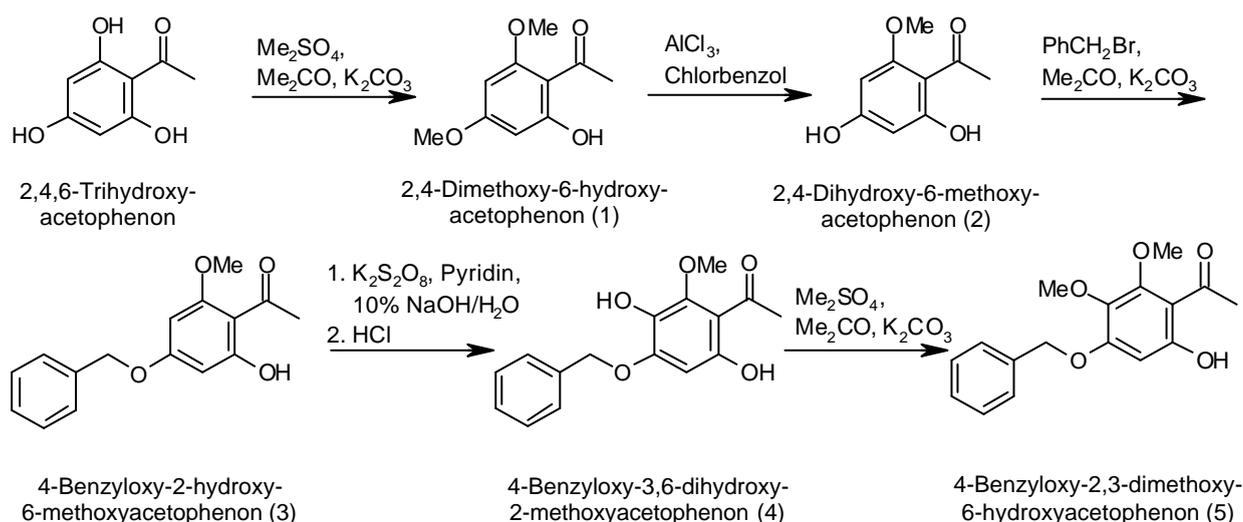


Abb. 38 Herstellung von Acetophenon (Baustein 1) zur Synthese von Hispidulin

Die Darstellung des Säurechlorids (Baustein 2) erfolgte quantitativ in der Reaktion der 4-Benzyloxybenzoesäure mit Oxalylchlorid (Abb. 39). Das Produkt konnte nach Entfer-

nung des Lösungsmittels als reine Komponente erhalten werden (Cherpeck, 1998). Die 4-Benzyloxybenzoesäure wurde entweder aus dem Handel bezogen oder aus 4-Hydroxybenzoesäure mit einer Ausbeute von etwa 50 % synthetisiert (Bracon *et al.*, 1999).

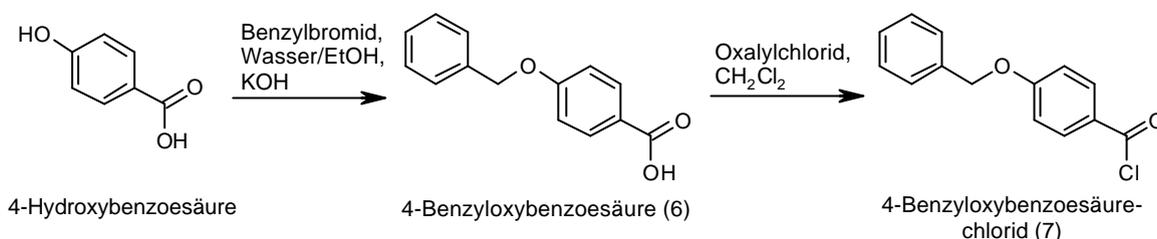


Abb. 39 Herstellung des Säurechlorids (Baustein 2) zur Synthese von Hispidulin

In Abb. 40 ist die eigentliche Flavonsynthese aus den vorbereiteten Vorstufen (Bausteine 1 und 2) dargestellt.

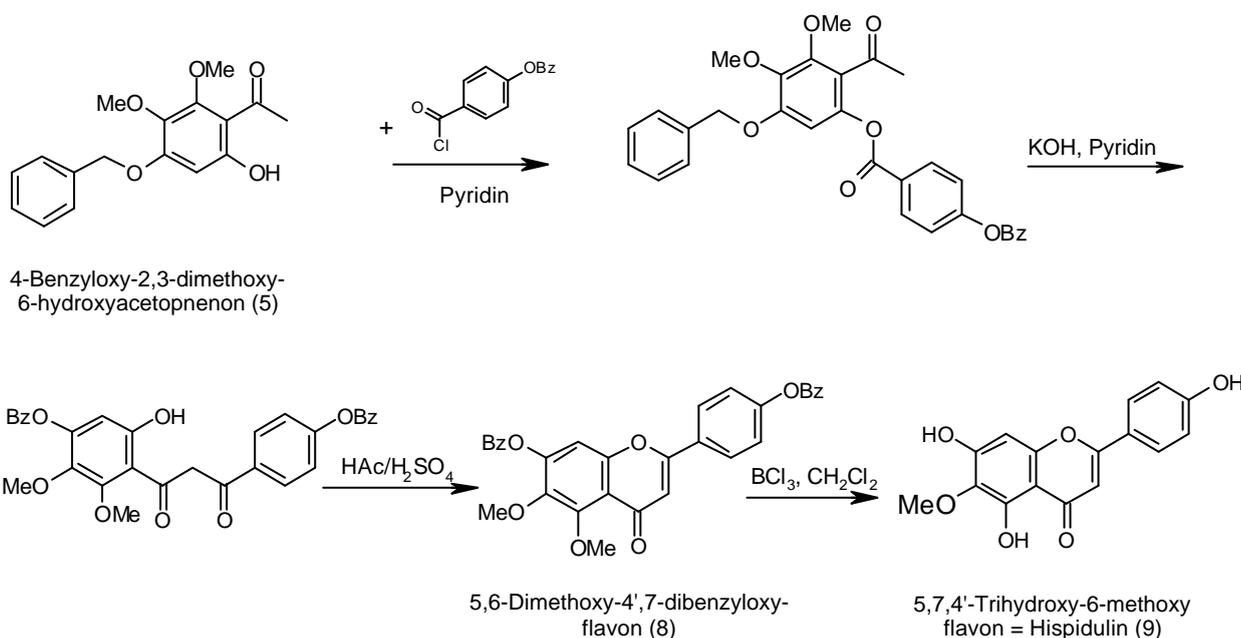


Abb. 40 Hispidulinsynthese aus dem Acetophenon- und dem Säurechlorid-Baustein mit Abspaltung der Schutzgruppen und der labilen C-5-Methylgruppe

Die Bildung des Benzylesters aus dem Acetophenon- und dem Säurechlorid-Baustein erfolgte in trockenem Pyridin. Die Baker-Venkataraman-Umlagerung zum Diketon wurde durch basische Bedingungen induziert. Das gebildete 1,3-Diketon zyklisierte in

einem HAc/H₂SO₄-Gemisch unter Hitzeeinwirkung und Wasserabspaltung zum Flavon. Anschließend führte die Umsetzung mit 1 M BCl₃-Lösung bei etwa -70 °C zur gleichzeitigen Entfernung der Schutzgruppen und der labilen C5-Methylgruppe. Die letzte Reaktion benötigte nur eine kurze Inkubationszeit von einer Stunde und lieferte gute Ausbeuten von über 80 % (Spearing *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse des RRA zeigten, dass Hispidulin als hoch affiner Ligand des BZD-R fungiert (vgl. Abschnitt 3.3). Die im RRA ermittelten Bindungsaktivitäten lassen jedoch keine Rückschlüsse auf die Art der Rezeptormodulation zu. Das heißt, die Frage, ob Hispidulin als positiver Modulator (Agonist), als negativer Modulator (inverser Agonist) oder als neutraler Modulator (Antagonist) am BZD-R bindet, blieb unbeantwortet (vgl. Abschnitt 2.3). Mit dem nunmehr synthetisierten Hispidulin bot sich die Möglichkeit, die Substanz auf ihre pharmakologischen Eigenschaften bezüglich der Modulation des GABA_A-Rezeptorkomplexes zu untersuchen. Diese Studien erfolgten im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. E. Sigel (Universität Bern).

3.7 *In vitro*-Bindungsstudien mit Hispidulin und Apigenin an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren

3.7.1 Untersuchung der Wirkung von Hispidulin und Apigenin auf das Membranpotential

Die *in vitro*-Affinität von Hispidulin zum BZD-R wurde bereits in früheren Studien an Homogenaten aus Rattenhirn beschrieben (Shen *et al.*, 1994). In unseren Untersuchungen konnte eine mit den Ergebnissen von Shen *et al.* vergleichbare Affinität zum humanen BZD-R gezeigt werden (vgl. Abschnitt 3.3). Die Ergebnisse des RRA liefern jedoch keine Aussagen zum pharmakologischen Profil *in vivo*. Aus diesem Grund war zu klären, ob Hispidulin *in vivo* als positiver oder als negativer Modulator des GABA-ergen Systems wirkt und somit inhibitorische oder erregende Eigenschaften besitzt. Apigenin wurden im Laufe der Jahre widersprüchliche Eigenschaften, von promnestisch bis anxiolytisch, zugesprochen (Salgueiro *et al.*, 1997). Aktuelle Studien (Avallone *et al.*, 2000) zeigen im Vergleich zu früheren Untersuchungen (Viola *et al.*, 1995) eine niedri-

gere Affinität. Zum Teil wurden Rückschlüsse gezogen, nach denen Apigenin nicht primär für die im Rattenversuch erzielten anxiolytischen Verhaltenseffekte verantwortlich sei (Avallone *et al.*, 2000).

Das Wirkprofil der BZD-R-Liganden hat man in früheren Studien hauptsächlich indirekt in TBPS-Shift-Experimenten oder mittels der sogenannten GABA-Ratios bestimmt (Shen *et al.*, 1994; Häberlein *et al.*, 1994). Aussagekräftiger sind aufwändige *in vivo*-Untersuchungen des Verhaltens. Als standardisierte Verhaltenstests kommen vor allem der Hell/Dunkel-Wahl-Test („light/dark choice test“) und das erhöhte X-Labyrinth („elevated plus maze“) in Frage. Im Hell/Dunkel-Wahl-Test wird die Zeit gemessen, die ein Versuchstier in einer hellen Kammer bzw. in einer dunklen Kammer verbringt. Die helle Zone stellt dabei einen angstausslösenden Stressfaktor dar. Die angstlösende Wirkung einer Testsubstanz macht sich durch eine erhöhte Verweilzeit in der hellen Kammer bemerkbar. Bei dem erhöhten X-Labyrinth-Test hat das Tier die Wahl zwischen offenen und gedeckten Bereichen. Man erfaßt die Häufigkeit, mit der ein Versuchstier in die seitlich offenen bzw. geschlossenen Arme eintritt und mißt jeweils die Zeit, die es dort verbringt. Die angstlösende Wirkung und damit das agonistische Wirkprofil einer Testsubstanz drücken sich in längeren Verweilzeiten auf den offenen Armen aus.

Wertvolle Detailinformationen zum Substanzprofil lassen sich aus elektrophysiologischen Untersuchungen mit rekombinanten Rezeptoren ableiten. Mit der Expression eines Rezeptorproteins in einer Zelle, die das Protein normalerweise nicht besitzt, bietet sich die Möglichkeit, die Eigenschaften eines Liganden und seine Wirkung auf das Membranpotential zu untersuchen. Bei solchen *in vitro*-Untersuchungen haben sich die Oozyten (reife Eizellen) des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* als Expressionsmedium für den GABA_A/Benzodiazepin-Rezeptorkomplex bewährt. Wegen ihrer Größe ($\varnothing \sim 1,0$ mm) und ihrer relativ einfachen Handhabung werden sie häufig für elektrophysiologische Untersuchungen verwendet.

Aufgrund der bemerkenswerten BZD-R-Aktivität von Hispidulin wurden in Zusammenarbeit mit dem Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. E. Sigel (Pharmakologisches Institut der Universität Bern, Schweiz) Untersuchungen zum pharmakologischen Profil von Hispidulin und Apigenin am Modell der *Xenopus laevis*-Oozyten durchgeführt. Durch Mikroinjektion von *in vitro* transkribierter poly(A)-cRNA wurde die genetische Information für die Proteine der entsprechenden Rezeptoren in das Zytoplasma transportiert.

Schon am nächsten Tag war die biologische Aktivität kodierter Rezeptorproteine auf der Oberfläche der Eizelle messbar. Die angewandte Methode zielte darauf ab, Ionenströme in Abhängigkeit von der Ligandenbindung zu messen. Das normale Potential einer Oozytenmembran beträgt -50 bis -60 mV und wird hauptsächlich durch den K^+ -Mangel in der Zelle hervorgerufen. Mittels einer Zwei-Elektroden-Spannungsklemme (Mikroelektrorendurchmesser: $1 \mu\text{m}$) ist es möglich, den durch GABA-Bindung induzierten Chloridionenstrom in die Zelle zu messen. Die Messung des Ionenstromes erfolgte in Gegenwart von GABA, vor und nach der Applikation des zu untersuchenden modulatorischen BZD-R-Liganden. Wie aus Abb. 41 ersichtlich, erhöhen die positiven Modulatoren (z.B. Benzodiazepine) durch Bindung an den BZD-R den GABA-induzierten Strom. Inverse Agonisten (z.B. β -CCM) verringern den Cl^- -Fluss in die Zelle. Antagonisten besetzen zwar die modulatorische Bindungsstelle, nehmen aber keinen Einfluss auf die GABA-Wirkung (Abb. 41).

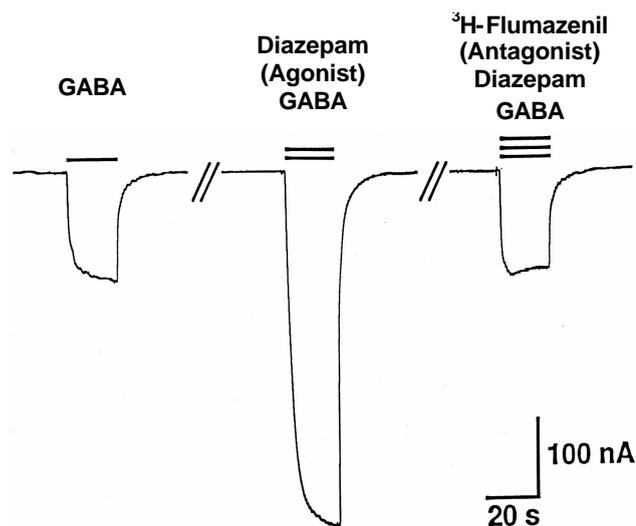


Abb. 41 Elektrophysiologische Untersuchung des pharmakologischen Profils von Modulatoren des GABA_A -Rezeptorkomplexes an *Xenopus laevis*-Oozyten

Hispidulin zeigte an allen untersuchten Subtypen (vgl. Abschnitt 3.7.2) eine starke positive Stimulation des GABA-induzierten Ionenstromes. In Abb. 42 A ist die Wirkung von Hispidulin am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Subtyp dargestellt. Im Vergleich dazu wurde die Wirkung von Apigenin, einem eng verwandten Flavon, untersucht. Wie man in Abb. 42 B erkennen kann, wirkte Apigenin trotz seiner strukturellen Ähnlichkeit zum Hispidulin als inverser Agonist, da der GABA-induzierte Strom mit steigender Apigenin-Konzentration abnahm.

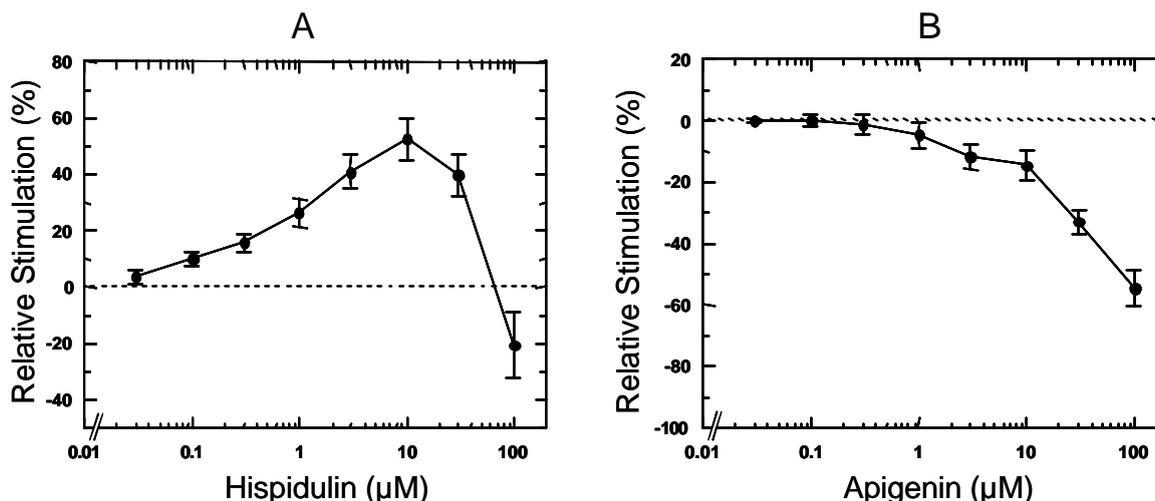
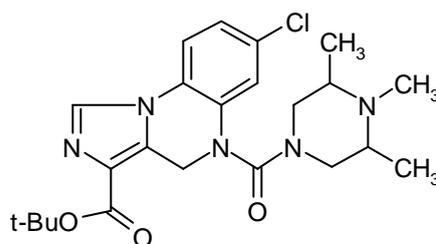


Abb. 42 Konzentration-Wirkungskurven von Hispidulin (A) und Apigenin (B) am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Subtyp des GABA_A/Benzodiazepin-Rezeptorkomplexes

Die maximale relative Stimulation durch Hispidulin wurde bei einer Konzentration von 10 μM erreicht (Abb. 42 A). Hier zeigte Hispidulin 24 % der maximalen Diazepam-Wirkung. Bereits Konzentrationen ab 50 nM induzierten eine Erhöhung des Stromflusses. Dagegen wurde bei hohen Konzentrationen (ab 50 μM) eine Schwächung des GABA-induzierten Stromes beobachtet. Eine ähnliche Beobachtung hat man mit Imidazochinoxalin U-97775 am $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ -Rezeptor gemacht (Im *et al.*, 1995).



U 97775

Im *et al.* stellten die Vermutung auf, dass der Ligand mit zwei Bindungsstellen des GABA_A-Rezeptor-Komplexes interagiert, d.h. mit starker Affinität zum BZD-R und mit geringerer zu einer anderen Bindungsstelle (1995). Da Hispidulin bei höherer Konzentration die GABA-induzierten Ströme inhibierte, bindet es höchstwahrscheinlich ebenfalls mit einer geringeren Aktivität an einer weiteren Bindungsstelle, an der es invers-agonistische Wirkung entfaltet.

Wie erwartet ließ sich die agonistische Wirkung von Hispidulin durch Einsatz eines spezifischen BZD-R-Antagonisten (3 H-Flumazenil = Ro 15-1788) aufheben (Abb. 43).

Diese Tatsache lieferte einen zusätzlichen Beweis dafür, dass die Wirkung von Hispidulin auf dessen Bindung am BZD-R zurückzuführen ist.

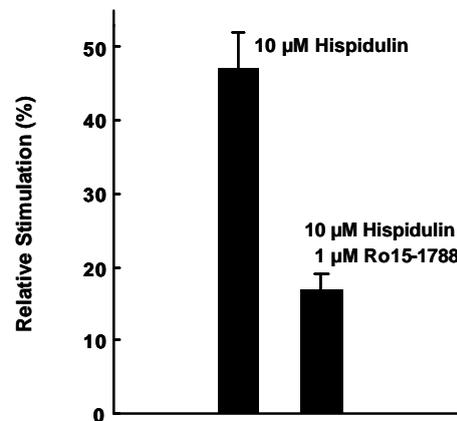


Abb. 43 Inhibierung der stimulierenden Wirkung von Hispidulin auf den GABA-induzierten Stromfluss mit dem spezifischen BZD-R-Antagonisten Ro 15-1788

3.7.2 Untersuchung der Subtypenselektivität von Hispidulin

Benzodiazepine (BZD) zeigen ein sehr breites Wirkungsspektrum und besitzen zugleich unerwünschte Nebeneffekte, da sie zahlreiche unterschiedliche Rezeptor-Subtypen aktivieren. Ziel der aktuellen Forschung ist es, neuartige, spezifische Wirkstoffe zu entwickeln, die selektiv an bestimmte Rezeptor-Subtypen binden und so nur ausgewählte Effekte erzeugen.

Über die funktionelle Diversität der Rezeptortypen wusste man bis vor ein paar Jahren noch sehr wenig. Obwohl die physiologischen Funktionen einer Vielzahl nativ vorkommender Rezeptorisoformen noch offen sind, gibt es erste Hinweise, die eine Zuordnung angstlösender und sedativer Effekte zu bestimmten Rezeptor-Subtypen ermöglichen. So konnte 1999 die Züricher Arbeitsgruppe um Rudolph zeigen, dass die sedative, amnestische und teilweise auch die antikonvulsive Wirkung der BZD durch die α_1 -haltigen GABA_A-Rezeptoren vermittelt wird (Rudolph *et al.*, 1999). Die Strategie zur Identifizierung angstlösender Rezeptoren beinhaltete gezielte Punktmutationen, die zu veränderten Aminosäuresequenzen führten. Der Austausch von einzelnen Aminosäuren veränderte dabei die pharmakologischen Wirkungen der BZD, nicht jedoch die Anzahl und Verteilung der Rezeptoren im ZNS. Dadurch konnten Rezeptorkomplexe hergestellt werden, die weiterhin GABA-responsiv, jedoch nur teilweise BZD-responsiv waren.

Bezüglich der α_1 -mutierten Mäuse zeigten sich so nach Applikation von Diazepam keine sedativen, amnestischen und zum Teil auch keine antikonvulsiven Effekte mehr. Dagegen ließen sich die angstlösenden, myorelaxierenden, lokomotionsbeeinträchtigenden und die Ethanolwirkung potenzierenden Effekte weiterhin beobachten und deshalb auf die verbleibenden, nicht mutierten Rezeptoren zurückführen (Rudolph *et al.*, 1999). Analog wurden auch die α_2 - und α_3 -Varianten der Rezeptoren auf ihre physiologischen Funktionen untersucht. Die α_2 -mutierten Mäuse (α_2 H101R) reagierten auf die Verabreichung von BZD mit Zeichen der Sedation, Anhebung der Krampfschwelle und Muskelrelaxation. Die angstlösenden Effekte konnten in diesen Mutanten nicht beobachtet werden. Dies lässt darauf schließen, dass Diazepam seine anxiolytische Wirkung über die α_2 -GABA_A-Rezeptoren vermittelt. Darüber hinaus scheint die α_3 -Untereinheit für angstlösende Effekte entbehrlich zu sein, da in α_3 -Mutanten kein Einfluss auf die angstlösende Wirkung beobachtet wurde. Man erwartet demnach von α_2 -selektiven Wirkstoffen nur die gewünschten angstlösenden und keine anderen Effekte (Löw *et al.*, 2000). Die Entwicklung solcher Arzneimittel ist für die Behandlung von Angsterkrankungen von besonderer Bedeutung.

In unseren Untersuchungen wurden die fünf häufigsten Rezeptorsubtypen $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$, $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ in den *Xenopus laevis*-Oozyten exprimiert. An diesen Kombinationen wurde die Bindungsaktivität von Hispidulin untersucht. Das Flavon zeigte an allen untersuchten Rezeptorsubtypen gleich starke agonistische Wirkungen (Abb. 42 A). Als eine Besonderheit erwies sich die Bindung von Hispidulin an den $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ -Subtyp (Abb. 44). BZD wie Diazepam können an diesen Subtyp nicht binden. Die lipophile Tasche L_3 ist in α_6 -Rezeptoren sehr klein (Zhang *et al.*, 1995). Es wurde vermutet, dass dies das Bindungsverhalten klassischer BZD beeinflusst (Marder *et al.*, 2001). Studien von Marder *et al.* zeigten keine Aktivität von Flavonoiden an dem α_6 -haltigen Rezeptorsubtyp $\alpha_6\beta_3\gamma_2$. Als Ursache hierfür wurde ebenfalls die durch die sterischen Effekte der Substituenten fehlende Besetzung der sehr kleinen L_3 -Tasche vermutet (Marder *et al.*, 2001). Aufgrund unserer Ergebnisse kann diese Hypothese zum Teil widerlegt werden, da Hispidulin, obwohl es zur Gruppe der Flavone gehört, dennoch an den α_6 -haltigen Rezeptorsubtyp $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ bindet. Es ist aber denkbar, dass die β -Einheit die unterschiedlichen Bindungseigenschaften beeinflusst. Um diese Vermutung abzusichern, sind weitere Untersuchungen mit den rekombinanten Rezeptoren notwendig.

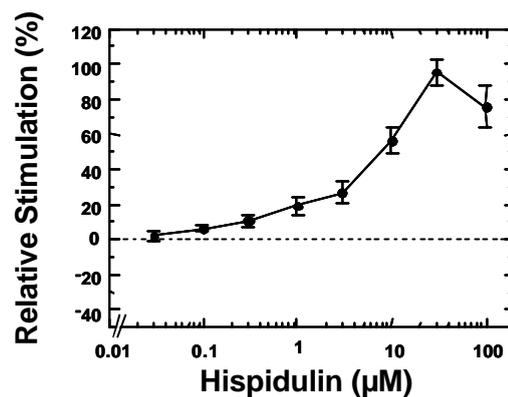


Abb. 44 Konzentrations-Wirkungskurve von Hispidulin am $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ -Subtyp des GABA_A-BZD-Rezeptorkomplexes

Einige BZD-R-Liganden, die als positive Modulatoren des GABA_A-Rezeptorkomplexes wirken, werden als wirksame Antikonvulsiva in der Therapie der Epilepsie eingesetzt. Da Hispidulin die GABA-induzierte inhibitorische Wirkung *in vitro* verstärkt (vgl. Abschnitt 3.7), lag es nahe, dass die Substanz auch *in vivo* antikonvulsive Effekte ausübt. Voraussetzung ist natürlich, dass es in genügender Menge resorbiert wird und die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Das Modell der Mongolischen Wüstenrennmaus bot die Möglichkeit, den ersten *in vivo*-Versuch mit Hispidulin zu starten, um gleichzeitig die biologische Verfügbarkeit und die *in vivo*-Wirksamkeit einzuschätzen.

3.8 Untersuchungen zur antiepileptischen Wirkung von Hispidulin

3.8.1 Bedeutung des GABA-ergen Systems in der Epilepsie

Unter dem Begriff Epilepsie werden Erkrankungen summiert, die mit wiederholten, zumeist unprovokierten Krampfanfällen einhergehen. Weltweit sind mehr als 0,5 % der Bevölkerung von Epilepsie betroffen (Kaneko *et al.*, 2002). Wegen der Vielfalt der klinischen Erscheinungsbilder, von der Bewegungsstarre bis zu tonisch-klonischen Konvulsionen, und aufgrund der unterschiedlichen Krankheitsverläufe existiert keine einheitliche Definition für das epileptische Krankheitsgeschehen. Auch können die Ursachen

der Epilepsie sehr verschieden sein. Dennoch geben neuere Erkenntnisse auf neurochemischer Basis einen guten Einblick in den prinzipiellen Anfallsmechanismus. So ist bekannt, dass es während eines epileptischen Anfalls zu einer Depolarisierung neuronaler Zellverbände kommt, wenn das normale Gleichgewicht zwischen erregenden und inhibitorischen Prozessen zugunsten der postsynaptischen Erregung verschoben ist. Ein epileptischer Anfall kann als vorübergehende synchrone elektrische Entladung im Gehirn betrachtet werden. Diese resultiert aus einer gesteigerten Erregbarkeit oder einer zu schwachen Inhibierung in bestimmten Hirnregionen (Julien, 1997).

Bei der Erhaltung der neuronalen Balance und somit bei der Protektion vor Anfällen spielt das GABA-erge System eine wesentliche Rolle. Dies konnte in mehreren experimentellen und klinischen Studien veranschaulicht werden (Treiman, 2001):

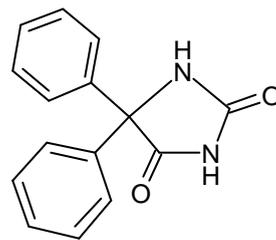
1. In Tiermodellen mit vererbter und erworbener Epilepsie hat man Abnormalitäten des GABA-ergen Systems (Mutationen) festgestellt.
2. In Studien an humanem Hirngewebe von Betroffenen wurde von einer Beeinträchtigung der GABA-vermittelten Inhibierung berichtet. Es fand sich eine reduzierte Glutamatdecarboxylase-Aktivität und Bindung am GABA_A-R und am BZD-R. Beschrieben wurde auch eine reduzierte GABA-Konzentration in der Cerebrospinalflüssigkeit und im Hirngewebe von Epilepsiepatienten.
3. GABA-Agonisten können Anfälle unterdrücken. Im Gegensatz dazu können GABA-Antagonisten Anfälle auslösen.
4. Substanzen, die die GABA-Synthese inhibieren, verursachen Anfälle.
5. Substanzen, welche die GABA-vermittelte Inhibierung verstärken (z.B. Benzodiazepine und Barbiturate), stellen effektive Antikonvulsiva dar.
6. Wirkstoffe, die durch Inhibierung des GABA-Abbaus oder der GABA-Wiederaufnahme die GABA-Konzentration in den Synapsen erhöhen, sind ebenfalls effektive Antikonvulsiva.

Das oben erwähnte, erregende „Signalgewitter“, das durch einen Überschuss erregender oder durch Insuffizienz inhibitorischer Neurotransmitter hervorgerufen wird, kann vor allem durch positive Modulatoren des GABA-ergen Systems gemindert oder ganz verhindert werden. So besitzen Benzodiazepine (BZD), die durch Bindung an den BZD-R die GABA-Wirkung verstärken, antikonvulsive Wirkung und werden in der Therapie der Epilepsie eingesetzt. Die meisten als Antiepileptika eingesetzten Medikamente, wie z.B. BZD oder Barbiturate, führen über eine positive allosterische Modifikation des

GABA_A-ergen Systems zu einer Verstärkung der inhibitorischen synaptischen Transmission. Auch ein Eingriff in Wirkmechanismen, wie die Steigerung der GABA-Synthese und die Hemmung des GABA-Abbaus bzw. der GABA-Wiederaufnahme, kommt in der Therapie der Epilepsie in Frage.

3.8.2 Epilepsiemodell der Mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil)

Das Studium der Epilepsie und die Entwicklung von Therapiemöglichkeiten ist auf die Verwendung von Modellsystemen angewiesen. Von diesen spielt das epileptische Tiermodell eine essentielle Rolle bei der Entdeckung und Beurteilung neuer Antiepileptika. Unter Zuhilfenahme von Tiermodellen mit Katzen und Hunden, bei denen Anfälle durch Elektroschocks oder durch bestimmte Chemikalien ausgelöst werden, wurden bereits zahlreiche Substanzen mit antikonvulsiven Effekten identifiziert, darunter das heute weit verbreitete Phenytoin (Merritt *et al.*, 1938).



Phenytoin

Das Modell der Mongolischen Wüstenrennmaus (Gerbil) ist ein natürliches Tiermodell zur Untersuchung epileptiformer Krämpfe (Bertorelli *et al.*, 1995). Die Anfälle werden bereits durch einfache Manipulation ausgelöst. Ein Eingriff mit krampfauslösenden Medikamenten sowie mit Elektroschocks ist hier nicht nötig. Das Krampfgeschehen beim Gerbil wird primär als ein Modell der Temporallappenepilepsie eingesetzt (Kato *et al.*, 2000). Der Hauptvorteil dieses Epilepsiemodells liegt darin, dass die hier natürlich auftretende Epilepsie der klinischen Situation der humanen Epilepsie näher kommt als bei anderen experimentellen Epilepsiemodellen. Zu den gemeinsamen Charakteristika beider Formen gehören spontane und stimulusinduzierte Anfälle, alters- und zustandsbedingter Beginn sowie die Antwort auf Antiepileptika und verschiedenste Veränderungen der Neurotransmittersysteme (Paul *et al.*, 1981; Seto-Ohshima *et al.*, 1992). Zu den praktischen Nachteilen des Modells gehören eine Abnahme der Anfallsneigung bei repetitiver Testung und die Entwicklung von Toleranz gegenüber antikonvulsiver Behandlung (Rausch, 1989).

Der Mongolische Gerbil kommt in ariden Steppen, in den Halbwüsten Nord-Chinas und in der Mongolei vor (Abb. 47). Er lebt unterirdisch in komplizierten Gangsystemen. Aufgrund seiner Anpassungsfähigkeit und relativen Unempfindlichkeit gegenüber Erkrankungen ist der Mongolische Gerbil als Haustier und als Versuchstier (Krebs-, Verhaltens-, Karies-, Arterioskleroseforschung, etc.) weit verbreitet. Bei etwa 20 % der in Gefangenschaft lebenden Tiere beobachtete man das Auftreten von schweren, spontanen epileptischen Anfällen. Durch Züchtung gelang es Eder, eine Population mit 80-90 % anfallsensitiven Tieren zu etablieren. Die genetische Komponente der Krampfbereitschaft konnte bislang noch nicht lokalisiert werden (Eder *et al.*, 1982).



Abb. 47 Ein etwa zwei bis drei Monate alter Gerbil (Ordnung: Rodentia; Unterordnung: Myomorpha; Familie: Cricetidae; Unterfamilie: Gerbillinae; Gattung: *Meriones*; Art: *Meriones unguiculatus*)

Der Ablauf des Anfalls ist bei allen Tieren ähnlich, kann sich aber durch Schwere und Dauer unterscheiden. Die Anfallserscheinungen können in Grade von 0 (kein Anfall) bis 6 (tonisch-klonischer Anfall, der zum Tode führt) eingestuft werden (Laskota *et al.*, 1974). Anfälle werden meist schon durch eine Ortsveränderung oder durch einen anderen Stress-induzierenden Außenreiz hervorgerufen (Kaplan, 1975). Mehrere klassische und neuere Antiepileptika, insbesondere BZD-R-Agonisten, führten in diesem Modell zu einer starken Reduktion der Anfallsneigung (Eder *et al.*, 1982; Bartoszyk und Hamer, 1987).

Bereits im Jahre 1985 gelang es der Arbeitsgruppe um Loescher, agonistische und partiell agonistische Effekte einiger β -Carboline im Gerbil-Modell zu demonstrieren. Mit Ausnahme des β -Carbolins ZK 93426 haben die untersuchten β -Carboline (ZK 91296

und ZK 93423) die Anfallshäufigkeit erheblich reduziert (vgl. Abschnitt 2.6.1). *In vivo*-Bindungsstudien zeigten, dass diese Substanzen radioaktiv markierte BZD von den Rezeptoren verdrängen. Sie lieferten einen weiteren Hinweis auf ihre antiepileptische Wirkung. Die antikonvulsiven Effekte sind -wie bei den BZD- bereits bei niedrigen Konzentrationen, d.h. bei geringer Rezeptorbesetzung, beobachtet worden. Im Gegensatz zu Diazepam zeigte ZK 91296 auch bei einer 90 %-igen Rezeptorbesetzung keine sedativen Nebenwirkungen (Loescher *et al.*, 1985).

3.8.3 Beschreibung der Gerbilpopulation und der Anfälle

Bei der von uns eingesetzten Population handelte es sich um Tiere, deren Anfallssensibilität in Vorversuchen geprüft worden war. Tiere, die hierbei keinerlei Anfälle zeigten, wurden vom Experiment ausgeschlossen. Entsprechend der Tagesform der Tiere wurden dabei mittlere bis schwere Anfälle mit einer Häufigkeit von etwa 90 % erreicht. Die Anfälle wurden zwischen 8 und 10 Uhr induziert, da in dieser Zeitspanne die größte Anfallsbereitschaft der Tiere liegt (Eder *et al.*, 1982).

Die Anfälle wurden durch Streicheln der Tiere entgegen der Fellwuchsrichtung induziert. Bei Ausbleiben eines Anfalls wurde der Vorgang nach etwa fünf Minuten wiederholt. Die innerhalb von fünf Minuten auftretenden Anfälle wurden entsprechend den in Abschnitt 4.3.7.2 beschriebenen Symptomen in drei Gruppen eingeteilt (0: kein Anfall, I: leichter Anfall, II: mittelschwerer bis schwerer Anfall). Aus Gründen der besseren Übersicht und der begrenzten Anzahl der zur Verfügung stehenden anfallssensiblen Versuchstiere wurde auf eine differenziertere Einteilung der Anfälle in die sechs Gruppen nach Laskota *et al.* (1974) verzichtet. Die Einteilung in drei Gruppen sollte zur ersten Beurteilung der pharmakologischen Wirkung von Hispidulin genügen.

Abb. 48 zeigt exemplarisch klinische Erscheinungsbilder, die während eines schweren epileptiformen Anfalls beobachtet werden.

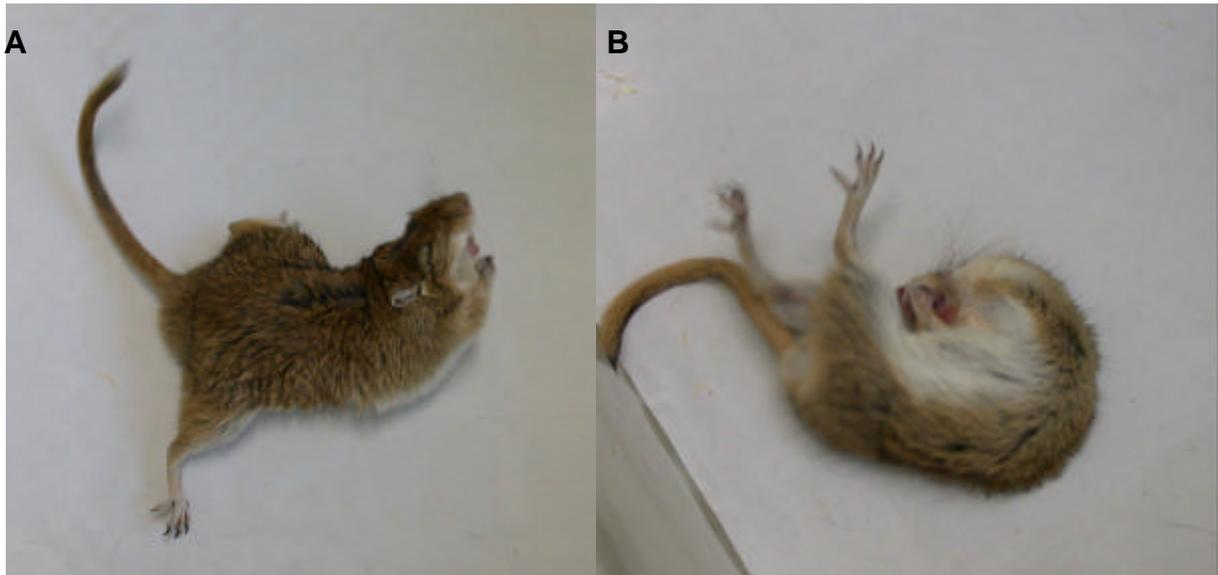


Abb. 48 Gerbil während eines schweren epileptiformen Anfalls (klonisch-tonischer Krampf); A: Streckung der Hinterbeine und Rückwärtsbewegung des Kopfes; B: Überrollen des Körpers

Die zur Verfügung stehenden 29 Gerbils wurden in drei Gruppen eingeteilt: eine Negativkontrollgruppe (10 Tiere), eine Testgruppe (10 Tiere) und eine Positivkontrollgruppe (9 Tiere). Vor der Durchführung der Verfütterung wurde das Anfallsprofil in allen Gruppen untersucht. In Abb. 49 ist die Anzahl der Anfallsereignisse nach Schweregrad (leichte sowie mittelschwere und schwere Anfälle) zusammengefasst dargestellt. In der Negativkontrollgruppe wurde eine 100 %-ige Häufigkeit von mittelschweren bis schweren Anfällen beobachtet. In der Testgruppe und in der Positivkontrollgruppe zeigten 9 von 10 bzw. 7 von 9 Tieren mittelschwere bis schwere Anfälle.

Die Untersuchung der antiepileptischen Wirkung von Hispidulin erfolgte nach oraler Gabe im Futter (Abb. 50). Da das Injizieren einer Substanz bereits zu einem Anfall führen würde, stellte die orale Gabe über das Futter die einzige reizarme Methode dar. Zwischen den Anfallsinduktionen wurde eine einwöchige Pause eingehalten, um Interferenzen durch die bekannte Refraktärphase nach einem Anfallsereignis zu vermeiden (Thiessen *et al.*, 1968). Das Verfütterungsexperiment erstreckte sich über sieben Tage. Die Negativkontrollgruppe erhielt täglich die gleiche Portion Placebo-Futter (5 g). Die Tagesportionen der Testgruppe wurden mit jeweils 1 mg Hispidulin versetzt. Das entsprach einer täglichen Dosis von 10 mg/kg Körpergewicht. Die Tiere

der Positivkontrollgruppe bekamen täglich ein mit 0,2 mg Diazepam supplementiertes Futter (entsprechend 2 mg/kg KG).

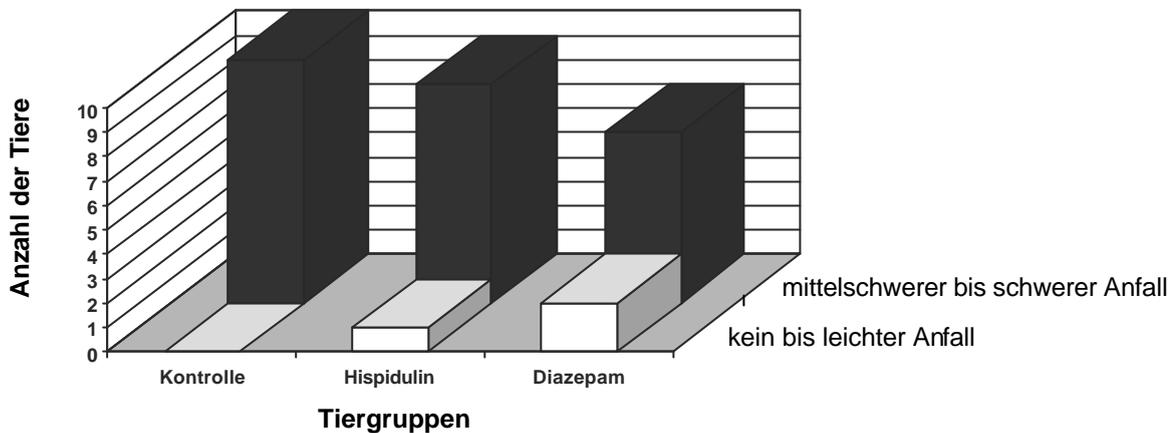


Abb. 49 Anfallshäufigkeit und –schwere vor der Durchführung der Verfütterung von Hispidulin und Diazepam. Es sind drei Tiergruppen dargestellt: die Negativkontrollgruppe (Kontrolle), die Testgruppe (Hispidulin) und die Positivkontrollgruppe (Diazepam)

Nach Ablauf der Verfütterungswoche wurden alle Gruppen auf Anfallshäufigkeit und Anfallsschwere getestet (Abb. 50). Wie erwartet zeigten sowohl die Test-, als auch die Positivkontrollgruppe eine Reduzierung der mittelschweren bis schweren Anfälle bei 30 bzw. 25 % der Tiere. In der Negativkontrollgruppe zeigten dagegen 80 % der Tiere mittelschwere bis schwere Anfälle.

Insgesamt wurden eine deutliche Abnahme der Anfallshäufigkeit sowie eine Minderung der Anfallsintensität in den Tiergruppen festgestellt, die eine Hispidulin- und Diazepamhaltige Diät bekommen haben. Hispidulin zeigte in dem durchgeführten Experiment eine mit Diazepam vergleichbare, antikonvulsive Wirkung und damit das Potential eines möglichen Antiepileptikums.

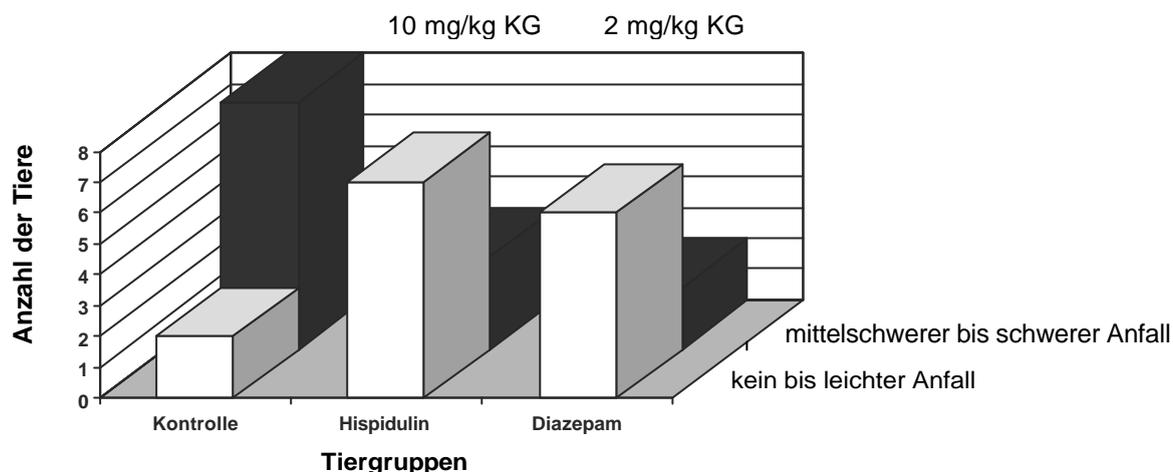


Abb. 50 Anfallshäufigkeit und –schwere nach der Verfütterung von Hispidulin und Diazepam

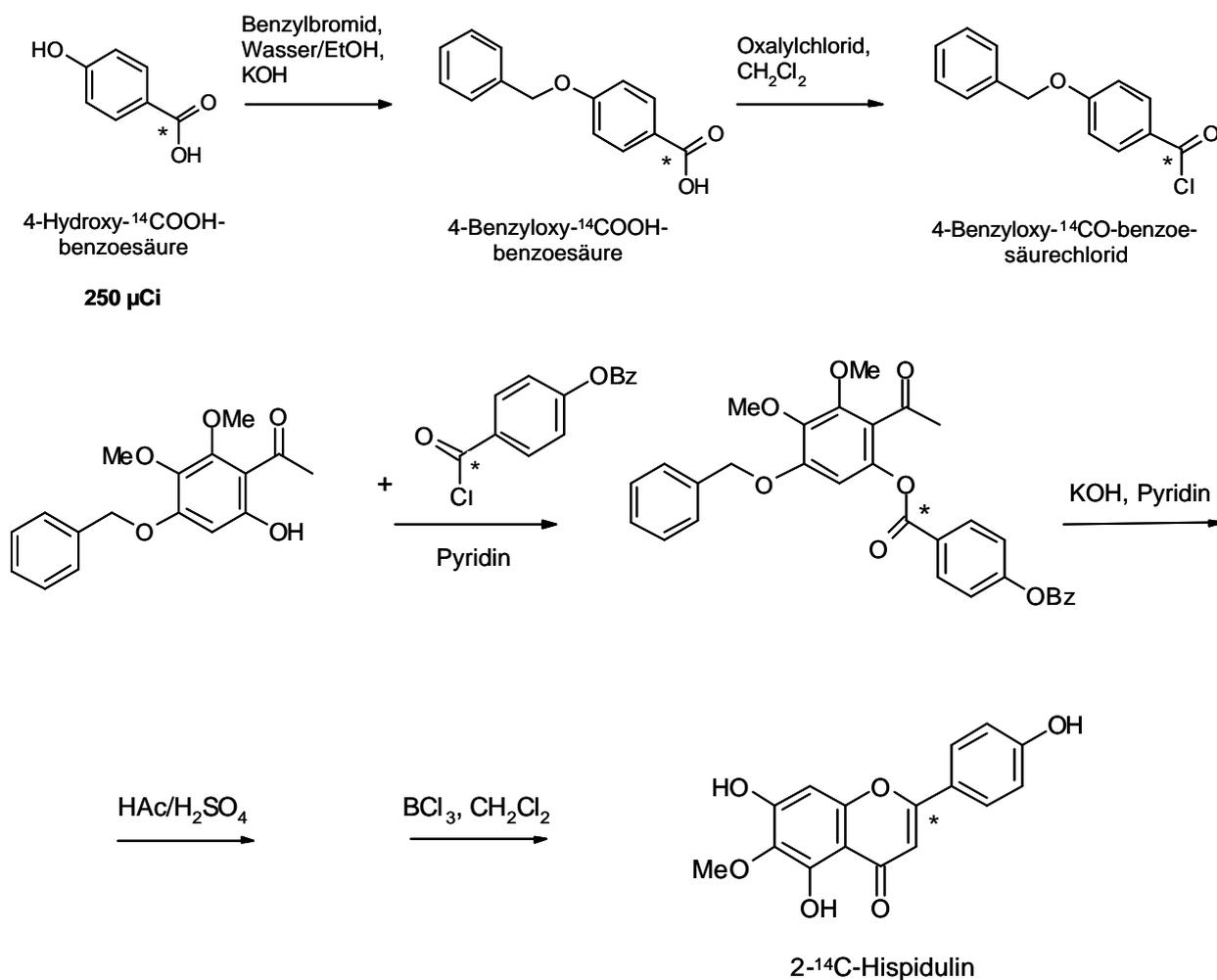
Der Gerbiltest ist als ein *in vivo*-Epilepsiemodell gut geeignet, um neue, potentiell antiepileptisch wirksame Substanzen zu identifizieren und ihre pharmakodynamische Aktivität zu bestimmen. Die niedrigen Tierhaltungskosten und geringen apparativen Aufwendungen erlauben dabei auch die Testung einer größeren Anzahl von Verbindungen. Es kann auf diese Weise eine engere Auswahl von Substanzen getroffen werden, die dann für weitergehende, kostenintensivere *in vitro*- und *in vivo*-Experimente in Betracht kommen. Dabei werden diverse standardisierte verhaltenspharmakologische Methoden (z. B. Motilitätstests und Kindlingexperimente) als klinikrelevante Epilepsiemodelle eingesetzt. Die abschließende Beurteilung der therapeutischen Eignung eines Wirkstoffs bleibt jedoch der sorgfältigen klinischen Prüfung am Menschen vorbehalten.

Nachdem das pharmakologische Profil von Hispidulin als agonistisch bzw. partiell agonistisch charakterisiert worden war und die Substanz antiepileptische Effekte im Gerbil-Modell gezeigt hatte, stellte sich die Frage nach der *in vivo*-Verfügbarkeit. Vor allem die Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit, die für die Wirksamkeit am BZD-R nötig ist, erschien von großer Bedeutung für zukünftige Studien. Für die Unter-

suchung der pharmakokinetischen Verteilung von Wirkstoffen eignen sich radioaktiv markierte Substanzen sehr gut, da man sie in kürzester Zeit in den einzelnen Geweben lokalisieren und quantifizieren kann. Aus diesem Grund sollte radioaktiv markiertes Hispidulin nach der bereits etablierten Methode (vgl. Abschnitt 3.6.2) synthetisiert und für *in vivo*-Untersuchungen bereitgestellt werden (*in vivo*-Experimente nicht im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt).

3.9 Synthese von 2-¹⁴C-Hispidulin

Die Radiomarkierung von Hispidulin wurde durch Einsatz des ¹⁴C-markierten Benzoessäurechlorids (Baustein 2) realisiert. Zur Synthese des Säurechlorids wurden 250 µCi 4-Hydroxy-¹⁴COOH-benzoessäure mit einer spezifischen Aktivität von 55 mCi/mmol eingesetzt (Abb. 45). Die Synthese von 2-¹⁴C-Hispidulin wurde nach der in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Baker-Venkataraman-Methode durchgeführt (Abb. 38-40 und 45). Um die Reaktions- und somit auch die Abfallvolumina radioaktiver Lösungen gering zu halten, wurde der Ansatz im unteren mg-Maßstab gewählt. Das radioaktive Hispidulin sollte in geringen Mengen, jedoch mit einer hohen spezifischen Aktivität erhalten werden. Das markierte Produkt sollte erst später mit der unmarkierten Substanz auf die benötigte Aktivität verdünnt werden.

Abb. 45 Radiosynthese von 2-¹⁴C-Hispidulin

Im Rohprodukt der Synthese wurde eine Gesamtaktivität von 10 µCi erhalten. Nach säulenchromatographischer Reinigung an Kieselgel wurden nur reine, Hispidulin-haltige Fraktionen vereinigt. Die Radioaktivität des ca. 3 mg schweren Reinproduktes betrug 9 µCi. Die Zwischenprodukte der Synthese und das Endprodukt wurden auf chemische und radiochemische Reinheit überprüft. Die mit UV- und Radiodetektor durchgeführte HPLC-Analytik ergab für das Endprodukt eine chemische und radiochemische Reinheit von über 99 % (Abb. 46). Die markierte Substanz wurde unter Berücksichtigung der geplanten Tierversuche mit 37 mg „kaltem“, d.h. nicht radioaktivem Hispidulin verdünnt. Das für die Untersuchung der pharmakokinetischen Verteilung in Ratten zur Verfügung stehende Material besaß eine spezifische Aktivität von 67,5 µCi/mmol (0,225 µCi/mg).

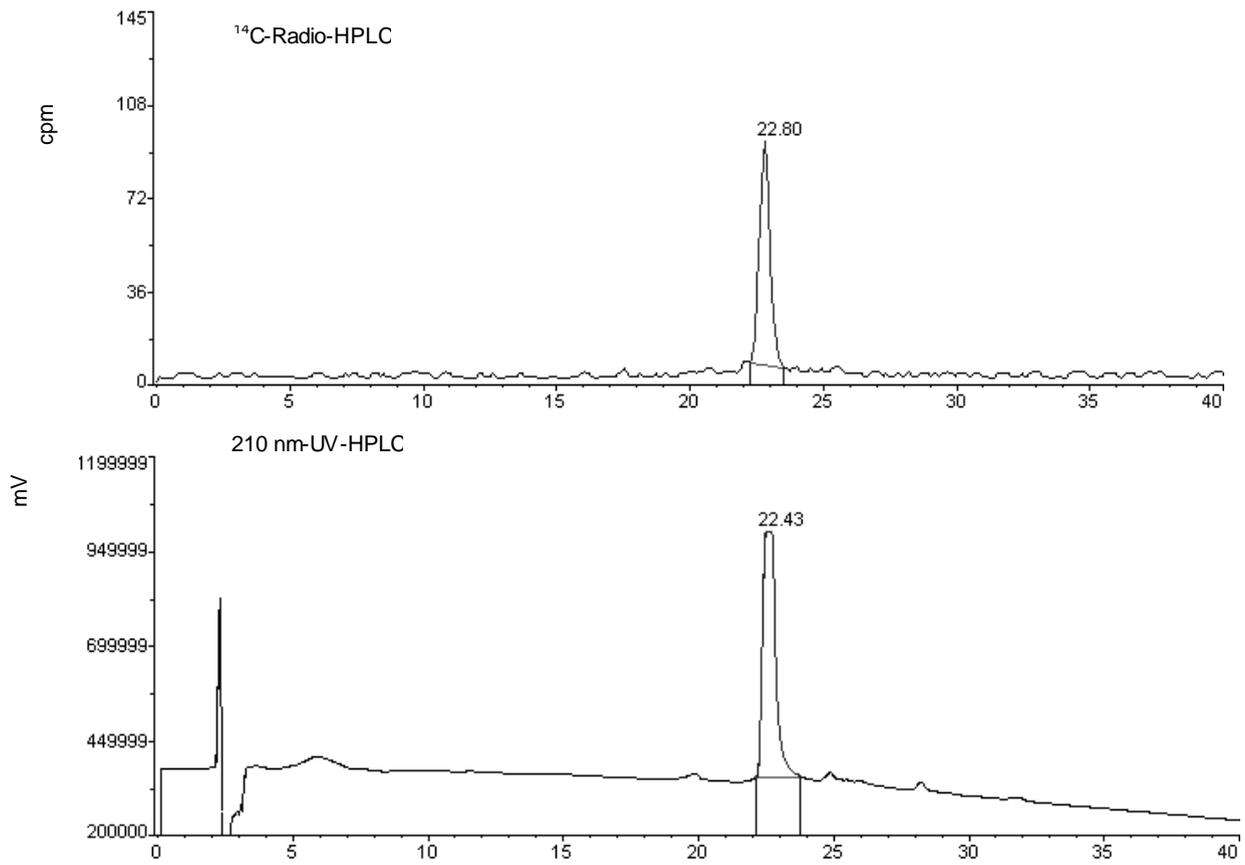


Abb. 46 HPLC-Chromatogramm des Radiosyntheseproduktes mit Radio- und UV-Detektion (Eurospher C18, $\text{H}_2\text{O}/0,05\%\text{HCOOH}$ (A)- MeCN (B), 1-99 % B in 40 min)

4 Experimententeil

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, in p.a.-Qualität von den Firmen Sigma-Aldrich, Fluka, Roth und Merck bezogen. ^3H -Flumazenil (Ro 15-1788, spezifische Aktivität: 70,80 Ci/mmol) für die Durchführung des Radiorezeptorbindungsassays (RRA) stammte von NENTM Life Science Products, Inc. (Boston, MA). Im RRA wurde der Szintillationscocktail für hydrophile und hydrophobe Proben Rotiszint_{ecoplus}[®] der Firma Roth (Karlsruhe) verwendet. In die Synthese von ^{14}C -Hispidulin wurde 4-Hydroxy- ^{14}C -COOH-benzoesäure von American Radiolabeled Chemicals Inc. mit einer Gesamtaktivität von 250 μCi und einer spezifischen Aktivität von 55 mCi/mmol eingesetzt. Lösungsmittel für Extraktionen, Aufarbeitungen sowie Isolierungen wurden zusätzlich über Füllkörperkolonnen rektifiziert. Für HPLC/DAD- und LC-MS/MS-Experimente wurden „gradient grade“-Lösungsmittel von Acros Organics (Belgien) und Merck (LiChrosolv[®], Deutschland) verwendet.

4.1.2 Untersuchungsmaterial

4.1.2.1 Kalluskulturen und pflanzliche Regenerate

Pflanzliche Kalluskulturen wurden im Botanischen Garten am Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie der Universität Würzburg unter sterilen und standardisierten Klimabedingungen (Klimakammer Sylvania F36W/Gro-Lux, 1200 Lux, 26 °C, 70 % rel. Luftfeuchtigkeit) bis zu 16 Wochen lang gezüchtet (Abou-Mandour *et al.*, 1994). Zur Induktion der Gewebekultur dienten junge Blätter und Stängel aus den apikalen Bereichen der Pflanzen, Stengel- und Wurzelspitzen. Nach Sterilisierung durch 10-minütiges Waschen mit 30-50 % Natriumhypochloritlösung und Spülen mit dest. Wasser wurden die Explantate auf Nährmedien nach Murashige und Skoog (MS) (Murashige und Skoog, 1962) bzw. Abou-Mandour (AM) (Abou-Mandour, 1977) gebracht und unter Dauerlicht kultiviert. Den Nährmedien wurden Phytohormone (2,4-D = 2,4-Dichlor-

phenoxyessigsäure, IES = β -Indolessigsäure, Kin = Kinetin, Zea = Zeatin, NES = α -Naphthylessigsäure) in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt (vgl. Tab. 4 und 5 in Abschnitt 3.1.1.1). Zur Induktion der Regeneratbildung unter Dauerlicht wurden Medien mit 0,3 mg/l Kinetin und 2 mg/l β -Indolessigsäure verwendet und die Regenerate auf hormonfreien Medien unter Wechsellicht (16 h Licht mit ca. 1800 Lux, 8 h Dunkelheit) weiter kultiviert. Für die Subkulturen der Kalli und Regenerate wurden Erlenmeyerkolben mit jeweils 100 ml Medium gefüllt. Dieses wurde vor dem Autoklavieren auf pH 5,8 (MS) und 5,6 (AM) eingestellt (Abou-Mandour *et al.*, 1994; Abou-Mandour, 1999). Bis zur Durchführung der analytischen Untersuchungen wurden die Pflanzenproben in Folienbeuteln in lyophilisierter Form unter Vakuum verpackt.

4.1.2.2 Pflanzendrogen

Die trockenen Salbeiblätter sowie alle anderen Drogen für das Screening der Bindungsaktivität am Benzodiazepinrezeptor (BZD-R) wurden von der Firma Klenk (Schwebheim) bezogen.

4.1.3 Adsorptionsmaterial

Bei der Säulenchromatographie sowie der „Flash“-Chromatographie wurde Kieselgel 60 (Korngröße 0,032-0,063 mm, Merck) als stationäre Phase verwendet. Zur Trennung an RP-Material wurde LiChroprep[®] RP-18 (Korngröße 40-63 μ m) von der Fa. Merck eingesetzt.

4.1.4 Dünnschichtchromatographie (DC)

Träger: analytische DC:(1) DC-Alufolien-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, 5×10 cm (Merck)
(2) DC-Polygram[®] SIL G/UV₂₅₄-Fertigfolien Kieselgel mit Fluoreszenzindikator, Schichtdicke 0,2 mm, 4×8 cm (Macherey-Nagel)

- präparative DC:(3) DC-Alufolien-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, Layer: 200 µm, 20×20 cm (Merck)
- (4) DC-Glas-Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, Layer: 250 µm, 20×20 cm (EM Separations Technologie)

Detektion: UV 254 nm

4.2 Geräte

4.2.1 Radiorezeptorbindungsassay (RRA)

Harvester: Modell MACH 96 (Tomtec)
Vakuumpumpe: Modell XX5522050 (Millipore)
Stanzer: P.O.Box 8 (Skatron, Lier)
Befüllautomat für
LSC: Modell BK-48 (Brandel)

4.2.2 Hochleistungsflüssigchromatographie (HPLC)

HPLC 1: Analytische HPLC von Hewlett-Packard (HPLC-DAD)

Pumpe: HP 1100 Binäre Pumpe mit analytischem Pumpenkopf
Injektor: Rheodyne 7125 mit 20 µl- bzw. 100 µl-Probenschleife
Detektor: HP 1100 Photodiodenarray-Detektor mit HP Chem-Station, Spek-
trenmodul und 2D ChemStation-Software
Spektralbereich: 200-600 nm
Trennsäule: Eurospher 100 C18, Knauer, 5 µm Partikelgröße (250×4 mm)
Fließmittel: H₂O (0,05 % TFA)/MeCN; Fluss 1 ml/min
Gradient: 1-99 % MeCN in 40 min

HPLC 2: Präparative HPLC von Knauer

Pumpen: 2 × Knauer HPLC 64 Pumpen mit präparativem Pumpenkopf
Gradientenformer: Knauer HPLC Software
Injektor: Rheodyne 7725 mit 100 µl-Probenschleife

Detektor: Knauer UV-Spektralphotometer Nr. 72387
Trennsäule: Eurospher 100 C18, Knauer, 5 µm Partikelgröße (250×16 mm)
Fließmittel: H₂O (0,05 % TFA)/MeCN; Fluss 7,5 ml/min
Gradient: 0-100 % MeCN in 30 min

HPLC 3: Analytische HPLC von Waters

Pumpen: 2 × Waters (Model 510) Pumpen mit analytischem Pumpenkopf
(Waters Associates, Milford, MA)

Gradientenformer: Automated Gradient Controller (Waters)

Injektor: Rheodyne 7125 mit 100 µl-Probenschleife

Trennsäule: Eurospher 100 C18, Knauer, 5 µm Partikelgröße (250×4 mm)

Fließmittel: H₂O (0,05 % HCOOH)/MeCN; Fluss 1 ml/min

Gradient: 1-99 % MeCN in 40 min

Detektoren: Absorbance Detector Spectroflow 757 (Kratos, Analytical Instruments, Weiterstadt);

Durchfluss-Radiodetektor Flow Scintillation Analyzer 500TR Series (Packard), Ultima-Flo™ AF LSC-Coctail (Packard Bioscience Company, Groningen, Niederlande)

4.2.3 Hochleistungsflüssigchromatographie-Tandemmassenspektrometrie (HPLC-MS/MS)

HPLC: Hochdruckgradientenanlage (Applied Biosystems)

Pumpe: Applied Biosystems 140B Pumpe für binäre Hochdruckgradienten

Autosampler: Triathlon mit µl-Pickup-Modus (Spark, Holland)

Injektor: Rheodyne 8125 mit 5 µl-Probenschleife

Trennsäule: Eurospher 100 C18, Knauer, 5 µm Partikelgröße (100×2 mm)

Fließmittel: H₂O (0,05 % TFA)/MeCN

Gradient: 20-38 % MeCN in 35 min

Tandemmassenspektrometer:

MS:	Finnigan TSQ 7000 Triple-Stage-Quadrupol-Tandemmassenspektrometer (Finnigan MAT, Bremen) mit Finnigan Electrospray-Ionisations-Interface (ESI)
ESI-Koppelkapillare:	deaktivierte Fused Silica Kapillare (50 µm i.d., J & W)
Ionenquelle:	Atmosphärendruck, Raumtemperatur
Quarzkapillare:	200 °C
ESI-	
Kapillarspannung:	4 kV
Sheathgas:	Stickstoff 5.0 (70 psi)
Hilfsgas:	Stickstoff 5.0; 10 Skalenteile
Messbereich:	m/z = 150 - 1000
Stossaktivierung:	Argon 5.0; Druck der Stosszelle: 2,1 mTorr
Datensystem:	ICIS 8.1 Data System (Finnigan MAT, Bremen) auf DECstation 5000/33 (Digital Equipment, Unterföhring)

4.2.4 Elektronenstoss-Ionisierung-Massenspektrometrie (EI-MS)

Gerät:	Finnigan MAT90
Ionenquelle:	EI-Modus; Elektronenenergie 70 eV; Emissionsstrom 0,5 mA; 220 °C
Beschleunigungs-	
spannung:	5 kV
Direkteinlass:	Temperatur 270 °C
Massenbereich:	m/z 35-900

4.2.5 Flüssigszintillationszähler (Liquid-Scintillation-Counting; LSC)

Gerät 1:	Rackbeta 1214 (LKB, Wallac, Freiburg)
Photomultiplier:	10 °C
Messkammer:	10 °C
Messzeiten:	10 min
LSC-Vials:	15 ml (Zinsser)

Automatische

Löschkorrektur: Standard-Kanalverhältnismethode mit ^{226}Ra als externem Standard

Auswertesoftware: „Ultrascan“ (LKB, Wallac, Freiburg)

Gerät 2: Beckman LS 5000 TD (Beckman Instruments, Fullerton, CA)

Messzeiten: 10 min

LSC-Vials: 3 ml (Beckman Bio-Vials SnapCap)

Automatische

Löschkorrektur: Standard-Kanalverhältnismethode mit ^{137}Cs als externem Standard

4.2.6 Kernresonanzspektroskopie (NMR)

Geräte: Bruker AC 250 (250 MHz bzw. 63 MHz)

Bruker Avance DMX-600 (600 MHz bzw. 150 MHz)

Standard: Tetramethylsilan (TMS) $\delta = 0,00$ ppm oder das jeweilige NMR-Lösungsmittel

Lösungsmittel: CDCl_3 , DMSO-d_6

Die 2D-Experimente wurden mit den Bruker Standard-Impulssequenzen durchgeführt. Zur Wiedergabe der Multiplizitäten in den ^1H -NMR-Spektren wurden folgende Abkürzungen verwendet: s = Singulett, d = Dublett, dd = Dublett von Dublett, dt = Dublett von Triplett, t = Triplett, m = Multipllett

4.2.7 Sonstige Geräte

Waagen: Mettler PL 300, Mettler P1200N, Sartorius BP 210 S

Ultraschallbad: Branson 1210

Rotavapor: Büchi B-173, Vakuum Controller B-720

pH-Meter: Labor-pH-Meter (Knick)

Zentrifugen: 1. Typ Universal 16R, Rotor 1616 & 1614 (Hettich)

2. Microspin 12S (Sorvall[®] Instruments DuPont, 12 000 RPM)

3. RC5C (Sorvall® Instruments)

Gefrier-

trocknungsanlage: Alpha II-12; 0,1 mbar (Christ)

UV-Lampe (für DC): Minuvius, KW 254 nm, LW 366 nm (Desaga)

4.3 Methoden

4.3.1 Radiorezeptorbindungsassay (RRA)

4.3.1.1 Reagenzien

50 mM Tris/HCl-Puffer: 6,057 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) werden in etwa 900 ml dest. Wasser gelöst, mit 1 M HCl auf pH 7,4 eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

³H-Flumazenil-Lösung: 20 µl der Originallösung von Ro 15-1788 (0,25 mCi in 0,25 ml EtOH) werden mit 1,110 ml Tris/HCl-Puffer verdünnt (≈ 250 nM). Diese Lösung wird bei -20 °C aufbewahrt und für den RRA 1:10 mit Puffer verdünnt (≈ 25 nM).

Gewebepräparation: Von humanem *post mortem*-Gehirngewebe aus den Regionen *Gyrus praecentralis*, *Cortex frontalis* und *Cortex frontoorbitalis* (2,8-3,0 g) wird zunächst die Hirnhaut nebst Blutgefäßen abpräpariert. Es wird dann für ca. 5 min im Teflon-Glas-Potter bei 1500/min auf Eis homogenisiert, in 60 ml Tris/HCl-Puffer (pH 7,4) suspendiert und auf sechs Aliquote (6×10 ml) verteilt. Die Suspensionen werden bei 30 000 g (Rotor Sorvall SM-24) bei 4 °C für 20 min zentrifugiert. Danach werden die Überstände verworfen, die Pellets insgesamt sechsmal in jeweils 10 ml Puffer suspendiert und unter den oben angegebenen Bedingungen zentrifugiert. Die Überstände werden jeweils verworfen und die Pellets nach dem sechsten Waschvorgang erneut in Tris/HCl-Puffer suspendiert. Die erhaltenen Suspensionen werden mit einer

Feinnadelspritze in 50 ml-Falconröhrchen überführt und bis zur Verwendung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

4.3.1.2 Durchführung

a) Untersuchung von Pflanzenextrakten auf Bindungsaktivität am BZD-R

Die auf Bindungsaktivität am BZD-R zu untersuchenden, lyophilisierten Pflanzenextrakte werden je nach Löslichkeit in einer Konzentration zwischen 10 und 20 mg/ml in Methanol gelöst. Aus dieser methanolischen Stammlösung wird in Zehnerschritten eine Verdünnungsreihe von 1:10 bis $1:10^6$ mit Tris/HCl-Puffer hergestellt. Von jeder Verdünnung werden jeweils 50 μl in drei Kavitäten einer Mikrotiterplatte (8x12, Greyer) pipettiert. Für die Bestimmung des Blindwertes werden jeweils 50 μl eines MeOH-Tris/HCl-Gemisches (1:10) in drei Vertiefungen gegeben. Als Positivkontrolle wird eine Verdünnungsreihe von Clonazepam (0,01-1000 nM) untersucht. Dazu werden jeweils 50 μl jeder Verdünnung in je drei Kavitäten der Mikrotiterplatte pipettiert. Als nächstes werden in jede Kavität 100 μl des Tris/HCl-Puffers (pH 7,4) gegeben. Die Inkubation wird durch Zugabe von jeweils 50 μl gut suspendierter Gewebepräparation gestartet. Man stellt die abgedeckte Titerplatte auf Eis und schüttelt eine Stunde. Danach werden in jede Kavität 10 μl ^3H -Flumazenil-Lösung pipettiert, die Platte wird erneut abgedeckt und eine Stunde auf Eis geschüttelt. Nach Ablauf der Inkubation werden die Reaktionslösungen unter Vakuum mit einem halbautomatischen Cell/Harvester auf einen Filter (1,0 μm Porengröße, 102x256 mm; FilterMAT; Skatron Instruments) abgesaugt und mit bidestilliertem Wasser nachgewaschen (3x3 s). Die so erhaltenen Spots werden ausgestanzt und in 3 ml-Vials überführt. In jedes Gefäß werden 3 ml Szintillationscocktail gegeben. Die Proben werden nach mindestens 3 h Inkubationszeit mittels Szintillationszählung in der dpm-Einheit vermessen (Gerät 2 in Abschnitt 4.2.5).

Um die in die Reaktion eingesetzte Radioaktivität und somit die genaue Konzentration des Tracers unter Berücksichtigung der spezifischen Aktivität zu bestimmen, werden jeweils 10 μl ^3H -Flumazenil-Lösung in drei 3 ml-Vials gegeben, mit Szintillationscocktail (3 ml) versetzt und ebenfalls vermessen.

Die Rezeptor-spezifische Bindung wird aus der Differenz der Gesamtbindung und der unspezifischen Bindung ermittelt. Die Gesamtbindung wird gemessen, wenn keine

Verdrängung von den Rezeptoren stattfindet. Dies entspricht dem Wert, der als Blindwert mit dem MeOH-Tris/HCl-Gemisch erhalten wird. Die unspezifische Bindung wird erhalten, wenn der gesamte eingesetzte Tracer von den Rezeptoren verdrängt wird. Dies ist bei Zusatz von 50 µl einer 1 µM Clonazepam-Verdünnung der Fall.

Die Bindungskurven werden durch nicht-lineare Regressionsanalyse mittels der Software Prism V2.01 (Graph Pad, San Diego, CA, USA) erstellt. Die IC_{50} -Werte sowie die Standardabweichungen (\pm S.E.M.) werden von der Software automatisch berechnet.

b) Nachweis von BZD-R-Liganden

Zur Untersuchung der bei der Fraktionierung (vgl. Abschnitt 4.3.4) anfallenden Proben auf BZD-R-Liganden werden vergleichbare Aliquote entnommen, vom Lösungsmittel befreit und in MeOH-Tris/HCl-Puffergemisch (1/10) gelöst. Von diesen Lösungen werden jeweils 50 µl in den RRA eingesetzt.

Bei wässrigen Probenlösungen (vgl. Abschnitt 4.3.2.1) mit einem Methanolgehalt von max. 10 % werden 50 µl-Aliquote direkt in den RRA eingesetzt.

Die weitere Durchführung des RRA erfolgt wie unter a) beschrieben. Bei der Auswertung werden die erhaltenen dpm-Werte relativ untereinander verglichen. Die aktivsten Proben, die die niedrigsten Messwerte ergeben, werden für eine weitere Aufreinigung ausgewählt.

4.3.2 Identifizierung natürlicher Benzodiazepine in sterilen, pflanzlichen Kalluskulturen und Regeneraten

4.3.2.1 Probenvorbereitung und Fraktionierung

Lyophilisierte, steril kultivierte Kalli- und Regeneratproben werden in Aliquoten von 5-10 g dreimal mit jeweils 100 ml MeOH_{dest} im Ultraschallbad extrahiert. Die methanolischen Extrakte werden vereinigt, vom Lösungsmittel befreit und getrocknet. Aliquote von 10 mg werden in MeOH gelöst und mit Tris/HCl-Puffer in Zehnerschritten (1:10 bis 1:10⁶) verdünnt. Die Verdünnungen werden mittels RRA auf BZD-R-Bindungsaktivität untersucht (vgl. Abschnitt 4.3.1).

Aktive Extrakte werden mittels präparativer HPLC (HPLC 2) fraktioniert. 1 ml-Fractionen werden gesammelt, lyophilisiert und nach erneuter Aufnahme in 100 µl Tris/HCl-Puffer im RRA getestet (vgl. Abschnitt 4.3.1).

4.3.2.2 Screening mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS (DAU- und SRM-Modus)

Aktive Fraktionen aus der Aufarbeitung der sterilen Kallus- und Regeneratextrakte werden mittels HPLC-ESI_{pos}-MS/MS untersucht. Die chromatographische Trennung erfolgt unter den in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Parametern. Das Screening wird mit Elektrospray-Ionisierung im positiven Modus durchgeführt. Eine Mischung von sechs Benzodiazepinen (Tab. 11) mit einer Konzentration von jeweils etwa 50 µg/ml in MeOH dient zur Etablierung der Methode mit zeitgeschalteten DAU- bzw. SRM-Experimenten.

Zur Detektion geringer Benzodiazepinspuren werden jeweils nur die in SRM-Experimenten ausgewählten Tochterionen detektiert. Der angegebene Scanbereich in den Tochterionenexperimenten (DAU-Experimenten) wird angewendet, wenn die Proben höhere Konzentrationen als 10 µg/ml aufweisen.

Tab. 11 HPLC-ESI_{pos}-MS/MS-Analytik von Benzodiazepinen; Parameter der DAU und SRM-Experimente (HPLC-Parameter siehe Abschnitt 4.2.3)

Referenz	Elternion [M+H] ⁺	Tochterion (Kollisionsenergie) im SRM-Modus	Scanbereich und Scanzeit im DAU-Modus	Zeitraum [min]
N-Desmethyldiazepam	271	208 (-30 eV)	20, 280, 1.0	0-18
Diazepam	285	257 (-30 eV)	20, 290, 0.3	18-26
Lorazepam	321	275 (-20 eV)	20, 330, 0.3	18-26
Oxazepam	287	241 (-25 eV)	20, 290, 0.3	18-26
Delorazepam	305	140 (-30 eV)	20, 310, 0.5	26-40
Temazepam	301	255 (-20 eV)	20, 310, 0.5	26-40

4.3.3 Screening pflanzlicher Drogen auf Liganden des BZD-R

Getrocknete Proben pflanzlicher Drogen werden nach methanolischer Extraktion im Ultraschallbad, Lyophilisierung der Extrakte und Erstellung einer Verdünnungsreihe im

RRA untersucht (Durchführung analog Abschnitt 4.3.2.1). Die Auflistung der untersuchten Pflanzen und der ermittelten Bindungsaktivitäten befindet sich in Abschnitt 3.2.

4.3.4 Isolierung und Charakterisierung von BZD-R-Liganden aus Salbei- blättern (*Salvia officinalis* L.)

Getrocknete, grob gemahlene Salveiblätter der Gattung *Salvia officinalis* (1 kg) werden in einem Mixer fein zerkleinert und portionsweise (4×250 g) mit MeOH (jeweils 500 ml) im Ultraschallbad für 2 h extrahiert. Nach Abtrennung des Extraktes werden die Blätter noch zweimal mit der gleichen Menge Lösungsmittel behandelt. Die vereinigten methanolischen Lösungen werden nach Konzentrierung am Rotationsverdampfer gefriergetrocknet und so 190 g Extrakt erhalten. Etwa 10 mg des Extraktes werden in 1 ml Methanol gelöst und sechsmal mit Tris/HCl-Puffer verdünnt. Die Verdünnungen dienen zur Bestimmung der Bindungsaktivität im RRA (vgl. Abschnitt 4.3.1). Der Extrakt (180 g) wird in etwa 800 ml Wasser suspendiert und mit n-Hexan (3×1 l), Diethylether (3×1 l) und Ethylacetat (3×1 l) ausgeschüttelt. Die einzelnen Phasen werden nach Konzentrierung und Trocknung im RRA untersucht. Aktive n-Hexan- und Diethylether-Fractionen werden jeweils mittels Flash-Chromatographie an Kieselgel grob vorfraktioniert. Pro 1 g Extrakt werden 10 g Kieselgel zur Trennung eingesetzt. Die Elution erfolgt diskontinuierlich mit n-Hexan/Ethylacetat-Gemisch steigender Polarität (0, 10, 20 ...70, 100 % Ethylacetat, jeweils 1 l). Aliquote der resultierenden Fractionen werden zur Ermittlung der Bindungsaktivität im RRA nach Abschnitt 4.3.1 untersucht. Bei der Flash-Chromatographie der Diethylether-Phase wird eine aktive Fraction erhalten, die mit 50 % Ethylacetat/n-Hexan eluiert. Eine weitere Trennung erfolgt mittels Säulenchromatographie an RP C18-Material (3×20 cm) mit Wasser/MeOH als Elutionsmittel (20-100 % MeOH, jeweils 250 ml). Es werden Fractionen mit einem Volumen von etwa 20 ml gesammelt. Jede zweite Fraction wird auf Vorhandensein von BZD-R-Liganden im RRA untersucht. Aktive Fractionen im 60 % MeOH-Eluat werden nach Konzentrierung mittels präparativer DC [(3) oder (4)] unter Verwendung von MeOH/CH₂Cl₂ (5/95) als Fließmittel aufgereinigt. Nach Vereinigung gleicher Banden erhält man die Substanzen 1 und 2 in reiner Form. Einige der 70 % MeOH-Fractionen weisen nach Kontrolle mittels HPLC-DAD bereits nur eine Komponente (Substanz 3) auf, die ohne weitere Aufreinigung nach Vereinigung und Trocknung zur Strukturaufklärung und Bestimmung der Bindungsaktivität eingesetzt werden kann. Die Fraktionierung der n-Hexan-Phase (34 g)

mittels Flash-Chromatographie führt zum aktiven 30 % Ethylacetat/n-Hexan-Eluat. Die weitere Aufreinigung an Kieselgel (5,5×45 cm) mit CHCl₃/n-Pentan-Gemisch (5-90 % CHCl₃, jeweils 1 l) als Elutionsmittel liefert aktive Komponenten in 30 % und 80 % CHCl₃-Fraktionen. Die 30 % CHCl₃-Fraktionen werden nach Konzentrierung (0,8 g) auf einer RP C18-Säule (3×20 cm) mit Wasser/MeOH als Elutionsmittel (20-100 % MeOH, jeweils 500 ml) appliziert. BZD-R-Aktivität wird im 60 %-Eluat, das die Substanz 4 in reiner Form enthält, vorgefunden. Die 80 % CHCl₃-Fraktionen werden nach Konzentrierung mittels präparativer DC [(3) oder (4)] unter Verwendung von MeOH/CH₂Cl₂ (5/95) als Fließmittel aufgereinigt. Man erhält eine aktive Bande (R_f = 0,68), die die Substanz 5 enthält. Die Charakterisierung der isolierten Komponenten erfolgt unter anderem mittels HPLC-ESI-MS/MS im positiven Modus. Die Substanzen werden ohne chromatographische Trennung direkt mittels Loop-Injektion (5 µl) im „full scan“- und im Tochterionenexperiment-Modus untersucht (Geräteparameter siehe Abschnitt 4.2.3). Als Fließmittel dient ein Wasser (0,05 % TFA)/MeCN-Gemisch (1:1) mit einem Fluss von 200 µl/min. Die angewendete Kollisionsenergie ist bei den aufgelisteten Fragmentierungen jeweils in der Klammer angegeben (s.u.). Die übrigen Parameter entsprechen den in Abschnitt 4.2.3 beschriebenen Konditionen.

Zur Aufnahme der EI/MS-Fragmentierungen werden die Substanzen in einer Konzentration von 1 mg/ml in Chloroform oder in MeOH am Lehrstuhl für Organische Chemie (Universität Würzburg) untersucht. Geräteparameter sind in Abschnitt 4.2.4 angegeben.

Apigenin (Substanz 1): t_R (HPLC 1) = 21,8 min; UV λ_{max}: 212, 268, 340 nm; DC (1) CH₂Cl₂/MeOH (95/5): R_f = 0,38; ES_{pos}MS/MS (-35 eV): 271 (65), 243 (40), 229 (10), 153 (100), 145 (35), 121 (10), 119 (35), 91 (20), 69 (20); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz) und ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 63 MHz): siehe Tab. 12.

Hispidulin (Substanz 2): t_R (HPLC 1) = 22,1 min; UV λ_{max}: 215, 274, 334 nm; DC (1) CH₂Cl₂/MeOH (95/5): R_f = 0,42; ES_{pos}MS/MS (-35 eV): 301 (5), 286 (100), 258 (10), 168 (65), 151 (5), 140 (10), 121, (10); EFMS: 300 (100), 285 (50), 282 (40), 271 (10), 257 (45), 167 (10), 153 (10), 139 (12), 119 (15); ¹H-NMR (DMSO-d₆, 250 MHz) und ¹³C-NMR (DMSO-d₆, 63 MHz): siehe Tab. 12.

Cirsimaritin (Substanz 3): t_R (HPLC 1) = 24,6 min; UV λ_{max}: 214, 274, 334 nm; DC (1) CH₂Cl₂/MeOH (95/5): R_f = 0,50; ES_{pos}MS/MS (-40 eV): 315 (8), 299 (10), 282 (30), 271

(20), 254 (100), 226 (20), 136, (65), 121 (15), 119 (25), 108 (40); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 250 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 63 MHz): siehe Tab. 12.

7-Methoxyrosmanol (Substanz 4): t_R (HPLC 1) = 27,8 min; UV λ_{max} : 208, 228sh, 290 nm; DC (1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5): R_f = 0,77; $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{MS/MS}$ (-30 eV): 361 (15), 329 (10), 315 (30), 301 (20), 283 (15), 273 (15), 259 (25), 255 (25), 245 (100), 231 (70), 109 (35); EI-MS : 360 (64), 330 (15), 314 (54), 301 (10), 284 (93), 269 (70), 259 (10), 245 (46), 231 (17), 215 (100); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 250 MHz) und $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 63 MHz): siehe Tab. 13.

Galdosol (Substanz 5): t_R (HPLC 1) = 27,4 min; UV λ_{max} : 218, 241, 302 nm; DC (1) $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (95/5): R_f = 0,68; $\text{ESI}_{\text{pos}}\text{MS/MS}$ (-30 eV): 345 (10), 327 (10), 299 (50), 281 (30), 275 (25), 257 (55), 231 (100), 157 (25), 85 (30); EI-MS : 344 (67), 314 (10), 301 (5), 285 (70), 257 (20), 244 (10), 230 (100), 215 (35), 91 (30); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 600 MHz), $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 150 MHz) und HMBC (CDCl_3 , 600 MHz): siehe Tab. 13.

Die ermittelten resonanzspektroskopischen Daten der isolierten Substanzen sind in den Tabellen 12 und 13 zusammengefasst.

Tab. 12 Charakterisierung von Apigenin (1), Hispidulin (2) und Cirsimaritin (3) mittels ^1H - und $^{13}\text{C-NMR}$

Position	1		2		3	
	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$
2	-	164.2	-	164.2	-	164.2
3	6.85 (1H,s)	103.1	6.86 (1H, s)	102.8	6.99 (1H, s)	103.0
4	-	181.9	-	182.5	-	182.5
5	-	161.3	-	153.2	-	152.8
6	6.28 (1H, d, 2.1)	121.4	-	131.9	-	132.1
7	-	164.2	-	157.5	-	158.8
8	6.57 (1H, d, 2.1)	94.2	6.72 (1H, s)	94.8	6.91 (1H, s)	91.8
9	-	157.5	-	152.9	-	152.3
10	-	103.9	-	104.4	-	105.2
1'	-	121.4	-	121.7	-	121.3
2', 6'	8.00 (2H, d, 8.9)	128.7	8.00 (2H, d, 8.9)	128.9	8.03 (2H, d, 8.9)	128.7
3', 5'	7.01 (2H, d, 8.9)	116.1	7.02 (2H, d, 8.9)	116.4	7.01 (2H, d, 8.9)	116.2
4'	-	161.7	-	161.6	-	161.5
5-OH	13.04 (1H, s)	-	13.15 (1H, s)	-	13.00 (1H, s)	-
6-MeO	-	-	3.81 (3H, s)	60.4	3.81 (3H, s)	60.2
7-MeO	-	-	-	-	3.99 (3H, s)	56.6

* δ in ppm (Kopplungsart und Kopplungskonstante J in Hz)

Tab. 13 Charakterisierung von 7-Methoxyrosmanol (4) und Galdosol (5) mittels ^1H - und ^{13}C -NMR. Für Galdosol werden zusätzlich HMBC-Daten angegeben

Position	4^a		5^b		
	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	$^1\text{H}^*$	$^{13}\text{C}^*$	HMBC
1ax	1.98 (1H, m)	27.1	2.05 (1H, m)	27.4	C-2, C-10, C-20
1eq	3.18 (1H, brd, 12.5)	-	3.23 (1H, brd, 14.6)	-	-
2ax	1.55 (1H, m)	19.0	1.57 (1H, m)	18.8	-
2eq	1.63 (1H, m)	-	1.65 (1H, m)	-	-
3ax	1.25 (1H, m)	38.0	1.25 (1H, m)	37.7	-
3eq	1.45 (1H, brd, 14.6)	-	1.50 (1H, brd, 12.7)	-	-
4	-	31.3	-	32.4	-
5	2.24 (1H, s)	50.8	2.45 (1H, s)	60.3	C-4, C-6, C-7, C-10, C-18, C-19, C-20
6eq	4.71 (1H, d, 3.4)	74.7	4.73 (1H, s)	81.1	C-4, C-7, C-8, C-10, C-20
7eq	4.25 (1H, d, 3.1)	77.4	-	189.5	-
8	-	126.6	-	122.3	-
9	-	123.8	-	142.9	-
10	-	47.1	-	49.5	-
11	-	142.2	-	151.4	-
12	-	142.0	-	148.0	-
13	-	135.0	-	134.5	-
14	6.76 (1H, s)	120.4	7.67 (1H, s)	120.6	C-15
15	3.05 (1H, quint, 6.7)	27.1	3.11 (1H, quint, 6.8)	27.2	C-12, C-13, C-14, C-16, C-17
16	1.20 (3H, d, 6.4)	22.2	1.27 (3H, d, 6.8)	22.2	C-13, C-15
17	1.20 (3H, d, 6.4)	22.0	1.25 (3H, d, 6.8)	22.0	C-13, C-15
18	1.00 (3H, s)	31.3	1.04 (3H, s)	31.6	C-3, C-4, C-5, C-19
19	0.93 (3H, s)	22.5	0.97 (3H, s)	22.0	C-3, C-4, C-5, C-18
20	-	179.2	-	177.1	-
7-OMe	3.66 (3H, s)	58.2	-	-	-

* δ in ppm (Kopplungsart und Kopplungskonstante J in Hz); ^a 250 und 60 MHz; ^b 600 und 150 MHz

4.3.5 Mehrstufensynthese von Hispidulin

4.3.5.1 Synthese von Baustein 1

4.3.5.1.1 2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1)

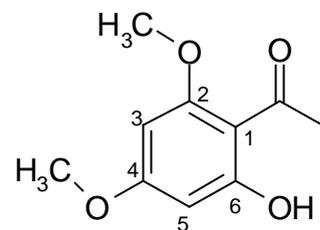
25 g (0,134 mol) 2,4,6-Trihydroxyacetophenon-Hydrat (Aldrich; T6,460-2) werden in 300 ml Aceton gelöst und mit 30 g Kaliumcarbonat versetzt. Das Gemisch wird im Ölbad bei 65-70 °C erhitzt und portionsweise Dimethylsulfat (je 5,1 ml) in 4 h-Intervallen zugegeben (insgesamt 15,3 ml; 0,16 mol). Nach abgeschlossener Reaktion (Reaktionskontrolle mittels HPLC 1) wird das Kaliumcarbonat abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen (Srivastava und Srivastava, 1987).

Ausbeute: 92 %

$t_R = 25,1$ min

λ_{max} : 211, 225sh, 288, 322sh nm

DC (1) MeOH/CH₂Cl₂ (5/95): $R_f = 0,32$



¹H-NMR (250 Hz, DMSO-d₆): 2,61 (3H, CO-CH₃, s), 3,88 (3H, 2-OCH₃, s), 3,93 (3H, 4-OCH₃, s), 6,15 (1H, H-5, dd, 2,1 und 0,9 Hz), 6,18 (1H, H-3, d, 2,1 Hz), 13,88 (1H, 6-OH, s)

4.3.5.1.2 2,4-Dihydroxy-6-methoxyacetophenon (2)

Aliquote von jeweils 1,5 g (7,7 mmol) 2,4-Dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (1) werden 1 h mit jeweils 1,5 g wasserfreiem Aluminiumchlorid (11,3 mmol) unter Rückfluss in je 20 ml Chlorbenzol erhitzt. Das Lösungsmittel wird im Vakuum abdestilliert und der Rückstand mit 40 ml eiskaltem H₂O/HCl-Gemisch (1:1) versetzt. Der weiße Niederschlag wird abfiltriert und in Ethylacetat gelöst. Liegt das gewünschte Produkt nach der HPLC-Kontrolle (HPLC 1) als Hauptkomponente vor, kann es durch Ausschütteln in reiner Form erhalten werden. Dazu wird das Produkt aus der EtOAc-Lösung mit wässriger 10 %-iger NaOH-Lösung ausgeschüttelt (3x50 ml) und nach dem Ansäuern wieder in die organische EtOAc-Phase überführt. Die EtOAc-Phase wird am Rotationsverdampfer so weit eingengt, bis die ersten Kristalle ausfallen. Nach Kühlung über Nacht wird das auskristallisierte Produkt abfiltriert, getrocknet und mittels

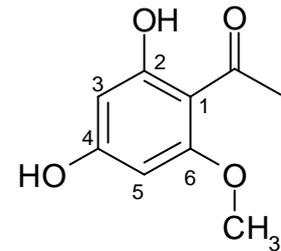
HPLC/DAD (HPLC 1) auf Reinheit untersucht. Liegt das gewünschte monomethylierte Produkt in dem oben erhaltenen weißen Niederschlag nicht als Hauptkomponente vor, muss es chromatographisch an Kieselgel aufgereinigt werden (Jain *et al.*, 1985). Die Elution erfolgt zuerst mit Benzol/Petrolether (1:1, Fraktion 1), dann mit Benzol (Fraktion 2) und anschließend mit EtOAc/Benzol (5:95, Fraktion 3). Das Produkt kristallisiert aus der 2. Fraktion als weißer Feststoff aus.

Ausbeute: 45-60 %

$t_R = 20,0$ min

λ_{max} : 209, 224sh, 288, 330sh nm

DC (1) MeOH/CH₂Cl₂ (5/95): $R_f = 0,52$



¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 2,58 (3H, CO-CH₃, s), 3,88 (3H, -OCH₃, s), 5,94 (1H, H-3, d, 2,1 Hz), 6,04 (1H, H-5, d, 2,1 Hz), 13,88 (1H, 2-OH, s)

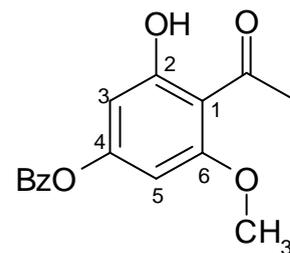
4.3.5.1.3 4-Benzyloxy-2-hydroxy-6-methoxyacetophenon (3)

1 g (5,5 mmol) Zwischenverbindung (2) wird in 60 ml trockenem Aceton gelöst und mit 6 g Kaliumcarbonat versetzt. Anschließend werden 0,85 ml (7,1 mmol) Benzylbromid in die Reaktionslösung zupipettiert und das Gemisch über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abgetrennt und das Produkt direkt in die nächste Synthesestufe eingesetzt (Hatayama *et al.*, 1985).

Ausbeute: 99 %

$t_R = 30,8$ min

λ_{max} : 210, 226 sh, 287, 330 sh nm



¹H-NMR (250 MHz, DMSO-d₆): 2,62 (3H, CO-CH₃, s), 3,93 (3H, -OCH₃, s), 5,24 (2H, -CH₂-, s), 6,25 (1H, H-3, d, 2,5 Hz), 6,28 (1H, H-5, d, 2,4 Hz), 7,49 (5H, -Ph, m)

4.3.5.1.4 4-Benzyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (4) (Elb's Persulfat-Oxidation)

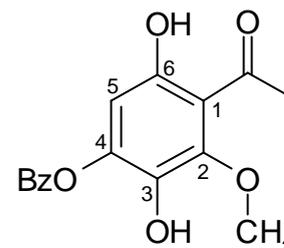
Die phenolische Komponente (3) (1 g; 3,7 mmol) wird zusammen mit NaOH-Plätzchen (0,74 g; 18,5 mmol) in 7,4 ml Wasser gelöst. Durch Zugabe von 1 ml Pyridin wird die

Löslichkeit des Phenols verbessert. Dann wird eine wässrige $K_2S_2O_3$ -Lösung (1,1 g in 22 ml H_2O) innerhalb von 4 h zugetropft und die Temperatur bei etwa 15 °C gehalten. Nach 24 h Rühren bei RT wird die braun gefärbte Reaktionslösung mit 1 M HCl auf pH 5 angesäuert und mit Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Lösung wird durch Zugabe von 4 ml HCl_{conc} stark angesäuert und mit 30 ml Diethylether 1 h unter Rückfluss erhitzt. Die Etherphase wird abgetrennt, mit Natriumsulfat getrocknet und einrotiert. Das Produkt erscheint als leicht braune, sirupartige Substanz (Baker *et al.*, 1939).

Ausbeute: 29 %

$t_R = 26,1$ min

λ_{max} : 240, 282, 352 nm



1H -NMR (250 Hz, $DMSO-d_6$): 2,66 (3H, $CO-CH_3$, s), 3,91 (3H, $2-OCH_3$, s), 5,28 (2H, $-CH_2-$, s), 6,46 (1H, H_{ar} , s), 7,48 (5H, Ph, m)

4.3.5.1.5 4-Benzyloxy-2,3-dimethoxy-6-hydroxyacetophenon (5)

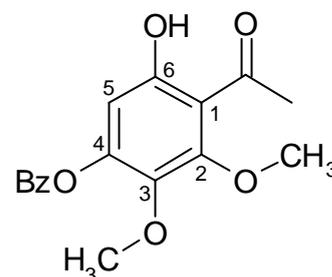
Das 4-Benzyloxy-3,6-dihydroxy-2-methoxyacetophenon (1 g; 3,5 mmol) wird mit 1,5 Äquivalenten Dimethylsulfat (0,5 ml; 5,2 mmol) und 5 g Kaliumcarbonat in 50 ml Aceton über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Das Lösungsmittel wird nach dem Abfiltrieren des Kaliumcarbonats abdestilliert und das Rohprodukt auf einer Kieselgel-Säule (2,8×42 cm) mit Chloroform als Fließmittel aufgereinigt. Das Produkt eluiert bei einem Fließmittelvolumen von etwa 500 bis 700 ml (Gupta *et al.*, 1974).

Ausbeute: 59 %

$t_R = 30,3$ min

λ_{max} : 208, 234sh, 282, 334 nm

DC (2) $CHCl_3$: $R_f = 0,54$



1H -NMR (250 Hz, $CDCl_3$): 2,66 (3H, $CO-CH_3$, s), 3,81 (3H, $2-OCH_3$, s), 4,01 (3H, $3-OCH_3$, s), 5,14 (2H, $-CH_2-$, s), 6,30 (1H, H_{ar} , s), 7,42 (5H, Ph, m), 13,40 (1H, $6-OH$, s)

4.3.5.2 Synthese von Baustein 2

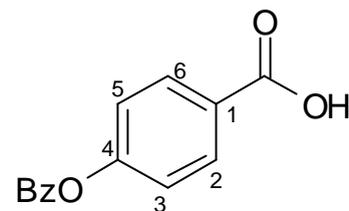
4.3.5.2.1 4-Benzyloxybenzoesäure (6)

Zu einer Lösung von 4,14 g 4-Hydroxybenzoesäure (30 mmol) in Wasser/Ethanol-Gemisch (10 ml/30 ml) wird eine Lösung von 3,36 g KOH (60 mmol) in 15 ml Wasser zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wird unter Rückfluss so lange gerührt, bis der Niederschlag verschwindet. Sollte an dieser Stelle kein Niederschlag entstehen, werden direkt nach dem Mischen 3,9 ml Benzylbromid (33 mmol) zugegeben und die Mischung über Nacht unter Rückfluss erhitzt. Zu dem gebildeten Niederschlag wird eine KOH-Lösung (1,85 g KOH in 15 ml Wasser) zugegeben und für 1 h unter Rückfluss erhitzt. Der gebildete Niederschlag wird bei Raumtemperatur abfiltriert und in Essigsäure umkristallisiert (Bracon *et al.*, 1999).

Ausbeute: 54%

$t_R = 25,2$ min

$\lambda_{max} = 256$ nm



$^1\text{H-NMR}$ (250 Hz, DMSO- d_6): 5,25 (2H, $-\text{CH}_2-$, s), 7,16 (2H, H-3 und H-5, td, 8,85 und 2,75 Hz), 7,48 (5H, Ph, m), 7,97 (2H, H-2 und H-6, td, 8,85 und 2,75 Hz)

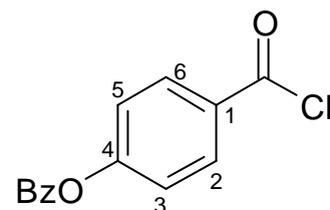
4.3.5.2.2 4-Benzyloxybenzoesäurechlorid (7)

1 g 4-Benzyloxybenzoesäure wird in 7 ml CH_2Cl_2 suspendiert. Dann werden vorsichtig 1,2 ml Oxalylchlorid zugegeben und unter Feuchtigkeitsausschluss (Trockenrohr) 16 h bei Raumtemperatur gerührt. Anschließend wird die klare Reaktionslösung vom Lösungsmittel und vom überschüssigen Oxalylchlorid durch Abdestillieren befreit und getrocknet (Cherpeck, 1998).

Ausbeute: 98-100 %

$t_R = 29,9$ min

$\lambda_{max} = 256$ nm



$^1\text{H-NMR}$ (250 Hz, DMSO- d_6): 5,25 (2H, $-\text{CH}_2-$, s), 7,17 (2H, H-3 und H-5, td, 8,85 und 2,75 Hz), 7,47 (5H, Ph, m), 7,97 (2H, H-2 und H-6, td, 8,85 und 2,75 Hz)

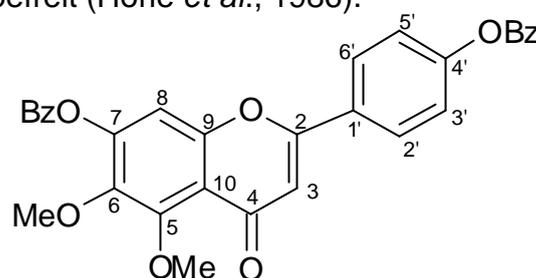
4.3.5.3 Kondensations-, Umlagerungs- und Zyklisierungsreaktion zum Flavon

Pro 1 g Acetophenon (3,3 mmol; Baustein 1) werden 0,816 g Säurechlorid (3,3 mmol; Baustein 2) in 10 ml trockenem Pyridin gelöst. Die Reaktionslösung wird etwa 7 h bei Raumtemperatur gerührt und nach beendeter Reaktion (HPLC 1-Kontrolle) auf 80 ml HCl/Eis-Gemisch (3 %) gegeben. Der Niederschlag wird mit EtOAc ausgeschüttelt. Anschließend wird die organische Phase mit Wasser und gesättigter wässriger Na_2CO_3 -Lösung gewaschen und über Natriumsulfat getrocknet. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird der so aufgereinigte Ester erneut in 3,3 ml Pyridin gelöst und nach Zugabe von 1,16 g frisch pulverisiertem Kaliumhydroxid 4 h bei 60 °C gerührt. Das Reaktionsgemisch wird wie oben beschrieben auf HCl/Eis-Gemisch gegossen, mit EtOAc ausgeschüttelt und nacheinander mit 1 M HCl und mit wässriger Na_2CO_3 -Lösung gewaschen. Die EtOAc-Phase wird am Rotationsverdampfer abgezogen und das gebildete Diketon in 30 ml HAc gelöst. Nach langsamer Zugabe von 0,75 ml $\text{H}_2\text{SO}_{4\text{conc}}$ erhitzt man 90 min bei 60 °C und gießt die Reaktionslösung auf 200 g Eis. Das ausgefallene Flavon wird mit EtOAc ausgeschüttelt, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und vom Lösungsmittel befreit (Horie *et al.*, 1986).

Ausbeute: 32 %

$t_R = 36,9$ min

λ_{max} : 215, 266, 318 nm



$^1\text{H-NMR}$ (250 Hz, CDCl_3): 3,97 (3H, $-\text{OCH}_3$, s), 4,03 (3H, $-\text{OCH}_3$, s), 5,18 (2H, $-\text{CH}_2-$, s), 5,33 (2H, $-\text{CH}_2-$, s), 7,07 (1H, H-8, s), 7,11 (1H, H-3, s), 7,11 (2H, H-3' und H-5', dd, 9,2 und 2,4 Hz), 7,42 (10H, 2 x -Ph, m), 8,04 (2H, H-2' und H-6', d, 8,2 Hz)

4.3.5.4 Selektive Demethylierung an C-5 und Entfernung von Schutzgruppen

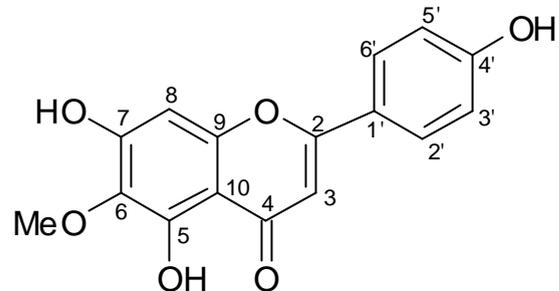
Zu einer auf -60 °C abgekühlten Lösung von 1 g 7,4'-Dibenzoyloxy-5,6-dimethoxyflavon (2,02 mmol) in 30 ml wasserfreiem CH_2Cl_2 werden 7,7 ml einer 1 M BCl_3 -Lösung in CH_2Cl_2 zugetropft. Die resultierende Mischung wird 90 min bei -60 °C gerührt. Danach wird die Reaktion durch Zugabe von 15 ml gesättigter wässriger NaHCO_3 -Lösung gestoppt und mit Diethylether extrahiert (3x50 ml). Die vereinigten Etherphasen werden mit gesättigter NaCl -Lösung gewaschen und über Magnesiumsulfat getrocknet (Iinuma

et al., 1986). Nach Konzentrierung erfolgt die Aufreinigung des Produktes mittels Säulenchromatographie (2,2x42 cm) an Kieselgel mit einem MeOH/CHCl₃-Gemisch (3/97) als Fließmittel. Das Produkt eluiert bei einem Fließmittelvolumen von etwa 250-370 ml.

Ausbeute: 89 %

$t_R = 22,0$ min

λ_{max} : 215, 274, 334 nm



¹H-NMR und ¹³C-NMR-Spektren des Produktes entsprechen den Daten des isolierten Hispidulins, die in Tab. 12 zusammengefasst sind (vgl. Abschnitt 4.3.4).

4.3.6 Untersuchungen der Bindungsprofile von Hispidulin und Apigenin an rekombinanten GABA_A-Rezeptoren

4.3.6.1 Präparation der Oozyten aus *Xenopus laevis*

Die Präparation der Oozyten erfolgt gemäß Sigel *et al.* (Sigel, 1987). Weibliche Krallenfrösche der Spezies *Xenopus laevis* werden durch Einlegen in eine 0,17 %-ige Tricain-Lösung anästhesiert. Dann werden Teile des Ovars chirurgisch entnommen. Nach der Präparation der Oozyten werden diese 5 bis 10 min bei RT in einer Kollagenase Typ II-Lösung (1 mg/ml) inkubiert und bis zur Injektion in modifizierter Barths-Lösung bei 4 °C aufbewahrt.

4.3.6.2 Injektion der cRNA in *Xenopus laevis*-Oozyten

Von der cRNA-Lösung (Sigel und Baur, 2000) werden 50 nl (20-25 ng in 5 mM K-HEPES, pH 6,8) in die Oozyte injiziert. Die cRNA-Lösungen enthalten jeweils Transkripte, die für die verschiedenen Untereinheiten des Rezeptors in einer Konzentration von 10 nM für α_x ($x = 1-3, 5, 6$), 10 nM für β_2 und 50 nM für γ_2 kodieren. Nach der Injektion werden die Oozyten 2-4 Tage bei 16 °C in Barths Lösung gehalten,

so dass Rezeptoren der Kombinationen $\alpha_1\beta_2\gamma_2$, $\alpha_2\beta_2\gamma_2$, $\alpha_3\beta_2\gamma_2$, $\alpha_5\beta_2\gamma_2$ und $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ auf der Oozyten-Zellwand präsentiert werden (Sigel, 1987; Sigel *et al.*, 1990).

4.3.6.3 2-Elektroden-Spannungsklemme („voltage clamp“-Methode)

Mit Hilfe der 2-Elektroden-Spannungsklemme kann der Stromfluss durch Ionenkanäle in der Oozytenmembran in Abhängigkeit vom Membranpotential gemessen werden. Die elektrophysiologische Messung erfolgt bei einem festen Potential von -80 mV. Die Oozyte befindet sich in einem Medium, das 90 mM NaCl, 1 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂ und 5 mM NaOH-HEPES (pH 7,4) enthält. Die allosterische Modifizierung am BZD-R wird bei einer GABA-Konzentration untersucht, die 3-5 % der maximalen GABA-Wirkung (ca. 2 μ M) hervorruft. Sie wird als relative Stromamplitude ausgedrückt und nach Teilung durch die Kontrollamplitude und Multiplikation mit 100 % als modulierte Stromamplitude berechnet. GABA wird für jeweils 20 s zugesetzt und dann während einer Periode von 4 min herausgewaschen, um eine völlige Desensibilisierung zu erreichen. Eine positive und negative Modulation der GABA-induzierten Ströme wird als prozentualer Anteil der entsprechenden Kontrollamplitude, die ohne Modulator gemessen wird, ausgedrückt (Sigel *et al.*, 1990; Sigel *et al.*, 1998). Die Modulation durch Hispidulin und Apigenin wird jeweils bei einer Konzentration von 0,01 bis 100 μ M des betreffenden BZD-R-Liganden untersucht.

4.3.7 Untersuchung der Wirkung von Hispidulin im Epilepsie-Modell mit der Mongolischen Wüstenrennmaus (*Meriones unguiculatus*)

4.3.7.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Als Versuchstiere dienen 24 etwa 6 Monate alte und fünf etwa 3 Jahre alte Mongolische Wüstenrennmäuse (Mongolian Gerbil, *Meriones unguiculatus*). Die männlichen, klinisch gesunden Tiere besitzen ein Körpergewicht zwischen 70 und 102 g. Die jüngeren Mäuse stammen aus dem Neurochemischen Labor der Universität Magdeburg. Die älteren Tiere sind am Institut für Medizinische Chemie der Veterinärmedizinischen Universität in Wien gezüchtet worden.

Die Tiere werden vor und während der Untersuchungen einzeln in Plastikkäfigen mit Streu aus Sägespänen gehalten. Das Trinkwasser wird alle zwei Tage gewechselt. Die Raumtemperatur wird auf 20 °C und die Luftfeuchtigkeit auf 55 % konditioniert. Ansonsten achtet man darauf, dass sich alle Tiere zwei Wochen vor der Untersuchung in stressfreier Umgebung befinden. Auf ein Umsetzen in neue Käfige wird in diesem Zeitraum verzichtet.

4.3.7.2 Anfallskontrolle

Alle Tiere werden vor der Verfütterung von Hispidulin auf ihre Anfallssensibilität getestet. Die Anfälle werden provoziert, indem die Tiere aus dem Käfig herausgenommen, auf eine graue Tischplatte gesetzt, fünfmal entgegen der Fellwuchsrichtung auf dem Rücken gestreichelt und in eine Wanne gesetzt werden. Direkt vor dem Eintreten des Anfalls verhält sich das Tier ruhig und duckt sich. Ein rhythmisches Zucken der Ohren geht in den meisten Fällen in einen tonisch-klonischen Krampf der Kopf-, Hals- und schließlich der gesamten Stamm- und Extremitätenmuskulatur über. In diesem Stadium kippt das Tier oft auch zur Seite oder auf den Rücken. Nach ca. 20-30 s endet der Krampf, das Tier kommt wieder auf die Beine und verharrt für etwa eine Minute in dieser Kauerstellung.

Die auf diese Weise induzierten Anfälle werden wie folgt klassifiziert und protokolliert:

- **Kein Anfall:** normales exploratives Verhalten und koordinierte Bewegungen.
- **Leichter Anfall:** Vibrissen und Pinnae zucken; das Tier erstarrt mitten in der Bewegung; Kopf und Körper werden an den Boden gepresst und es treten kurz dauernde myoklonische Zuckungen des Körpers auf.
- **Schwerer Anfall:** Beginn wie bei leichtem Anfall; danach Entwicklung eines tonisch-klonischen Anfalls, bei dem das Tier schnelle, vertikale Sprünge macht oder sich der ganze Körper im Krampf einrollt und das Tier seitwärts oder auf den Rücken fällt bzw. umhergeschleudert wird.

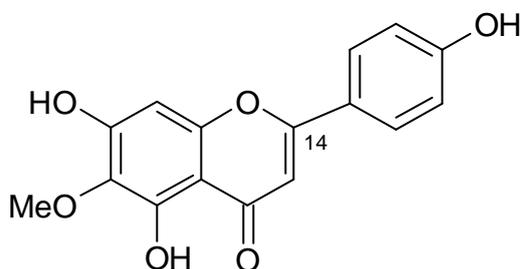
Beim Ausbleiben des Anfalls wird das Tier fünf Minuten später noch einmal aus dem Käfig herausgenommen und durch erneutes, fünfmaliges Streicheln gestresst. Tritt in diesem Fall wieder kein Anfall auf, wird der Versuch als negativ gewertet. Die Testung erfolgt morgens zwischen 8 und 10 Uhr. Die Anfallskontrolle wird vor und nach der siebentägigen Verfütterung des präparierten Futters durchgeführt.

4.3.7.3 Herstellung des Futters und Verfütterung

105 mg Hispidulin werden in 7 ml Ethanol gelöst und mit 230 ml Wasser verdünnt. Die Lösung wird in einer Teigmaschine vorgelegt und unter Rühren portionsweise mit insgesamt 264 g pulverisiertem Trockenfutter (Altromin®-Pellets) gemischt. Der pastöse Teig (486 g, max. 1,4 % EtOH) wird anschließend durch einen Fleischwolf zu kleinen Würstchen verarbeitet und in 5 g-Portionen eingefroren (1,08 mg Hispidulin pro 5 g Tagesration). Mit der gleichen Methode wird ein Teig mit Diazepam (20 mg Diazepam in 486 g Fertigteig) versetzt (0,21 mg Diazepam pro 5 g-Tagesration). Für die Negativkontrollgruppe wird ein Teig nur aus Ethanol/Wasser-Gemisch und Futterpulver hergestellt. Alle Portionen werden abends vor dem Verfütterungstag im Kühlschrank (7 °C) aufgetaut und am Morgen des nächsten Tages verabreicht. Alle Tiere bekommen sieben Tage 5 g Futter pro Tag. Bei der Gruppe, die Hispidulin-haltige Diät bekommt, entspricht dies 1,08 mg Hispidulin pro 5 g Futter und Tier (ca. 10 mg/kg KG) an einem Tag. Jedes Tier aus der Gruppe für die Positivkontrolle bekommt täglich 0,2 mg Diazepam. Die 5 g-Tagesportionen werden von den Tieren vollständig aufgefressen.

4.3.8 Synthese von 2-¹⁴C-Hispidulin

Die Durchführung der Radioaktivsynthese von 2-¹⁴C-Hispidulin erfolgt in Anlehnung an die in Abschnitt 4.3.5 beschriebene Methode, jedoch in einem um etwa den Faktor 10 kleineren Maßstab.



Die radioaktive Markierung stammt dabei aus der 4-Hydroxy-¹⁴COOH-benzoesäure (American Radiolabeled Chemicals Inc., 250 µCi, spezif. Aktivität 55 mCi/mmol), die mit 45 mg nicht markierter 4-Hydroxybenzoesäure (0,326 mmol) in 450 µl H₂O/EtOH (1:3) versetzt wird. Das Gemisch wird nach Zugabe von 170 µl wässriger KOH-Lösung und 45 µl Benzylbromid 6 h unter Rückfluss erhitzt (vgl. Abschnitt 4.3.5.2.1). Nach dem

Versetzen mit weiteren 500 µl der KOH-Lösung erhitzt man weitere 2 h und zentrifugiert die erkaltete Suspension bei 15 000 U/min (Zentrifuge siehe Abschnitt 4.2.7, Nr.2). Der Überstand wird verworfen, der Niederschlag in 1 ml HAc umkristallisiert und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 27 mg (0,118 mmol, 36 %)

Radiochem. Ausbeute: 78 µCi (31 %)

Die erhaltene 4-Benzyloxy-¹⁴COOH-benzoesäure wird anschließend in 1 ml CH₂Cl₂ suspendiert und 8 h bei Raumtemperatur mit 28 µl Oxalylchlorid gerührt. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wird das Produkt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 29 mg (0,118 mmol, 100 %)

Radiochem. Ausbeute: 76 µCi (97 %)

Das resultierende Säurechlorid wird mit 36 mg Acetophenon-Baustein (0,12 mmol) in 0,7 ml trockenem Pyridin gelöst und 3 h bei RT gerührt. Danach wird das Reaktionsgemisch auf 11 ml eiskalte 3 %-ige HCl gegeben und quantitativ unter Nachspülen mit insgesamt 25 ml EtOAc in einen 25 ml Schütteltrichter überführt. Die EtOAc-Phase wird zweimal mit wässriger, gesättigter Na₂CO₃-Lösung und einmal mit Wasser gewaschen. Nach dem Abdestillieren des organischen Lösungsmittels wird der erhaltene Ester eingefroren und gefriergetrocknet.

Ausbeute: 49 mg (0,096 mmol, 81 %)

Radiochem. Ausbeute: 55 µCi (72 %)

Der getrocknete Ester wird erneut in 500 µl trockenem Pyridin gelöst und mit 0,175 g frisch pulverisiertem KOH versetzt. Danach rührt man das Gemisch 4 h bei 60 °C, stoppt die Reaktion durch Zugabe von 11 ml eiskalter 3 %-iger HCl und arbeitet wie in der vorherigen Stufe auf.

Ausbeute: 27 mg (0,053 mmol, 55 %)

Radiochem. Ausbeute: 26 µCi (47 %)

Für die Ringschlussreaktion wird die 1,3-Diketoverbindung mit 1,7 ml HAc und 42 µl H₂SO_{4conc} 90 min bei 60 °C gerührt, auf 10 g Eis gegeben und mit EtOAc (10 ml) ausgeschüttelt. Nach dem Abziehen des Lösungsmittels wird das Produkt gefriergetrocknet.

Ausbeute: 16 mg (0,032 mmol, 60 %)

Radiochem. Ausbeute: 14 µCi (54 %)

Die Abspaltung der Benzylgruppen und der C-5-Methylgruppe erfolgt bei etwa -70 °C in 1 ml CH₂Cl₂ nach Zugabe von 0,25 ml 1 M BCl₃-Lösung (in CH₂Cl₂). Nach 90 min wird

die Reaktion mit 1 ml gesättigter NaHCO_3 -Lösung gestoppt und das Rohprodukt durch dreimaliges Ausschütteln mit Diethylether (je 5 ml) erhalten.

Ausbeute: 7 mg (0,023 mmol, 72 %)

Radiochem. Ausbeute: 10 μCi (71 %)

Das Hispidulin wird mittels Kieselgel-Säulenchromatographie (1,9×18 cm) aufgereinigt. Zur Elution wird $\text{MeOH}/\text{CHCl}_3$ (3/97) als Fließmittel verwendet. Nach LSC-Kontrolle (Gerät 1 in Abschnitt 4.2.5) findet man die Hauptaktivität in den Fraktionen 3 bis 5 (56-70 ml Elutionsvolumen). Diese Fraktionen (ca. 3 mg) werden vereinigt und nach der Reinheitskontrolle mittels analytischer HPLC (HPLC 3) mit 37 mg nicht markiertem Hispidulin verdünnt.

Ausbeute (reines ^{14}C -Hispidulin): 3 mg (0,010 mmol, 44 %)

Radiochem. Ausbeute: 9 μCi (90 %)

5 Literatur

- Abou-Mandour, A. A. (1977). "Ein Standardnährmedium für die Anzucht von Kalluskulturen einiger Arzneipflanzen." *Z. Pflanzenphysiol.* **85**: 273-7.
- Abou-Mandour, A. A., Van den Berg, T. und Czygan, F.-C. (1994). "Regeneratbildung und Produktion flüchtiger Verbindungen in Gewebekulturen aus *Melissa officinalis* L. 1. Der Einfluss von Phytohormonen auf Kalluswachstum und Organbildung; Charakterisierung des ätherischen Öls der Regenerate." *Angew. Bot.* **68**: 163-7.
- Abou-Mandour, A. A. (1999). "Einfluss von Phytohormonen auf die Organogenese von Gewebekulturen von *Ageratina riparia* Regel (*Asteraceae*)." *Angew. Bot.* **73**: 162-6.
- Ai, J., Dekermendjian, K., Wang, X., Nielsen, M. und Witt, M.-R. (1997). "6-Methylflavone, a benzodiazepine receptor ligand with antagonistic properties on rat brain and human recombinant GABA_A receptors *in vitro*." *Drug Dev. Res.* **41**: 99-106.
- Alho, H., Costa, E., Ferrero, P., Fujimoto, M., Cosenza-Murphy, D., Guidotti, A. (1985). "Diazepam-binding inhibitor: a neuropeptide located in selected neuronal populations of rat brain." *Science* **229**: 179-82.
- Allan, J. und Robinson, R. (1924). "Accessible derivative of chromonol." *J. Chem. Soc.* **125**: 2192-5.
- Amin, J., Brooks-Kayal, A. und Weiss, D. S. (1997). "Two tyrosine residues on the α subunit are crucial for benzodiazepine binding and allosteric modulation of γ -aminobutyric acidA receptors." *Mol. Pharmacol.* **51**: 833-41.
- Asano, T. und Spector, S. (1978). "Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous ligands for brain benzodiazepine binding sites." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 977-81.
- Auterhoff, H., Knabe, J. und Höltje, H.-D. (1999). "Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie." 14 Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Avallone, R., Zeneroli, M. L., Venturini, I., Corsi, L., Schreier, P., Kleinschnitz, M., Ferrarese, C., Farina, F., Baraldi, C., Pecora, N., Frigo, M. und Baraldi, M. (1998). "Endogenous benzodiazepine-like compounds and diazepam binding inhibitor in serum of patients with liver cirrhosis with and without overt encephalopathy." *GUT* **42**: 861-7.

- Avallone, R., Zanolì, P., Puia, G., Kleinschnitz, M., Schreier, P. und Baraldi, M. (2000). "Pharmacological profile of apigenin, a flavonoid isolated from *Matricaria chamomilla*." *Biochem. Pharmacol.* **59**: 1387-94.
- Baker, W. (1933). "Molecular rearrangement of some o-acyloxyacetophenones and the mechanism of the production of 3-acylchromones." *J. Chem. Soc.:* 1381-9.
- Baker, W., Brown, N. C. und Scott, J. A. (1939). "The synthesis of 5-hydroxy-8-methoxyflavone (primetin monomethyl ether)." *J. Chem. Soc.:* 1922-7.
- Barbaccia, M. L., Costa, E. und Guidotti, A. (1988). "Endogenous ligands for high-affinity recognition sites of psychotropic drugs." *Ann. Rev, Pharm. Tox.* **28**: 451-76.
- Barnard, E. A., Skolnick, P., Olsen, R. W., Möhler, H., Sieghart, W., Biggio, G., Braestrup, C., Bateson, A. N. und Langer, S. Z. (1998). "International union of pharmacology. XV. Subtypes of γ -aminobutyric acid_A receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function." *Pharmacol. Rev.* **50**: 291-313.
- Barrero, A. F., Alvarez-Manzaneda, E. J. und Chahboun, R. (1998). "Synthesis of wiedeniol-A and wiedeniol-B from labdane diterpenes." *Tetrahedron* **54**: 5635-50.
- Bartoszyk, G. D. und Hamer, M. (1987). "The genetic animal model of reflex epilepsy in the Mongolian gerbil: differential efficacy of new anticonvulsive drugs and prototype antiepileptics" *Pharm. Res. Commun.* **19**: 429-40.
- Basile, A. S., Pannell, L., Jaouni, T., Gammal, S. H., Fales, H., Jones, E. A. und Skolnick, P. (1990). "Brain concentrations of benzodiazepines are elevated in an animal model of hepatic encephalopathy." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**: 5263-7.
- Basile, A. S., Harrison, P. M., Hughes, R. D., Gu, Z.-Q., Pannell, L., McKinney, A., Jones, E. A. und Williams, R. (1994). "Relationship between plasma benzodiazepine receptor ligand concentrations and severity of hepatic encephalopathy." *Hepatology* **19**: 112-21.
- Benke, D., Fritschy, J.-M., Trzeciak, A., Bannerworth, W. und Möhler, H. (1994). "Distribution, prevalence and drug-binding profile of GABA_A-receptor subtypes differing in β -subunit isoform." *J. Biol. Chem.* **269**: 27100-7.
- Benson, J. A., Löw, K., Keist, R., Möhler, H. und Rudolph, U. (1998). "Pharmacology of recombinant γ -aminobutyric acid_A receptors rendered diazepam-insensitive by point-mutated α -subunits." *FEBS Lett.* **431**: 400-4.

- Bergendorff, O., Dekermendjian, K., Nielsen, M., Shan, R., Witt, R., Ai, J. und Sterner, O. (1997). "Furanocoumarins with affinity to brain benzodiazepine receptors *in vitro*." *Phytochemistry* **44**: 1121-4.
- Bertorelli, R., Adami, M. und Ongini, E. (1995). "The Mongolian gerbil in experimental epilepsy." *Ital. J. Neurol. Sci.* **16**: 101-6.
- Bois, F., Beney, C., Mariotte, A.-M. und Boumendjel, A. (1999). "A one-step synthesis of 5-hydroxyflavones." *Synlett* **9**: 1480-2.
- Bourdillat, B., Delautier, D., Labat, C., Benveniste, J., Potier, P. und Brink, C. (1988). "Hispidulin, a natural flavone, inhibits human platelet aggregation by increasing cAMP levels." *Eur. J. Pharmacol.* **147**: 1-6.
- Bozdog, O., Verspohl, E. J. und Ertan, R. (1999). "Synthesis and hypoglycaemic activity of some new flavone derivatives. Part 1: flavonylsulphonylurea derivatives." *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem.* **332**: 435-8.
- Bracon, F., Guittard, F., Taffin de Givenchy, E. und Cambon, A. (1999). "Highly fluorinated monomers precursors of side-chain liquid crystalline polysiloxanes." *J. Polym. Sci. Part A: Polymer Chem.* **37**: 4487-96.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal. Biochem.* **72**: 248-54.
- Braestrup, C. und Squires, R. (1977). "Specific benzodiazepine receptors in the rat brain characterized by high-affinity [3H]diazepam binding." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 3805-9.
- Braestrup, C. und Nielsen, M. (1980). "Benzodiazepine receptors." *Drug Res.* **30**: 852-7.
- Brieskorn, C. H. und Melchior, J. (1969). "Quantitative change of terpenoids in germ-bud and leaf of *Salvia officinalis* L. under different conditions. 21. Contents of *Salvia off. L.*" *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges* **302**: 921-31.
- Brieskorn, C. H. und Biechele, W. (1971). "Flavone aus *Salvia officinalis* L." *Arch. Pharm.* **304**: 557-61.
- Brieskorn, C. H. und Kapadia, Z. (1979). "Constituents of *Salvia officinalis*. XXIII: 5-Methoxysalvigenin in Leaves of *Salvia officinalis*." *Planta Med.* **35**: 376-8.
- Bringmann, G. (1992). "A first biosynthetic proposal for the *in vivo* formation of naturally occurring diazepam-like benzodiazepines." *J. Neural. Transm. [Gen. Sect.]* **88**: 77-82.

- Bringmann, G. und Mader, T. (1995). "In vivo formation of diazepam-like 1,4-benzodiazepines by *Penicillium verrucosum* var. *verrucosum* after administration of 2-aminobenzophenones and glycine." *J. Neural. Transm. [Gen. Sect.]* **101**: 169-81.
- Buhr, A., Baur, R., Malherbe, P. und Sigel, E. (1996). "Point mutation of the $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptor affecting modulation of the channel by ligands of the benzodiazepine binding site." *Mol. Pharmacol.* **49**: 1080-4.
- Buhr, A., Baur, R. und Sigel, E. (1997 a). "Subtle changes in residue 77 of the γ subunit of $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptors drastically alter the affinity for ligands of the benzodiazepine binding site." *J. Biol. Chem.* **272**: 11799-804.
- Buhr, A. und Sigel, E. (1997 b). "A point mutation in the γ_2 subunit of γ -aminobutyric acid type_A receptors results in altered benzodiazepine binding site specificity." *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**: 8824-9.
- Buhr, A., Schaerer, M. T., Baur, R. und Sigel, E. (1997 c). "Residues at position 206 and 209 of the α_1 subunit of γ -aminobutyric acid A receptors influence affinities for benzodiazepine binding site ligands." *Mol. Pharmacol.* **52**: 676-82.
- Cassady, J. M., Baird, W. M. und Chang, C.-J. (1990). "Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents" *J. Nat. Prod.* **53**: 23-41.
- Cassels, B. K., Dajas, F. J., Medina, J. H., Paladini, A. C. und Silveira, R. H. (1995). "Flavonoid and biflavonoid derivatives, their pharmaceutical compositions, their anxiolytic activity." *WO 95/05169*.
- Chang, L. R., Barnard, E. A., Lo, M. M. S. und Dolly, J. O. (1981). "Molecular sizes of benzodiazepine receptors and the interacting GABA receptors in the membrane are identical." *FEBS Lett.* **126**: 309-12.
- Chang, H. M., Cheng, K. P., Choang, T. F., Chow, H. F., Chui, K. Y., Hon, P. M., Tan, F. W. L., Yang, Y., Zhong, Z. P., Lee, C. M., Sham, H. L., Chan, C. F., Cui, Y. X. und Wong, H. N. C. (1990). "Structure elucidation and total synthesis of new tanshinones isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen)." *J. Org. Chem.* **55**: 3537-43.
- Chang, H. M., Chui, K. Y., Tan, F. W., Yang, Y., Zhong, Z. P., Lee, C. M., Sham, H. L. und Wong, H. N. (1991). "Structure-activity relationship of miltirone, an active central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (Danshen)." *J. Med. Chem.* **34**: 1675-92.

- Chang, Y., Wang, R., Barot, S. und Weiss, D. S. (1996). "Stoichiometry of a recombinant GABA_A receptor." *J. Neurosci.* **16**: 5415-24.
- Chapouthier, G. und Venault, P. (2001). "A pharmacological link between epilepsy and anxiety?" *Trends Pharmacol. Sci.* **22**: 491-3.
- Chebib, M. und Johnston, G. A. R. (2000). "GABA-activated ligand gated ion channels: medicinal chemistry and molecular biology." *J. Med. Chem.* **43**: 1427-47.
- Chen, Y. T., Zheng, R. L., Jia, Z. J. und Ju, Y. (1990). "Flavonoids as superoxide scavengers and antioxidants." *Free Radic. Biol. Med.* **9**: 19-21.
- Cherpeck, R. E. (1998). "Preparation and use of aromatic amides of poly(oxyalkylene) carbamates as fuel additives, especially gasoline deposite inhibitors." *US 5786499*.
- Chipault, J. R. (1952). "A study of the antioxidants of natural spices." *Ann. Rept.* **1951-1952**: 25-30.
- Chulasiri, M., Bunyaphatsara, N. und Moongkarndi, P. (1992). "Mutagenicity and antimutagenicity of hispidulin and hortensin, the flavonoids from *Millingtonia hortensis* L." *Environ. Mol. Mutagenesis* **20**: 307-12.
- Costa, E. und Guidotti, A. (1991). "Diazepam binding inhibitor (DBI): a peptide with multiple biological actions." *Life Sci.* **49**: 325-44.
- Cox, E. D., Diaz-Arauzo, H., Huang, Q., Reddy, M. S., Ma, C., Harris, B., McKernan, R., Skolnick, P. und Cook, J. M. (1998). "Synthesis and evaluation of analogs of the partial agonist 6-(propyloxy)-4-(methoxymethyl)- β -carboline-3-carboxylic acid ethyl ester (6-PBC) and the full agonist 6-(benzyloxy)-4-(methoxymethyl)- β -carboline-3-carboxylic acid ethyl ester (ZK 93423) at wild type and recombinant GABA_A receptors." *J. Med. Chem.* **41**: 2537-52.
- Cui, B., Lee, Y. H., Chai, H., Tucker, J. C., Fairchild, C. R. Raventos-Suarez, C., Long, B., Lane, K. E., Menendez, A. T., Beecher, C. W., Cordell, G. A., Pezzuto, J. M. und Kinghorn, A. D. (1999). "Cytotoxic sesquiterpenoids from *Ratibida columnifera*." *J. Nat. Prod.* **62**: 1545-50.
- Cushman, M., Nagarathnam, D., Burg, D. L. und Geahlen, R. L. (1991). "Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activities of flavonoid analogs" *J. Med. Chem.* **34**: 798-806
- Cutting, G. R., Curristin, S., Zoghbi, H., O'Hara, B. Seldin, M. F. und Uhl, G. R. (1992). "Identification of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor subunit rho2 cDNA

- and colocalization of the genes encoding rho2 (GABAR2) and rho1 (GABAR1) to human chromosome 6q14-q21 and mouse chromosome 4." *Genomics* **12**: 801-6 .
- Cutting, G. R., Luo, I., O'Hara, B. F., Kasch, L. M., Montrose-Rafizadeh, C., Donovan, D. M., Shimada, S., Antonarakis, S. E., Guggino, W. B., Uhl, G. R. und Kazazian, H. H. (1991). "Cloning of the GABA (rho1) ρ_1 cDNA: a novel GABA_A receptor subunit highly expressed in retina." *Proc. Natn. Acad. Sci. U.S.A.* **88**: 2673-7.
- Da Cunha, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Koya, R., Izquierdo, I. und Medina, J. H. (1992). "Effect of various training procedures on performance in an elevated plus maze: possible relation with brain regional levels of benzodiazepine-like molecules." *Pharmacol. Biochem. Behav.* **43**: 677-81.
- Dasarathy, S. und Mullen, K. D. (1998). "Benzodiazepines in hepatic encephalopathy: sleeping with the enemy." *GUT* **42**: 764-5.
- Da Settimo, A., Primofiore, G., Da Settimo, F., Marini, A. M., Novellino, E., Greco, G., Martini, C., Giannaccini, G. und Lucacchini, A. (1996). "Synthesis, structure-activity relationships, and molecular modeling studies of N-(Indol-3-ylglyoxylyl)benzylamine derivatives acting at the benzodiazepine receptor." *J. Med. Chem.* **39**: 5083-91.
- Da Settimo, A., Primofiore, G., Da Settimo, F., Marini, A. M., Novellino, E., Greco, G., Gesi, M., Martini, C., Giannaccini, G. und Lucacchini, A. (1998). "N'-Phenylindol-3-ylglyoxylohydrazide derivatives: synthesis, structure-activity relationships, molecular modeling studies, and pharmacological action on brain benzodiazepine receptors." *J. Med. Chem.* **41**: 3821-30.
- Datla, K. P., Christidou, M., Widmer, W. W., Rooprai, H. K. und Dexter, D. T. (2001). "Tissue distribution and neuroprotective effects of citrus flavonoid tangeretin in a rat model of Parkinson's disease." *Neuroreport* **12**: 3871-5.
- Davies, P. A., Hanna, M. C., Hales, T. G. und Kirkness, E. F. (1997). "A novel class of GABA-A receptor subunit confers insensitivity to anaesthetic agents." *Nature* **385**: 820-3.
- Davies, M., Bateson, A. N. und Dunn, S. M. J. (1998). "Structural requirements for ligand interactions at the benzodiazepine recognition site of the GABA_A receptor." *J. Neurochem.* **70**: 2188-94.
- De Blas, A. L. (1993). "Benzodiazepines and benzodiazepine-like molecules are present in brain." Chichester, England, Ellis Horwood Limited.

- Dekermendjian, K., Kahnberg, P., Witt, M.-R., Sterner, O., Nielsen, M. und Liljefors, T. (1999). "Structure-activity relationships and molecular modeling analysis of flavonoids binding to the benzodiazepine site of the rat brain GABA_A receptor complex." *J. Med. Chem.* **42**: 4343-50.
- Dencker, S. J. und Johansson, G. (1990). "Benzodiazepine-like substances in mother's milk." *Lancet* **335**: 413.
- Dencker, S. J., Johansson, G. und Milsom, I. (1992). "Quantification of naturally occurring benzodiazepine-like substances in human breast milk." *Psychopharmacology* **107**: 69-72.
- De Robertis, E., Peña, C., Paladini, A. C. und Medina, J. H. (1988). "New developments on the search for the endogenous ligand(s) of central benzodiazepine receptors." *Neurochem. Int.* **13**: 1-11.
- Deutsch, S. I., Miller, L. G., Weizman, R., Weizman, A., Vocci, F. J., Greenblatt, D. J. und Paul, S. M. (1987). "Characterization of specific [³H]Ro 15-1788 binding *in vivo*." *Psychopharmacol. Bull.* **23**: 469-72.
- Dieck, tom S. und Gundelfinger, E. D. (2000). "Chemische Synapsen des Zentralnervensystems." *Chemie in unserer Zeit* **34**: 140-8.
- Duncalfe, L. L., Carpenter, M. R., Smillie, L. B., Martin, I. L. und Dunn, S. M. J. (1996). "The major site of photoaffinity labeling of the γ -aminobutyric acid type A receptor by [³H]flunitrazepam is histidine 102 of the α subunit." *J. Biol. Chem.* **271**: 9209-14.
- Duthel, J. M., Constant, H., Vallon, J. J., Rochet, T. und Miachon, S. (1992). "Quantitation by gas chromatography with selected-ion monitoring mass spectrometry of "natural" diazepam, N-desmethyldiazepam and oxazepam in normal human serum." *J. Chromatogr.* **579**: 85-91.
- Eder, T., Riederer, P. und Weiser, M. (1982). "Über die Hemmwirkung von γ -L-Glutamyl-L-Taurin und einiger anderer Antikonvulsiva auf durch Umweltreize auslösbare epileptiforme Anfälle Mongolischer Wüstenrennmäuse (*Meriones unguiculatus*)." *Wien. Tierärztl. Monatsschrift* **69**: 16-8.
- Elema, E. T., Schripsema, J. und Malingre, T. M. (1989). "Flavones and flavonol glycosides from *Eupatorium cannabinum* L." *Pharmaceutisch Weekblad. Scientific Edition* **11**: 161-4.

- Farkas, L. und Strelisky, J. (1970). "The direct synthesis of 5,7-dihydroxy-6-methoxyflavones. I. Synthesis of 4',6-dimethoxy-3',5,7-trihydroxyflavone and pectolinaringenin." *Tetrahedron Lett.* **2**: 187-90.
- Ferrandiz, M. L., Bustos, G., Paya, M., Gunasegaran, R. und Alcaraz, M. J. (1994). "Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice." *Life Sci.* **55**: 145-50.
- Ferraro, G., Martino, V., Borrajo, G. und Coussio, J. D. (1987). "5,7,3',4'-Tetrahydroxy-6-methoxyflavanone from *Eupatorium subhastatum*." *Phytochemistry* **26**: 3092-3.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W. und Starke, K. (1996). "Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie, Biologie sowie für Ärzte, Tierärzte und Apotheker." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Fritschy, J. M. und Möhler, H. (1995). "GABA_A-receptor heterogeneity in the adult rat brain: Differential regional and cellular distribution of seven major subunits." *J. Comp. Neurol.* **359**: 154-94.
- Fullas, F., Hussain, R. A., Chai, H. B., Pezzuto, J. M., Soejarto, D. D. und Kinghorn, A. (1994). "Cytotoxic constituents of *Baccharis gaudichaudiana*." *J. Nat. Prod.* **57**: 801-7.
- Gardner, C. R., Tully, W. R. und Hedgecock, C. J. R. (1993). "The rapidly expanding range of neuronal benzodiazepine receptor ligands." *Prog. Neurobiol.* **40**: 1-61.
- Gil, B., Sanz, M. J., Terencio, M. C., Ferrandiz, M. L., Bustos, G., Paya, M., Gunasegaran, R. und Alcaraz, M. J. (1994). "Effects of flavonoids on *Naja naja* and human recombinant synovial phospholipases A2 and inflammatory responses in mice." *Life Sci.* **54**: 333-8.
- Glaeske, G. (2001). "Psychotrope und andere Arzneimittel mit Missbrauchs- und Abhängigkeitspotenzial." Jahrbuch Sucht 2001, Neuland DHS: 63-79.
- Graf, H. (1990). "Benzodiazepine in Lebensmitteln." *GIT Fachz. Lab.* **4**: 405-12.
- Graham, D., Faure, C., Besnard, F. und Langer, S. Z. (1996). "Pharmacological profile of benzodiazepine site ligands with recombinant GABA_A receptor subtypes." *Eur. Neuropsychopharmacol.* **6**: 119-25.
- Grassi, G., Magnani, R. und Roncuzzi, L. (1997). "Evaluation of the content of benzodiazepine-like molecules in some foods." *Italian J. Food Sci.* **9**: 71-4.

- Grassi, G., Giraudi, G., Moschella, A., Giovannoli, C. und Baggiani, C. (1998). "Production of antibodies against benzodiazepines for competitive enzyme immuno-assay detection in plant extracts." *Ital. J. Food Sci.* **10**: 5-15.
- Gribble, G. W. (1998). "Naturally occurring organohalogen compounds." *Acc. Chem. Res.* **31**: 141-52.
- Gupta, H. C., Ayengar, K. N. N., Rangaswami, S. (1974). "Synthesis of Nepetin." *Indian J. Chem* **12**: 914-5.
- Häberlein, H., Tschiersch, K.-P. und Schäfer, H. L. (1994). "Flavonoids from *Leptospermum scoparium* with affinity to the benzodiazepine receptor characterized by structure activity relationships and *in vivo* studies of a plant extract." *Pharmazie* **49**: 912-22.
- Haefely, W., Kucsar, A., Möhler, H., Pieri, L., Polc, P. und Schaffner, R. (1975). "Possible involvement of GABA in the central actions of benzodiazepines." *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* **14**: 131-51.
- Haefely, W., Kyburz, E., Gerecke, M. und Möhler, H. (1985). "Recent advances in the molecular pharmacology of benzodiazepine receptors and the structure - activity relationship of their agonists and antagonists." *Adv. Drug Res.* **14**: 165-322.
- Halliwell, B. und Gutteridge, J. M. C. (1999). "Free radicals in biology and medicine." Dritte Ausgabe, Oxford University Press Inc., New York.
- Harborne, J. B. und Williams, C. A. (2000). "Advances in flavonoid research since 1992." *Phytochemistry* **55**: 481-504.
- Hatayama, K., Yokomori, S., Kawashima, Y., Saziki, R. und Kazuaki, K. (1985). "Anti-ulcer effect of isoprenyl flavonoids. III. Synthesis and anti-ulcer activity of metabolites of 2'-carboxymethoxy-4,4'-bis(3-methyl-2-butenyloxy)chalcone." *Chem. Pharm. Bull.* **33**: 1327-33.
- Hauser, C. A. E., Wetzel, C. H. R., Berning, B., Gerner, F. M. und Rupprecht, R. (1997). "Flunitrazepam has an inverse agonistic effect on recombinant $\alpha_6\beta_2\gamma_2$ -GABA_A receptors via a flunitrazepam-binding site." *J. Biol. Chem.* **272**: 11723-7.
- Hercouet, A., Le Corre, M. und Le Floc'h, Y. (1982). "A simple synthesis of chromones." *Synthesis*: 597-8.

- Hevers, W. und Lüddens, H. (1998). "The diversity of GABA_A receptors. Pharmacological and electrophysiological properties of GABA_A channel subtypes." *Molecular Neurobiol.* **18**: 35-86.
- Horie, T., Tsukayama, M., Kourai, H., Yokoyama, C., Furukawa, M., Yoshimoto, T., Yamamoto, S., Watanabe-Kohno, S. und Ohata, K. (1986). "Syntheses of 5,6,7- and 5,7,8-trioxygenated 3',4'-dihydroxyflavones having alkoxy groups and their inhibitory activities against arachidonate 5-lipoxygenase." *J. Med. Chem.* **29**: 2256-62.
- Horie, T., Tsukayama, M., Kawamura, M. und Seno, M. (1987). "Studies of the selective O-alkylation and dealkylation of flavonoids. X. Selective demethylation of 7-hydroxy-3,5,8-trimethoxyflavones with anhydrous aluminum halide in acetonitrile or ether." *J. Org. Chem.* **52**: 4702-9.
- Horie, T., Shibata, K., Yamashita, K., Kawamura, Y. und Tsukayama, M. (1997). "Studies of the selective O-alkylation and dealkylation of flavonoids. XXII. A convenient method for synthesizing 3,5,7-trihydroxy-6-methoxyflavones." *Chem. Pharm. Bull.* **45**: 446-51.
- Hoshino, Y., Ochinata, T. und Takeno, N. (1986). "The direct preparation of flavones from 2'-hydroxychalcones using disulfides." *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **59**: 2351-2.
- Huang, X., Liu, T., Gu, J., Luo, X., Ji, R., Cao, Y., Xue, H., Wong, J. T.-F., Wong, B. L., Pei, G., Jiang, H. und Chen, K. (2001). "3D-QSAR model of flavonoids binding at benzodiazepine site in GABA_A receptors." *J. Med. Chem.* **44**: 1883-91.
- Hui, K. M., Wang, X. H. und Xue, H. (2000). "Interaction of flavones from the roots of *Scutellaria baicalensis* with the benzodiazepine site." *Planta Med.* **66**: 91-3.
- Hui, K. M., Huen, M. S. Y., Wang, H. Y., Zheng, H., Sigel, E., Baur, R., Ren, H., Li, Z. W., Wong, J. T.-F. und Xue, H. (2002). "Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi." *Biochem. Pharm.* **64**: 1415-24.
- Iinuma, M., Iwashima, K. und Matsuura, S. (1984). "Synthetic studies on flavone derivatives. XIV. Synthesis of 2',4',5'-trioxygenated flavones." *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 4935-41.
- Iinuma, M., Tanaka, T. und Matsuura, S. (1984). "Synthetic studies on the flavone derivatives. XIII. Synthesis of flavones with tetramethoxyl groups in ring B." *Chem. Pharm. Bull.* **32**: 3354-60.

- linuma, M., Tanaka, T., Mizuno, M. und Mabry, T. J., (1986). "Flavonoid syntheses. IV. Syntheses of 2',3,4',5,5',6,7,8-octaoxygenated flavones." *Chem. Pharm. Bull.* **34**: 2228-30.
- Im, H. K., Im, W. B., Pregenzer, J. F., Carter, D. B., Jacobsen, E. J. und Hamilton, B. J. (1995). "Characterization of U-97775 as a GABA_A receptor ligand of dual functionality in cloned rat GABA_A receptor subtypes." *Br. J. Pharmacol.* **115**: 19-24.
- Izquierdo, I. und Medina, J. H. (1991). "GABA_A receptor modulation of memory: the role of endogenous benzodiazepines." *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 260-5.
- Izquierdo, I. und Medina, J. (1993). "Naturally occurring benzodiazepines: structure, distribution and function." Rubinstein, M. H. (Herausgeber), Ellis Horwood Chichester.
- Jacobsen, E. J., Stelzer, L. S., Belonga, K. L., Carter, D. B., Im, W. B., Sethy, V. H., Tang, A. H., Von Voigtlander, P. F. und Petke, J. D. (1996). "3-Phenyl-substituted imidazo[1,5-a]quinoxalin-4-ones and imidazo[1,5-a]quinoxaline ureas that have high affinity at the GABA_A/benzodiazepine receptor complex." *J. Med. Chem.* **39**: 3820-36.
- Jacobsen, E., J., Stelzer, L. S., Ten Brink, R. E., Belonga, K. L., Carter, D. B., Im, H. K., Im, W. B., Sethy, V. H., Tang, A. H., Von Voigtlander, P. F., Petke, J. D., Zhong, W.-Z. und Mickelson, J. W. (1999). "Piperazine imidazo[1,5-a]quinoxaline ureas as high-affinity GABA_A ligands of dual functionality." *J. Med. Chem.* **42**: 1123-44.
- Jain, A. C., Gupta, S. M. und Bambah, P. (1985). "Aromatic benzhydrylation: part III - synthesis of chromones of triphenylmethane type." *Indian J. Chem., Sect. B* **24B**: 393-7.
- Johnston, G. A. R. (1996). "GABA_A receptor pharmacology." *Pharmacol. Ther.* **69**: 173-98.
- Julien, R. M. (1997). "Drogen und Psychopharmaka." Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Kaneko, S., Iwasa, H. und Okada, M. (2002) "Genetic identifiers of epilepsy." *Epilepsia* **43** (Suppl. 9):16-20.
- Kaplan, H. (1975). "What triggers seizures in the gerbil, *Meriones unguiculatus*?" *Life Sci.* **17**: 693-8.

- Kato, M., Ito, M. und Seto-Ohshima, A. (2000). "Cortical somatosensory evoked potentials of seizure-sensitive and seizure-resistant gerbils." *Epilepsy Res.* **40**: 129-39.
- Kavvadias, D., Abou-Mandour, A. A., Czygan, F.-C., Beckmann, H., Sand, P., Riederer, P. und Schreier, P. (2000). "Identification of benzodiazepines in *Artemisia dracuncululus* and *Solanum tuberosum* rationalizing their endogenous formation in plant tissue." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**: 290-5.
- Kleinschnitz, M., Herderich, M. und Schreier, P. (1996). "Determination of 1,4-benzodiazepines by high-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry." *J. Chrom. B, Biochem. App.* **676**: 61-7.
- Klotz, U. (1990). "Natural benzodiazepines in man." *Lancet* **335**: 922.
- Klotz, U. (1991). "Occurrence of 'natural' benzodiazepines." *Life Sci.* **48**: 673-82.
- Kunovac, J. L. und Stahl, S. M. (1995). "Future directions in anxiolytic pharmacotherapy." *The Psychiatric Clinics of North America* **18**: 895-909.
- Lam, T. B. T., Iiyama, K. und Stone, B. A. (1996). "Caffeic acid: O-methyltransferases and the biosynthesis of ferulic acid in primary cell walls of wheat seedlings." *Phytochemistry.* **41**: 1507-10.
- Laskota, W. J., Lomax, P. und Rich, S. T. (1974). "The gerbil as a model for the study of the epilepsies. Seizure patterns and ontogenesis." *Epilepsia* **15**: 109-19.
- Lee, C. M., Wong, H. N. C, Chui, K. Y., Choang, T. F., Hon, P. M. und Chang, H. M. (1991). "Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza*." *Neurosci. Lett.* **127**: 237-41.
- Le Floc'h, Y. und Lefeuvre, M. (1986). "Synthesis of (dihydroxyphenacylidene)triphenylphosphoranes, new flavonoid precursors. Synthesis of 6- and 7-hydroxychromones." *Tetrahedron Lett.* **27**: 2751-2.
- Leonard, B. E. (1994). "Sleep disorders and anxiety: biochemical antecedents and pharmacological consequences." *J. Psychosomatic Res.* **38** (Suppl. 1): 69-87.
- Li, Y., Meselhy, M. R., Wang, L.-Q., Ma, C.-M., Nakamura, N. und Hattori, M. (2000). "Biotransformation of a C-glycosylflavone, abrusin 2''-O- β -D-apioside, by human intestinal bacteria." *Chem. Pharm.Bull.* **48**: 1239-41.
- Liao, J. F., Wang, H. H., Chen, M. C., Chen, C. C. und Chen, C. F. (1998). "Benzodiazepine binding site-interactive flavones from *Scutellaria baicalensis* root." *Planta Med.* **64**: 571-2.

- Liu, Y.-L. und Mabry, T. J. (1981). "Flavonoids from *Artemisia frigida*." *Phytochemistry* **20**: 1389-95.
- Liu, Y. L., Ho, D. K., Cassady, J. M., Cook, V. M. und Baird, W. M. (1992). "Isolation of potential cancer chemopreventive agents from *Eriodictyon californicum*." *J. Nat. Prod.* **55**: 357-63.
- Loescher, W., Schneider, H. und Kehr, W. (1985). "Evaluation of different β -carbolines in Mongolian gerbils with reflex epilepsy." *Eur. J. Pharmacol.* **114**: 261-6.
- Löw, K., Crestani, F., Keist, R., Benke, D., Brünig, I., Benson, J. A., Fritschy, J.-M., Rüllicke, T., Bluethmann, H., Möhler, H. und Rudolph, U. (2000). "Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety." *Science* **290**: 131-4.
- Lu, Y. und Yeap Foo, L. (2000). "Flavonoid and phenolic glycosides from *Salvia officinalis*." *Phytochemistry* **55**: 263-7.
- Luckner, M. (1984). "Secondary metabolism in microorganisms, plants and animals." Springer Verlag Berlin.
- Ma, Q. G., Liu, W. Z., Wu, X. Y., Zhou, T. X. und Qin, G. (1997). "Diterpenoids from *Euphorbia fischeriana*." *Phytochemistry* **44**: 663-6.
- Mahal, H. S. und Venkataraman, K. (1934). "Synthetical experiments in the chromone group. XIV. Action of sodamide on 1-acyloxy-2-acetonaphthones." *J. Chem. Soc.:* 1767-9.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Cassels, B. K., Medina J. H. und Paladini A. C. (1996 a). "6-Bromoflavone, a high affinity ligand for the central benzodiazepine receptors is a member of a family of active flavonoids." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **223**: 384-9.
- Marder, M., Viola, H., Wasowski, C., Wolfman, C., Waterman, P. G., Medina, J. H. und Paladini, A. C. (1996 b). "Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors." *Phytomedicine* **3**: 29-31.
- Marder, M., Estiu, G., Blanch, L. B., Viola, H., Wasowski, C., Medina, J. H. und Paladini, A. C. (2001). "Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor complex." *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 323-35.

- Marrero, J. G., Andres, L. S. und Luis, J. G. (2002). "Semisynthesis of rosmanol and its derivatives. Easy access to abietatriene diterpenes isolated from the genus *Salvia* with biological activities." *J. Nat. Prod.* **65**: 986-9.
- McKernan, R. M. und Whiting, P. J. (1996). "Which GABA_A-receptor subtypes really occur in the brain?" *J. Trends Neurosci.* **19**: 139-43.
- McKernan, R. M., Farrar, S., Collins, I., Emms, F., Asuni, A., Quirk, K. und Broughton, H. (1998). "Photoaffinity labeling of the benzodiazepine binding site of $\alpha_1\beta_3\gamma_2$ γ -aminobutyric acidA receptors with flunitrazepam identifies a subset of ligands that interact directly with His102 of the α subunit and predicts orientation of these within the benzodiazepine pharmacophore." *Mol. Pharmacol.* **54**: 33-43.
- Medina, J. H., Pena, C., Piva, M., Paladini, A. C. und De Robertis, E. (1988). "Presence of benzodiazepine-like molecules in mammalian brain and milk." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **152**: 534-9.
- Medina, J. H., Paladini, A. C., Wolfman, C., Levi de Stein, M., Calvo, D., Diaz, L. E. und Peña, C. (1990). "Chrysin (5,7-di-OH-flavone), a naturally-occurring ligand for benzodiazepine receptors, with anticonvulsant properties." *Biochem. Pharmacol.* **40**: 2227-31.
- Medina, J. H., Danelon, J. L., Wasowski, C., Levi de Stein, M. und Paladini, A. C. (1991). "Production of benzodiazepine-like compounds in bovine rumen." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**: 972-81.
- Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, D. und Paladini, A. C. (1997). "Overview-flavonoids: a new family of benzodiazepine receptor ligands." *Neurochem. Res.* **22**: 419-25.
- Medina, J. H., Viola, H., Wolfman, C., Marder, M., Wasowski, C., Calvo, C. und Paladini, A. C. (1998). "Neuroactive flavonoids: new ligands for the benzodiazepine receptors." *Phytomedicine* **5**: 235-43.
- Merritt, H., H., Putnam, T. J. und Schwab, D. M. (1938). "A new series of anti-convulsant drugs tested by experiments on animals." *Arch. Neurol. Psychiat.* **39**: 1003-15.
- Mickelson, J. W., Jacobsen, E. J., Carter, D. B., Im, H. K., Im, W. B., Schreur, P. J. K. D., Sethy, V. H., Tang, A. H., McGee, J. E. und Petke, J. D. (1996). "High-affinity α -aminobutyric acid A/benzodiazepine ligands: synthesis and structure-activity

- relationship studies of a new series of tetracyclic imidazoquinoxalines." *J. Med. Chem.* **39**: 4654-66.
- Miclo, L., Perrin, E., Driou, A., Papadopoulos, V., Boujrad, N., Vanderesse, R., Boudier, J.-F., Desor, D., Linden, G. und Gaillard, J. L. (2001). "Characterization of α -casozepine, a tryptic peptide from bovine α_{S1} -casein with benzodiazepine-like activity." *FASEB J.* **15**: 1780-2.
- Mihic, S. J., Whiting, P. J., Klein, R. L., Wafford, K. A. und Harris, R. A. (1994). "A single amino acid of the human gamma-aminobutyric acid type A receptor gamma 2 subunit determines benzodiazepine efficacy." *J. Biol. Chem.* **269**: 32768-73.
- Miura, K., Kikuzaki, H. und Nakatani, N. (2002). "Antioxidant activity of chemical components from sage (*Salvia officinalis* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) measured by the oil stability index method." *J. Agric. Food Chem.* **50**: 1845-51.
- Möhler, H. und Okada, T. (1977). "Benzodiazepine receptors: demonstration in the central nervous system." *Science* **198**: 849-51.
- Möhler, H., Polc, P., Cumin, R., Pieri, L. und Kettler, R. (1979). "Nicotinamide is a brain constituent with benzodiazepin-like actions." *Nature* **278**: 563-5.
- Möhler, H. und Richards, J. G. (1981). "Agonist and antagonist benzodiazepine receptor interaction *in vitro*." *Nature* **294**: 763-5.
- Möhler, H., Benke, D. und Fritschy, J.-M. (1997). "The GABA_A receptors." *Current Problems in Epilepsy* **12**: 39-53.
- Mossier, B., Tögel, M., Fuchs, K. und Sieghart, W. (1994). "Immunoaffinity purification of γ -aminobutyric acid_A (GABA_A) receptors containing γ 1-subunits. Evidence for the presence of a single type of γ -subunit in GABA_A receptors." *J. Biol. Chem.* **269**: 25777-82.
- Mullen, K. D., Szauter, K. M. und Kaminsky-Russ, K. (1990). "Endogenous benzodiazepine activity in body fluids of patients with hepatic encephalopathy." *Lancet* **336**: 81-3.
- Mullen, K. D., Gacad, R., Kaminsky-Russ, K., Aronson, L. und Gregory, C. (1997). "Endogenous benzodiazepine may originate from the intestine." *Advances in Hepatic Ecephalopathy & Metabolism in Liver Disease (International Symposium on Ammonia)*: 239-43.

- Murashige, T. und Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." *Physiologia Plantarum* **15**: 473-98.
- Mutschler, E. (1996). "Arzneimittelwirkungen. Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Nakane, H. und Ono, K. (1990). "Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases." *Biochemistry* **29**: 2841-5.
- Nakasugi, T. und Komai, K. (1998). "Antimutagens in the brazilian folk medicinal plant Carqueja (*Baccharis trimera* Less.)." *J. Agric. Food Chem.* **46**: 2560-4.
- Nielsen, M., Frokjaer, S. und Braestrup, C. (1988). "High affinity of the naturally-occurring biflavonoid, amentoflavon, to brain benzodiazepine receptors *in vitro*." *Biochem. Pharmacol.* **37**: 3285-7.
- Oelschläger, H. (1988). "Benzodiazepine - ein faszinierendes Kapitel moderner Arzneimittelforschung." Akademie der Wissenschaften und der Literatur, Mainz Wiesbaden.
- Ogurusu, T. und Shingai, R. (1996). "Cloning of a putative γ -aminobutyric acid (GABA) receptor sub unit $\rho 3$ cDNA." *Biochimica et Biophysica Acta* **1305**: 15-8.
- Olasmaa, M., Rothstein, J. D., Guidotti, A., Weber, R. J., Paul, S. M., Spector, S., Zeneroli, M. L., Baraldi, M. und Costa, E. (1990). "Endogenous benzodiazepine receptor ligands in human and animal hepatic encephalopathy." *J. Neurochemistry* **55**: 2015-23.
- Olsen, R. W. (1981). "GABA-benzodiazepine-barbiturate receptor interactions." *J. Neurochem.* **37**: 1-13 .
- Olsen, R. und Tobin, A. J. (1990). "Molecular biology of GABA_A receptors." *FASEB J.* **4**: 1469-80.
- Osorio-Olivares, M., Cassels, B. K., Sepulveda-Boza, S. und Rezende, M. C. (1999). "A novel route to 5,7-dimethoxy-6-hydroxyflavone." *Synthetic Communications.* **29**: 815-9.
- Paladini, A. C., Wasowski, C., De Stein, M. L. und Medina, J. H. (1992). "Benzodiazepine-like compounds in soil." *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* **80**: 105-8.

- Paladini, A. C. und Medina, J. H. (1998). "Use of halo and/or nitro-substituted flavonoids as anxiolytics." *WO 98/44920*.
- Paladini, A. C., Marder, M., Viola, H., Wolfman, C., Wasowski, C. und Medina, J. H. (1999). "Flavonoids and the central nervous system: from forgotten factors to potent anxiolytic compounds." *J. Pharm. Pharmacol.* **51**: 519-26.
- Paul, L. A., Fried, I., Watanabe, K., Forsythe, A. B. und Scheibel, A. B. (1981). "Structural correlates of seizure behavior in the mongolian gerbil." *Science* **213**: 924-6.
- Paul, S. M. und Purdy, R. H. (1992). "Neuroactive steroids." *FASEB J.* **6**: 2311-22.
- Peña, C., Medina, J. H., Piva, M., Diaz, L. E., Danilowicz, C. und Paladini, A. C. (1991). "Naturally occurring benzodiazepines in human milk." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **175**: 1042-50.
- Phadke, P. S., Rama Rao, A. V. und Venkataraman, K. (1967). "Synthetic experiments in the chromone group: part XXXVI - a synthesis of dinatin." *Indian J. Chem.* **5**: 131-3.
- Piva, M. A., Medina, J. H., De Blas, A. L. und Peña, C. (1991). "Formation of benzodiazepine-like molecules in rat brain." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**: 972-81.
- Polc, P. (1995). "Involvement of endogenous benzodiazepine receptor ligands in brain disorders: therapeutic potential for benzodiazepine antagonists?" *Med. Hypotheses* **44**: 439-46.
- Prichett, D. B., Sontheimer, H., Shivers, B. D., Ymer, S., Kettenmann, H., Schofield, P. R. und Seeburg, P. H. (1989). "Importance of a novel GABA_A receptor subunit for benzodiazepine pharmacology." *Nature* **338**: 582-5.
- Quirk, K., Gillard, N. P., Ragan, C. I., Whiting, P. J. und McKernan, R. M. (1994). "Model of subunit composition of γ -aminobutyric acid A receptor subtypes expressed in rat cerebellum with respect to their α and γ/δ subunits." *J. Biol. Chem.* **269**: 16020-8.
- Rausch, W. D. (1989). "The Mongolian gerbil - a laboratory animal for epileptic event studies." *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* **76**: 150-3.
- Renard, S., Olivier, A., Granger, P., Avenet, P., Graham, D., Sevrin, M., George, P. und Besnard, F. (1999). "Structural elements of the γ -aminobutyric acid type A receptor conferring subtype selectivity for benzodiazepine site ligands." *J. Biol. Chem.* **274**: 13370-4.

- Rojas, A., Villena, R., Jimenez, A. und Mata, R. (1991). "Chemical studies on Mexican plants used in traditional medicine, XXI. Ratibinolide II, a new sesquiterpene lactone from *Ratibida latipalearis*." *J. Nat. Prod.* **54**: 1279-82.
- Roth, H. J. und Fenner, H. (2000). "Arzneistoffe. Struktur - Bioreaktivität - Wirkungsbezogene Eigenschaften." Deutscher Apotheker Verlag Stuttgart.
- Rothstein, J. D. und Olasmaa, M. (1990). "Endogenous GABAergic modulators in the pathogenesis of hepatic encephalopathy." *Neurochem. Res.* **15**: 193-7.
- Rudolph, U., Crestani, F., Benke, D., Brünig, I., Benson, J.A, Fritschy, J.-M., Martin, J. R., Bluethmann, H. und Möhler, H. (1999). "Benzodiazepine actions mediated by specific γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes." *Nature* **401**: 796-800.
- Rudolph, U. und Möhler, H. (2000). "Identifizierung von Rezeptoren für Angst-lösende Medikamente im Gehirn." Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Zürich und Eidgenössische Technische Hochschule Zürich.
- Rutherford, D. M., Nielsen, M. P. C., Hansen, S. K., Witt, M. R., Bergendorff, O. und Sterner, O. (1992). "Isolation from *Salvia officinalis* and identification of two diterpenes which inhibit ³H-butylbicyclophosphoro[35S]thionate binding to chloride channel of rat cerebrocortical membranes *in vitro*." *Neurosci. Lett.* **135**: 224-6.
- Salgueiro, J. B., Ardenghi, P., Dias, M., Ferreira, M. B. C., Izquierdo, I. und Medina, J. H. (1997). "Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats." *Pharmacol. Biochem. Behav.* **58**: 887-91.
- Sand, P., Kleinschnitz, M., Vogel, P., Beckmann, H., Schreier, P., Strik, W. und Riederer, P. (1998). "Circadian patterns of serum endogenous bezodiazepines." *International Congress Series* **1152**: 567-71.
- Sand, P., Kavvadias, D., Feineis, D., Riederer, P., Schreier, P., Kleinschnitz, M., Czygan, F.-C., Abou-Mandour, A., Bringmann, G. und Beckmann, H. (2000). "Naturally occurring benzodiazepines: current status of research and clinical implications." *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* **250**: 1-9.
- Sangameswaran, L. und De Blas, A. L. (1985). "Demonstration of benzodiazepine-like neuronal molecules in the mammalian brain with a monoclonal antibody to benzodiazepines." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**: 5560-4.

- Sangameswaren, L., Fales, H. M., Friedrich, P. und De Blas, A. L. (1986). "Purification of benzodiazepines from bovine brain and detection-like immunoreactivity in human brain." *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 9236-40.
- Savini, L., Chiasserini, L., Pellerano, C., Biggio, G., Maciocco, E., Serra, M., Cinone, N., Carrieri, A., Altomare, C. und Carotti, A. (2001). "High affinity central benzodiazepine receptor ligands. Part 2: quantitative structure-activity relationships and comparative molecular field analysis of pyrazolo[4,3-c]quinolin-3-ones." *Bioorg. Med. Chem.* **9**: 431-44.
- Schofield, P. R., Darlison, M. G., Fujita, M., Burt, D. R., Stephenson, F. A., Rodriguez, H., Rhee, L. M., Ramachandran, J., Reale, V., Glencorse, T. A., Seeburg, P. H. und Barnard, E. A. (1987). "Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor superfamily." *Nature* **328**: 221-7.
- Sethna, S. M. (1951). "The Elbs persulfate oxidation." *Chem. Revs.* **49**: 91-101.
- Seto-Ohshima, A., Ito, M., Kudo, T. und Mizutani, A. (1992). "Intrinsic and drug-induced seizures of adult and developing gerbils." *Acta Neurologica Scand.* **85**: 311-7.
- Shen, X., Witt, M. R., Nielsen, M., Bergendorff, O., Sterner, O., Khayyal, M. T., El-Alfy, T. S. und El-Gohary, H. (1993). "Flavone derivatives isolated from *Artemisia herba alba* have affinity to brain benzodiazepine and α 1-adrenergic receptors *in vitro*." *Zhongguo Yaolixue Yu Dulixue Zazhi* **7**: 305-6.
- Shen, X. L., Nielsen, M., Witt, M.R., Sterner, O., Bergendorff, O. und Khayyal, M. (1994). "Inhibition of [methyl-3H]diazepam binding to rat brain membranes *in vitro* by dinatin and skrofulein." *Acta Pharmacologica Sinica* **15**: 385-8.
- Shimada, S., Cutting, G. und Uhl, G. R. (1992). " γ -Aminobutyric acid A or C receptor? γ -Aminobutyric acid ρ 1 receptor RNA induces bicuculline-, barbiturate-, and benzodiazepine-insensitive γ -aminobutyric acid responses in *Xenopus oocytes*." *Mol. Pharmacol.* **41**: 683-7.
- Sieghart, W. (1994). "Pharmacology of benzodiazepine receptors: an update." *J. Psych. Neurosci.* **19**: 24-9.
- Sieghart, W. (1995). "Structure and function of γ -aminobutyric acid_A receptor subtypes." *Pharmacol. Rev.* **47**: 181-234.

- Sigel, E. und Barnard, E. A. (1984). "A γ -aminobutyric acid/benzodiazepine receptor complex from bovine cerebral cortex: improved purification with preservation of regulatory sites and their regulations." *J. Biol. Chem.* **259**: 7129-233.
- Sigel, E. (1987). "Properties of single sodium channels translated by *Xenopus* oocytes after injection with messenger ribonucleic acid." *J. Physiol.* **386**: 73-90.
- Sigel, E., Baur, R., Trube, G., Möhler, H. und Malherbe, P. (1990). "The effect of subunit composition of rat brain GABA_A receptors on channel function." *Neuron* **5**: 703-11.
- Sigel, E. und Buhr, A. (1997). "The benzodiazepine binding site on GABA_A receptors." *Trends Pharmacol. Sci.* **18**: 425-9.
- Sigel, E., Schaerer, M. T., Buhr, A. und Baur, R. (1998). "The benzodiazepine binding pocket of recombinant $\alpha_1\beta_2\gamma_2$ GABA_A receptors: relative orientation of ligands and amino acid side chains." *Mol. Pharmacol.* **54**: 1097-105.
- Sigel, E. und Baur, R. (2000). "Electrophysiological evidence for the coexistence of α_1 and α_6 subunits in a single functional GABA_A receptor." *J. Neurochem.* **74**: 2590-6.
- Skolnick, P., Marangos, P., Goodwin, F. K., Edwards, M. und Paul, M. (1978). "Identification of inosine and hypoxanthine as endogenous inhibitors of 3H-diazepam binding in the CNS." *Life Sci.* **23**: 1473-80.
- Smith, T. A. D. (2001). "Type A γ -aminobutyric acid (GABA_A) receptor subunits and benzodiazepine binding: significance to clinical syndromes and their treatment." *British J. Biomed. Sci.* **58**: 111-21.
- Spearing, P., Majetich, G. und Bhattacharyya, J. (1997). "Synthesis of (R,S)-dioclein, a bioactive flavanone from the root bark of *Diocleia grandiflora*." *J. Nat. Prod.* **60**: 399-400.
- Srivastava, S. D. und Srivastava, S. K. (1987). "Synthesis of a new flavone." *Indian J. Chem.* **26B**: 57-8.
- Stephenson, F. A. (1995). "The GABA_A receptors." *Biochem. J.* **310**: 1-9.
- Strecker, G. J., Park, W. K. und Dudek, F. E. (1999). "Zinc and flunitrazepam modulation of GABA-mediated currents in rat suprachiasmatic neurons." *J. Neurophysiol.* **81**: 184-91.

- Takenaka, M., Watanabe, T., Sugahara, K., Harada, Y., Yoshida, S. und Sugawara, F. (1997). "New antimicrobial substances against *Streptomyces scabies* from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.)." *Biosci. Biotech. Biochem.* **61**: 1440-4.
- Tan, R. X., Lu, H., Wolfender, J. L., Yu, T. T., Zheng, W. F., Yang, L., Gafner, S. und Hostettmann, K. (1999). "Mono- and sesquiterpenes and antifungal constituents from *Artemisia* species." *Planta Med.* **65**: 64-7.
- Teuber, L., Wätjen, F. und Jensen, L. H. (1999). "Ligands for the benzodiazepine binding site - a survey." *Current Pharm. Des.* **5**: 317-43.
- Thiessen, D. D., Lindzey, G. und Friend, H. C. (1968). "Spontaneous seizures in the Mongolian gerbil." *Psychonom. Sci.* **2**: 227-8.
- Treiman, D. M. (2001). "GABAergic mechanisms in epilepsy." *Epilepsia* **42**(Suppl. 3): 8-12.
- Tsien, R. Y. und Furuta, T. (2000). "Preparation of halogenated coumarins, quinoline-2-ones, xanthenes, thioxanthenes, selenoxanthenes, and anthracenes as photolabile protecting groups with increased photosensitivities" *WO 00/31588*.
- Twaij, H. A., Kery, A. und Al-Khazraji, N. K. (1983). "Some pharmacological, toxicological and phytochemical investigations on *Centaurea phyllocephala*." *J. Ethnopharmacol.* **9**: 299-314.
- Unsel, E., Krishna, D., Fischer, C. und Klotz, U. (1989). "Detection of desmethyldiazepam and diazepam in brain of different species and plants." *Biochem. Pharmacol.* **38**: 2473-8.
- Unsel, E., Fischer, C., Rothmund, E. und Klotz, U. (1990). "Occurrence of "natural" diazepam in human brain." *Biochem. Pharmacol.* **39**: 210-2.
- Viola, H., Wasowski, C., Levi de Stein, M., Wolfman, C., Silveira, R., Dajas, F., Medina, J. H. und Paldini, A. C. (1995). "Apigenin, a component of *Matricaria recutita* flowers, is a central benzodiazepine receptors-ligand with anxiolytic effects." *Planta Med.* **61**: 213-6.
- Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Giorgi, O., Paladini, A. C. und Medina, J. H. (2000). "6,3'-Dibromoflavone and 6-nitro-3'-bromoflavone: new additions to the 6,3'-disubstituted flavone family of high-affinity ligands of the brain benzodiazepine binding site with agonistic properties." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **273**: 694-8.

- Wang, H. und Joseph, J. A. (1999). "Structure-activity relationships of quercetin in antagonizing hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells." *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 683-94.
- Whiting, P. J., McAllister, G., Vasilatis, D., Bonnert, T. P., Heavens, R. P., Smith, D. W., Hewson, L., O'Donnell, R., Rigby, M. R., Sirinathsinghji, D. J. S., Marshall, G., Thompson, S. A. und Wafford, K. A. (1997). "Neuronally restricted RNA splicing regulates the expression of a novel GABA_A receptor subunit conferring atypical functional properties." *J. Neurosci.* **17**: 5027-37.
- Wichtl, M. (2002). "Teedrogen und Phytopharmaka." Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- Wieland, H. A., Lüddens, H. und Seeburg, P. H. (1992). "A single histidine in GABA_A receptors is essential for benzodiazepine agonist binding." *J. Biol. Chem.* **267**: 1426-9.
- Wildmann, J., Möhler, H., Vetter, W., Ranalder, U., Schmidt, K. und Maurer, R. (1987). "Diazepam and N-desmethyldiazepam are found in rat brain and adrenal and may be of plant origin." *J. Neural. Transm.* **70**: 383-98.
- Wildmann, J., Vetter, W., Ranalder, U. B., Schmidt, K., Maurer, R. und Möhler, H. (1988 a). "Occurrence of pharmacologically active benzodiazepine in trace amounts in wheat and potato." *Biochem. Pharm.* **37**: 3549-59.
- Wildmann, J. (1988 b). "Increase of natural benzodiazepines in wheat and potato during germination." *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **157**: 1436-43.
- Wisden, W. und Stephens, D. N. (1999). "Pharmacology: towards better benzodiazepines." *Nature* **401**: 751-2.
- Wolfman, C., Da Cunha, C., Jerusalinsky, D., Levi de Stein, M., Viola, H., Izquierdo, I. und Medina, J. (1991). "Habituation and inhibitory avoidance training alter brain regional levels of benzodiazepine-like molecules and are affected by intracerebral flumazenil microinjections." *Brain Res.* **548**: 74-80.
- Wolfman, C., Viola, H., Paladini, A., Dajas, F. und Medina, J. H. (1994). "Possible anxiolytic effects of chrysin, a central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Passiflora coerulea*." *Pharm. Biochem. Behav.* **47**: 1-4.
- Wolfman, C., Viola, H., Marder, M., Wasowski, C., Ardenghi, P., Izquierdo, I., Paladini, A. und Medina, J. H. (1996). "Anxiolytic properties of 6,3'-dinitroflavone, a high-affinity benzodiazepine receptor ligand." *Eur. J. Pharmacol.* **318**: 23-30.

- Woods, M. J. und Williams., D. C. (1996). "Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor." *Biochem. Pharmacol.* **52**: 1805-14.
- Yao, Z. X., Drieu, K. und Papadopoulos, V. (2001). "The *Ginkgo biloba* extract Egb 761 reduces the PC12 neuronal cells from β -amyloid-induced cell death by inhibiting the formation of β -amyloid-derived diffusible neurotoxic ligands." *Brain Res.* **889**: 181-90.
- Youdim, K. A., Spencer, J. P. E., Schroeter, H. und Rice-Evans, C. (2002). "Dietary flavonoids as potential neuroprotectants." *Biol. Chem.* **383**: 503-19.
- Zhang, W., Koehler, K. F., Zhang, P. und Cook, J. M. (1995). "Development of a comprehensive pharmacophore model for the benzodiazepine receptor." *Drug Des. Dis.* **12**: 193-248.

Lebenslauf

Name Dominique Kavvadias
Geburtsdatum 31.05.1974
Geburtsort Tichau/Oberschlesien (Polen)
Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

1981-1989 Volksschule in Tichau (Polen)
1989-1990 Private Förderschule für junge Aussiedler in Bamberg
1990-1994 Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Schweinfurt
06/1994 Abitur

Studium

1994-1998 Studium der Lebensmittelchemie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg
10/1996 Vorexamen
11/1998 Erste Staatsprüfung
seit 08/2002 Berufspraktikum am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit in Erlangen

Promotion

seit 01/1999 Promotion am Lehrstuhl für Lebensmittelchemie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität in Würzburg

Industriepraktikum

09/1997 Mainfrucht GmbH in Gochsheim/Ufr., Abteilung für Qualitätskontrolle

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation „Liganden des Benzodiazepin-Rezeptors. Studien über Benzodiazepine in pflanzlichen Geweben sowie über Hispidulin“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 10.01.2003

.....
Dominique Kavvadias