

Effekt von SNAP-5114 auf den elektrogenen Transport von GAT 1-EGFP

Holger Rabe¹, Ingo Böhme¹, Ralf Schirmmacher², Frank Rösch² und Hartmut Lüddens¹

¹Klinische Forschergruppe, Psychiatrische Klinik der Universität Mainz, ²Institut für Kernchemie, Universität Mainz

Einleitung

Im Gehirn von Säugetieren ist γ -Aminobuttersäure (GABA) der hauptsächliche inhibitorisch wirkende Neurotransmitter. Die GABA-vermittelte neuronale Transmission wird innerhalb weniger Millisekunden durch die Aufnahme des Neurotransmitters über spezifische, hoch affine Transporter beendet. Insgesamt sind bei Säugetieren vier GABA-selektive Transporter bekannt, die beim Menschen und bei der Ratte als GAT-1, BGT-1 (Betain/GABA Transporter), GAT-2, sowie GAT-3 bezeichnet werden (Borden et al., 1992). Die vier GATs bilden eine Unterfamilie in der Gruppe der elektrogenen Na^+/Cl^- Neurotransmitter Transporter, die eine einheitliche Struktur aufweisen.

Die beiden hirnspezifischen GATs zeichnen sich unter anderem durch unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften aus. GAT-1 kann beispielsweise durch L-(2,4)-diamin-buttersäure (L-DABA) und durch cis-3-aminocyclohexancarboxylat (ACHC) inhibiert werden, während er für β -Alanin insensitive ist. Im Gegensatz dazu wird GAT-3 durch β -Alanin blockiert (Borden et al., 1992, Kanner und Bendahan, 1990). Neben den pharmakologischen Unterschieden ist die Substratspezifität für GABA von GAT-1 deutlich ausgeprägter als dies bei GAT-3 der Fall ist. Aus diesen Gründen scheint es möglich, (PET)-Liganden zu synthetisieren, die zwischen den verschiedenen Transportern unterscheiden und damit ausschließlich auf ein bestimmtes GABA-Aufnahmesystem wirken. In den letzten Jahren wurden daher einige lipophile Substanzen synthetisiert, die als GABA-Analogon die GATs beeinflussen. Sehr erfolgversprechende Substanzen sind dabei Derivate der Nipicotinsäure (Dhar et al., 1994).

Im Arbeitskreis von Herrn Prof. Rösch wurde bereits der potentielle GAT-3 Ligand (\pm) -1-[2-(Triphenylmethoxy)ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid (SNAP-5114), ein Derivat der Nipicotinsäure, synthetisiert. Diese Substanz liegt auch als triziierte (^3H)SNAP-5114 und fluorierte Form (Fluoroethyl-SNAP-5114) vor (Schirmmacher et al., 2000), die für Positronenemissionstomographie (PET) notwendig sind.

Material und Methoden

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden HEK-293 Zellen passagiert und auf 12 mm Glasdeckgläschen ausplattiert, die sich in 9,6 cm Plastik Kulturschalen mit 10 ml Minimum Essential Medium (MEM, Gibco) befanden. Das Medium wurde vorher mit 158 mg/l Natriumbicarbonat, 2 mM Glutamin (Gibco), 100 U/ml Penicillin-Streptomycin (Gibco) und 10% FCS (fetal calf serum, Gibco) angereichert. Diese Kulturen wurden bei 37 °C in einer humidifizierten 95% O_2 /5% CO_2 Atmosphäre für 2-3 Tage gehalten.

Die Transfektion mit rekombinanten Ratten GAT1-Transportern wurde mit pRK5-rGAT1 oder pEGFP-rGAT1 Vektoren nach dem bereits im Detail beschriebenen Ablauf mit der Phosphat-Prezipitations Methode durchgeführt (Korpi and Lüddens, 1993; Lüddens and Korpi, 1995b).

Zwei Tage nach der Transfektion wurde ein Deckgläschen mit HEK 293 Zellen in die Ableitkammer des elektrophysiologischen Messstandes gebracht, die auf dem Kreuztisch eines Fluoreszenzmikroskops (Olympus IX70) montiert ist. Die gesamte Zeit wurden die Zellen mit einer physiologischen Salzlösung folgender Zusammensetzung perfundiert (in mM): 130 NaCl, 5, KCl, 2 CaCl₂, 2 MgSO₄, 10 Glukose, 5 Saccharose und 10 HEPES (freie Säure), der pH wurde auf 7,35 mit ungefähr 35 mM NaOH eingestellt. Die von GAT1 verursachten GABA induzierten Chloridströme wurden mit der Ganzzelleableitungsvariante der "patch-clamp" Technik gemessen (Hamill et al., 1981). Die "patch"-Pipetten wurden aus Borosilikat Glaskapillaren mit Filament (0.5 mm ID, 1.5 mm OD, Vitrex, Science Products GmbH, Hofheim, Germany) mit einem vertikalen Puller (Sutor Instruments) gezogen. Die Pipetten hatten einen Widerstand von 3-5 M Ω , nachdem sie mit folgender Salzlösung gefüllt waren (in mM): 70 CsCl, 50 CsOH, 20 CsF, 2 CaCl₂, 2 MgCl₂, 10 EGTA, 3,1 ATP (di-Kaliumsalz), 0,4 GTP (tri-Natriumsalz) und 10 HEPES (freie Säure), pH 7,35.

Durch leichtes Saugen an der Pipette wurde ein elektrischer Widerstand zwischen Glas und Zellmembran von mehr als 1 G Ω erreicht. Anschließend wurde die Membranfläche innerhalb der Pipetten durch stärkeren Unterdruck durchbrochen, so dass ein relativ freier elektrischer Zugang zur Zelle entstand. Um die elektrischen Artefakte zu minimieren, wurden die Pipettenkapazität, die Membrankapazität und der Serienwiderstand elektronisch kompensiert. Die Testlösungen enthielten 1 mM GABA und folgende SNAP-5114-Konzentrationen (in μM): 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 500, 1000, 3000. Diese Lösungen wurde mit Hilfe eines schnellen Y-förmigen Applikationssystems auf die Zelle gebracht. Die Ströme wurden mit einem "patch-clamp" Verstärker (EPC-8, HEKA-Electronic, Lambrecht, Germany) in Verbindung mit einem PC und dem pClamp6 Software Paket (Axon Instruments, Foster City, CA) aufgenommen. Die Digitalisierung wurde mit mindestens 1 kHz mit einem Digidata 1200 Interface (Axon Instruments, Foster City, CA) durchgeführt, nachdem die Ströme mit einem 8-Pol Bessel Filter bei 5 kHz tieffpass gefiltert wurden.

Ergebnisse

Da bereits gezeigt werden konnte, dass der Transporterstrom und damit wahrscheinlich die Transporterfunktion vom Ratten GAT-1-EGFP Fusionsprotein nicht signifikant verschieden vom Wildtyp GAT-1 ist, wurde das Fusionsprotein in dieser Untersuchung verwendet. In allen Fällen wurde der von 1 mM GABA-induzierte Transporterstrom durch(±)-1-[2-(Triphenylmethoxy)ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid (SNAP-5114) durch Konzentrationen, die größer als 100 μM waren, dosisabhängig blockiert (Abb.1).

In den Messspuren fällt auf, dass die Wirkung von SNAP-5114 erst allmählich einsetzt und der Chloridstrom blockiert wird. Dieses deutet darauf hin, dass nur der aktive Transporter von SNAP-5114

inhibiert wird. Zur Untermauerung dieser Annahme wurde zusätzlich zur GABA-induzierten Transporteraktivität eine substratunabhängige Aktivität erzeugt, in dem das Haltepotential vom Membranruhepotential hyperpolarisiert wurde. Unter diesen Bedingungen reduzierte SNAP-5114 den GABA-induzierten Transporterstrom mit der gleichen Konzentrationsabhängigkeit wie bereits beschrieben. Erwartungsgemäß war SNAP-5114 darüber hinaus in der Lage, die substratunabhängige Transporteraktivität zu inhibieren. Wie in der Dosis-Wirkungskurve erkennbar ist, liegt der "Hill Slope" deutlich über Eins, so dass SNAP-5114 entweder zwei oder mehr Bindungsstellen am Transporterprotein hat oder dass die Substanz gleichzeitig verschiedene Wirkungsmechanismen aufweist.

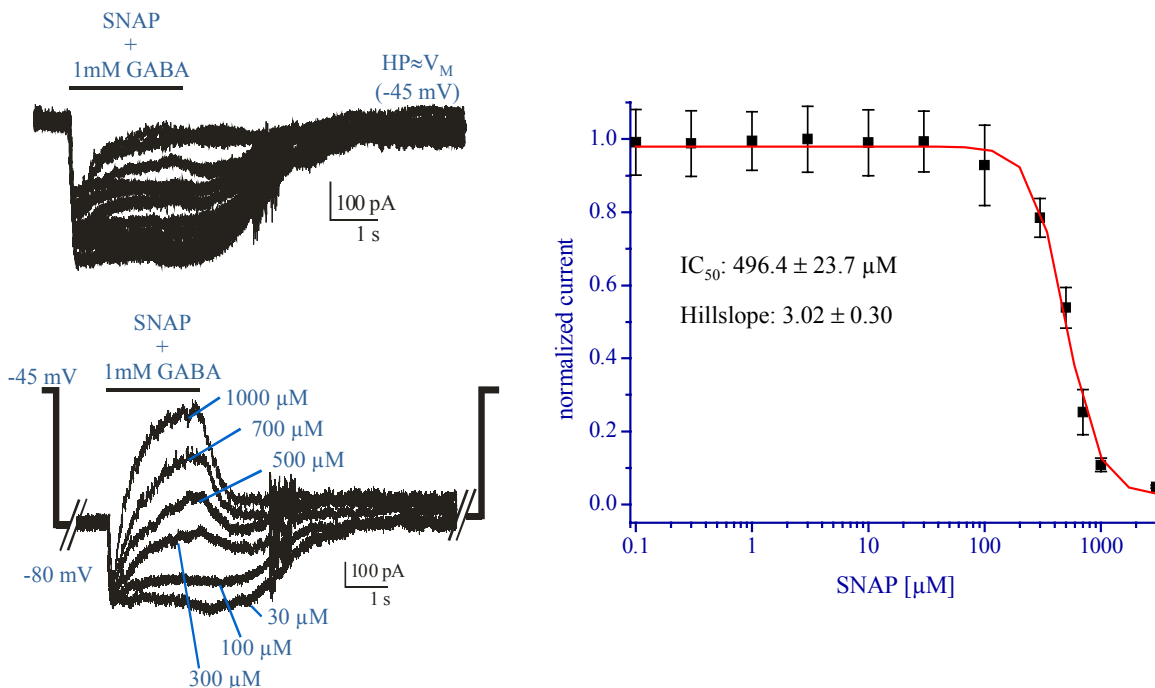


Abbildung 1: Verringerung des Transporterstroms von Ratten GAT-1-EGFP Fusionsproteinen durch Ko-Applikation von 1 mM GABA und SNAP-5114. Die Balken in den Originalmessungen symbolisieren die GABA-Applikationsdauer, die Dosis-Wirkungskurve ist auf den maximalen GABA-induzierten Strom normiert.

Literatur

- Borden, L.A., Smith, K.E., Hartig, P.R., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. (1992) Molecular heterogeneity of the γ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J. Biol. Chem.*, 267:21098-21104.
- Dhar, T.G.M., Borden, L.A., Sriram Tyagarajan, Smith, K.E., Branchek, T.A., Weinshank, R.L., Gluchowski, C. (1994) Design, synthesis and evaluation of substituted triarylnipicotic acid derivatives as GABA uptake inhibitors: Identification of a ligand with moderate affinity and selectivity for the cloned human GABA transporter GAT-3. *J. Med. Chem.*, 37:2334-2345.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J., 1981. Improved patch-clamp technique for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391, 85-100.
- Kanner, B.I. and Bendhan, A. (1990) Two pharmacologically distinct sodium- and chloride-coupled high affinity γ -aminobutyric acid transporters are present in plasma membrane vesicles and reconstituted preparations from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 87:2550-2554.
- Korpi, E.R., Lüddens, H., 1993. Regional γ -aminobutyric acid sensitivity of *t*-butylbicyclophosphoro[^{35}S]thionate binding depends on γ -aminobutyric acid_A receptor α subunit. *Mol. Pharmacol.* 44, 87-92.
- Lüddens, H., Korpi, E.R., 1995b. GABA antagonists differentiate between recombinant GABA_A/benzodiazepine receptor subtypes. *J. Neurosci.* 15, 6957-6962.
- Schirmacher, R., Hamkens, W., Lüddens, H. Rösch, F. (2000) Synthesis of tritium labeled (\pm)-1-[2-(triphenylmethoxy)ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid: A possible compound to determine the efficacy of potential GABA transporter substances *in vitro*. *J. Labelled Cpd. Radiopharm.* 43:1127-1134.