

# Effekte von SNAP-5114 und F-SNAP 5114 auf den elektrogenen Transport von rGAT 1-EGFP und rGAT-3-EGFP Fusionsproteinen

Holger Rabe<sup>1</sup>, Ingo Böhme<sup>1</sup>, Ralf Schirmmacher<sup>2</sup>, Frank Rösch<sup>2</sup> und Hartmut Lüddens<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Klin. Forschergruppe, Psychiatrische Klinik der Universität Mainz; <sup>2</sup>Institut für Kernchemie, Universität Mainz

**Einleitung:** Im Gehirn von nahezu allen Vertebraten ist die Aminosäure  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) der hauptsächlich 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). Im Arbeitskreis Rösch wurde bereits der potentielle GAT-3 Ligand ( $\pm$ )-1-[2-(Triphenylmethoxy)ethyl]-3-piperidinecarboxylic acid (SNAP-5114), ein Derivat der Nipecotinsäure, synthetisiert. Diese Substanz liegt auch als tritierte ( $^3\text{H}$ )SNAP-5114 und fluorierte Form (Fluoroethyl-SNAP-5114) vor (Schirmmacher et al., 2000), die für PET notwendig sind.

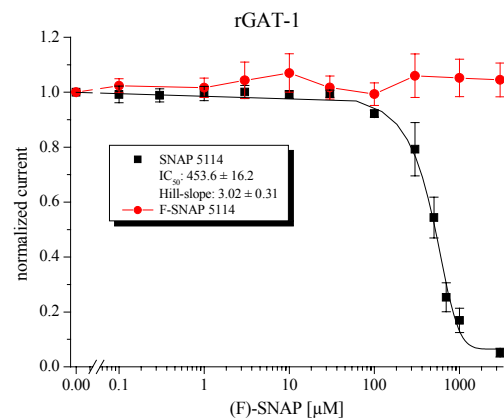
**Material und Methoden:** Für die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden HEK-293 Zellen passagiert und auf 12 mm Deckgläschen ausplattiert, die sich in 9,6 cm Plastik Kulturschalen mit 10 ml Minimum Essential Medium (MEM, Gibco) befanden. Das Medium wurde vorher mit 158 mg/l Natriumbicarbonat, 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<sub>2</sub>/5% CO<sub>2</sub> Atmosphäre für 2-3 Tage gehalten. Die Transfektion mit rekombinanten Ratten GAT-1 bzw. Ratten GAT-3 Transportern wurde mit den entsprechenden pEGFP Vektoren nach dem bereits im Detail beschriebenen Ablauf mit der Phosphat-Präzipitationsmethode durchgeführt (Korpi and Lüddens, 1993; Lüddens and Korpi, 1995b).

**Ergebnisse:** Da bereits gezeigt werden konnte, dass die Transporterströme und damit wahrscheinlich die Transporterfunktionen von rGAT-1-EGFP sowie rGAT-3-EGFP Fusionsproteinen nicht signifikant verschieden vom jeweiligen Wildtyp sind, wurden die Fusionsproteine in dieser Untersuchung verwendet. Die fluorierte Substanz F-SNAP 5114 zeigte auf rGAT-3 im Gegensatz zu rGAT-1 eine inhibitorische Wirkung. Allerdings ist sie in ihrer Effizienz den Transporterstrom bei rGAT-3 zu blockieren deutlich schlechter als die Ausgangssubstanz, da sie nur maximal 20% des von 30  $\mu\text{M}$  GABA induzierten Stromes inhibiert. Da zusätzlich eine signifikante Erhöhung des IC<sub>50</sub> auf 8,72  $\pm$  0,75  $\mu\text{M}$  F-SNAP 5114 festzustellen ist, deuten beide Ergebnisse zusammen auf eine verringerte Affinität dieser Substanz zu rGAT-3 hin (Abb.2). Weiterhin liegt auch in diesem Fall der Hill-Koeffizient bei 1, so dass bei F-SNAP 5114 ebenfalls von einer Bindungsstelle bzw. einem Wirkungsmechanismus ausgegangen werden kann.

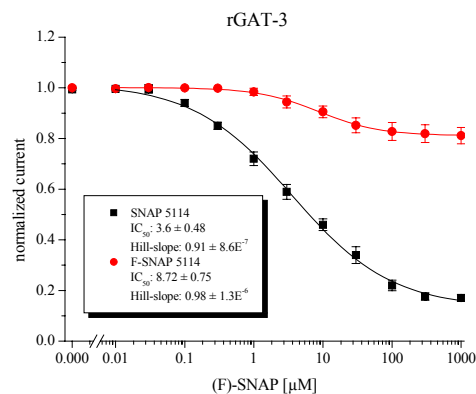
In diesem Jahr konnte die Aussage über die Auswirkungen von SNAP auf den GABA Transport über rGAT-1 mit den Daten des F-SNAP 5114 komplettiert werden (Abb.1). Dabei stellte sich heraus, dass die fluorierte Form dieser Substanz keinen Einfluss auf den GABA induzierten Transporterstrom hat.

Zusätzlich wurde in diesem Jahr die Wirkung von SNAP 5114 und F-SNAP 5114 auf rGAT-3-EGFP Fusionsproteinen analysiert. Im Vergleich zu rGAT-1 ist rGAT-3 mehr als hundertfach sensitiver gegenüber SNAP 5114 (IC<sub>50</sub>: 453  $\pm$

16,2 bzw. 3,6  $\pm$  0,48  $\mu\text{M}$ ) bei vergleichbarem maximalen Blockierungseffekt. Weiterhin weist die Dosis-Wirkungskurve bei rGAT-3 einen Hill-Koeffizienten von ungefähr 1 auf, was im Gegensatz zu rGAT-1 (Hill-Koeffizienten > 3) auf die Existenz nur einer Bindungsstelle bzw. eines Wirkmechanismus schließen lässt (Abb.2).



**Abbildung 1:** Verringerung des durch 1 mM GABA induzierten Transporterstroms von rGAT-1-EGFP Fusionsproteinen exprimiert in HEK 293 Zellen durch Ko-Applikation von SNAP-5114 (schwarze Kurve) bzw. F-SNAP 5114 (roter Kurve). Die Dosis-Wirkungskurven sind auf die jeweiligen maximalen GABA-induzierten Ströme normiert.



**Abbildung 2:** Verringerung des durch 30  $\mu\text{M}$  GABA induzierten Transporterstroms von rGAT-3-EGFP Fusionsproteinen exprimiert in HEK 293 Zellen durch Ko-Applikation von SNAP-5114 (schwarze Kurve) bzw. F-SNAP 5114 (rote Kurve). Die Dosis-Wirkungskurven sind auf die jeweiligen maximalen GABA-induzierten Ströme normiert.

Borden, L.A., Smith, K.E., Hartig, P.R., Branchek, T.A., Weinshank, R.L. (1992) Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J. Biol. Chem.*, 267:21098-21104.

Korpi, E.R., Lüddens, H., 1993. Regional  $\gamma$ -aminobutyric acid sensitivity of t-butylbicyclophosphoro[ $^{35}\text{S}$ ]thionate binding depends on  $\gamma$ -aminobutyric acid<sub>A</sub> receptor  $\alpha$  subunit. *Mol. Pharmacol.* 44, 87-92.

Lüddens, H., Korpi, E.R., 1995b. GABA antagonists differentiate between recombinant GABA<sub>A</sub>/benzodiazepine receptor subtypes. *J. Neurosci.* 15, 6957-6962.

Schirmmacher, 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.* 43:1127-113