

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**GABA-Transporter:
Entwicklung subtypenselektiver Testsysteme und
Untersuchung neu synthetisierter und
bekannter Substanzen auf ihre Eignung
als GABA-uptake Inhibitoren**

Andrea Kragler

aus

Neuburg an der Donau

2003

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Klaus Th. Wanner betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 17.03.2003

.....

(Andrea Kragler)

Dissertation eingereicht am 17.03.2003

1. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Th. Wanner
2. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vollmar

Mündliche Prüfung am 10.04.2003

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Januar 2001 bis März 2003
am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-
Universität München auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Klaus Th. Wanner

Für die vorzügliche und stets engagierte Betreuung und Förderung meiner Arbeit
sowie für die hervorragenden Forschungsbedingungen danke ich

Herrn Prof. Dr. Klaus Th. Wanner sehr herzlich.

Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Insbesondere möchte ich auch der Studienstiftung des deutschen Volkes danken,
die meine Arbeit durch ein großzügiges Promotionsstipendium ermöglicht und gefördert hat.

Mein Dank gilt allen (ehemaligen) Mitarbeitern des Arbeitskreises:

Lars Allmendinger, Gabriele Appel, Gerd Bauschke, Jan Bräckow, Justus Dächsel, Markus Ege, Mark Faust, Krzysztof Ferenc, Tanja Franz, Peter Gebauer, Petra Gerteis, Klaus Görler, Cornelia Hösl, Anne Kärtner, Marion Kestel, Claus-Jürgen Koch, Tanja Kovaleva, Susanne Lukassen, Susanne Maison, Marcel Metz, Birgit Mitterreiter, Andreas Müller, Karin Niessen, Jörg Pabel, Franz Paintner, Ingolf Sitka, Soňa Šimonyiová, Tobias Steffan, Christa Wehnhard-Ritter, Christine Zepperitz, Xueqing Zhao, Elisabeth Zoller.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der analytischen Abteilungen danke ich für die äußerst zuverlässige und kompetente Aufnahme der NMR- und Massenspektren sowie der Anfertigung der Elementaranalysen: Frau W. Bogatsch, Frau U. Groß, Frau G. Käser, Herrn Dr. H. Lerche, Frau K.-J. Pankau, Herrn H. Schulz.

Georg danke ich besonders für seine immerwährende Hilfsbereitschaft und seine zahlreichen, äußerst kompetenten fachlichen Ratschläge.

Bei Silke und Ljilja bedanke ich mich für die sehr herzliche und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre sowie ihre äußerst engagierte und immer zuverlässige Mitarbeit im Labor, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen hat.

Meine Freundin Babette hat mich in den letzten zwei Jahren mit ihrer lieben Art immer wieder erfreut und zum Lachen gebracht. Dafür bedanke ich mich bei ihr aufs herzlichste.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, meiner Großmutter und Gerhard bedanken, die mich jederzeit unermüdlich und geduldig unterstützt, aufgemuntert und auch in schwierigeren Zeiten motiviert haben.

Man reist nicht, um anzukommen.

JOHANN WOLFGANG VON GOETHE

**Meinen Eltern und meiner Großmutter
in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.**

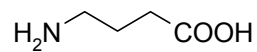
Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|----|
| 1. Einleitung..... | 3 |
| 2. Zielsetzung..... | 11 |
| 3. Theoretischer Teil..... | 15 |
| 3.1. Bereitstellung der cDNAs von mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 in geeigneten eukaryontischen Expressionsvektoren | 15 |
| 3.1.1. Eukaryontische Expressionsvektoren..... | 15 |
| 3.1.2. Umklonierung von mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 in pcDNA3.1(+).. | 16 |
| 3.1.3. Versuch der Isolierung der für hGAT-3 codierenden cDNA | 21 |
| 3.2. Transiente Transfektion von Säugerzelllinien mit GABA-Transportern, Aufbau subtypenselektiver Testsysteme..... | 22 |
| 3.2.1. Aufbau eines Testsystems für mGAT1..... | 25 |
| 3.2.2. Optimierung des Testsystems für mGAT1 | 26 |
| 3.2.3. Aufbau von Testsystemen für hGAT-1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 | 34 |
| 3.3. Stabile Transfektion von Säugerzelllinien | 40 |
| 3.4. Immunpräzipitation und Westernblot..... | 44 |
| 3.5. Synthese neuer als GAT-Inhibitoren in Frage kommender Substanzen | 48 |
| 3.5.1. Auswahlkriterien..... | 48 |
| 3.5.2. Synthesestrategie | 52 |
| 3.5.3. Synthese der lipophilen Reste..... | 54 |
| 3.5.4. Synthese von Aminomethylphenolderivaten..... | 57 |
| 3.5.5. Synthese von Aminomethylfluorphenolderivaten | 60 |

| | |
|--|-----|
| 3.6. Ermittlung von IC ₅₀ -Werten neuer und bekannter Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern | 65 |
| 3.6.1. Screening der unter 3.5. beschriebenen, neu synthetisierten Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern | 68 |
| 3.6.2. Screening verschiedener möglicher Leitsubstanzen für GAT-Inhibitoren an den vier verschiedenen GABA-Transportern..... | 76 |
| 3.6.3. Screening von GAT-Inhibitoren an den vier murinen GABA-Transportern..... | 79 |
| 3.6.4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen..... | 89 |
| 3.6.5. Screening von GAT-Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 bezüglich eventuell bestehender Speziesunterschiede | 91 |
| 4. Zusammenfassung | 95 |
| 4.1. Transiente und stabile Expression von GABA-Transportern in Zelllinien, Aufbau subtypenselektiver Testsysteme..... | 95 |
| 4.2. Synthese neuer als GAT-Inhibitoren in Frage kommender Verbindungen..... | 96 |
| 4.3. Ermittlung von IC ₅₀ -Werten neuer und bekannter Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern | 98 |
| 5. Praktischer Teil – Biologische Prüfung..... | 104 |
| 5.1. Material | 104 |
| 5.2. Methoden..... | 111 |
| 6. Praktischer Teil – Synthese | 125 |
| 6.1. Allgemeine Angaben..... | 125 |
| 6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften | 127 |
| 6.3. Analytische Daten | 129 |
| 7. Verzeichnis der Abkürzungen | 147 |
| 8. Literaturverzeichnis | 149 |

1. Einleitung

Erkrankungen des Zentralnervensystems zu behandeln, ist eine zunehmend wichtige Aufgabe für die Medizin des 21. Jahrhunderts. Angriffspunkt für viele ZNS-Pharmaka ist die synaptische Übertragung durch die verschiedenen Neurotransmitter. Eine zentrale Rolle spielen dabei die Aminosäuretransmitter, vor allem Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA (1)).



GABA 1

Neben anderen Transmittern kontrolliert GABA die neuronale Aktivität im Gehirn; es ist der wichtigste hemmende Neurotransmitter^[1]. Dies wird daraus ersichtlich, dass eine gezielte Unterdrückung der GABAergen Neurotransmission zu Krampfanfällen führt, die durch eine unkontrollierte Entladung von Neuronen bedingt sind.

Die gezielte Erhöhung der GABA-Konzentration im synaptischen Spalt bietet deshalb einen bedeutenden Ansatzpunkt für die Behandlung neurologischer Erkrankungen wie der Epilepsie^[2]. Andere bislang nur schlecht therapierbare Krankheiten wie Morbus Parkinson^[3] und Morbus Alzheimer^[4] gehen ebenfalls mit einer Störung der GABAergen Neurotransmission einher. Auch hierfür sucht man nach Stoffen, die am GABAergen System angreifen.

In der Regel sind GABAerge Neurone Interneurone, jedoch sind auch Projektionsneurone bekannt. Die synaptische Übertragung durch GABA ist in Abbildung 1 schematisch dargestellt.

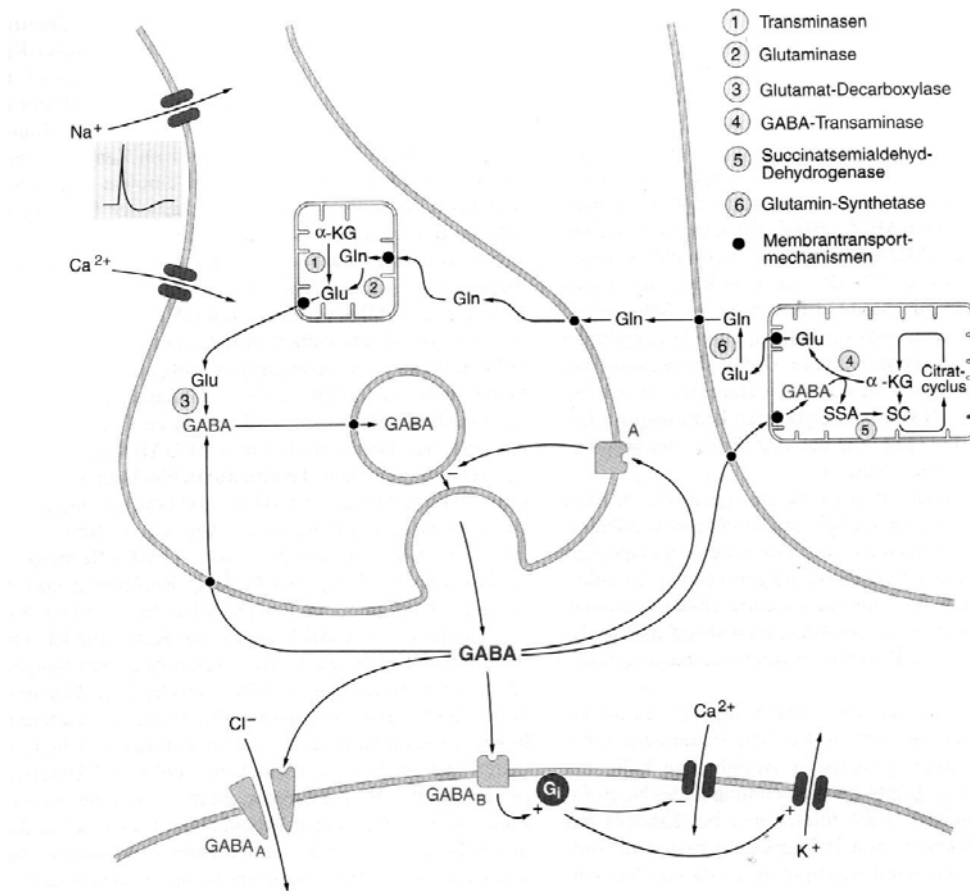


Abb. 1: Synaptische Übertragung durch GABA^[5]

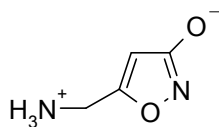
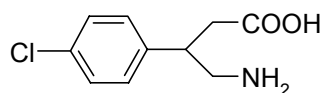
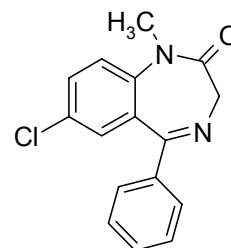
Bemerkenswert ist, dass GABA in der präsynaptischen Zelle aus Glutamat unter Katalyse der Glutamat-Decarboxylase synthetisiert wird. So entsteht aus dem wichtigsten erregenden der wichtigste hemmende Neurotransmitter. Nach seiner Synthese wird GABA in Transportvesikel eingeschleust und dann bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Dort kann es am postsynaptischen Neuron mit zwei verschiedenen Arten von GABA-Rezeptoren interagieren, dem GABA_A- und dem GABA_B-Rezeptor.

Der *GABA_A-Rezeptor* ist ein ligandengesteuerter Ionenkanal. Wird GABA gebunden, öffnet sich der aus fünf Proteinuntereinheiten bestehende Chloridkanal^[6]. Durch die daraus resultierende Hyperpolarisation wird die Zelle gehemmt. Die verschiedenen Untereinheiten

werden in fünf Familien α , β , γ , δ und ϵ eingeteilt, die wiederum in sich heterogen sind (α 1-6, β 1-4, γ 1-3, δ , ϵ). So wären enorm viele Kombinationen möglich. Tatsächlich besteht aber der Hauptanteil der GABA_A-Rezeptoren aus nur etwa 10 Subtypen^[7]. Bevorzugt setzt sich der GABA_A-Rezeptor aus zwei α -, zwei β - und einer γ -Untereinheit zusammen. Als selektiver Agonist des GABA_A-Rezeptors ist das Pilzgift Muscimol (**2**) bekannt^[8].

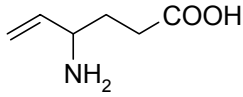
Der GABA_B-Rezeptor ist G-Protein-gekoppelt^[9]. Aktiviert erhöht er die Offenwahrscheinlichkeit von Kaliumkanälen und erniedrigt die Offenwahrscheinlichkeit von Calciumkanälen. So kommt es ebenfalls zu einer Hemmung der Zelle. Ein selektiver Agonist des GABA_B-Rezeptors ist das Baclofen (**3**)^[10].

Pharmakologisch besonders interessant ist der GABA_A-Rezeptor. Durch die Bindung von Benzodiazepinen wie dem Diazepam (**4**) an eine allosterische Bindungsstelle erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch wird die Empfindlichkeit gegenüber GABA und damit dessen hemmende Wirkung verstärkt. Die Benzodiazepine werden in der Medizin vielfach angewandt, zum Beispiel bei Angstzuständen, Schlafstörungen und Epilepsie.

Muscimol **2**Baclofen **3**Diazepam **4**

Nach seiner Freisetzung wird GABA schnell aus dem synaptischen Spalt entfernt, entweder durch Abdiffusion oder durch spezifische Transporter. Im letzteren Fall wird es in präsynaptische Zellen und umliegende Gliazellen aufgenommen. Dort kann GABA durch die GABA-Transaminase enzymatisch zu Succinsemialdehyd abgebaut und so inaktiviert werden.

Die irreversible Hemmung der GABA-Transaminase ist das Wirkprinzip des Antiepileptikums Vigabatrin (**5**)^[11].



Vigabatrin **5**

Werden die Transporter inhibiert, die GABA aus dem synaptischen Spalt in präsynaptische Zellen und Gliazellen zurückbefördern, so wird in der Folge die GABAerge Transmission verstärkt. Daher kommt auch der Entwicklung solcher Inhibitoren große Bedeutung zu: Sie bieten Ansatzpunkte für die Behandlung neurologischer Krankheiten, insbesondere der Epilepsie.

Bisher wurden vier verschiedene GABA-Transporter nachgewiesen: GAT-1, GAT-2, GAT-3 und BGT-1. Zu beachten gilt, dass die GABA-Transporter der Maus in ihrer *Nomenklatur* von den übrigen Spezies (Mensch, Ratte, Schwein) abweichen. So entspricht der murine GABA-Transporter mGAT1 dem GAT-1, mGAT2 dem BGT-1, mGAT3 dem GAT-2 und mGAT4 dem GAT-3 anderer Spezies. Alle GABA-Transporter sind Natrium- und Chlorid-gekoppelt. GAT-1 und GAT-3 wurden ausschließlich im Zentralnervensystem nachgewiesen – hier speziell an Neuronen und Typ-2-Astrozyten. GAT-2 und BGT-1 hingegen kommen außer im ZNS auch in einigen anderen Geweben vor. Im ZNS fand man GAT-2 an Typ-2-Astrozyten und BGT-1 an Neuronen, Typ-1-Astrozyten und Typ-2-Astrozyten^[12]. Daneben existiert GAT-2 auch in peripheren Geweben wie der Leber. BGT-1, das nicht nur GABA, sondern auch Betain transportiert, konnte vor allem in der Niere nachgewiesen werden^[13]. Für alle vier Subtypen der GABA-Transporter nimmt man an, daß sie zwölf transmembrane Domänen besitzen^[14,15,16]. In Abbildung 2 ist dies für den GABA-Transporter 1 der Ratte (rGAT-1) veranschaulicht.

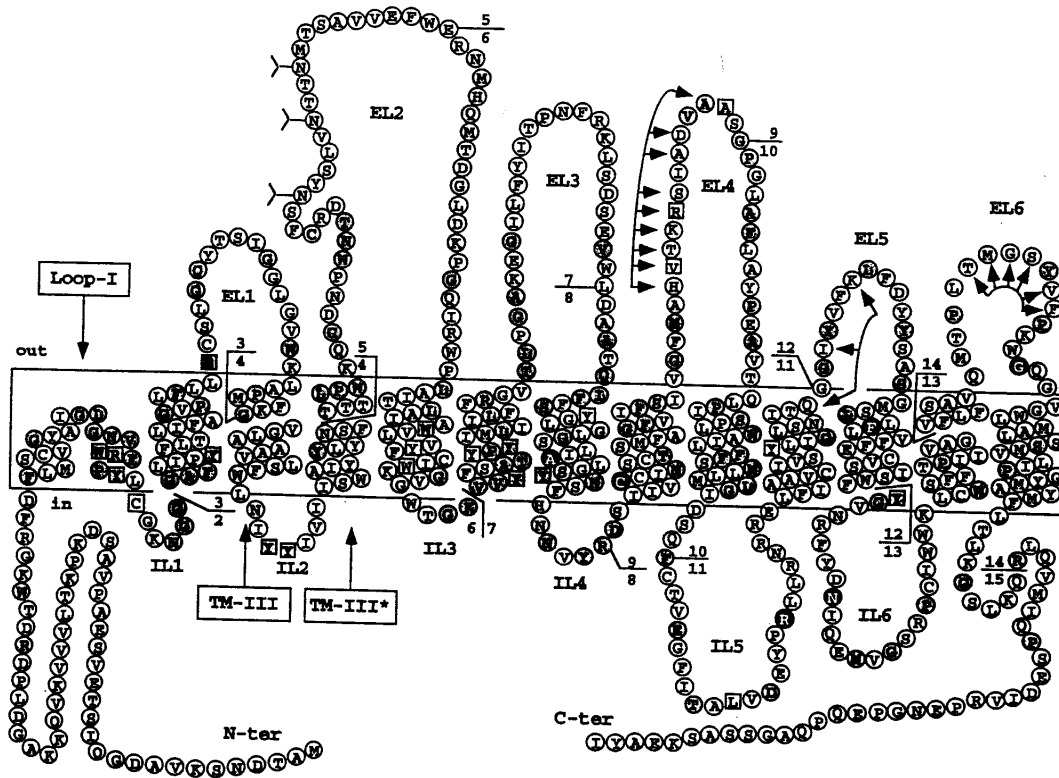


Abb. 2: Modell der Membran-Orientierung von rGAT-1^[17]

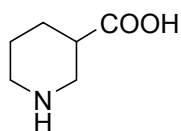
In verschiedenen Studien wurde die Bedeutung der zwölf transmembranen Domänen und ihrer Schleifen für rGAT-1 untersucht. Es hat sich erwiesen, daß weder der NH₂- noch der COOH-Terminus für die Transportfunktionen von Bedeutung sind^[18,19], während die hydrophilen Schleifen EL4 und IL5 dafür wesentlich sind^[20]. Die Schleifen EL4-6 bilden wahrscheinlich eine Tasche, in die das Substrat bindet^[21]. Loop-I (und hier vor allem Arg-69) ist vermutlich essentiell für die Transportfunktion^[22]. Es wird angenommen, dass insbesondere Tyr-140 (TM III oder IL2)^[23] und Trp-222 (TM IV)^[24] an der Bindung der Aminogruppe des Substrats beteiligt sind. Nach der Bindung von Substrat und Coionen (zwei Na⁺, ein Cl⁻)^[25] kommt es wahrscheinlich zu einem stufenweisen Konformationswechsel, durch den das Substrat ins Zellinnere transportiert wird. Der genaue Ablauf dieses Prozesses ist jedoch bis heute ungeklärt^[26].

Bislang sind von der Maus und der Ratte jeweils alle vier GABA-Transporter kloniert worden, wohingegen vom Menschen nur Klone von hGAT-1, hGAT-3 und hBGT-1 existieren, für hGAT-2 ist also kein Klon vorhanden^[27,28,29,30,31,32,33,34,35]. Die humanen GABA-Transportproteine zeigen untereinander relativ hohe Ähnlichkeit in ihrer Primärstruktur (etwa 40 %)^[36]. Auch zwischen den verschiedenen Spezies besteht – wie Tabelle 1 zu entnehmen ist – innerhalb desselben Transporter-Subtyps durchwegs sehr hohe Ähnlichkeit.

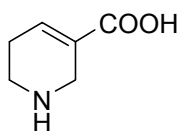
| | GAT-1 | GAT-2 | GAT-3 | BGT-1 |
|------------------|-------|-------|-------|-------|
| Mensch vs. Ratte | 97 % | 90 % | 95 % | 86 % |
| Mensch vs. Maus | 96 % | 91 % | 95 % | 87 % |

Tab. 1: Homologie der Primärstruktur der GABA-Transportproteine zwischen Mensch und Ratte bzw. Maus^[37]

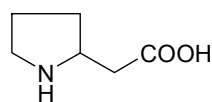
Als Leitstrukturen für Inhibitoren der GABA-Transporter konnten in vitro Nipicotinsäure (**6**) und Guvacin (**7**) gefunden werden^[38]. Auch das von Fülep^[39] untersuchte Homoprolin (**8**) erweist sich als hervorragende Leitstruktur für neue GAT-Inhibitoren.



Nipicotinsäure **6**



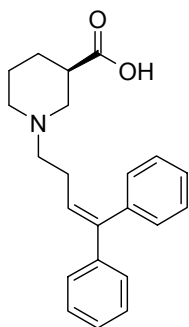
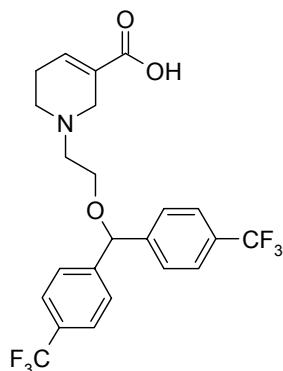
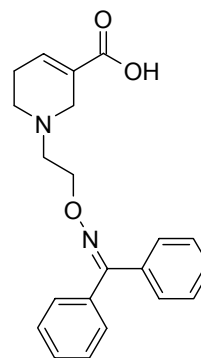
Guvacin **7**



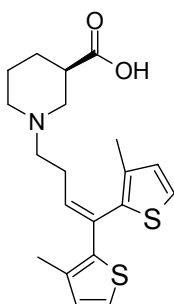
Homoprolin **8**

In vivo sind diese Substanzen wie auch GABA selbst zu hydrophil, um die Blut-Hirn-Schranke zu überschreiten. Um die Verbindungen ZNS-gängig zu machen, mussten in die Leitstrukturen am Stickstoff lipophile Reste eingeführt werden. Dabei stellte sich heraus, dass kleine lipophile Reste die Affinität zu den Transportern verringerten, während große lipophile Reste sehr potente Verbindungen wie das SKF 89976A (**9**) lieferten^[40]. Später fand man weitere hochaffine Uptake-Inhibitoren wie CI966 (**10**)^[41] und NO711 (**11**)^[42].

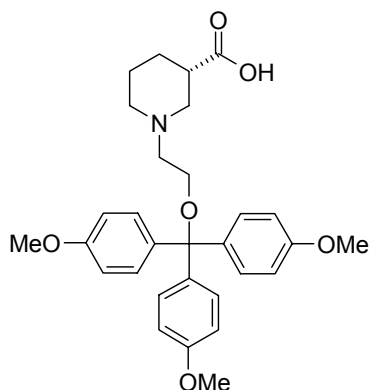
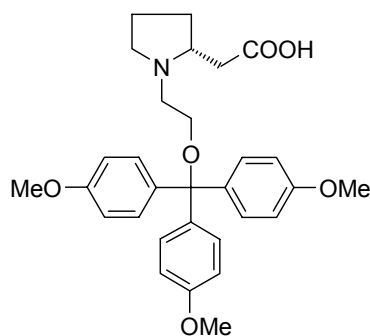
Die IC_{50} -Werte dieser Substanzen an hGAT-1 betragen $0.2 \mu\text{M}$ für SKF89976A, $0.34 \mu\text{M}$ für CI966 und $0.047 \mu\text{M}$ für NO711^[43]. Gemeinsam ist diesen Verbindungen, dass sie selektiv für GAT-1 sind und an den anderen GABA-Transportern praktisch keine Wirkung zeigen^[44].

SKF89976A **9**CI966 **10**NO711 **11**

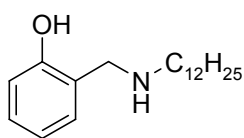
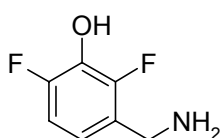
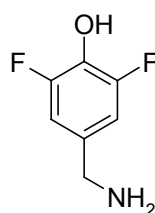
Ein weiterer selektiver GAT-1-Inhibitor, das (*R*)-Tiagabin (**12**) (IC_{50} : $0.07 \mu\text{M}$), dient unter dem Handelsnamen Gabitril[®] als Add-on-Therapeutikum zur Behandlung von epileptischen Erkrankungen bei partiellen Anfällen mit oder ohne sekundäre Generalisierung^[45].

(*R*)-Tiagabin **12**

Auch für GAT-3 wurden selektive Substanzen gefunden. Hierbei handelt es sich insbesondere um das (*S*)-SNAP5114 (**13**)^[46] mit einem IC_{50} -Wert von $5 \mu\text{M}$ an hGAT-3 und $388 \mu\text{M}$ an hGAT-1, was einer Selektivität von etwa 78:1 (hGAT-3:hGAT-1) entspricht^[46]. Inzwischen konnten noch weitere für GAT-3 selektive Substanzen entdeckt werden, insbesondere das von Fülep charakterisierte Pyrrolidinessigsäurederivat **14**^[39] mit einem IC_{50} -Wert von $3.1 \mu\text{M}$ an pGAT-3 (Schwein) und einer Selektivität von 20:1 (pGAT-3:pGAT-1).

(S)-SNAP5114 **13****14**

Als Inhibitoren der GAT-Proteine sind des Weiteren seit langem die von Iversen *et al.* untersuchten Phenole^[47] bekannt. Hier sind besonders die am Aminstickstoff mit einem Dodecyl-Rest substituierten Aminomethylphenole (**15**) zu erwähnen. Die relativ geringe Potenz dieser Substanzen erklärt sich vermutlich aus ihrer zu geringen Acidität, wodurch es unter physiologischen Bedingungen nicht zu ausreichender Dissoziation kommt. Silverman *et al.* haben schließlich unter Fluorphenolderivaten sehr potente Bioisostere zu GABA gefunden^[48]. Als Leitstrukturen sind hier das 3-(Aminomethyl)-2,6-difluorphenol (**16**) und das 4-(Aminomethyl)-2,6-difluorphenol (**17**) zu nennen. Diese beiden Substanzen werden von Silverman *et al.* als kompetitive Inhibitoren der GABA-Aminotransferase beschrieben.

**15****16****17**

In der vorliegenden Arbeit sollten nun Derivate der genannten Strukturen **15**, **16**, und **17** synthetisiert und auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren an neu zu entwickelnden Testsystemen geprüft werden.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte folgende vorrangige Ziele:

- Es sollten neue selektive Testsysteme für die murinen GABA-Transporter mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 sowie den humanen GABA-Transporter hGAT-1 entwickelt werden.
- Es sollten neue Substanzen synthetisiert werden, die aufgrund ihrer Molekülstruktur als GAT-Inhibitoren in Frage kämen. Diese würden dann an den neu entwickelten Testsystemen bezüglich ihrer Potenz als Inhibitoren der vier verschiedenen GAT-Proteine sowie ihrer Subtypenselektivität untersucht werden. Dabei könnten neue potente und subtypenselektive GAT-Inhibitoren entdeckt werden.
- Es sollten bekannte Substanzen an den neu entwickelten Testsystemen auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren hin untersucht werden und dabei
 - o Grundstrukturen für neue GAT-Inhibitoren gefunden,
 - o Subtypenselektivitäten über alle vier verschiedenen Transporter hinweg bestimmt und ausgehend von diesen womöglich neue Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die verschiedenen GABA-Transporter erstellt und
 - o eventuell bestehende Speziesunterschiede hinsichtlich der Potenz der Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 aufgedeckt werden.

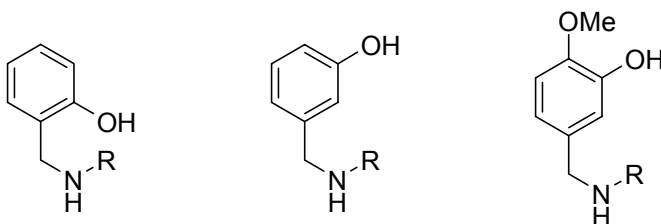
Aufbau von selektiven Testsystemen

In der vorliegenden Arbeit sollten Testsysteme für die vier GABA-Transporter geschaffen werden, die für jeweils einen der Subtypen selektiv sind. Dazu müssten die einzelnen GAT-Proteine in Zelllinien exprimiert werden. Wird nämlich natives Hirnmaterial verwendet, so muss immer mit der Anwesenheit anderer störender GAT-Proteine gerechnet werden. Besonders zu beachten ist weiterhin, dass für GAT-2 und BGT-1 bislang kein auf nativem Hirnmaterial beruhendes Testsystem etabliert ist. Um Daten erheben zu können, ist man deshalb auf kloniertes Material angewiesen.

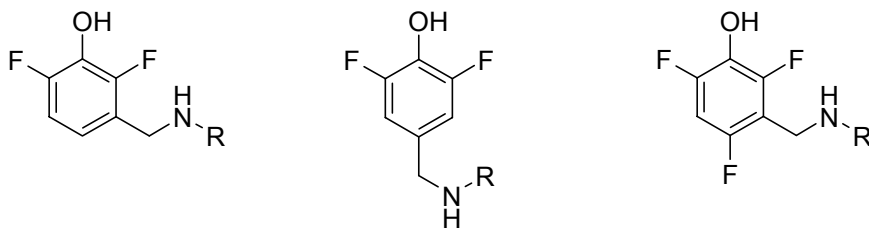
Zunächst sollten die murinen GABA-Transporter mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 (entsprechend den humanen GABA-Transportern hGAT-1, hBGT-1, hGAT-2 und hGAT-3) sowie der humane GABA-Transporter hGAT-1 transient und später auch stabil in Zelllinien exprimiert werden. Darauf basierend wäre es möglich, Testsysteme aufzubauen, mit denen die IC_{50} -Werte von bekannten und neuen Substanzen am jeweiligen GABA-Transporter-Subtyp bestimmt werden. Die Expression der verschiedenen Transporter durch die Zellen kann durch Immunpräzipitation des Proteins und anschließenden Westernblot nachgewiesen werden.

Synthese neuer als GAT-Inhibitoren in Frage kommender Verbindungen

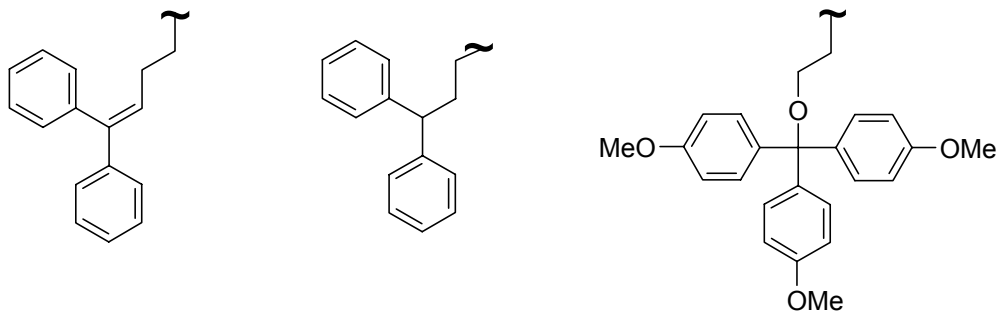
Im Rahmen der Arbeit sollten verschiedene Derivate der von Iversen *et al.*^[47] bereits als GAT-Inhibitoren beschriebenen Aminomethylphenole synthetisiert werden. Insbesondere wurden folgende Zielstrukturen näher in Betracht gezogen:



Aminomethylphenole gelten als Bioisostere zu GABA. Dabei imitiert die Hydroxylgruppe die Carboxylfunktion von GABA. Während unter physiologischen Bedingungen GABA praktisch vollständig dissoziiert ist, liegen die Aminomethylphenole hier nur zu einem Bruchteil als Zwitterionen vor. Damit erfüllen sie dieses wichtige Kriterium für potente GAT-Inhibitoren nur unzureichend. Silverman *et al.*^[48] beschrieben Aminomethylfluorphenole als kompetitive Inhibitoren der GABA-Aminotransferase. Diese Verbindungen weisen, bedingt durch die Fluorsubstitution, eine wesentlich höhere Acidität auf und liegen unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig als Zwitterionen vor. Derivate dieser im Folgenden abgebildeten Leitstrukturen sollten sich also womöglich als noch potentere GAT-Inhibitoren erweisen als Derivate der Aminomethylphenole.



Bei den Resten R handelt es sich um große lipophile Strukturen, welche die Substanzen zum einen ZNS-gängig machen und zum anderen die Affinität zu den verschiedenen Transportern sowie die Subtypenselektivität deutlich erhöhen. Aus der Literatur sind viele derartige Reste bekannt^[40,41,42,46]. In der vorliegenden Arbeit sollten die im Folgenden abgebildeten drei Reste verwendet werden. Die ersten beiden Reste eignen sich insbesondere für selektive GAT-1-Inhibitoren, während der dritte Rest günstig für GAT-3-Inhibitoren ist:



Screening verschiedener Substanzen an den neu etablierten Testsystemen

Die in der vorliegenden Arbeit neu synthetisierten Substanzen sollten zunächst an den vier murinen GABA-Transportern sowie dem humanen GABA-Transporter hGAT-1 bezüglich ihrer Potenz und Subtypenselektivität vollständig charakterisiert werden. Dabei könnten womöglich neue, potente und subtypenselektive GAT-Inhibitoren entdeckt werden.

Beim Screening von bekannten Substanzen an Zelllinien, die transient die vier murinen GABA-Transporter exprimieren, sollte nach Grundstrukturen für neue potente GAT-Inhibitoren gesucht werden. Schließlich würden die erzielten Ergebnisse insbesondere auch dahingehend geprüft werden, welche Subtypenselektivitäten die verschiedenen Stoffe an den vier murinen GABA-Transportern zeigen. Dabei könnten neue, spezifische Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die einzelnen GABA-Transporter-Subtypen erstellt werden, die so bislang noch nicht existieren und hilfreich bei weiteren Entwicklungen sein sollten.

Des Weiteren würde auch die Potenz der verschiedenen GAT-Inhibitoren am *humanen* Transporter hGAT-1 ermittelt werden; schließlich stammt er von der Spezies, an der die zu entwickelnden Arzneistoffe später auch zum Einsatz kommen. In diesem Zusammenhang sollte dann noch untersucht werden, ob hinsichtlich der Potenz der GAT-Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 Speziesunterschiede bestehen. Dies ist deshalb bedeutsam, weil bei der Suche nach neuen Arzneistoffen erste Tests bezüglich deren Potenz häufig am Transporter von der Maus durchgeführt werden und eben nicht am humanen GABA-Transporter. Es gilt also herauszufinden, ob die an den murinen Testsystemen erzielten Ergebnisse denen äquivalent sind, die am humanen Testsystem ermittelt wurden.

3. Theoretischer Teil

3.1. Bereitstellung der cDNAs von mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 in geeigneten eukaryontischen Expressionsvektoren

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, subtypenselektive Testsysteme für die murinen GABA-Transporter mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 sowie den humanen GABA-Transporter hGAT-1 zu entwickeln. Dazu mussten die genannten Transporter in Säugerzelllinien exprimiert werden. Zuvor war es allerdings nötig, die verschiedenen GAT-Proteine durch Umklonieren in geeigneten eukaryontischen Expressionsvektoren bereitzustellen.

3.1.1. Eukaryontische Expressionsvektoren

Als eukaryontische Expressionsvektoren wurden die Invitrogen-Plasmide pRc/CMV und pcDNA3.1(+) verwendet.

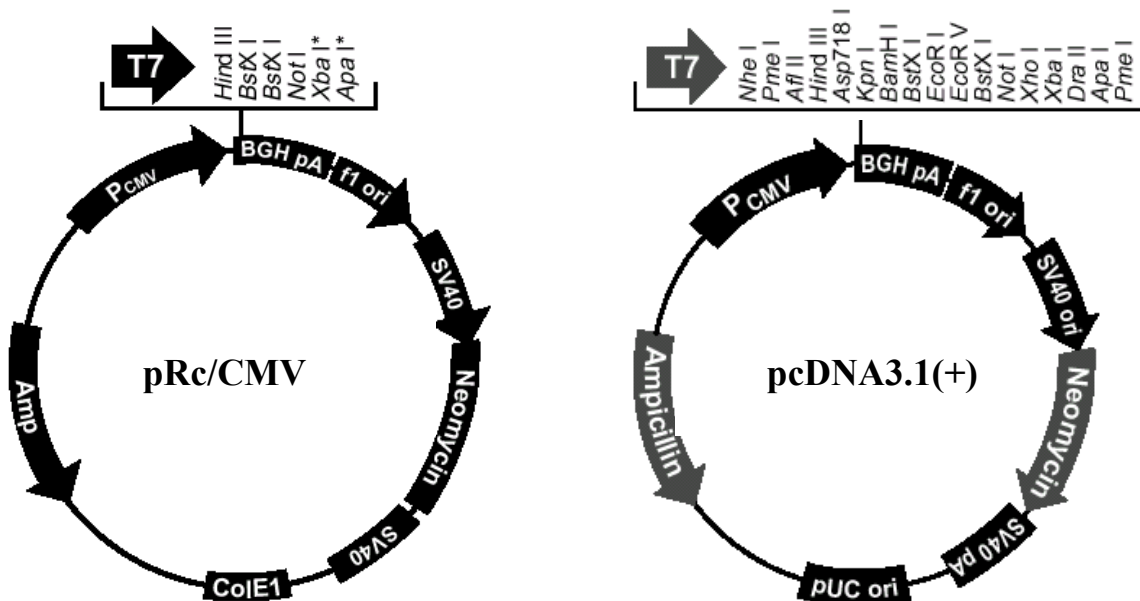


Abb. 3: pRc/CMV und pcDNA3.1(+)^[49]

Sowohl pRc/CMV als auch pcDNA3.1(+) enthalten Funktionselemente, die eine Vermehrung und Selektion in *E.coli* ermöglichen, nämlich den Replikationsursprung colE1 origin (pRc/CMV) beziehungsweise pUC origin (pcDNA3.1(+)), sowie das β -Lactamase-Gen, das eine Ampicillin-Resistenz bedingt. Daneben besitzen beide Vektoren eukaryontische Funktionselemente. Hierzu zählen der CMV promoter, an dem die Transkription gestartet wird, und die BGH polyadenylation sequence, durch welche die Transkription beendet wird. Außerdem sind der SV40 promoter, die SV40 origin of replication und die SV40 polyadenylation sequence enthalten. In Verbindung mit COS-7 Zellen entsteht daraus ein sehr effizientes Wirts-Vektor-System: Der Vektor wird in der Wirtszelllinie stark vermehrt, was zu extrem hohen Ausbeuten an Fremd-Protein führt^[50]. pRc/CMV und pcDNA3.1(+) besitzen weiterhin das Gen für die Neomycin-Phosphotransferase, das die Selektion stabiler Zelllinien mit G418 ermöglicht. Die multiple cloning site (MCS) beider Vektoren enthält Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen, die im Einzelnen Abbildung 3 zu entnehmen sind; so können die zu klonierenden fremden DNA-Fragmente in die Plasmide eingebaut werden.

3.1.2. Umklonierung von mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 in pcDNA3.1(+)

Die für den murinen GABA-Transporter mGAT1 kodierende cDNA wurde von Prof. Lüddens, Universität Mainz, zur Verfügung gestellt. Sie war bereits in den Vektor pRc/CMV kloniert. Somit konnte sie ohne weitergehende Maßnahmen verwendet werden.

Die cDNAs von mGAT2, mGAT3 und mGAT4 sowie hGAT-1 wurden von Prof. Nelson, Universität Tel Aviv, zur Verfügung gestellt. mGAT2 war kloniert in den Oozytenexpressionsvektor pGEM-HJ, der für eine Expression in Säugerzelllinien ungeeignet ist. mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 waren in pBluescript kloniert, welches die Expression in Säugerzelllinien ebenfalls nicht zulässt. Die cDNAs mussten also in einen geeigneten eukaryontischen Expressionsvektor umkloniert werden. Die Wahl fiel dabei auf

pcDNA3.1(+), da dieser in seiner MCS Erkennungssequenzen für verschiedenste Restriktionsenzyme besitzt. Dadurch sollte es möglich sein, die jeweiligen GABA-Transporter relativ einfach in diesen Vektor zu insertieren.

Um schließlich die cDNAs umzuklonieren, mussten diese zunächst aus dem Ursprungsplasmid durch geeignete Restriktionsendonukleasen herausgeschnitten werden. Gleichzeitig erfolgte ein Verdau des Zielvektors pcDNA3.1(+) mit den passenden Restriktionsendonukleasen. pcDNA3.1(+) wurde im Anschluß daran durch Calf intestinal phosphatase (CIP) am 5'-Ende dephosphoryliert, um bei der Ligation der GABA-Transporter-cDNA mit pcDNA3.1(+) zu erreichen, dass ausschließlich Insert und Vektor miteinander verbunden wurden. Die Ligation erfolgte durch die T4-DNA-Ligase. In Abbildung 4 ist dies schematisch dargestellt.

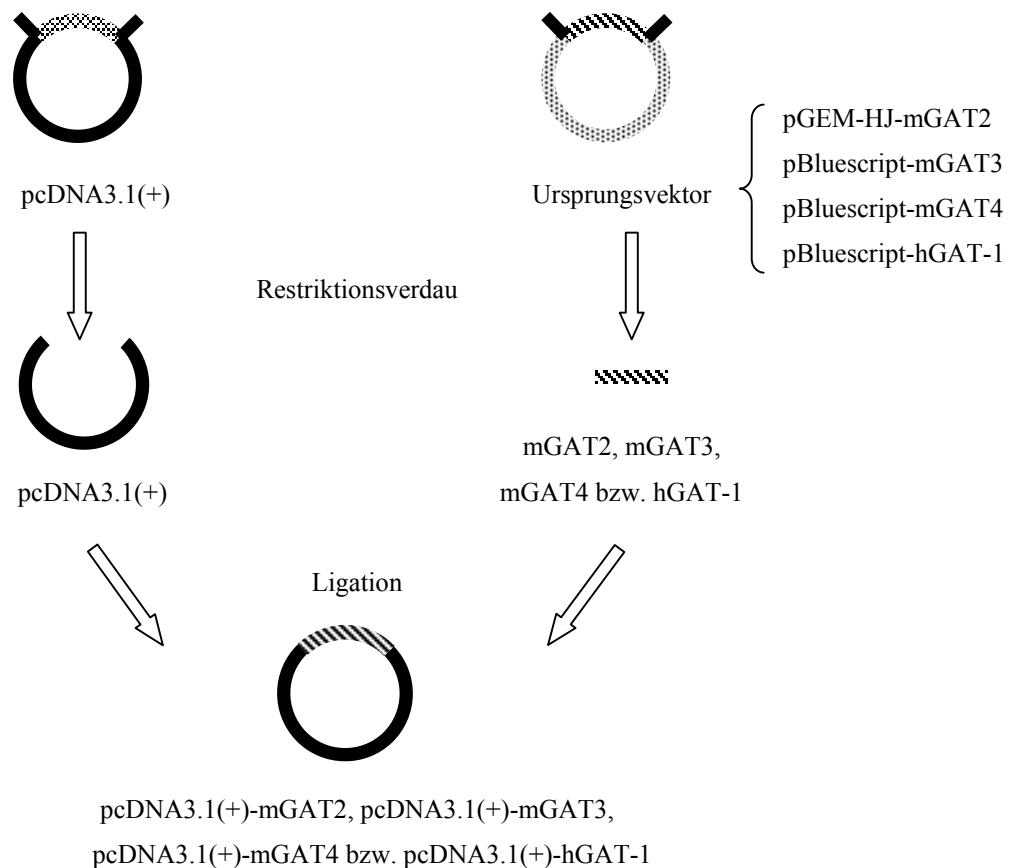


Abb. 4: Umklonierung

Im Folgenden wird die Umklonierung für die einzelnen cDNAs im Detail besprochen.

mGAT2

Die cDNA, die für mGAT2 kodiert, konnte durch Restriktionsverdau mit *Bam*H I und *Xho* I aus pGEM-HJ ausgeschnitten werden. Gleichzeitig wurde der Zielvektor pcDNA3.1(+) mit denselben Restriktionsenzymen geöffnet. Im Anschluß daran erfolgte die Ligation der cDNA von mGAT2 mit dem Zielvektor.

mGAT3

Die für mGAT3 kodierende cDNA ließ sich aus dem Ursprungsvektor pBluescript nur durch Restriktionsverdau mit *Spe* I und *Pvu* I sinnvoll ausschneiden. pcDNA3.1(+) besitzt aber weder für *Spe* I noch für *Pvu* I Schnittstellen in der MCS. Jedoch kann ein durch *Spe* I geschnittenes DNA-Fragment mit einem durch *Nhe* I geschnittenen DNA-Fragment ligiert werden, da beide Enzyme miteinander kompatible klebrige Enden produzieren. Da in der MCS von pcDNA3.1(+) *Nhe* I enthalten ist, war es möglich, beide Fragmente auf der einen Seite miteinander zu ligieren. Ein durch *Pvu* I geschnittenes DNA-Fragment konnte allerdings nicht ohne weiteres in die MCS von pcDNA3.1(+) eingefügt werden. Daher musste mit einem kurzen doppelsträngigen DNA-Stück (Adapter) gearbeitet werden, welches zwischen das mit *Pvu* I geschnittene DNA-Fragment und den mit *Bam*H I aufgeschnittenen pcDNA3.1(+) eingefügt wurde. So konnte letztendlich die cDNA von mGAT3 erfolgreich in pcDNA3.1(+) ligiert werden. Das ist in Abbildung 5 veranschaulicht.

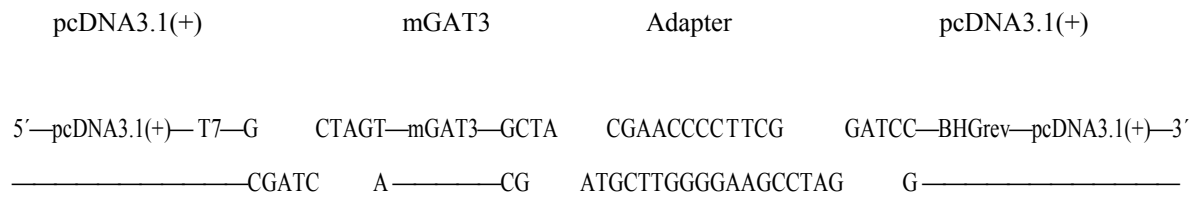


Abb. 5: Ligation von mGAT3 und pcDNA3.1(+)

mGAT4

pBluescript-mGAT4 enthielt die gesamte publizierte für mGAT4 codierende cDNA^[31]. Diese besteht aus 4127 Basenpaaren. Für mGAT4 codieren allerdings nur die ersten 1922 Basenpaare. Da pcDNA3.1(+) selbst schon aus 5500 bp besteht, würde der Einbau der kompletten cDNA von mGAT4 zu einer Plasmidgröße von etwa 9500 bp führen. Bakterien sind nur schwer mit Vektoren dieser Größe zu transformieren. Auch die Transfektion von Säugerzelllinien mit Vektoren derartiger Größe ist problematisch. Daher wurde nach einem Weg gesucht, ausschließlich die für mGAT4 codierende cDNA in pcDNA3.1(+) zu ligieren. Es stellte sich heraus, dass durch die Restriktionsendonuklease *Xba* I die cDNA von mGAT4 bei Base 2175 geschnitten werden kann. So würde der für mGAT4 nicht codierende Teil der cDNA weitgehend entfernt. Weiterhin war es möglich, die cDNA vor dem Startcodon durch *EcoR* I aus pBluescript auszuschneiden. So wurde mGAT4 schließlich durch Restriktionsverdau mit *EcoR* I und *Xba* I aus dem Ursprungsvektor gewonnen und in den durch dieselben Enzyme verdauten pcDNA3.1(+) eingefügt.

hGAT-1

Die für hGAT-1 codierende cDNA wurde mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Xho* I aus dem Ursprungsplasmid pBluescript ausgeschnitten und danach in den Zielvektor pcDNA3.1(+) ligiert, der durch dieselben Restriktionsendonukleasen geöffnet wurde.

Transformation kompetenter *E.coli*, Minipräp, Maxipräp

Nachdem pcDNA3.1(+) und die für den jeweiligen GABA-Transporter codierende cDNA ligiert waren, wurden TSS kompetente *E.coli* mit den Ligationsprodukten transformiert. Bakterien, die einen Vektor aufgenommen hatten, konnten durch Ausplattieren auf ampicillin-haltige Agarplatten selektiert werden. Einzelne Bakterienkolonien dieser Platten wurden anschließend vermehrt. Minipräparationen lieferten ausreichende Plasmid-DNA-Mengen für weitergehende Analysen: Beim *Restriktionsverdau* der isolierten Vektor-DNA mit einem geeigneten Restriktionsenzym konnte man Fragmente definierter Länge erhalten und so überprüfen, ob das Insert korrekt in pcDNA3.1(+) eingebaut worden war. Für alle vier cDNAs ist es gelungen, ein Plasmid zu finden, in dem das Insert vollständig und in der richtigen Orientierung integriert war. Stellvertretend für die vier Cuts ist in Abbildung 6 das Ergebnis der Restriktionsanalyse für hGAT-1 abgebildet. *Bam*H I schneidet die aus 2131 Basenpaaren bestehende cDNA von hGAT-1 bei Basenpaar 899 und 1699 sowie den 5400 Basenpaare großen pcDNA3.1(+) 23 Basenpaare vor dem eingefügten Insert. Beim korrekten Einbau der DNA von hGAT-1 in pcDNA3.1(+) müssen also Fragmente von etwa 800, 920 und 5830 Basenpaaren erhalten werden. Dies war der Fall. Zusätzlich wurde noch jeweils eine *Sequenzierung* der Insert-DNA durchgeführt, um absolut sicherzustellen, dass es sich bei dem in pcDNA3.1(+) eingefügten DNA-Fragment tatsächlich um die cDNA des jeweiligen Transporters handelte. Eine einzelne transformierte Bakterienkolonie wurde dann jeweils entsprechend weitervermehrt. Aus dieser konnte anschließend die Plasmid-DNA durch

Maxipräparation isoliert werden. So erhielt man für spätere Transfektionsversuche ausreichende Mengen an Expressionsvektoren.

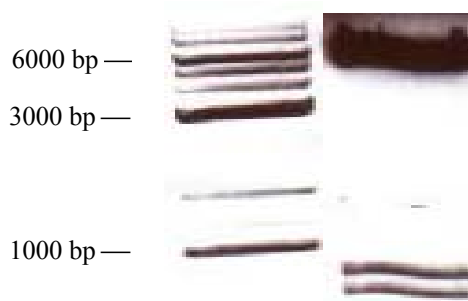


Abb. 6: Cut von pcDNA3-1(+)-hGAT-1 mit *Bam*H I (Spur 1: Basenpaarmarker; Spur 2: Cut)

3.1.3. Versuch der Isolierung der für hGAT-3 codierenden cDNA

Da ich die für den humanen GABA-Transporter hGAT-3 codierende cDNA nicht von Professor Nelson oder auf anderem Wege erhalten konnte, blieb nur die Möglichkeit, die beiden I.M.A.G.E.^[F1]-Klone 2781892^[51] und 5313099^[52] zu untersuchen. Bekannt war, dass die ersten 434 Basen des I.M.A.G.E.-Klons 2781892 beziehungsweise die ersten 644 Basen des I.M.A.G.E.-Klons 5313099 mit der cDNA von hGAT-3 übereinstimmen. Zur Sicherheit wurde die Insert-DNA beider Klone vollständig sequenziert. Dabei stellte sich heraus, dass die für hGAT-3 codierende cDNA in beiden Fällen nicht komplett enthalten war. Es fehlten jeweils mindestens die letzten 1000 Basenpaare. Dies bedeutete, dass die beiden I.M.A.G.E.-Klone unbrauchbar waren. Weitere I.M.A.G.E.-Klone, die einen Teil der für hGAT-3 codierenden cDNA enthalten, sind nicht bekannt. Die einzige verbleibende Möglichkeit, doch noch die cDNA zu erhalten, besteht darin, verschiedene cDNA-Genbanken dahingehend zu untersuchen, ob die cDNA von hGAT-3 in einem der Vektoren komplett enthalten ist. Dies konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit aus Zeitgründen nicht mehr realisiert werden.

^[F1] I.M.A.G.E.: Integrated Molecular Analysis of Genomes and their Expression

3.2. Transiente Transfektion von Säugerzelllinien mit GABA-Transportern, Aufbau subtypenselektiver Testsysteme

Nachdem nun alle cDNAs in geeigneten eukaryontischen Expressionsvektoren bereitgestellt waren, sollten diese im weiteren Verlauf der Arbeit – zunächst transient – in Säugerzelllinien exprimiert werden und darauf basierend neue, für die einzelnen GABA-Transporter subtypenselektive Testsysteme aufgebaut werden.

Um COS-7 Zellen transient mit einem Expressionsvektor zu transfizieren, wurde in ersten Versuchen die Methode der Calciumphosphat-vermittelten Transfektion gewählt. Dabei bildet sich ein Calciumphosphat-DNA-Zusammenschluss, der auf die Oberfläche der zu transfizierenden Zellen präzipitiert. Das Copräzipitat wird schließlich durch Endozytose in die Zellen aufgenommen^[53]. 48 Stunden nach der Transfektion können die Zellen geerntet werden.

Die Effizienz dieser Methode ist nur gering. Dies bedeutet, dass die Signalhöhe relativ zu einer Negativkontrolle aus nicht transfizierten Zellen sehr niedrig ist. Sie war jedoch für erste Vorversuche ausreichend, in denen es galt, Testsysteme für mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 aufzubauen und diese zu optimieren.

Wie schon früher erwähnt, ist zu beachten, dass

- mGAT1 dem GAT-1,
- mGAT2 dem BGT-1,
- mGAT3 dem GAT-2,
- mGAT4 dem GAT-3

anderer Spezies (Mensch, Ratte, Schwein) äquivalent ist.

Jedes der neu entwickelten Testsysteme wird für den jeweiligen Transporter, also für mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 oder hGAT-1, selektiv sein. Die Anwesenheit eines anderen GABA-Transporters als des vorgesehenen kann ausgeschlossen werden, da COS-7 und HEK Zellen diese Transporter nativ nicht exprimieren. Verwendet man dagegen eine Präparation aus Hirnmaterial, um beispielsweise den durch GAT-3 vermittelten GABA-uptake zu untersuchen, so ist nicht auszuschließen, dass auch andere GABA-Transporter anwesend sind. Hier kann man versuchen, das Material so aufzureinigen, dass nur der gewünschte Transporter übrig bleibt. Das kann aber sehr aufwendig sein und gelingt nicht immer. Im Fall von GAT-3 wurde gefunden, dass selbst nach dem Aufreinigen noch ein beträchtlicher Anteil an GAT-1 vorhanden war^[54]. Das Problem wurde dann so gelöst, dass ein selektiver GAT-1-Inhibitor (10 μ M NO711) zugesetzt wurde, um damit die durch GAT-1 verursachte Störung zu unterdrücken. Trotzdem kann man nie sicher sein, dass GAT-1 in einem solchen Testsystem vollständig inaktiviert ist und nicht den ermittelten IC₅₀-Wert einer Substanz auf GAT-3 verfälscht. Dieses Risiko besteht hingegen nicht, wenn man – wie in der vorliegenden Arbeit – kloniertes Material verwendet, bei dem man sicher sein kann, dass eben nur der gewünschte Transporter exprimiert wird.

Ein weiterer Nachteil von Hirnpräparationen besteht eben darin, dass mit nativem Material gearbeitet wird. Im Zuge von BSE wurde bereits der Umgang mit Rinderhirnen unter die Sicherheitsstufe S2 gestellt, die den routinemäßigen Ablauf der Assays sehr erschwert. Es wird momentan erwogen, auch die Arbeit mit Hirnmaterial anderer Spezies unter S2 zu stellen, da man das Risikopotential nicht ausreichend einschätzen kann. Dann könnten diese Testsysteme nur noch unter sehr großen Schwierigkeiten aufrecht erhalten werden.

Durch die Arbeit mit kloniertem Material ist es zudem möglich, selbst Testsysteme für GAT-2 und BGT-1 zu etablieren. Mit einer Hirnpräparation sind diese beiden Transporter

nicht in der erforderlichen Menge und Reinheit zugänglich. Um IC_{50} -Werte an diesen Transportern zu ermitteln, ist man somit sogar auf kloniertes Material angewiesen.

Aus der Literatur sind Testsysteme für die verschiedenen GABA-Transporter, die mit kloniertem Material arbeiten^[z.B. 30,55,56], bereits bekannt. Die Vorgehensweise bei den dort beschriebenen Assays ist miteinander vergleichbar: Die Zellen werden in Multiwellschalen ausgesät und transient mit dem entsprechenden Vektor transfiziert. 48 Stunden später wird der zu untersuchende GAT-Inhibitor in verschiedenen Konzentrationen in die einzelnen Vertiefungen eingebracht, radioaktiv markiertes GABA ($[^3H]$ GABA) zugegeben und für eine definierte Zeit bei $37^{\circ}C$ inkubiert. Der Transport von $[^3H]$ GABA in die transfizierten Zellen wird dann durch Waschen mit eiskaltem Puffer abgebrochen. Anschließend müssen die Zellen aus jedem *einzelnen* well lysiert werden. Ein Aliquot davon wird eingesetzt, um die Radioaktivität zu messen und die Proteinbestimmung (aus allen Einzelproben!) durchzuführen. Diese Vorgehensweise ist äußerst zeitaufwendig und erlaubt keinen größeren Probendurchsatz. Die im Rahmen dieser Arbeit neu zu entwickelnden Testsysteme sollten die bisher bekannten Testsysteme, die mit kloniertem Material arbeiten, *deutlich* vereinfachen. So könnte eine Vielzahl an Substanzen in relativ geringer Zeit an diesen Testsystemen untersucht werden.

G. Höfner^[54] hat im Arbeitskreis gut funktionierende Testsysteme für die porcinen GABA-Transporter pGAT-1 und pGAT-3 etabliert, die mit nativem Hirnmaterial arbeiten. Beide Testsysteme erlauben einen sehr hohen Probendurchsatz. Da geplant war, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation neu zu entwickelnden Testsysteme in Analogie zu denen von G. Höfner^[54] zu gestalten, soll im Folgenden kurz die Vorgehensweise bei diesen erläutert werden: Die Verdünnungsreihe eines GAT-Inhibitors wird zunächst mit einer definierten Menge einer pGAT-1 beziehungsweise pGAT-3 enthaltenden Synaptosomenpräparation vorinkubiert. Dies geschieht für zehn Minuten bei $37^{\circ}C$ im Schüttelwasserbad. Im Anschluß

daran wird eine definierte Menge [^3H]GABA zugefügt und für weitere vier Minuten im Schüttelwasserbad bei 37°C belassen. Danach werden die Synaptosomen mit einem Zellharvester abfiltriert, die Filterstückchen einzeln mit Szintillationscocktail versetzt und am nächsten Tag je zwei Minuten im Szintillationszähler vermessen.

In der vorliegenden Arbeit sollten also subtypenselektive Testsysteme für mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 etabliert werden,

- die mit *kloniertem* Material arbeiten und
- im Gegensatz zu allen anderen publizierten Testsystemen für GABA-Transporter, die auch kloniertes Material verwenden, *deutlich* vereinfacht sind und damit
- einen wesentlich *höheren* Probendurchsatz in *derselben* Zeit ermöglichen.

3.2.1. Aufbau eines Testsystems für mGAT1

Nun soll dargestellt werden, wie in Analogie zu den Testsystemen von G. Höfner^[54] ein Testsystem für den murinen GABA-Transporter mGAT1 aufgebaut wurde. Dabei ging man zunächst nach dem im Folgenden aufgezeigten Schema vor: Zu 50 Prozent konfluente COS-7 Zellen wurden transient mit pcDNA3.1(+)-mGAT1 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet werden. Aliquots der erhaltenen Zellsuspension wurden daraufhin zu der Verdünnungsreihe eines GAT-Inhibitors gegeben. Anschließend inkubierte man für zehn Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad, ehe man eine definierte Menge [^3H]GABA zufügte und für weitere zehn Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad beließ. Danach wurden die Zellen mit dem Zellharvester abfiltriert, alle Filterstückchen einzeln mit Szintillationscocktail versetzt und am nächsten Tag im Szintillationszähler je zwei Minuten vermessen.

Um schließlich den IC_{50} -Wertes der Testsubstanz ermitteln zu können, war in jedem Probenblock noch eine Positiv- und eine Negativkontrolle vorhanden. Sämtliche Einzelwerte wurden jeweils als Mittelwert aus drei verschiedenen Messwerten bestimmt (Triplikate). Die *Positivkontrolle* (Gesamtaufnahme) bestand aus einer Probe, der kein Inhibitor zugesetzt war. Hiermit konnte man das Ausmaß der GABA-Aufnahme durch Zellen bestimmen, die mit der für ein GAT-Protein codierenden cDNA transfiziert worden waren. Mit der *Negativkontrolle* wird die nichtspezifische Aufnahme von GABA durch die Zelle ermittelt. Es handelt sich hierbei um die Aufnahme von GABA, die nicht durch einen GABA-Transporter, sondern zum Beispiel durch nichtspezifische Aminosäuretransporter bedingt ist. Als Negativkontrolle wurden zunächst nicht transfizierte Zellen verwendet.

Der IC_{50} -Wert gibt schließlich an, bei welcher Wirkstoffkonzentration die GABA-Aufnahme in die Zelle gegenüber nicht inhibierten Zellen – jeweils korrigiert um die Negativkontrolle – zu 50 Prozent unterbunden ist.

3.2.2. Optimierung des Testsystems für mGAT1

Das Testsystem für mGAT1 sollte möglichst optimal gestaltet werden. Ziel war es, die Signalhöhe der Positivkontrolle relativ zur Negativkontrolle deutlich zu erhöhen, gleichzeitig aber mit weniger Zellen und möglichst geringer Menge an [3H]GABA pro Probe auszukommen. So würde zum einen die Effizienz verbessert; zum anderen könnte man die Kosten pro Probe senken.

Optimierung der Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme

Zunächst musste überlegt werden, auf welche Weise in späteren Versuchen die nichtspezifische Aufnahme bestimmt werden sollte. Diese kann man auf drei Arten ermitteln:

- 1) Es werden nicht transfizierte Zellen verwendet (Leierzellen).
- 2) Es wird ein Puffersystem ohne Na^+ verwendet, da der spezifische Transport natriumabhängig ist.
- 3) Es wird ein GAT-Inhibitor zugesetzt, um spezifischen Transport zu unterbinden (zum Beispiel GABA oder NO711).

Im Folgenden galt es herauszufinden, ob alle drei Möglichkeiten identische Ergebnisse liefern. In der hierzu durchgeführten Versuchsreihe wurden COS-7 Zellen transient mit pcDNA3.1(+)-mGAT1 transfiziert und 48 Stunden später für den Assay verwendet. Dieser wurde wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt. Es wurden etwa 120000 Zellen pro Probe eingesetzt. Die GABA-Konzentration betrug 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol) und 20 nM radioaktiv nicht markiertes GABA. Die nichtspezifische Aufnahme wurde durch den Einsatz von Leierzellen, durch Verwendung eines Puffersystems ohne Natriumzusatz oder durch Zusatz von 1 mM GABA beziehungsweise 10 μM NO711 bestimmt. Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Abbildung 10 dargestellt:

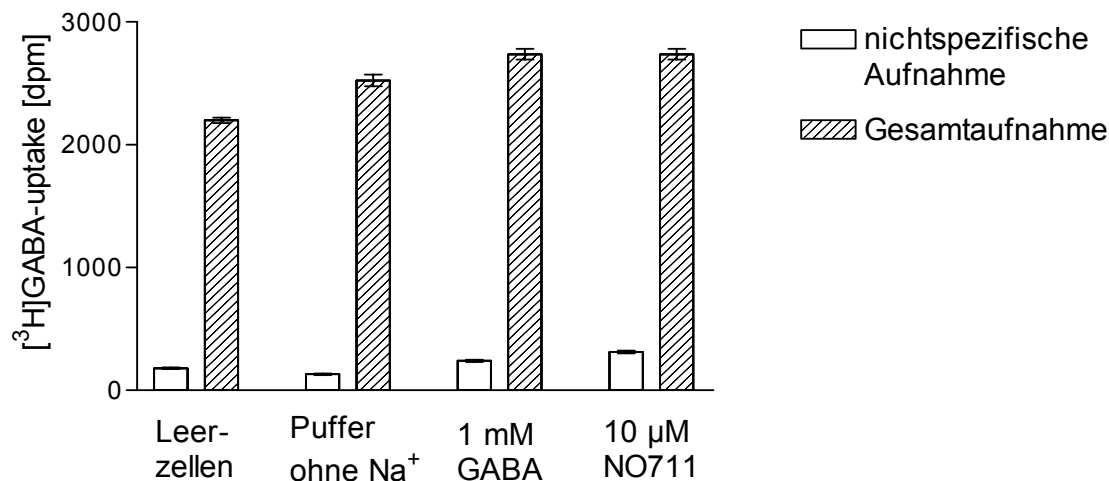


Abb. 10: Ermittlung der nichtspezifischen Aufnahme von [^3H]GABA (120000 Zellen pro Probe, 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol) und 20 nM radioaktiv nicht markiertes GABA)

Man kann erkennen, dass die nichtspezifische Aufnahme bezogen auf die Gesamtaufnahme wenig voneinander abweicht. Dabei ist allerdings die Schwankungsbreite so gering, dass sie

vernachlässigt werden kann. Schließlich wurde entschieden, die nichtspezifische Aufnahme durch Zusatz von NO711 (10 μ M) zu mit pcDNA3.1(+)-mGAT1 transfizierten Zellen zu ermitteln. Natürlich hätte auch GABA (1 mM) verwendet werden können, um die nichtspezifische Aufnahme zu bestimmen. Trotzdem sollte in Zukunft NO711 zugesetzt werden, um nichtspezifischen Transport zu messen, da es sich hierbei um einen selektiven GAT-1-Inhibitor handelt. Das Verwenden eines Puffersystems ohne Natriumzusatz beziehungsweise von Leerzellen schied aus rein praktischen Gründen aus: Hier müssen nämlich zwei getrennte Zellaufarbeitungen gemacht werden. Beim Einsatz von NO711 zur Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme ist nur eine Zellaufarbeitung erforderlich, was im Gegensatz zu den beiden anderen Methoden nur die halbe Zeit in Anspruch nimmt.

Optimierung der Transfektionseffizienz

Neben der bereits erwähnten Calciumphosphat-Copräzipitation stehen einige andere, effizientere Transfektionsarten zur Verfügung. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei weitere Methoden untersucht, nämlich die Transfektion mit DEAE-Dextran und die Transfektion mit FuGENE6. Das Problem bei der *Calciumphosphat-Copräzipitation* liegt wahrscheinlich darin, dass viele Zellen feste Niederschläge auf der Zelloberfläche nicht vertragen^[57]. Bei der effizienteren *DEAE-Dextran-Methode* bildet sich, da DEAE-Dextran (Diethylaminoethyl-Dextran) löslich ist, kein Niederschlag. Wahrscheinlich wird die Endozytose der DNA durch eine Wechselwirkung zwischen dem Polykation DEAE-Dextran, der negativ geladenen DNA und Strukturen auf der Zelloberfläche begünstigt^[58]. *FuGENE6* besteht nach Angaben des Herstellers Roche aus Lipiden und anderen Komponenten. Über die Transfektionsmethode werden durch die Firma keine näheren Angaben gemacht.

In den Versuchen, welche die Transfektionseffizienz der verschiedenen Methoden überprüfen sollten, wurden zu 50 Prozent konfluente COS-7 Zellen mit pcDNA3.1(+)-mGAT1 transient

mittels Calciumphosphat-Copräzipitation, DEAE-Dextran und FuGENE6 transfiziert. Dabei wurden jeweils 20 µg DNA eingesetzt. 48 Stunden nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet werden. Der Assay wurde wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt. Eingesetzt wurden etwa 240000 Zellen pro Probe. Die GABA-Konzentration betrug 40 nM [³H]GABA (1 TBq/mmol). Es wurden jeweils die nichtspezifische Aufnahme in Gegenwart von 10 µM NO711 und die Gesamtaufnahme bestimmt. Das Ergebnis des Versuchs ist in Abbildung 7 dargestellt.

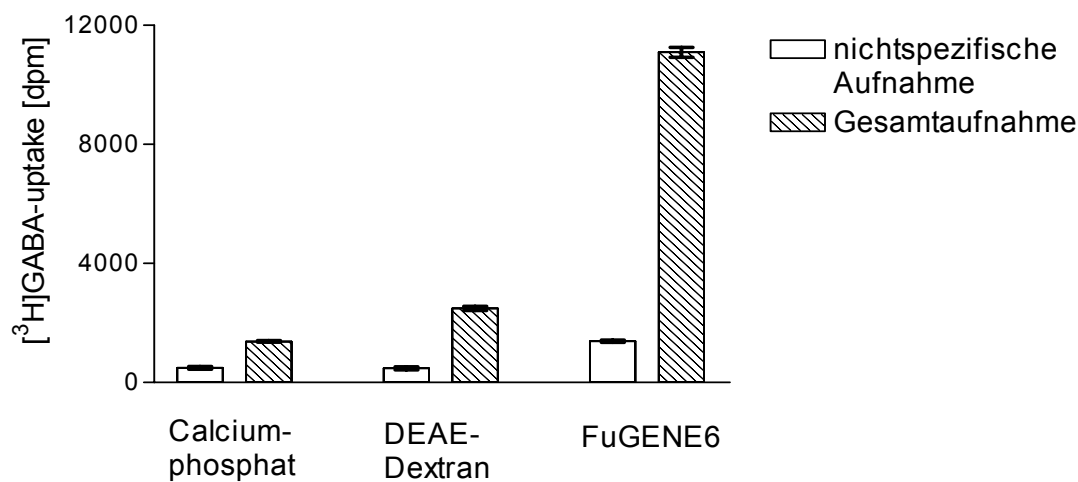


Abb. 7: Überprüfung der Effizienz der Transfektion mittels Calciumphosphat-Copräzipitation, DEAE-Dextran und FuGENE6 (240000 Zellen pro Probe, 40 nM [³H]GABA (1 TBq/mmol), Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme durch Zusatz von 10 µM NO711)

Aus der Versuchsreihe wird deutlich, dass die Transfektion mit FuGENE6 die höchste Effizienz nach sich zieht. Daher sollte in allen weiteren Assays mit FuGENE6 transfiziert werden. In den beschriebenen Versuchen wurde jeweils ein FuGENE6 : DNA-Verhältnis von 3:1 verwendet, da dies vom Hersteller für erste Tests empfohlen war. Dieses Verhältnis sollte nun optimiert werden mit dem Ziel, möglichst wenig FuGENE6 zu verbrauchen und gleichzeitig eine optimale Transfektionseffizienz zu erreichen. Dazu wurden 50 Prozent konfluente COS-7 Zellen in je einer 75 cm²-Kulturflasche mit verschiedenen FuGENE6 : pcDNA3.1(+)-mGAT1-Verhältnissen transfiziert. Wie vom Hersteller für diese Kulturfläche empfohlen, wurden wenigstens 20 µl FuGENE6 verwendet. Der Assay wurde

48 Stunden nach der Transfektion wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt. Es wurden etwa 240000 Zellen pro Probe eingesetzt. Die GABA-Konzentration betrug 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol). Zur Auswertung wurde der Quotient aus Gesamtaufnahme und nichtspezifischer Aufnahme (bestimmt in Gegenwart von 10 μM NO711) gebildet. Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 8 und Tabelle 2 zusammengefasst:

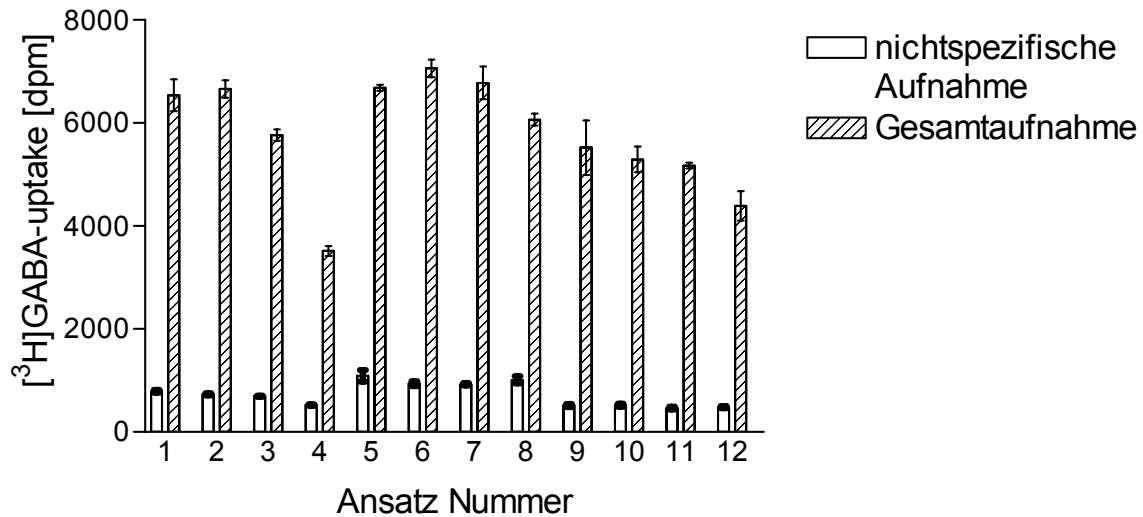


Abb. 8: Transfektionsversuch zur Ermittlung des optimalen FuGENE6 : DNA-Verhältnisses (240000 Zellen pro Probe, 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol), Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme durch Zusatz von 10 μM NO711)

| Ansatz | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------|------|-------------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|------|
| FuGENE6 [μl] | 20 | 20 | 20 | 20 | 30 | 30 | 30 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| DNA [μg] | 3.33 | 6.67 | 10.0 | 13.3 | 5.0 | 10.0 | 15.0 | 20.0 | 6.67 | 13.3 | 20.0 | 26.7 |
| Verhältnis | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 |
| Ergebnis | 8.3 | 9.1 | 8.3 | 6.7 | 6.8 | 7.6 | 7.3 | 6.0 | 10.8 | 10.2 | 11.2 | 9.7 |

Tabelle 2: Transfektionsversuch zur Ermittlung des optimalen FuGENE6 : DNA-Verhältnisses (Angaben jeweils bezogen auf 75 cm^2 -Kulturflaschen)

Es stellte sich heraus, dass die Transfektionseffizienz bei FuGENE6 : DNA-Verhältnissen von 6:1, 3:1 und 2:1 tendenziell leicht besser ist als bei einem Verhältnis von 3:2. In den folgenden Versuchen sollte mit möglichst wenig FuGENE6 gearbeitet werden, um die Kosten pro Versuch zu senken. Gleichzeitig galt es aber auch, eine optimale Transfektionseffizienz zu erzielen. Daher wurde entschieden, in Zukunft 20 μl FuGENE6 und 6.67 μg DNA pro 75 cm^2 -Kulturflasche einzusetzen (Ansatz 2). Bei Versuchen mit 182 cm^2 -Kulturflaschen zeigte sich, dass diese Mengen jeweils verdoppelt werden mussten (40 μl FuGENE6 und 13.3 μg DNA), um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten.

Optimierung der eingesetzten Zellmenge und der [^3H]GABA-Konzentration

Aus Kostengründen sollten je Probe sowohl möglichst wenig Zellen als auch [^3H]GABA verwendet werden. Gleichzeitig aber musste auch ein ausreichend hohes Signal erhalten werden. Um die Ergebnisse vergleichen zu können, war es nötig, die Gesamtmenge an GABA in jeder Probe gleich zu belassen. Daher erfolgte ein Zusatz von nicht radioaktiv markiertem GABA zu jeder Einzelprobe, um immer auf eine Endkonzentration von 40 nM GABA zu kommen. Zu beachten ist, dass die spezifische Aktivität von [^3H]GABA hier 3 TBq/mmol betrug, also dreimal so hoch war, wie bei dem in den vorherigen Experimenten eingesetzten [^3H]GABA. Der Versuch wurde mit transient mGAT1 exprimierenden COS-7 Zellen durchgeführt. Tabelle 3 zeigt die Versuchsbedingungen, sowie die durch FuGENE6 und [^3H]GABA pro Probe anfallenden Kosten (FuGENE6, 1 ml, 408 €, 40 μl FuGENE6 reichen aus, um etwa 6 Millionen transfizierte Zellen zu erhalten; [^3H]GABA, 1 ml, 878 €, bei Verwendung von 20 nM [^3H]GABA werden pro Probe 0.5 μl der Stammlösung benötigt, bei Verwendung von 13.3 nM [^3H]GABA 0.33 μl und bei Verwendung von 6.67 nM [^3H]GABA 0.167 μl).

| Ansatz | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|----------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|--------|
| Zellzahl | 30000 | 60000 | 90000 | 120000 | 30000 | 60000 | 90000 | 120000 | 30000 | 60000 | 90000 | 120000 |
| [³ H]GABA [nM] | 20 | 20 | 20 | 20 | 13.3 | 13.3 | 13.3 | 13.3 | 6.67 | 6.67 | 6.67 | 6.67 |
| FuGENE6 [€] | 0.08 | 0.16 | 0.24 | 0.32 | 0.08 | 0.16 | 0.24 | 0.32 | 0.08 | 0.16 | 0.24 | 0.32 |
| [³ H]GABA[€] | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.44 | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.29 | 0.15 | 0.15 | 0.15 | 0.15 |
| Kosten/Probe [€] | 0.52 | 0.60 | 0.68 | 0.76 | 0.37 | 0.45 | 0.53 | 0.61 | 0.23 | 0.31 | 0.39 | 0.47 |

Tab. 3: Versuch zur Bestimmung der optimal einzusetzenden Zellzahl sowie der optimal zu verwendenden [³H]GABA Konzentration

Um das optimale Verhältnis Zellzahl-[³H]GABA-Konzentration rein rechnerisch herauszufinden, wäre es ausreichend gewesen, nur für die Ansätze 1-4 Daten zu erheben. Bei gleichbleibender Gesamtkonzentration an GABA muss sich nämlich bei einer Abnahme der [³H]GABA-Konzentration um die Hälfte auch die Signalhöhe um die Hälfte verringern, da zwischen beiden Größen eine lineare Beziehung besteht. Dasselbe gilt ebenfalls für die eingesetzte Zellzahl. Trotzdem schien es sinnvoll, dies mit dem geschilderten Versuch abzusichern, dessen Ergebnisse in Abbildung 9 dargestellt sind:

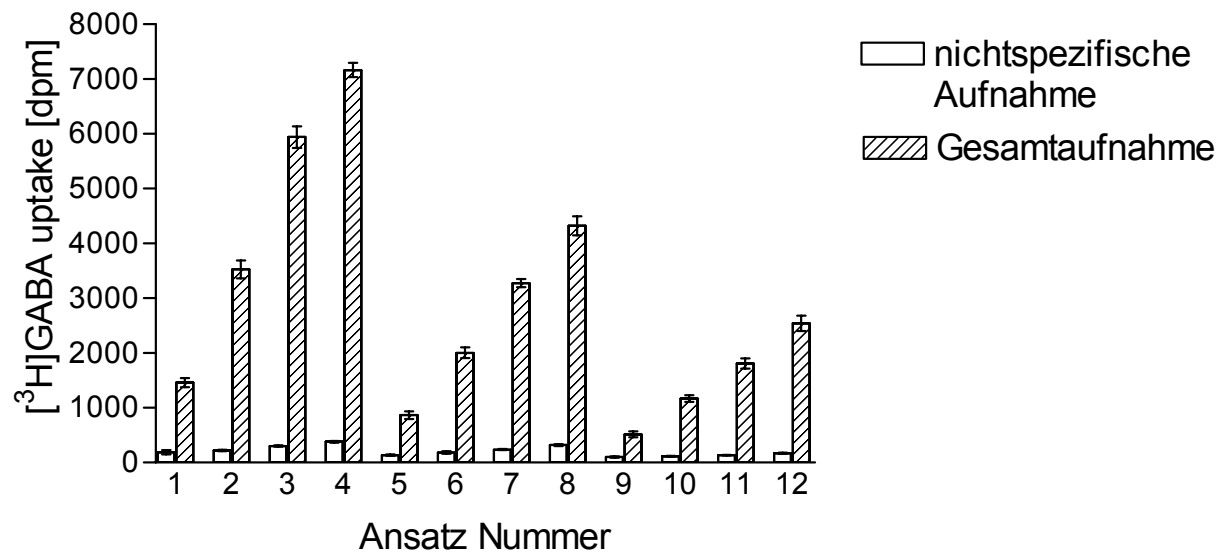


Abb. 9: Ergebnis des Versuchs zur Bestimmung der optimal einzusetzenden Zellzahl sowie der optimal zu verwendenden [^3H]GABA Konzentration (Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme durch Zusatz von $10\ \mu\text{M}$ NO711)

Aus Abbildung 9 wird nun ersichtlich, dass die Signalhöhe – wie bereits angenommen – sowohl linear zur eingesetzten Zellmenge wie auch linear zur Konzentration an [^3H]GABA abnimmt. Die optimale Signalhöhe liegt bei etwa 2000 bis 3000 dpm für die Gesamtaufnahme. Bei den Ansätzen 6, 7 und 12 ist dies der Fall. Die Kosten sind bei Ansatz 6 am geringsten. Außerdem können hier mit dem Ertrag aus einer voll bewachsenen $182\ \text{cm}^2$ -Flasche 96 Proben gemessen werden^[F2]. Bei Ansatz 12 wäre nur die halbe Probenzahl möglich und damit der Transfektionsaufwand entsprechend größer. Künftig würden daher pro Probe etwa 60000 Zellen und ein Mischungsverhältnis von $13.3\ \text{nM}$ [^3H]GABA ($3\text{TBq}/\text{mmol}$) zu $26.7\ \text{nM}$ nicht radioaktiv markiertem GABA verwendet werden.

In einigen Versuchen zeigte sich, dass bei den genannten Bedingungen im Fall von mGAT1 für die Gesamtaufnahme ein Signal von deutlich mehr als 3000 dpm erzielt werden konnte.

^[F2] Der Ertrag aus einer $182\ \text{cm}^2$ -Kulturflasche beträgt etwa 6 Millionen COS-7 Zellen. Das bedeutet, dass die Zellen einer $182\ \text{cm}^2$ -Kulturflasche ausreichen, um vier Probenblöcke mit je 24 Proben, also insgesamt 96 Proben zu untersuchen.

Der Grund hierfür liegt darin, dass die Expressionsrate von mGAT1 nicht immer gleich groß ist und es daher zu Schwankungen bezüglich der Signalhöhe kommt. Die je Probe eingesetzte Zellmenge und das Verhältnis aus radioaktiv markiertem und unmarkiertem GABA wurden aber daraufhin nicht verändert, da sichergestellt sein sollte, dass die Signalhöhe in jedem durchgeführten Versuch mindestens etwa 2000 bis 3000 dpm beträgt. Außerdem sollten die einzelnen Parameter des Testsystems im Nachhinein nicht mehr variiert werden.

Interessant ist, dass die durch die transfizierten Zellen tatsächlich aufgenommene Menge GABA in Bezug auf die im Versuch verwendete Menge verschwindend gering ist. Misst man die Aktivität der pro Probe eingesetzten [³H]GABA-Menge, so erhält man ein Signal von 600000 dpm (25 µl 13.3 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol)). Inkubiert man mGAT1 exprimierende Zellen mit eben dieser [³H]GABA-Menge, beträgt die Signalhöhe für die Gesamtaufnahme rund 2000 bis 3000 dpm. Es wird also nur etwa 0.33 bis 0.5 Prozent des eingesetzten GABA durch die GAT-Proteine transportiert. Die extrazelluläre Konzentration an GABA verändert sich folglich während des Versuchs praktisch nicht.

Thomsen *et al.* beschreiben für die murinen GABA-Transporter K_m -Werte von 12 µM für mGAT1, 95 µM für mGAT2, 8 µM für mGAT3 und 13 µM für mGAT4^[59]. Damit wird deutlich, dass bei der im Versuch eingesetzten GABA-Konzentration von 40 nM der jeweilige Transporter bei weitem noch nicht gesättigt ist: Die durch die GAT-Proteine transportierte GABA-Menge steigt in diesem Bereich annähernd proportional zur Substratkonzentration an, folgt also einer Kinetik 1. Ordnung.

3.2.3. Aufbau von Testsystemen für hGAT-1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4

Nachdem nun ein Testsystem für mGAT1 aufgebaut und optimiert worden war, galt es, auch für mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 subtypenselektive Testsysteme zu etablieren. In

ersten Versuchen, in denen jeweils Testsysteme für mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 erstellt werden sollten, wurden zunächst dieselben Versuchsbedingungen gewählt wie für mGAT1. Die nichtspezifische Aufnahme musste natürlich im Fall von mGAT2, mGAT3 und mGAT4 auf andere Art bestimmt werden, da es für diese Transporter keine geeigneten selektiven Inhibitoren gibt. Sie wurde deshalb bei mGAT2, mGAT3 und mGAT4 durch Zusatz von 1 mM GABA ermittelt; diese Vorgehensweise ist bereits in der Literatur beschrieben^[30]. Im Folgenden wird auf die neuen Testsysteme im Einzelnen eingegangen.

mGAT3, mGAT4, hGAT-1

Für mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 konnte das für mGAT1 erstellte Testsystem übernommen werden. In allen Fällen wurde mit einer Signalhöhe von etwa 2000 bis 3000 dpm auf Anrieb ein optimales Ergebnis erzielt. Es war dabei möglich, sowohl das FuGENE6 : DNA-Verhältnis als auch die Konzentration an [³H]GABA und die eingesetzte Zellmenge gegenüber dem Testsystem für mGAT1 gleich zu belassen. Weitergehende Versuche, die Testsysteme zu optimieren, mussten für die drei Transporter nicht durchgeführt werden.

mGAT2

Im Fall von mGAT2 zeigte sich, dass COS-7 Zellen den Transporter nur schlecht exprimieren. Daher wurden im folgenden Versuch statt der COS-7 Zellen HEK Zellen verwendet. Gleichzeitig sollte dabei auch das optimale FuGENE6 : DNA-Verhältnis bestimmt werden. Dazu wurden analog zu dem auf Seite 29ff. für mGAT1 beschriebenen Versuch 50 Prozent konfluente HEK Zellen in je einer 75 cm²-Kulturflasche mit verschiedenen FuGENE6 : pcDNA3.1(+)-mGAT2-Verhältnissen transfiziert. Der Assay wurde 48 Stunden nach der Transfektion wie auf Seite 25 beschrieben durchgeführt. Da Vorversuche bereits gezeigt hatten, dass im Gegensatz zu den anderen Testsystemen deutlich mehr Zellen pro

Probe verwendet werden mussten, um ein ausreichend hohes Signal zu erhalten, wurden etwa 800000 Zellen pro Probe eingesetzt. Die GABA-Konzentration betrug 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol). Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe sind in Abbildung 11 und Tabelle 4 zusammengefasst. Die Expressionsrate wurde dabei als Quotient aus Gesamtaufnahme und nichtspezifischer Aufnahme bestimmt.

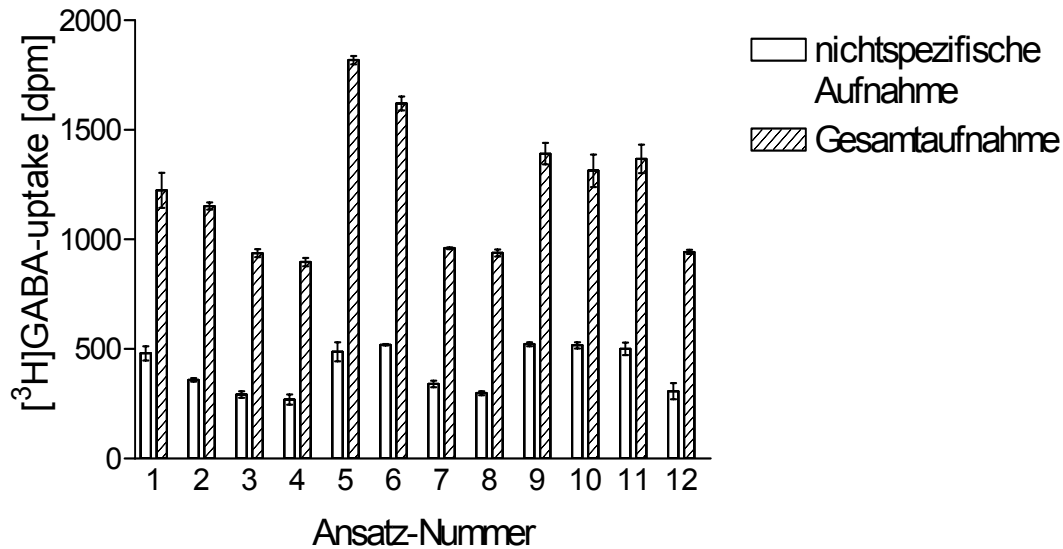


Abb. 11: Transfektionsversuch zur Ermittlung des optimalen FuGENE6 : DNA-Verhältnisses (800000 Zellen pro Probe, 40 nM [^3H]GABA (1 TBq/mmol), Bestimmung der nichtspezifischen Aufnahme durch Zusatz von 1 mM GABA)

| Ansatz | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---------------------------|------|------|------|------|------------|------|------|------|------|------|------|------|
| FuGENE6 [μl] | 20 | 20 | 20 | 20 | 30 | 30 | 30 | 30 | 40 | 40 | 40 | 40 |
| DNA [μg] | 3.33 | 6.67 | 10.0 | 13.3 | 5.0 | 10.0 | 15.0 | 20.0 | 6.67 | 13.3 | 20.0 | 26.7 |
| Verhältnis | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 | 6:1 | 3:1 | 2:1 | 3:2 |
| Ergebnis | 2.6 | 3.2 | 3.2 | 3.3 | 3.7 | 3.1 | 2.8 | 3.1 | 2.7 | 2.5 | 2.7 | 3.1 |

Tabelle 4: Transfektionsversuch zur Ermittlung des optimalen FuGENE6 : DNA-Verhältnisses (Angaben jeweils bezogen auf 75 cm²-Kulturflaschen)

Aus Tabelle 4 und Abbildung 11 kann entnommen werden, dass die Transfektionseffizienz relativ gering ist. Doch eine Expressionsrate von 3.5 bis 4 ist völlig ausreichend, um zuverlässige Daten mit dem Testsystem zu erheben. Bei Ansatz 5 wird die günstigste Transfektionseffizienz von Faktor 3.7 erzielt. Diese ist bestens geeignet, um verlässliche Werte mit diesem Testsystem zu gewinnen. Daher wurde entschieden, in Zukunft HEK Zellen mit jeweils 30 μl FuGENE6 und 5.0 μg DNA je 75 cm^2 -Kulturflasche zu transfizieren (entsprechend Ansatz 5). Es stellte sich heraus, dass bei Versuchen mit 182 cm^2 -Kulturflaschen diese Mengen jeweils verdoppelt werden mussten (60 μl FuGENE6 und 10.0 μg DNA), um dasselbe optimale Ergebnis zu erzielen.

In den folgenden Experimenten zeigte sich, dass mit einer Zellzahl von 400000 Zellen pro Probe^[F3] und einer GABA-Konzentration von 26.7 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 13.3 nM nicht radioaktiv markiertem GABA eine optimale Signalhöhe erzielt werden kann. Bei den vier anderen Testsystemen wird ein GABA-Verhältnis von 13.3 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 26.7 nM nicht radioaktiv markiertem GABA verwendet. Wichtig ist, dass die Gesamtkonzentration von 40 nM GABA beibehalten wurde, um die Vergleichbarkeit mit den an den übrigen Testsystemen erzielten Ergebnissen nicht zu gefährden.

^[F3] Der Ertrag aus einer 182 cm^2 -Kulturflasche beträgt etwa 20 Millionen HEK Zellen und ist damit deutlich höher als der Ertrag an COS-7 Zellen aus derselben Flaschengröße (etwa 6 Millionen Zellen). Die aus einer 182 cm^2 -Kulturflasche erhaltenen HEK Zellen reichen aus, um zwei Probenblöcke mit je 24 Proben, also insgesamt 48 Proben zu untersuchen.

Zusammenfassend werden nun noch einmal die Versuchsbedingungen dargestellt, die in den neu erstellten fünf Testsystemen verwendet wurden:

- 1) Pro 182 cm²-Kulturflasche wurden 40 µl FuGENE6 und 13.3 µg DNA (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) beziehungsweise 60 µl FuGENE6 und 10.0 µg DNA (mGAT2) zur Transfektion verwendet.
- 2) Es wurden 60000 COS-7 Zellen (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) beziehungsweise 400000 HEK Zellen (mGAT2) pro Probe eingesetzt.
- 3) Der GABA-uptake durch transfizierte Zellen wurde durch Zusatz einer Mischung aus 13.3 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 26.7 nM nicht radioaktiv markiertem GABA (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) beziehungsweise aus 26.7 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 13.3 nM nicht radioaktiv markiertem GABA (mGAT2) pro Probe ermittelt.
- 4) Die nichtspezifische Aufnahme wurde durch Zusatz von 10 µM NO711 (mGAT1, hGAT-1) beziehungsweise 1 mM GABA (mGAT2, mGAT3, mGAT4) bestimmt.

In der vorliegenden Arbeit ist es also hiermit gelungen, subtypenselektive Testsysteme für mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 sowie hGAT-1 zu erstellen, die alle mit kloniertem Material arbeiten. Dadurch ist ausgeschlossen, dass das jeweilige Testsystem mit einem der anderen GABA-Transporter verunreinigt ist. Des Weiteren konnten die bisher literaturbeschriebenen Testsysteme^[z.B.30,55,56], die auch mit kloniertem Material arbeiten, deutlich vereinfacht werden. Damit ist es möglich, in derselben Zeit einen wesentlich größeren Probendurchsatz zu erzielen. Besonders wichtig ist außerdem, dass alle fünf Testsysteme unter vergleichbaren Bedingungen ablaufen. So können alle an diesen Testsystemen ermittelten Werte absolut einander gegenübergestellt werden.

In Abbildung 12 ist der Ablauf des Assays nochmals am Beispiel von mGAT1 schematisch dargestellt:

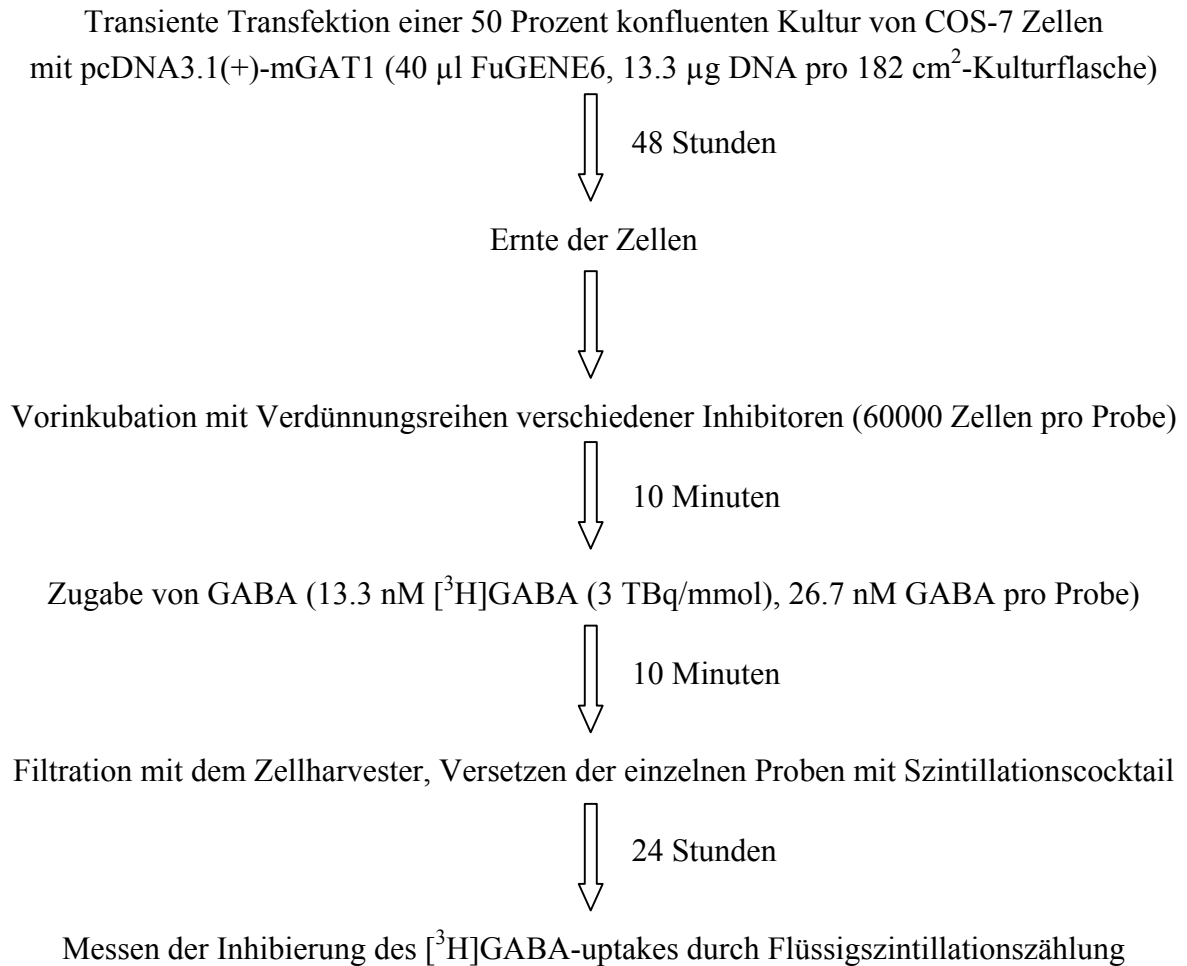


Abb. 12: Ablauf des GABA-uptake Assays

3.3. Stabile Transfektion von Säugerzelllinien

Neben der transienten Transfektion von COS-7 und HEK Zellen mit den verschiedenen GABA-Transportern war ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit, Zelllinien zu etablieren, die mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 stabil exprimieren.

Da sich COS-7 Zellen nicht zur stabilen Transfektion eignen^[53], wurden hierzu HEK Zellen verwendet. pcDNA3.1(+) enthält – wie bereits erwähnt – das für die Neomycin-Phosphotransferase codierende Gen, welches eine Selektion stabil transfizierter eukaryontischer Zellen mit G418 ermöglicht.

Vor der eigentlichen Transfektion musste der jeweilige Expressionsvektor linearisiert werden, um einerseits den Einbau in das Genom der Zelle zu erleichtern und andererseits zu verhindern, dass für die spätere Expression wichtige Elemente des Vektors oder die cDNA des jeweiligen GABA-Transporters selbst bei der Integration aufgebrochen werden. Die Linearisierung erfolgte durch Restriktionsverdau mit *Sca* I im Fall von mGAT1, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 beziehungsweise mit *Mfe* I bei mGAT2. *Sca* I schneidet pcDNA3.1(+) im Ampicillin-Resistenz-Gen, *Mfe* I im upstream des CMV-Promotor. Dadurch wird die spätere Funktionsfähigkeit des Vektors in eukaryontischen Zellen nicht beeinträchtigt. Die DNA der verschiedenen GABA-Transporter wird durch die angegebenen Enzyme natürlich nicht geschnitten. Der linearisierte Vektor wurde jeweils durch präparative Agarosegelelektrophorese gereinigt, bevor er zur Transfektion eingesetzt wurde.

Die Transfektion erfolgte standardmäßig mittels FuGENE6 (40 µl FuGENE6, 13.3 µg DNA) an zu 50 Prozent konfluenten HEK Zellen. 48 Stunden später wurde das normale Wachstumsmedium durch Selektionsmedium ersetzt. Dieses enthält neben den üblichen Zusätzen (10 % fötales Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) 500 µg/ml G418.

So können Zellen selektiert werden, die den jeweiligen Expressionsvektor stabil in ihr Genom integriert haben, da sie aufgrund der Expression der Neomycin-Phosphotrasferase gegenüber G418 resistent sind. Etwa zwei Wochen nachdem das Selektionsmedium zugegeben worden war, traten einzelne Klone auf, die mit Hilfe von Kloningzylindern gepickt und getrennt weitervermehrt werden konnten. Nach zwei weiteren Wochen waren ausreichend Zellen vorhanden, um die Expressionsrate von mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 beziehungsweise hGAT-1 zu überprüfen. Dies geschah mittels GABA-uptake Assays durch Ermittlung des Quotienten aus Gesamtaufnahme und nichtspezifischer Aufnahme. Pro Transporter wurde ein Hochleistungsstamm ermittelt und kryokonserviert.

In Abbildung 13 ist der Ablauf der stabilen Transfektion am Beispiel von mGAT1 dargestellt:

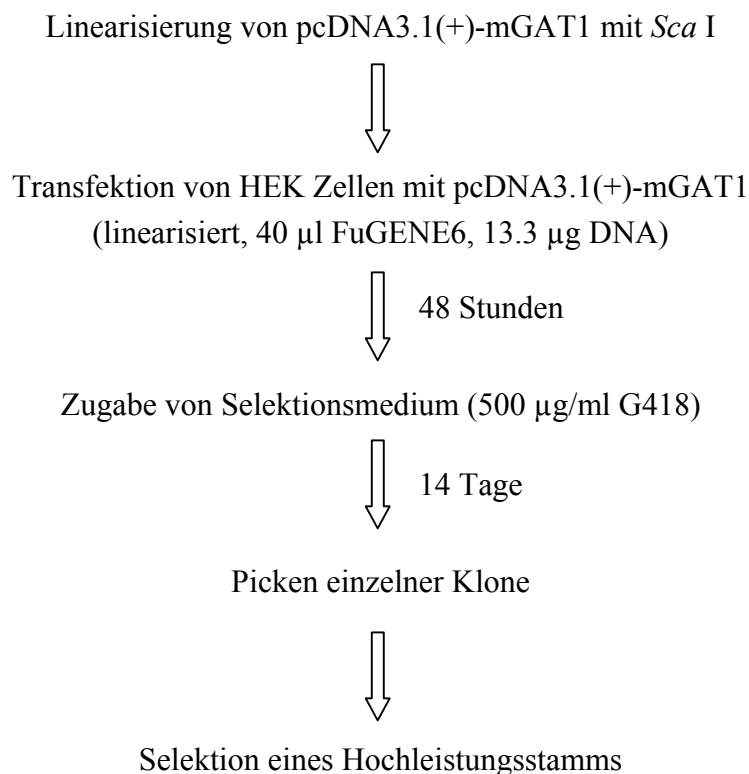


Abb. 13: Ablauf der stabilen Transfektion am Beispiel von mGAT1

Gleichzeitig war es wichtig, die Expressionsrate der verschiedenen GABA-Transporter durch die stabilen Zellen über einen längeren Zeitraum zu verfolgen. So sollte sichergestellt werden, dass das jeweilige GAT-Protein über die optimale Kulturdauer von vier Wochen hinweg exprimiert wurde. Dies geschah durch einen Versuch, in dem alle sieben Tage die Expressionsrate als Quotient aus Gesamtaufnahme und nichtspezifischer Aufnahme ermittelt wurde. Die Ergebnisse dieser Tests sind in Abbildung 14 für die fünf verschiedenen Transporter dargestellt.

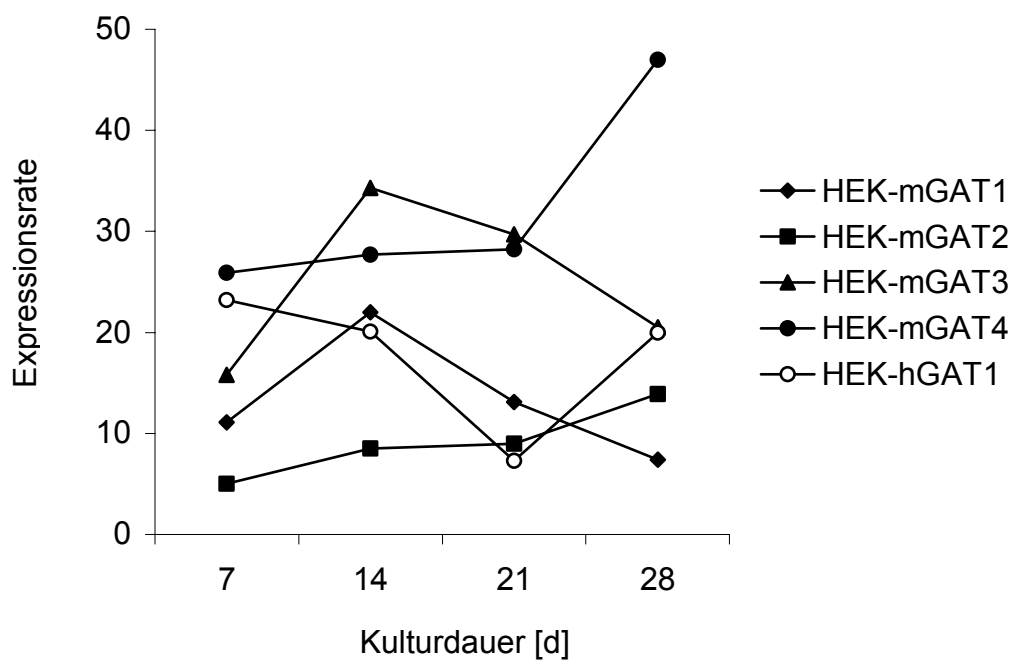


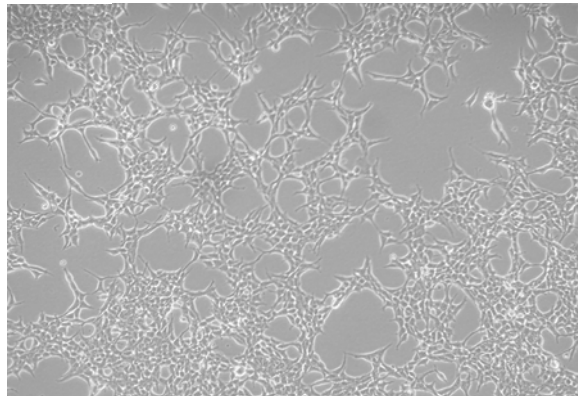
Abb. 14: Expressionsrate der GABA-Transporter durch die verschiedenen stabilen Zelllinien in Abhängigkeit von der Kulturdauer

Der Versuch zeigt, dass über die gesamte Kulturdauer von vier Wochen hinweg der jeweilige GABA-Transporter exprimiert wird. Zwar schwankt die Expressionsrate durch die stabilen HEK Zellen, jedoch wird zu jedem Zeitpunkt mehr als ausreichend Protein für Experimente mit den Zellen gebildet.

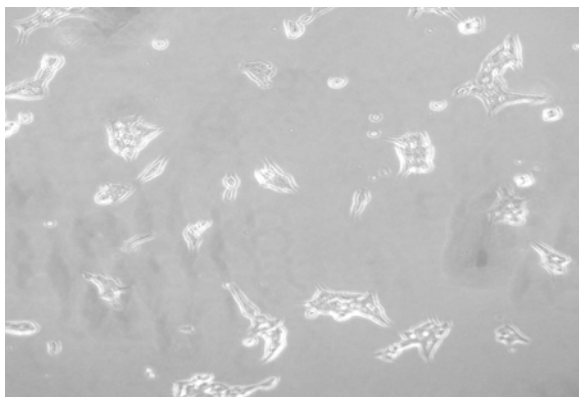
In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass es enorm wichtig ist, die Zellen für die jeweiligen Versuche in einer ganz bestimmten Wachstumsphase zu ernten, um die maximal

mögliche Expressionsrate zu erhalten. HEK Zellen wachsen sternchenförmig am Boden der Kulturflasche. Ideal ist es, die Zellen genau dann zu ernten, wenn sie zwar bereits Kontakt zu Nachbarzellen haben, aber noch deutliche Zelllücken erkennen lassen. Dann nämlich ist die Expressionsrate des jeweiligen GABA-Transporters besonders hoch. In Abbildung 15 ist eine Kultur von HEK Zellen in drei verschiedenen Wachstumsphasen abgebildet, die das Aussehen vor, während und nach der für die Ernte idealen Wachstumsphase wiedergibt. Es ist selbstverständlich, dass für sämtliche Versuche ausschließlich Zellen verwendet wurden, die sich in der optimalen Wachstumsphase befanden.

a)



b)



c)

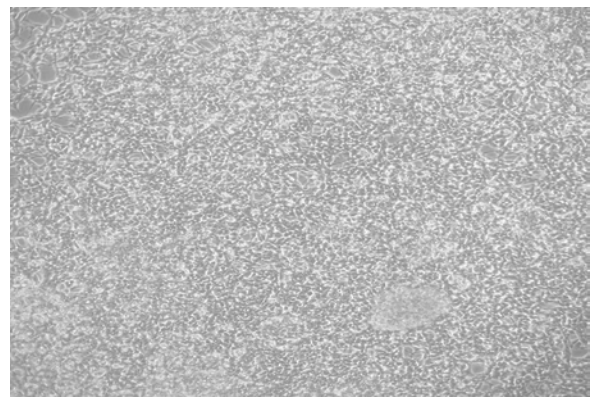


Abb. 15: Kultur von HEK Zellen a) während, b) vor, c) nach der für die Ernte idealen Wachstumsphase

3.4. Immunpräzipitation und Westernblot

Sowohl bei der stabilen als auch bei der transienten Transfektion musste sichergestellt werden, dass wirklich der beabsichtigte GABA-Transporter durch die Zellen exprimiert wurde. Dies geschah mittels Westernblots, da hierbei durch die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung die Anwesenheit des beabsichtigten Transporters am besten verifiziert werden konnte.

In der Literatur wird zum Nachweis der Expression der verschiedenen GABA-Transporter ausschließlich die Methode der Immunpräzipitation mit darauf folgender Autoradiographie angewandt ^{z.B.[60,61]}. Bekannt ist weiterhin, dass die GABA-Transporter als Monomere (GAT-1, GAT-3, BGT-1 ca. 65 kDa, GAT-2 ca. 85 kDa), Dimere (ca. 130 kDa) und höhermolekulare Aggregate detektiert werden können, wobei das Monomer oft nur schwach oder gar nicht zu sehen ist^[62,63,64]. Dies liegt wahrscheinlich daran, dass sich durch das Erhitzen der Proben vor der Elektrophorese die GAT-Proteine zu Aggregaten zusammenschließen.

Zunächst wurde versucht, die verschiedenen GABA-Transporter direkt aus dem Zelllysat transfizierter Zellen mittels Westernblot zu detektieren. Die hierbei erzielten Resultate waren jedoch ungenügend, da einzelne Banden nicht erkennbar waren. Deshalb wurden in späteren Versuchen die GAT-Proteine durch Immunpräzipitation aufkonzentriert und anschließend der Antigen-Antikörper-Komplex im Westernblot eingesetzt.

Vorgehensweise, Ergebnis

Stabil oder transient den jeweiligen GABA-Transporter exprimierende HEK oder COS-7 Zellen wurden mittels eines stark detergentienhaltigen Puffersystems lysiert. Ein Aliquot des Zelllysats wurde mit dem entsprechenden polyklonalen Antikörper vorinkubiert (anti-GAT-1,

anti-GAT-2, anti-GAT-3 oder anti-BGT-1, jeweils gewonnen aus Kaninchen). Der Antigen-Antikörper-Komplex wurde anschließend durch Protein A-Sepharose gebunden und Fremdprotein durch Waschen entfernt. Daraufhin löste man durch Erhitzen Antigen und Antikörper von der Protein A-Sepharose und trennte diese im Folgenden vom Überstand ab, welcher Antigen und Antikörper enthielt. Der Überstand wurde dann in der SDS-PAGE-Elektrophorese eingesetzt. Nach erfolgtem Elektrophoreselauf mit anschließendem Blotten der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde ein Westernblot durchgeführt. Dabei blockte man zuerst unspezifische Bindungsstellen durch Milcheiweiß, ehe die Membran mit dem gegen den jeweiligen GABA-Transporter gerichteten Primärantikörper inkubiert wurde. Gebundener Primärantikörper konnte mit Hilfe des Sekundärantikörpers detektiert werden. Zu beachten ist, dass aufgrund der vorangegangenen Immunpräzipitation die schwere Kette des Primärantikörpers stets bei etwa 50-55 kDa auf dem Blot zu sehen ist.

In allen Fällen wurde als Primärantikörper ein aus Kaninchen gewonnener, gegen den jeweiligen GABA-Transporter der Ratte gerichteter Antikörper verwendet. Dieser konnte aufgrund der hohen Homologie der Primärstruktur der GAT-Proteine verschiedener Spezies^[37] auch zum Nachweis der verschiedenen Transporter von Maus und Mensch eingesetzt werden. Als Sekundärantikörper diente Ziege-gegen-Kaninchen IgG. Dieser war HRP konjugiert, so dass er durch Lumineszenz detektiert werden konnte.

Sowohl bei den stabil transfizierten Zelllinien als auch im Fall der transienten Transfektion konnten durch Immunpräzipitation und darauf folgenden Westernblot immer das Dimer bei etwa 130 kDa oder höhermolekulare Aggregate des jeweiligen GABA-Transporters zweifelsfrei detektiert werden. Bei stabil mGAT3 und mGAT4 exprimierenden Zellen konnte sogar das Monomer bei etwa 85 kDa beziehungsweise 65 kDa nachgewiesen werden, was an der außergewöhnlich starken Expression dieses Transporters durch die stabil transfizierten HEK Zellen liegen dürfte.

Abbildung 16 zeigt die Immunpräzipitation mit daran anschließendem Westernblot der GAT-Proteine, die transient in COS-7 beziehungsweise HEK Zellen exprimiert wurden. Bei allen Transportern konnten jeweils das Dimer bei etwa 130 kDa sowie teilweise auch höhermolekulare Aggregate detektiert werden.

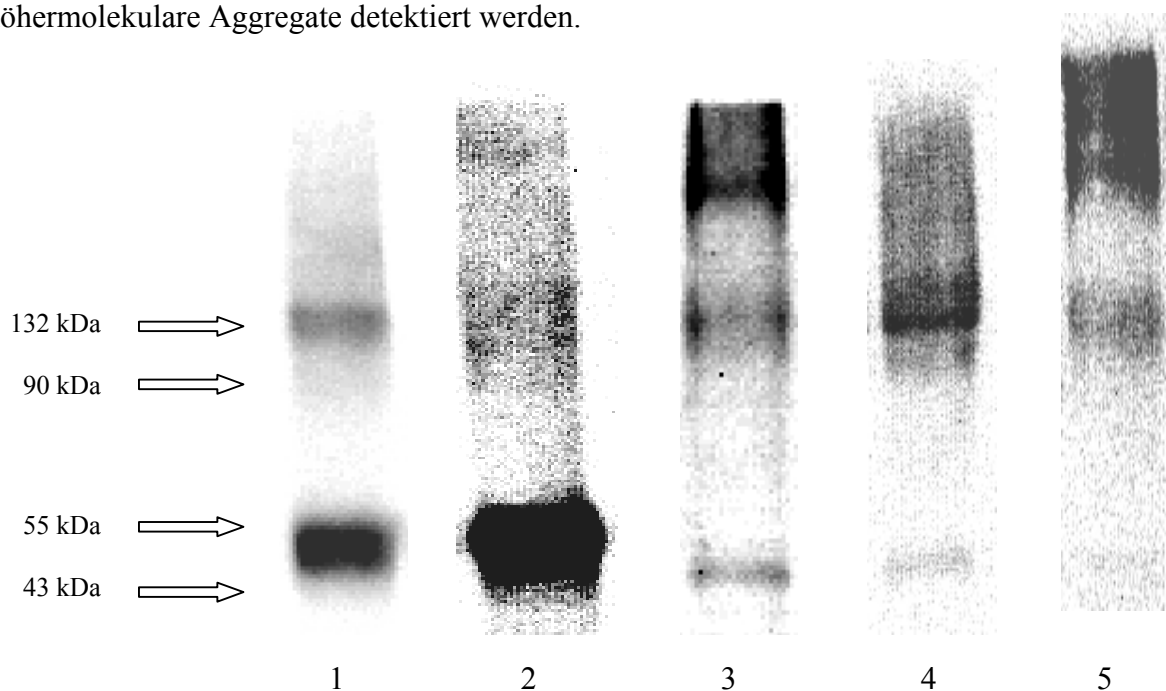


Abb. 16: Immunpräzipitation und Westernblot der transient in COS-7 bzw. HEK Zellen GAT-Proteine; zu beachten ist, dass bei ca. 50-55 kDa jeweils die schwere Kette des Primärantikörpers detektiert wird.

Spur 1: Immunpräzipitation eines Zelllysats von transient mGAT1 exprimierenden COS-7 Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 2: Immunpräzipitation eines Zelllysats von transient mGAT2 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-BGT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 3: Immunpräzipitation eines Zelllysats von transient mGAT3 exprimierenden COS-7 Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-2 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 4: Immunpräzipitation eines Zelllysats von transient mGAT4 exprimierenden COS-7 Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-3 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 5: Immunpräzipitation eines Zelllysats von transient hGAT-1 exprimierenden COS-7 Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Abbildung 17 zeigt die Immunpräzipitation mit folgendem Westernblot der Lysate von HEK Zellen, welche die verschiedenen GABA-Transporter stabil exprimieren. Bei mGAT1 (Spur 1) und hGAT-1 (Spur 5) konnte das Dimer bei etwa 130 kDa, bei mGAT2 (Spur 2) höhermolekulare Aggregate und bei mGAT3 (Spur 3) und mGAT4 (Spur 4) das Monomer bei etwa 85 kDa beziehungsweise 65 kDa sowie höhermolekulare Aggregate detektiert werden.

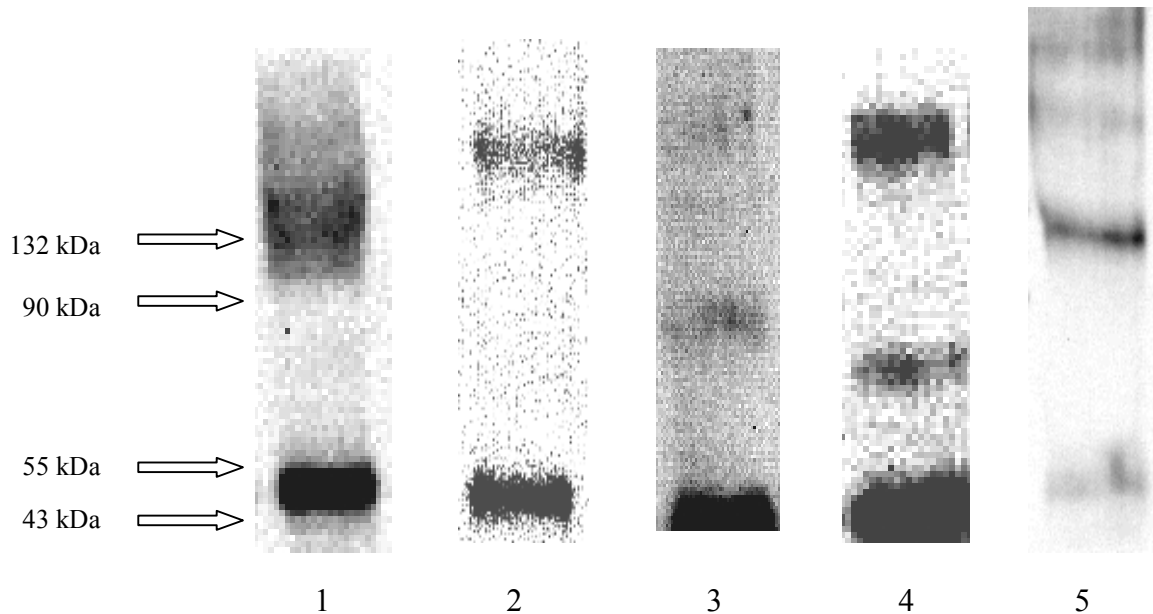


Abb. 17: Immunpräzipitation und Westernblot der stabil in HEK Zellen exprimierten GAT-Proteine; zu beachten ist, dass bei ca. 50-55 kDa jeweils die schwere Kette des Primärantikörpers detektiert wird.

Spur 1: Immunpräzipitation eines Zelllysats von stabil mGAT1 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 2: Immunpräzipitation eines Zelllysats von stabil mGAT2 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-BGT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 3: Immunpräzipitation eines Zelllysats von stabil mGAT3 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-2 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

Spur 4: Immunpräzipitation eines Zelllysats von stabil mGAT4 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-3 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

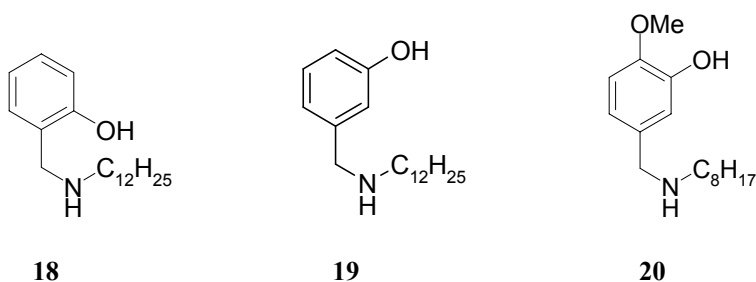
Spur 5: Immunpräzipitation eines Zelllysats von stabil hGAT-1 exprimierenden HEK Zellen; Primärantikörper: anti-GAT-1 (aus Kaninchen); Sekundärantikörper: goat anti rabbit IgG (HRP konjugiert).

3.5. Synthese neuer als GAT-Inhibitoren in Frage kommender Substanzen

3.5.1. Auswahlkriterien

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit war es, neue als GAT-Inhibitoren in Frage kommende Substanzen zu synthetisieren und dabei eventuell hochpotente und subtypenselektive Verbindungen zu entdecken. Als Leitstrukturen sollten dabei zunächst die von Iversen *et al.*^[47] untersuchten Aminomethylphenole betrachtet werden. Iversen *et al.* beschreiben verschiedene am Aminstickstoff mit unverzweigt-kettigen Alkylresten substituierte Aminomethylphenolderivate als kompetitive Inhibitoren des neuronalen GABA-uptakes. Aminomethylphenole können aufgrund ihrer Molekülstruktur als Bioisostere zu GABA aufgefasst werden. Dabei imitiert die Hydroxylgruppe die Carboxylfunktion von GABA.

Drei der von Iversen charakterisierten Substanzen erwiesen sich dabei als gute Inhibitoren des neuronalen GABA-uptakes: 2-Dodecylaminomethylphenol (**18**), 3-Dodecylaminomethylphenol (**19**) und 5-Octylaminomethyl-2-methoxyphenol (**20**). Die Arbeit von Iversen *et al.* entstand 1981; damals war noch nicht bekannt, dass es verschiedene GABA-Transporter-Subtypen gibt. Die Untersuchungen wurden damals an einer Präparation aus dem Cortex von Ratten durchgeführt. Es ist zu vermuten, dass Iversen *et al.* hier die durch GAT-1 vermittelte Inhibition des neuronalen GABA-uptake gemessen haben; denn inzwischen ist bekannt, dass GAT-1 in sehr hohem Maß im Cortex vorhanden ist.

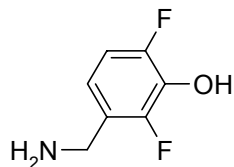
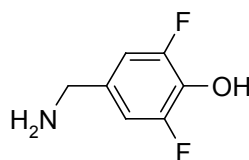


Als IC_{50} -Werte des neuronalen GABA-uptakes wurden für diese Verbindungen an einer Cortex-Präparation von Iversen *et al.* 25 μM für **18** und 52 μM für **20** ermittelt. Bei Zusatz von **19** in einer Konzentration von 1 mM werden nur noch 65 Prozent der GABA-Menge, die ohne Inhibitorzusatz transportiert wird, in die Zelle aufgenommen. **19** hemmt also in einer Konzentration von 1 mM den neuronalen GABA-uptake zu 35 Prozent^[47].

Vergleicht man die Potenz dieser Substanzen mit einem selektiven GAT-1-Inhibitor wie dem NO711 mit einem IC_{50} -Wert von 47 nM^[42] an hGAT-1, so stellt man fest, dass NO711 den durch GAT1 vermittelten GABA-uptake um drei Zehnerpotenzen besser inhibiert als die genannten Aminomethylphenole. Es wurde angenommen, dass dies am Dodecyl-beziehungsweise Octyl-Rest liegt, da diese als lipophile Reste für GAT-Inhibitoren weniger geeignet sein dürften. Bedenkt man, dass die dem NO711 zugrunde liegende Leitstruktur, nämlich das Guvacin, nur einen IC_{50} -Wert von 14 μM an hGAT-1 aufweist^[46], so könnte man erwarten, dass sich die Potenz der Aminomethylphenole als GAT-Inhibitoren wesentlich steigern ließe, indem ein passender lipophiler Rest – wie etwa bei NO711 – in die Moleküle eingeführt wird.

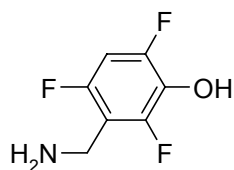
Ein zweiter Ansatzpunkt, die Potenz der Aminomethylphenole als kompetitive Inhibitoren der GAT-Proteine zu verbessern, wurde darin gesehen, die Acidität der phenolischen OH-Gruppe zu erhöhen, was beispielsweise durch eine Fluorsubstitution möglich wäre. Denn ähnlich wie bei GABA soll auch bei GABA-Mimetika die Säurefunktion unter physiologischen Bedingungen fast vollständig dissoziiert sein, da die ionische als die eigentliche Wirkform angenommen wird. Dieses wichtige Kriterium erfüllen die Aminomethylphenole nur unzureichend, da sie aufgrund ihrer geringen Acidität unter physiologischen Bedingungen kaum als Zwitterionen vorliegen.

Silverman *et al.*^[48] beschreiben das 3-Aminomethyl-2,6-difluorphenol (**21**) sowie das 4-Aminomethyl-2,6-difluorphenol (**22**) als kompetitive Inhibitoren der GABA-Aminotransferase.

**21****22**

Verglichen mit Phenol, das einen pK_a von 9.8 besitzt, weisen diese Verbindungen eine wesentlich höhere Acidität auf: Für 2,6-Difluorphenol wurde ein pK_a von 7.1 ermittelt^[65]. Somit sind die Aminomethylfluorphenole bezüglich der phenolischen OH-Funktion unter physiologischen Bedingungen nahezu vollständig dissoziiert, liegen also als Zwitterionen vor, womit sie ein wichtiges Kriterium für potente GABA-Mimetika erfüllen.

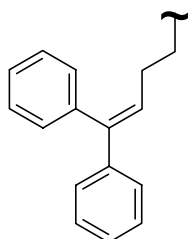
Neben den von Silverman *et al.* beschriebenen Verbindungen sollte auch noch eine andere vielversprechende Leitstruktur näher betrachtet werden, nämlich das 3-Aminomethyl-2,4,6-trifluorphenol (**23**).

**23**

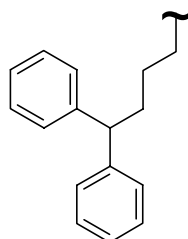
Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, ausgehend von den eben genannten Leitstrukturen (**18-23**) verschiedene Derivate herzustellen und dabei zu neuen potenten GAT-Inhibitoren zu gelangen. Um die Potenz der Ausgangsverbindungen als GABA-uptake Inhibitoren zu steigern, sollten – wie bereits angedeutet – am Aminstickstoff der Aminomethylphenole und Aminomethylfluorphenole geeignete lipophile Seitenketten eingeführt werden. Diese Reste erfüllen drei wichtige Funktionen:

- Sie erhöhen die Lipophilie der Zielmoleküle und machen sie damit ZNS-gängig.
- Sie erhöhen die Affinität der Zielmoleküle zu den verschiedenen GABA-Transportern.
- Sie erhöhen die Selektivität für den jeweiligen GABA-Transporter-Subtyp.

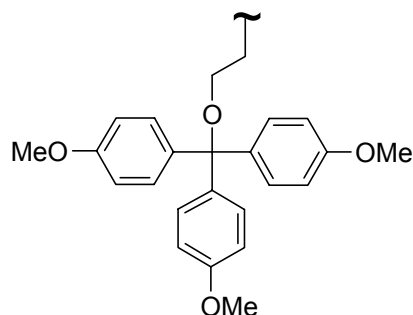
Aus der Literatur ist eine Vielzahl derartiger Reste bekannt^[40,41,42,46]. Bei diesen handelt es sich immer um relativ große Moleküle; es konnte sogar festgestellt werden, dass kleinere Strukturen die Affinität zu den GABA-Transportern verringern^[40]. Auf Seite 9f. finden sich Beispiele für geeignete lipophile Reste. Für diese Arbeit wurden als Seitenketten der 4,4-Diphenylbut-3-enyl- (**24**), der 3,3-Diphenylpropyl-Rest (**25**) und der 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl-Rest (**26**) ausgewählt. **24** ist dabei ein typischer Rest für GAT-1 selektive Inhibitoren, während **26** das Kennzeichen selektiver GAT-3-Inhibitoren ist^[46]. **25** ist bisher nicht als Rest für GAT-Inhibitoren bekannt; aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit **24** sollte er jedoch mituntersucht werden.



24



25

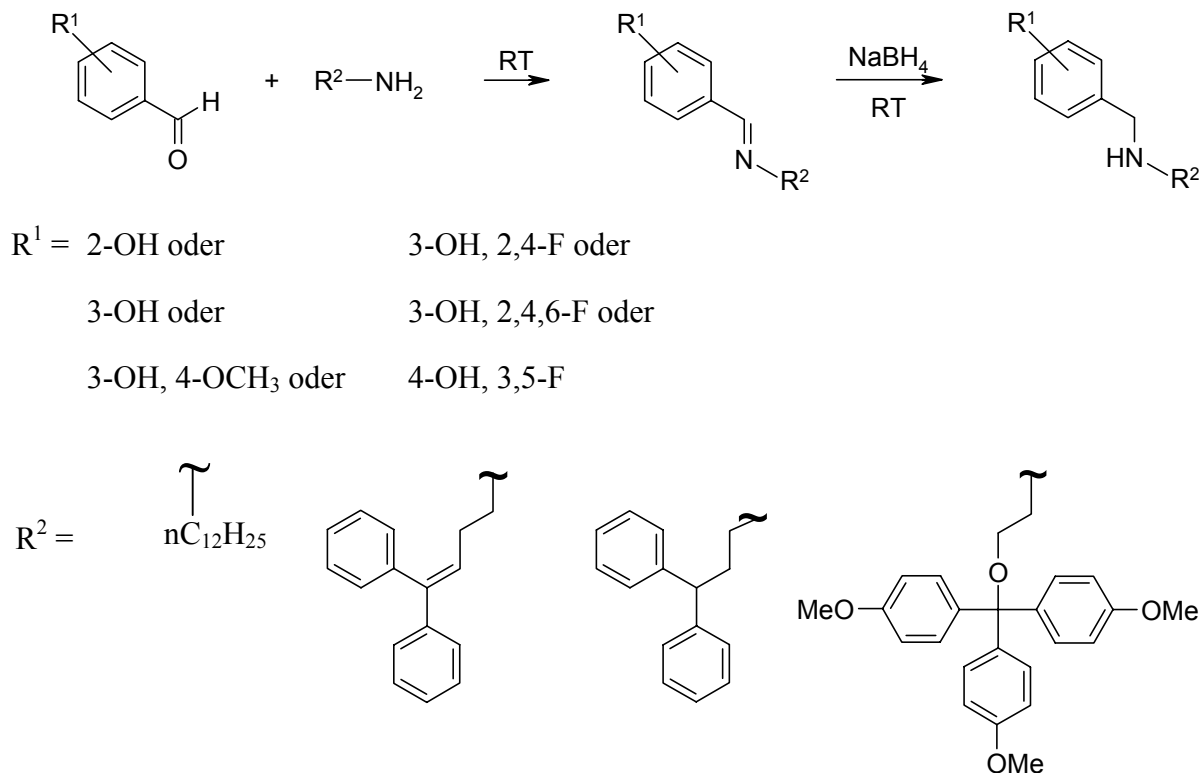


26

3.5.2. Synthesestrategie

Die verschiedenen Aminomethylphenol- und Aminomethylfluorphenolderivate sollten durch reduktive Aminierung^[66] von Benzaldehydderivaten mit den als primären Aminen eingesetzten lipophilen Resten synthetisiert werden. Ein großes Problem bei der Synthese von sekundären aus primären Aminen besteht darin, dass ohne geeignete Schutzmaßnahmen häufig am Stickstoff überalkyliert wird. Als unerwünschte Nebenprodukte fallen dann tertiäre Amine beziehungsweise quartäre Ammoniumsalze an. Mittels der reduktiven Aminierung lassen sich sekundäre Amine vergleichsweise selektiv darstellen. Besonders vorteilhaft ist es dabei, zunächst die Iminzwischenstufe zu bilden und zu isolieren. Diese kann anschließend zum sekundären Amin reduziert werden.

Die allgemeine Vorgehensweise bei der reduktiven Aminierung ist in Schema 1 dargestellt:



Schema 1: Reduktive Aminierung

Die erforderlichen nicht fluorsubstituierten Benzaldehydderivate waren käuflich erhältlich, die fluorsubstituierten Benzaldehydderivate mussten erst synthetisiert werden.

Hierfür sollte eine Literaturvorschrift von Songca *et al.*^[67] verwendet werden. Dort wird die Synthese von 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd und von 2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd beschrieben. 2,4,6-Trifluor-3-hydroxybenzaldehyd könnte dann analog zu der Vorschrift für 2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd hergestellt werden. Nähere Angaben dazu sind unter 3.5.5. auf Seite 60ff. zu finden.

Die lipophilen Reste sollten gemäß dem Syntheseplan als primäre Amine eingesetzt werden. 3,3-Diphenyl-propylamin war käuflich erhältlich, so dass nur 4,4-Diphenylbut-3-enylamin und 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamin bereitgestellt werden mussten.

4,4-Diphenylbut-3-enylamin konnte dabei auf bekanntem Weg in Analogie zu zwei Literaturvorschriften^[40,68,69] synthetisiert werden.

Das bislang nicht literaturbekannte 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)-methoxy]ethylamin hingegen sollte auf neuem Weg aus Tris-(4-methoxyphenyl)methanol über eine Phthalimidzwischenstufe hergestellt werden. Nähere Angaben zur Synthese können dem Punkt 3.5.3. auf Seite 54ff. entnommen werden.

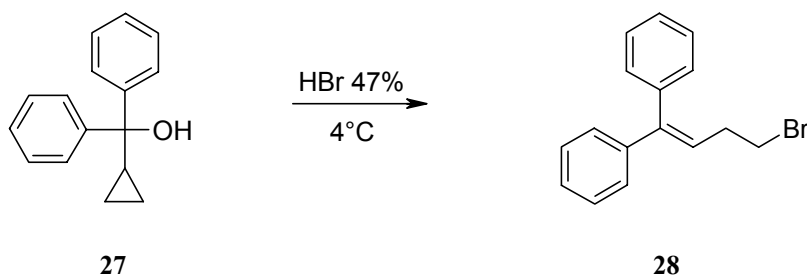
Im Folgenden wird zunächst auf die Synthese der lipophilen Reste eingegangen (siehe unter 3.5.3.), ehe im Detail die Herstellung der jeweiligen Aminomethylphenol- (siehe unter 3.5.4.) und Aminomethylfluorphenolderivate (siehe unter 3.5.5.) beschrieben wird.

3.5.3. Synthese der lipophilen Reste

3.5.3.1. 4,4-Diphenylbut-3-enylamin x HCl (31)

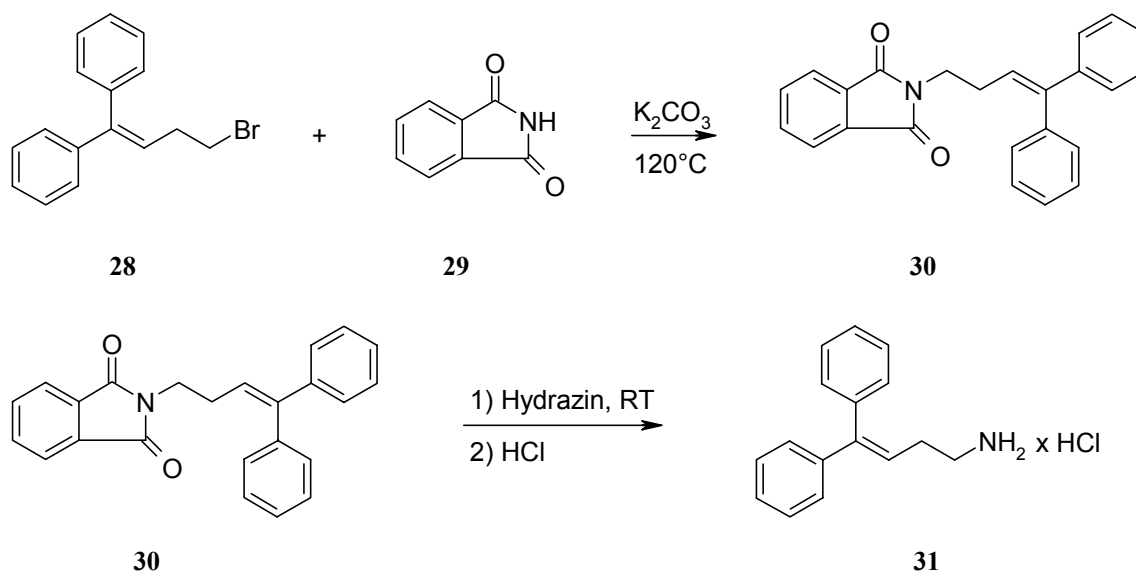
4,4-Diphenylbut-3-enylamin x HCl (**31**) wurde durch Kombination dreier Literaturvorschriften auf bekanntem Weg synthetisiert.

Zunächst wurde hierbei Cyclopropyldiphenylcarbinol (**27**) mit 47 % Bromwasserstoffsäure bei 4°C einer Literaturvorschrift folgend^[40] zu 4,4-Diphenylbut-3-enylbromid (**28**) umgesetzt (Schema 2). Nachdem das Rohprodukt durch Säulenchromatographie gereinigt worden war, erhielt man **28** – wie in der Literatur beschrieben – mit einer Ausbeute von 96 Prozent.



Schema 2: Synthese von 4,4-Diphenylbut-3-enylbromid (**28**)

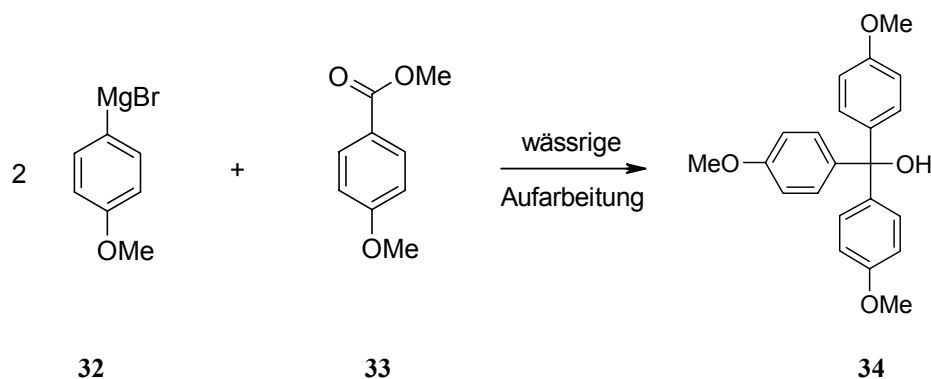
4,4-Diphenylbut-3-enylbromid (**28**) wurde daraufhin in Analogie zu einer Literaturvorschrift^[68] durch Erhitzen auf 120°C unter Zusatz von K₂CO₃ einer S_N-Reaktion mit Phthalimid (**29**) unterzogen. Das Phthalimiderivat (**30**) wurde bei Raumtemperatur nach der Methode von van der Bent *et al.*^[69] mit Hydrazin gespalten und das gebildete freie Amin sofort in das Hydrochlorid (**31**) überführt. Dieses konnte durch Umkristallisieren gereinigt werden (Schema 3). Die Substitutionsreaktion des Alkylhalogenids mit Phthalimid verlief unter einer Ausbeute von 80 Prozent (Literatur 80 Prozent); die anschließende Hydrazinolyse erfolgte nahezu quantitativ. Die Ausbeute belief sich auf 97 Prozent und übertrifft damit die in der Literatur beschriebene Ausbeute von 52 Prozent deutlich.



Schema 3: Synthese von 4,4-Diphenylbut-3-enylamin x HCl (**31**)

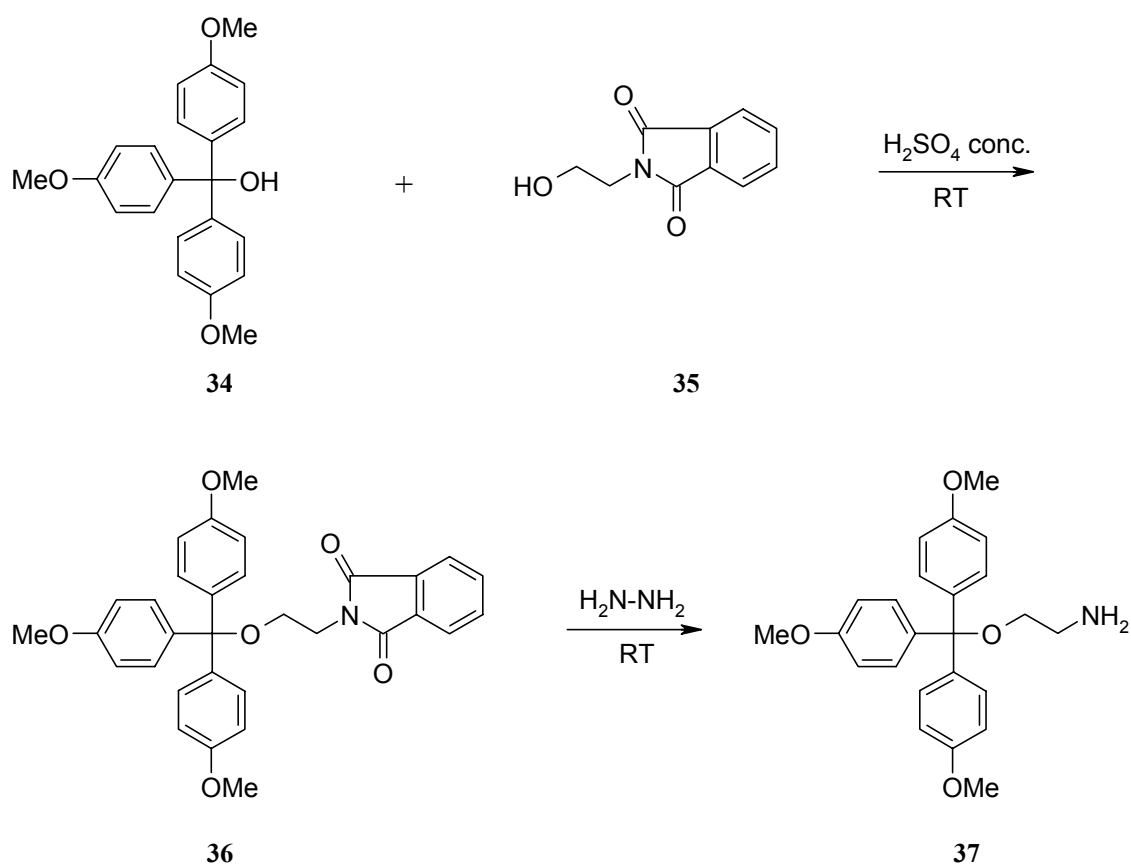
3.5.3.2. 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)-methoxy]ethylamin (**37**)

Tris-(4-methoxyphenyl)methanol (**34**) wurde als Vorstufe zur Darstellung des primären Amins **37** gemäß der Vorschrift von Dhar *et al.*^[46] durch eine Grignard-Reaktion zwischen 4-Methoxyphenylmagnesiumbromid (**32**) und Anissäuremethylester (**33**) hergestellt. Nach Reinigen durch Säulenchromatographie betrug die Ausbeute an **34** 85 Prozent (Schema 4).



Schema 4: Synthese von Tris-(4-methoxyphenyl)methanol (**34**)

Um ausgehend von Tris-(4-methoxyphenyl)methanol (**34**) das nicht literaturbekannte 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamin (**37**) zu synthetisieren, wurde **34** in Gegenwart von konzentrierter Schwefelsäure mit N-Hydroxyethylphthalimid (**35**) verethert. Dabei entstand **36** in einer Ausbeute von 76 Prozent. Das Phthalimiderivat wurde dann auf bekanntem Weg in Analogie zu einer Literaturvorschrift von Breipohl *et al.*^[70] mit Hydrazin zum freien Amin (**37**) hydrolysiert, das durch Säulenchromatographie gereinigt wurde (Schema 5). Die Ausbeute an 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamin (**37**) betrug 94 Prozent.



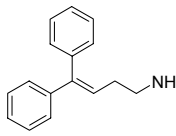
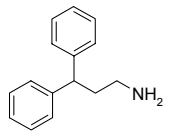
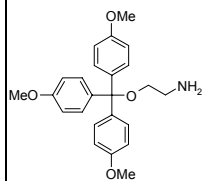
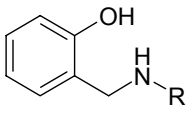
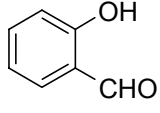
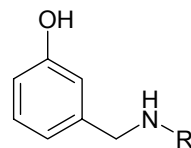
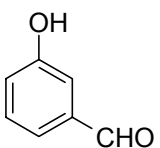
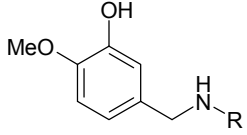
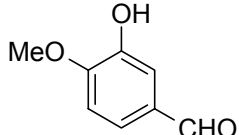
Schema 5: Synthese von 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)-methoxy]ethylamin (**37**)

3.5.4. Synthese von Aminomethylphenolderivaten

Die verschiedenen Aminomethylphenolderivate sollten nun – wie bereits ausgeführt – durch reduktive Aminierung hergestellt werden. Der lipophile Rest wurde dabei als primäres Amin (1.2 eq) eingesetzt und zunächst mit dem entsprechenden Hydroxybenzaldehydderivat (1.0 eq) zur Schiffbase kondensiert. Die Reaktion führte man in Ethanol über 20 Stunden bei Raumtemperatur aus. Durch Zusatz von Molekularsieb (3 Å) wurde entstandenes Reaktionswasser entfernt und so das Gleichgewicht auf die Produktseite verschoben. Die Schiffbase wurde anschließend über Kieselgel filtriert, vollständig mit Ethanol eluiert und im Vakuum fast zur Trockene eingengt. Den Rückstand nahm man wiederum in Ethanol auf und reduzierte dann die Schiffbase durch Zusatz von Natriumborhydrid (1.2 eq) zum sekundären Amin. Die Reaktion dauerte bei Raumtemperatur etwa zwei Stunden. Die Rohprodukte wurden daraufhin durch Säulenchromatographie gereinigt.

Die mit einem *n*Dodecyl-Rest substituierten Aminomethylphenole (**38-40**) waren nur in sehr dürftigen Ausbeuten (22 bis 50 Prozent) zugänglich. Auch die Ausbeuten der Verbindungen **41-48** waren mit 57 bis 86 Prozent nur mittelmäßig. Diese Tatsache könnte mit einer unzureichenden Iminbildung sowie Verlusten bei den Reinigungsschritten erklärt werden. Da die genannten Stoffe aber mit dem Ziel synthetisiert wurden, ausreichend Substanz für spätere biologische Tests zu erhalten, reichten die erzielten Ausbeuten völlig aus.

Die durch reduktive Aminierung synthetisierten Aminomethylphenolderivate sind Tabelle 5 zu entnehmen. Während **38** und **39** bereits von Iversen *et al.*^[47] synthetisiert worden waren, waren die Verbindungen **40** bis **48** noch nicht literaturbekannt.

| | Edukt | R = $n\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{-NH}_2$ | R =  | R =  | R =  |
|--|--|---|--|---|---|
|  |  | 38 50 % | 41 66 % | 44 69 % | 46 86 % |
|  |  | 39 37 % | 42 57 % | 45 69 % | 47 80 % |
|  |  | 40 22 % | 43 70 % | nicht synthetisiert | 48 75 % |

Tab. 5: Durch reduktive Aminierung synthetisierte Aminomethylphenolderivate; die Prozentwerte geben jeweils die Ausbeute an.

Stellvertretend für die Aminomethylphenolderivate ist in Abbildung 18 das ^1H NMR-Spektrum der Verbindung **41** dargestellt, das die Struktur der Verbindung eindeutig belegt.

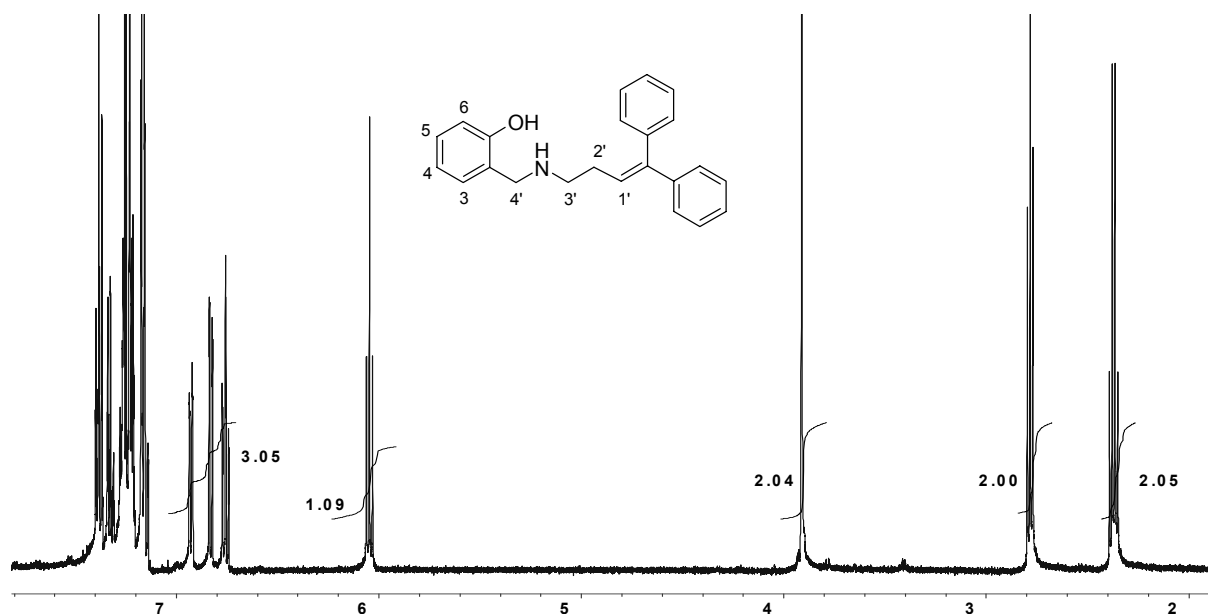


Abb. 18: ¹H NMR von **41** (aufgenommen in CDCl₃)

Bei 2.38 ppm ($J = 6.9$ Hz) findet man ein Signal, das den beiden Protonen in 2'-Stellung entspricht und durch die drei Nachbarprotonen in ein Quartett aufgespalten ist. Die Protonen H-3' koppeln mit den beiden Protonen H-2' und erscheinen daher als Triplet bei 2.78 ppm ($J = 6.9$ Hz). Die isolierten Protonen H-4' treten als Singulett bei 3.92 ppm auf. Die größte chemische Verschiebung innerhalb der Seitenkette zeigt schließlich das olefinische Proton H-1', das aufgrund der Kopplung mit den beiden ihm benachbarten Protonen H-B' als Triplet bei 6.05 ppm ($J = 6.9$ Hz) zu sehen ist.

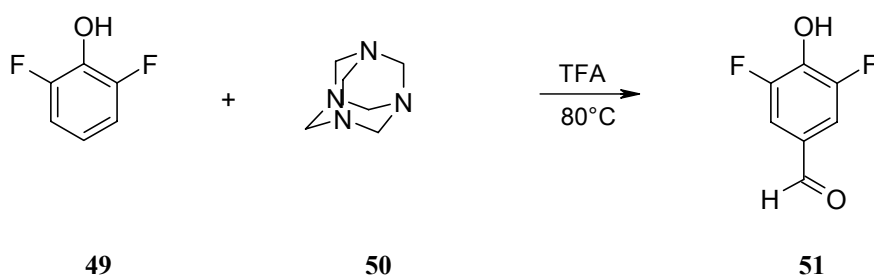
Nach Inkrementberechnung sollte das Triplet bei 6.76 ppm ($J = 7.5$ Hz) auf H-4 und die beiden Dubletts bei 6.84 ppm ($J = 7.5$ Hz) und 6.94 ppm ($J = 7.5$ Hz) auf H-6 beziehungsweise H-3 zurückzuführen sein. Bei etwa 7.20 ppm dürfte H-5 wiederum als Triplet erscheinen. Dieses Signal ist unter dem Multipllett verdeckt. Den aromatischen Protonen der Seitenkette kann das Multipllett bei 7.15 bis 7.38 ppm zugeordnet werden.

3.5.5. Synthese von Aminomethylfluorphenolderivaten

Schließlich sollten noch mit für GAT-Inhibitoren geeigneten lipophilen Seitenketten substituierte Aminomethylfluorphenolderivate mittels reduktiver Aminierung synthetisiert werden. Dafür war es nötig, zunächst die verschiedenen Grundkörper herzustellen. Songca *et al.*^[67] beschreiben die Synthese von 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd (**51**) und 2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd (**54**). Für die bisher nicht literaturbekannte Verbindung 2,4,6-Trifluor-3-hydroxybenzaldehyd (**55**) sollte versucht werden, diese in Analogie bereitzustellen.

3.5.5.1. Synthese der Grundkörper

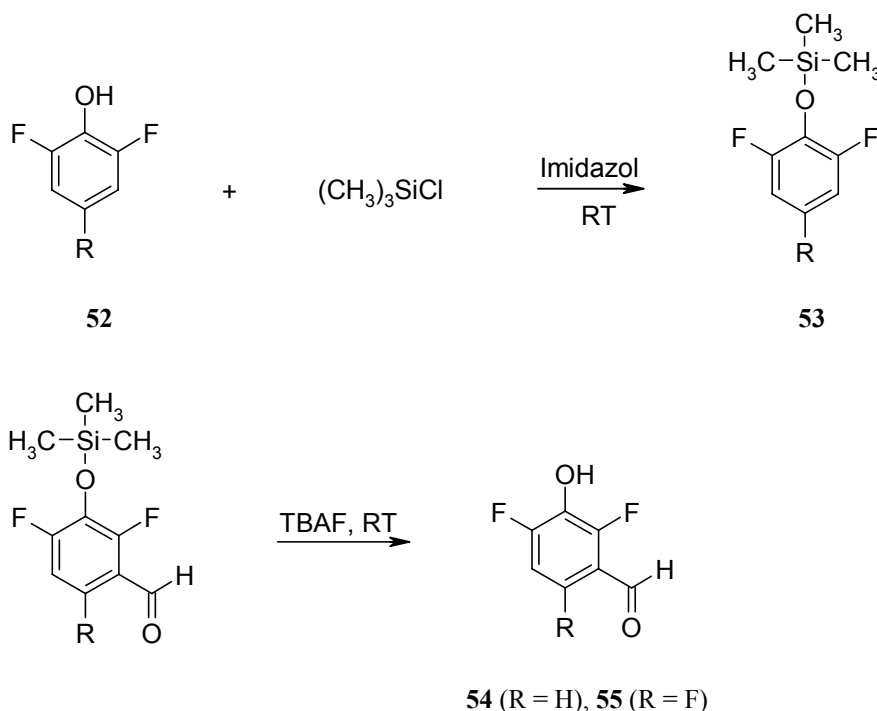
Für die Synthese von **51** wurden – wie von Songca *et al.*^[67] beschrieben – 2,6-Difluorphenol (**49**) und Hexamethylentetramin (**50**) in Trifluoressigsäure fünf Stunden bei 80°C unter Stickstoffatmosphäre erhitzt (Schema 6). Nach Umkristallisieren konnte 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd (**51**) mit 62 Prozent Ausbeute erhalten werden (Literatur: 55 Prozent).



Schema 6: Synthese von 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd (**51**)

2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd (**54**; R=H) wurde ebenfalls nach der Vorschrift von Songca *et al.*^[67] hergestellt. Dabei wurde zunächst 2,6-Difluorphenol (**52**; R = H) mit Trimethylsilylchlorid umgesetzt, um die phenolische Hydroxylgruppe zu schützen. Imidazol diente dabei als Hilfsbase. Der entstandene Trimethylsilylether (**53**; R = H) wurde dann durch

sec-Butyllithium in *meta*-Stellung deprotoniert. Durch Reaktion bei -78°C wurde mit Dimethylformamid eine Formylgruppe eingeführt. Nach dem Abspalten der Schutzgruppe mit Tetrabutylammoniumfluorid erhielt man **54** (Schema 7). Der noch nicht literaturbekannte 2,4,6-Trifluor-3-hydroxybenzaldehyd (**55**; $\text{R}=\text{F}$) konnte vollkommen analog dargestellt werden. Die Ausbeute betrug für **54** 51 Prozent (Literatur 49 Prozent) und für **55** 22 Prozent.



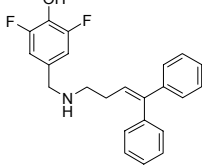
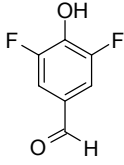
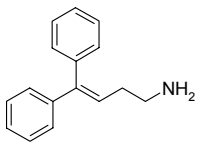
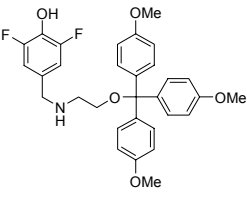
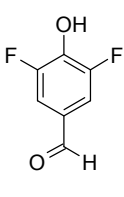
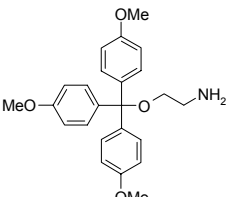
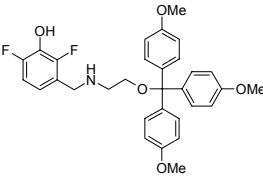
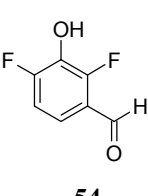
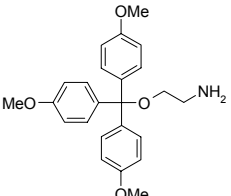
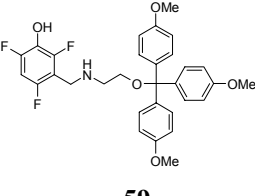
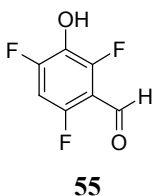
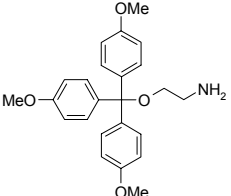
Schema 7: Synthese von *meta*-substituierten Fluorhydroxybenzaldehyden

3.5.5.2. Synthese der Aminomethylfluorphenolderivate

Nachdem nun die erforderlichen Benzaldehydderivate bereitgestellt waren, galt es, verschiedene Aminomethylfluorphenolderivate zu generieren. Diese sollten in Analogie zu den Aminomethylphenolderivaten durch reduktive Aminierung synthetisiert werden. Hierbei ging man wie bereits unter 3.5.3. auf Seite 57 beschrieben vor. Die Rohprodukte wurden hier sowohl durch Umkristallisieren als auch durch Säulenchromatographie gereinigt. Die Ausbeuten waren im Vergleich zu den Aminomethylphenolen mit 31 bis 62 Prozent deutlich

schlechter. Dies hängt wahrscheinlich mit der zunehmenden Schwerlöslichkeit dieser Verbindungen zusammen, die zum Teil schon während der Bildung der Iminzwischenstufe ausfielen und womöglich dann bei der folgenden Filtration über Kieselgel verloren gingen.

Tabelle 6 stellt die vier neu synthetisierten, noch nicht literaturbekannten Aminomethylfluorphenolderivate vor:

| | Produkt | Benzaldehydderivat | primäres Amin | Ausbeute |
|---|--|--|---|-----------------|
| 1 |  56 |  51 |  31 | 31 % |
| 2 |  57 |  51 |  37 | 54 % |
| 3 |  58 |  54 |  37 | 56 % |
| 4 |  59 |  55 |  37 | 62 % |

Tab. 6: Durch reduktive Aminierung synthetisierte Aminomethylfluorphenolderivate

In Abbildung 19 ist stellvertretend für die Aminomethylfluorphenolderivate das ^1H NMR von **57** zu sehen, durch das die Struktur der Verbindung eindeutig belegt wird.

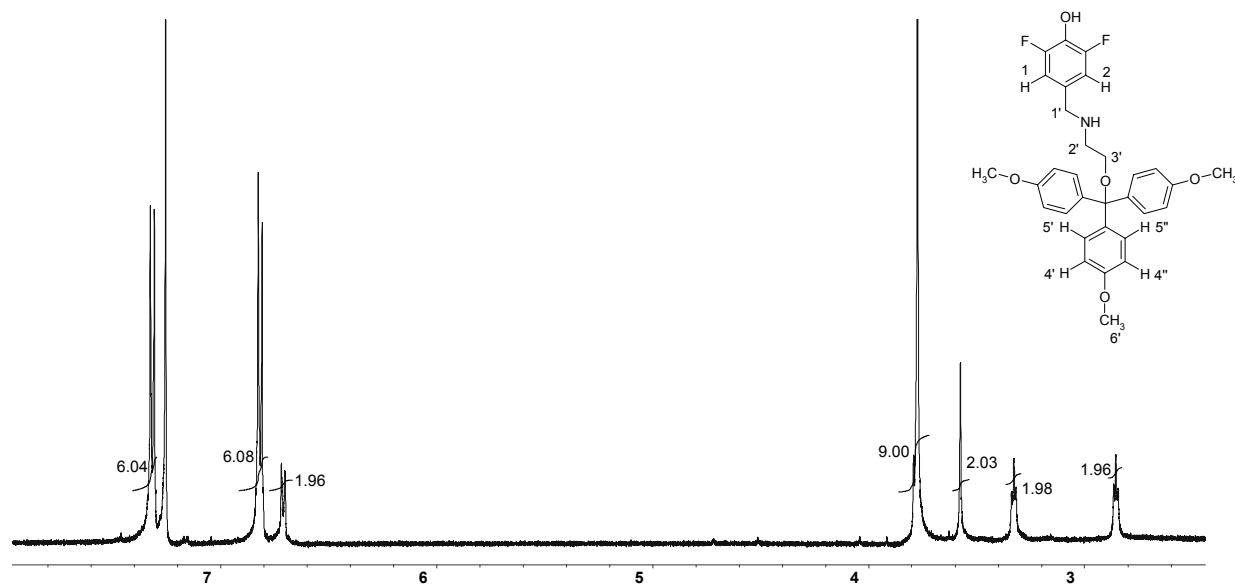
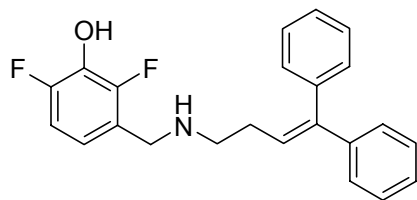
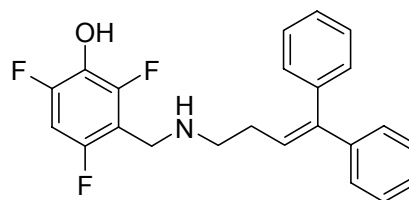


Abb. 19: ^1H NMR von **57** (aufgenommen in CDCl_3)

Besonders hingewiesen sei auf die beiden aromatischen Protonen H-1 und H-2, die aufgrund der symmetrischen Substitution des Aromaten zusammen bei 6.67 ppm erscheinen. Aufgrund einer Fluorkopplung spalten sie in ein Dublett ($J = 8.4$ Hz) auf. Die Signale bei 6.83 ppm und 7.30 ppm sind den zwölf aromatischen Protonen H-4'4'' und H-5'5'' der Trityleinheit zuzuordnen. Als 4'4''5'5''-Einheit bilden die Protonen ein Spinsystem höherer Ordnung, wobei die Signale näherungsweise zu Dubletts mit einer Kopplungskonstante von jeweils 6.6 Hz aufspalten. Die Protonen H-2' und H-3' erscheinen als Triplets bei 2.86 ppm ($J = 5.3$ Hz) beziehungsweise bei 3,33 ppm ($J = 5.3$ Hz), wobei H-3' durch die Sauerstoffsubstitution stärker entschirmt sind. Die isolierten Protonen H-1' (3.58 ppm) und H-6' (3.78 ppm) treten schließlich jeweils als Singulett auf und lassen sich auf Grund ihrer Signalintensität eindeutig zuordnen (H-1' = 2H; H-6' = 9H).

Neben den genannten Aminomethylfluorphenolen wäre natürlich auch interessant gewesen, weitere Derivate mit einem 4,4-Diphenylbut-3-enyl-Rest zu synthetisieren (**60**, **61**).

**60****61**

Leider ist es nicht gelungen, diese beiden Substanzen herzustellen. Der Grund hierfür liegt in der äußerst hohen Schwerlöslichkeit der Verbindungen. Bereits die Schiffbase fiel jeweils aus dem Reaktionsansatz aus und konnte durch kein gängiges Lösungsmittel – polar wie apolar – mehr aufgenommen werden. So scheiterte selbst der Versuch, die Substanzen durch Ionenpaarbildung mit Tetrabutylammoniumhydroxid oder Weinsäure in Lösung zu bringen. Auch DMSO vermochte als Lösungsvermittler nichts auszurichten.

Da **60** und **61** aufgrund der geschilderten Schwerlöslichkeit nicht zugänglich waren, wurde darauf verzichtet, im Rahmen dieser Arbeit die entsprechenden mit einem 3,3-Diphenylpropyl-Rest substituierten Aminomethylfluorphenole zu synthetisieren. Es lag wegen der strukturellen Ähnlichkeit der Reste nämlich nahe, dass die geschilderten Probleme in ähnlicher Form wieder auftreten würden. Aus Zeitgründen wurde schließlich auch beschlossen, die Synthesevorhaben damit zu beschließen und volle Aufmerksamkeit auf das Screening verschiedener GAT-Inhibitoren an den neu entwickelten Testsystemen zu legen.

3.6. Ermittlung von IC_{50} -Werten neuer und bekannter Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern

Im letzten Teil der vorliegenden Dissertation sollten nun die unter 3.5. beschriebenen, neu synthetisierten Substanzen sowie eine Auswahl verschiedener bekannter GAT-Inhibitoren an den neu für mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und hGAT-1 entwickelten Testsystemen untersucht werden.

Ziel war es, neue potente und subtypenselektive GAT-Inhibitoren oder Grundstrukturen für GAT-Inhibitoren zu identifizieren. Die Ergebnisse sollten insbesondere daraufhin untersucht werden, welche Subtypenselektivitäten die Stoffe an den einzelnen GABA-Transportern zeigen. Möglicherweise könnten dabei neue Struktur-Aktivitäts-Beziehungen gefunden und so die Entwicklung neuer subtypenselektiver GAT-Inhibitoren erleichtert werden. Schließlich sollten sich beim Vergleich der Ergebnisse, die sich an hGAT-1 und mGAT1 zeigen, mögliche Speziesunterschiede hinsichtlich der Potenz der GAT-Inhibitoren aufdecken lassen.

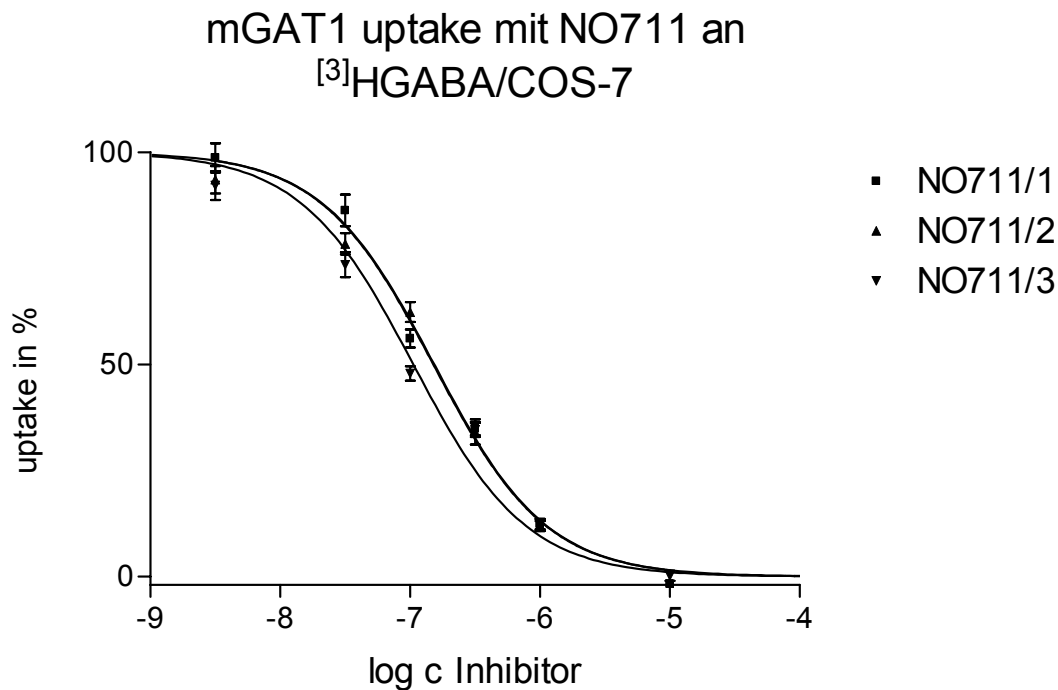
Die im Folgenden angegebenen IC_{50} -Werte von GAT-Inhibitoren am humanen GABA-Transporter hGAT-1 und an den murinen GABA-Transportern mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 wurden ausschließlich an den unter 3.2. beschriebenen, neu entwickelten, auf kloniertem Material basierenden Testsystemen ermittelt (zur Definition des IC_{50} -Werts siehe Seite 26).

Sämtliche IC_{50} -Werte an pGAT-1 wurden mittels Synaptosomenpräparation aus dem frontalen Cortex, IC_{50} -Werte an pGAT-3 mittels Synaptosomenpräparation aus dem Stammhirn frisch geschlachteter, ausgewachsener Schweine von G. Höfner^[54] bestimmt. Genaue Angaben zum Aufbau der beiden darauf basierenden Testsysteme sind dem praktischen Teil auf Seite 123f. zu entnehmen.

Zu beachten ist, dass alle angegebenen IC_{50} -Werte Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen sind. Innerhalb eines Versuchs wurden alle Einzelwerte für jede Inhibitor-konzentration als Triplikat ermittelt. In jedem Probenblock wurde zudem mit einem Triplikat die nichtspezifische Aufnahme und mit einem Triplikat die Gesamtaufnahme bestimmt. Die nichtspezifische Aufnahme wurde ermittelt, indem den Zellen, die den jeweiligen GABA-Transporter exprimierten, 10 μ M NO711 bei hGAT-1 und mGAT1 beziehungsweise 1 mM GABA bei mGAT2, mGAT3 und mGAT4 zugesetzt wurde. Im Fall von pGAT-1 und pGAT-3 wurde die nichtspezifische Aufnahme durch ein Puffersystem ohne Natrium bestimmt (siehe dazu S. 124). Die Gesamtaufnahme wurde in allen Testsystemen mit einem Triplikat ohne weiteren Inhibitorzusatz bestimmt.

Spezifische Aufnahme wurde definiert als Gesamtaufnahme abzüglich der nichtspezifischen Aufnahme. Sämtliche IC_{50} -Werte wurden mit Prism 2.01 durch nichtlineare Regressionsanalyse ermittelt. IC_{50} -Werte konnten natürlich nicht bestimmt werden, wenn der Inhibitor in seiner höchsten einsetzbaren Konzentration die spezifische GABA-Aufnahme um weniger als 50 Prozent reduzierte. Es wurden also mehr als 50 Prozent der GABA-Menge, die ohne Inhibitorzusatz durch das jeweilige GAT-Protein transportiert würde (100 Prozent), in die Zelle aufgenommen. In solchen Fällen wurde zur Charakterisierung der Inhibition eben dieser Prozentwert angegeben.

In Abbildung 20 ist am Beispiel von NO711 dargestellt, wie mit Prism 2.01 der IC_{50} -Wert dieser Substanz an mGAT1 bestimmt werden konnte.



| | NO711/1 | NO711/2 | NO711/3 |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Equation 1 | | | |
| Variables | | | |
| BOTTOM (Constant) | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| TOP (Constant) | 100.0 | 100.0 | 100.0 |
| LOGEC50 | -6.821 | -6.975 | -6.814 |
| EC50 | 1.512e-007 | 1.060e-007 | 1.535e-007 |
| Std. Error | | | |
| LOGEC50 | 0.04123 | 0.06154 | 0.03665 |
| 95% Confidence Intervals | | | |
| LOGEC50 | -6.927 to -6.715 | -7.133 to -6.816 | -6.908 to -6.720 |
| EC50 | 1.184e-007 to 1.930e-007 | 7.365e-008 to 1.526e-007 | 1.236e-007 to 1.907e-007 |
| Goodness of Fit | | | |
| Degrees of Freedom | 5 | 5 | 5 |
| R ² | 0.9971 | 0.9918 | 0.9978 |
| Absolute Sum of Squares | 20.94 | 51.25 | 17.74 |
| Sy.x | 2.046 | 3.201 | 1.883 |
| Data | | | |
| Number of X values | 10 | 8 | 8 |
| Number of Y replicates | 1 | 1 | 1 |
| Total number of values | 6 | 6 | 6 |
| Number of missing values | 4 | 2 | 2 |

Abb. 20: Ermittlung des IC_{50} -Wertes von NO711 mit Prism 2.01 an mGAT1

3.6.1. Screening der unter 3.5. beschriebenen, neu synthetisierten Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern

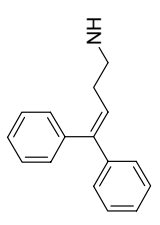
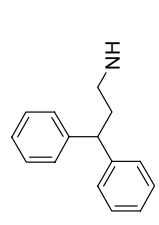
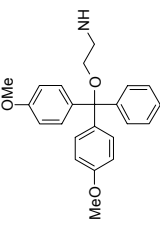
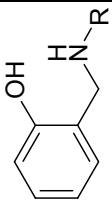
Nun sollten die unter 3.5. beschriebenen, im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Substanzen auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren hin untersucht werden. Um die Verbindungen überhaupt testen zu können, mussten sie zunächst in Wasser oder einem anderen geeigneten Lösungsmittel gelöst werden. Alle Stoffe erwiesen sich als wasserunlöslich. Daher mussten sie in DMSO aufgenommen werden. Die hierbei maximal mögliche Endkonzentration betrug 10 mM. In höheren Konzentrationen waren die Verbindungen auch in DMSO nicht löslich.

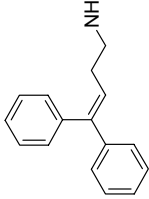
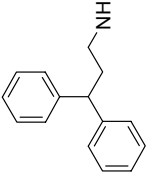
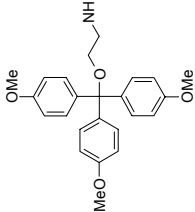
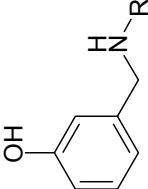
Im Assay wird ein Prozent DMSO von den Zellen toleriert. Dies konnte in Versuchen gezeigt werden, in denen alle Messwerte in Gegenwart von einem Prozent DMSO erhoben und daraus korrekte Ergebnisse erhalten werden konnten. Hierbei wird auch den Kontrollmessungen ein Prozent DMSO zugesetzt. In höheren Konzentrationen allerdings wirkt DMSO toxisch auf die Zellen. Die uptake-Inhibition ist dann nicht auf den eigentlichen Arzneistoff, sondern hauptsächlich auf das DMSO zurückzuführen. Dieses Phänomen konnte in einem Versuch beobachtet werden, in dem versehentlich die DMSO-Konzentration drei Prozent betrug. Deshalb mussten alle neu synthetisierten, in DMSO gelösten Verbindungen für das Screening an den verschiedenen GABA-Transportern 1:100 in ein wässriges Puffersystem verdünnt werden.

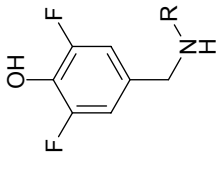
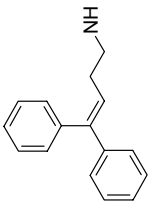
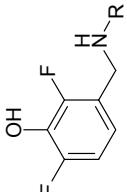
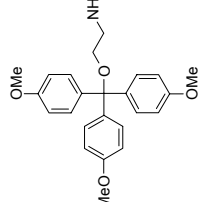
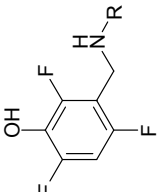
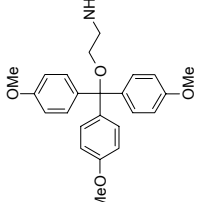
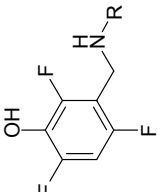
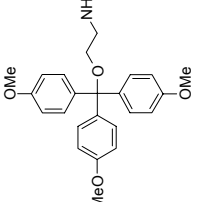
Dabei stellte sich allerdings heraus, dass alle neu synthetisierten Substanzen selbst in der resultierenden Endkonzentration von 100 μ M aus wässriger Lösung ausfielen. Mit Hilfe einer Verdünnungsreihe wurde dann für jede Verbindung die höchstmögliche Konzentration ermittelt, bei welcher der Stoff noch in Lösung blieb. Diese betrug in der Regel 5-10 μ M; nur eine Substanz konnte in einer Konzentration von 20 μ M im wässrigen Puffersystem gelöst werden.

So entstand ein Problem: Aufgrund der maximal einsetzbaren Inhibitorkonzentrationen von 5-10 μM erschien es sehr unwahrscheinlich, IC_{50} -Werte für die Verbindungen an den verschiedenen GAT-Proteinen bestimmen zu können. Bedenkt man nämlich, dass GABA selbst an den vier GABA-Transportern einen IC_{50} -Wert um 5 μM besitzt, so wird deutlich, dass es nur für äußerst wirksame Inhibitoren noch möglich sein würde, bei den einsetzbaren Konzentrationen einen IC_{50} -Wert zu ermitteln.

Daher wurden alle neu synthetisierten Substanzen zunächst einem Screening an den verschiedenen GABA-Transportern unterzogen. Die daraus resultierenden Ergebnisse sind Tabelle 7 zu entnehmen. Die Prozentwerte geben den [^3H]GABA uptake bei Zusatz eines Inhibitors in der angegebenen Konzentration im Vergleich zur Gesamtaufnahme jeweils abzüglich der nichtspezifischen Aufnahme an.

| | R-NH | Nr. | Konz. | hGAT-1 | mGAT1 | pGAT-1 | mGAT2 | mGAT3 | mGAT4 | pGAT-3 | |
|--|---|-----------|------------|---------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--|
| | $nC_{12}H_{25}-NH$ | 38 | 5 μM | 104.0 % | 85.0 % | 94.8 % | 74.5 % | 100.6 % | 83.1 % | 93.9 % | |
| |  | 41 | 10 μM | 79.3 % | 76.3 % | 96.3 % | 68.9 % | 75.0 % | 74.1 % | 82.3 % | |
| |  | 44 | 10 μM | 68.4 % | 91.2 % | 83.9 % | 80.3 % | 102.6 % | 86.1 % | 94.1 % | |
| |  | 46 | 5 μM | 72.0 % | 83.3 % | 97.9 % | 115.8 % | 99.6 % | 81.1 % | 87.7 % | |
| |  | | | | | | | | | | |

| | R-NH | Nr. | Konz. | hGAT-1 | mGAT1 | pGAT-1 | mGAT2 | mGAT3 | mGAT4 | pGAT-3 | |
|--|---|-----------|------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | $nC_{12}H_{25}-NH$ | 39 | 5 μM | 100.9 % | 81.7 % | 99.9 % | 82.4 % | 83.2 % | 76.2 % | 93.4 % | |
| |  | 42 | 10 μM | 82.4 % | 74.9 % | 91.6 % | 90.7 % | 67.8 % | 78.9 % | 80.1 % | |
| |  | 45 | 20 μM | 58.0 % | 84.1 % | 97.3 % | 94.7 % | 95.2 % | 78.2 % | 77.6 % | |
| |  | 47 | 10 μM | 68.4 % | 65.5 % | 89.5 % | 85.1 % | 77.4 % | 73.0 % | 84.3 % | |
| |  | | | | | | | | | | |

| | R-NH | Nr. | Konz. | hGAT-1 | mGAT1 | pGAT-1 | mGAT2 | mGAT3 | mGAT4 | pGAT-3 |
|---|---|-----------|------------|--------|---------|---------|---------|---------|--------|---------|
|  |  | 56 | 10 μ M | 82.6 % | 89.2 % | 96.3 % | 110.0 % | 107.6 % | 80.5 % | 90.8 % |
|  |  | 57 | 10 μ M | 99.3 % | 100.3 % | 103.2 % | 77.0 % | 79.9 % | 81.5 % | 100.9 % |
|  |  | 58 | 5 μ M | 98.7 % | 97.6 % | 104.4 % | 106.5 % | 101.6 % | 96.3 % | 99.5 % |
|  |  | 59 | 5 μ M | 96.5 % | 86.2 % | 99.4 % | 83.4 % | 86.7 % | 86.9 % | 97.2 % |

Sämtliche neu synthetisierte Substanzen zeigten in der höchstmöglich einsetzbaren Konzentration an allen GABA-Transportern eine so geringe Inhibition der GABA-Aufnahme, dass es nicht möglich war, IC_{50} -Werte zu ermitteln.

Dennoch können aus dem Screening einige Ergebnisse abgeleitet werden:

Die bereits von Iversen *et al.* beschriebenen Verbindungen 2-Dodecylaminomethylphenol (**38**) und 3-Dodecylaminomethylphenol (**39**) sowie das mit einem Dodecylrest substituierte Analogon zum 5-Octylaminomethyl-2-methoxyphenol (**40**) wirken in einer Konzentration von jeweils 5 μM so gut wie gar nicht als Inhibitoren an den verschiedenen GABA-Transportern. Iversen *et al.* bestimmten für **38** an einer Rattencortexpräparation^[F4] einen IC_{50} -Wert von 25 μM beziehungsweise von 52 μM für das 5-Octylaminomethyl-2-methoxyphenol. Für **39** konnten sie in einer Testkonzentration von 1 mM feststellen, dass der neuronale GABA-uptake immerhin zu 35 Prozent gehemmt wird^[47]. Aufgrund der geschilderten Löslichkeitsprobleme von **38**, **39** und **40**, die maximal in einer Konzentration von 5 μM in einem wässrigen Puffersystem löslich waren, scheint mehr als fraglich, wie Iversen *et al.* ihre Werte überhaupt ermitteln konnten.

Obwohl sämtliche im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Stoffe in den durch die Löslichkeit vorgegebenen Konzentrationen von 5-10 μM praktisch nicht als GAT-Inhibitoren wirken, kann keine Aussage getroffen werden, ob sich durch das Ersetzen des Dodecyl-Rests der Verbindungen **38**, **39** und **40** durch den 4,4-Diphenylbut-3-enyl-, den 3,3-Diphenylpropyl-

^[F4] Als die Untersuchungen von Iversen *et al.* ausgeführt wurden, war noch nicht bekannt, dass es vier verschiedene GABA-Transporter-Subtypen gibt. Anhand der geschilderten Vorgehensweise bei der Präparation des Hirnmaterials kann aber davon ausgegangen werden, dass hier der durch GAT1 vermittelte GABA-uptake gemessen wurde.

beziehungsweise den 2-[Tris-(4-methoxy-phenyl)methoxy]ethyl-Rest, die Potenz oder die Subtypenselektivität der Substanzen als GABA-uptake Inhibitoren verbessert.

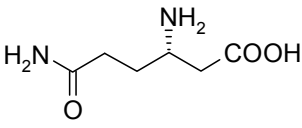
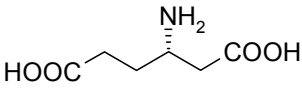
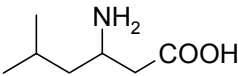
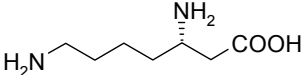
Aufgrund ihrer höheren Acidität müssen die Aminomethylfluorphenolderivate, anders als die Aminomethylphenole, bei physiologischem pH – wie GABA auch – vollständig zwitterionisch vorliegen. Man mochte deshalb hoffen, dass sich dadurch ihre Potenz als GABA-uptake Inhibitoren steigert. Dennoch sind die Aminomethylfluorphenolderivate in den vorgegebenen Konzentrationen von 5-10 μM – wie die Aminomethylphenole – als GAT-Inhibitoren unbrauchbar: Sie können den GABA-uptake praktisch nicht hemmen.

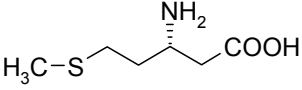
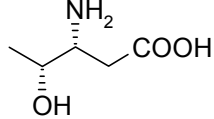
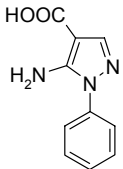
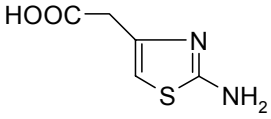
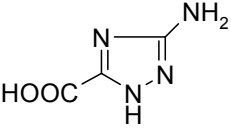
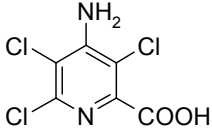
Nun stellt sich die Frage, warum die Aminomethylphenol- und Aminomethylfluorphenolderivate als GAT-Inhibitoren versagen. Dies könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass sie gar nicht – wie im Vorfeld angenommen – mit der GABA-Bindungsstelle interagieren, sondern eine andere Domäne der Transporter bedienen. Die Substitution der Aminomethylphenole und Aminomethylfluorphenole mit großen, lipophilen Resten könnte hier so hinderlich sein, dass sie mit dieser Domäne nicht mehr wechselwirken und damit den GABA-uptake auch nicht mehr inhibieren können.

3.6.2. Screening verschiedener möglicher Leitsubstanzen für GAT-Inhibitoren an den vier verschiedenen GABA-Transportern

Mit dem Ziel, neue Leitsubstanzen für GABA-uptake Inhibitoren zu finden, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch verschiedene käuflich erhältliche, bisher noch nicht als GAT-Inhibitoren getestete Substanzen auf ihre Potenz hin untersucht werden. Aus der Literatur ist bekannt^[13], dass β -Alanin selektiv den durch mGAT3 und mGAT4 vermittelten GABA-uptake inhibiert. Daher schien es interessant, weitere β -Aminosäuren an diesen Transportern zu testen (Tab. 8/1-6). Des Weiteren sollten noch vier andere Stoffe untersucht werden, die aufgrund ihrer Molekülstruktur als Bioisostere zu GABA aufgefasst werden und damit interessante Leitstrukturen für GAT-Inhibitoren sein könnten (Tab. 8/7-10).

Die Ergebnisse dieses Screenings sind in Tabelle 8 zusammengestellt:

| | | hGAT-1 | mGAT1 | pGAT-1 | mGAT2 | mGAT3 | mGAT4 | pGAT-3 |
|---|--|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| 1 |  L- β -Homoglutamin | 1 mM 70.3 % | 1 mM 66.6 % | 1 mM 92.9 % | 1 mM 72.7 % | 1 mM 77.6 % | 1 mM 106.8 % | 1 mM 70.2 % |
| 2 |  L- β -Homoglutaminsäure | 1 mM 62.5 % | 1 mM 72.5 % | 1 mM 87.2 % | 1 mM 77.5 % | 1 mM 83.2 % | 1 mM 92.5 % | 1 mM 55.2 % |
| 3 |  DL-Homoleucin | 1 mM 118.5 % | 1 mM 83.1 % | 1 mM 80.0 % | 1 mM 63.4 % | 1 mM 85.6 % | 1 mM 110.2 % | 1 mM 102.7 % |
| 4 |  L- β -Homolysin | 1 mM 77.7 % | 1 mM 57.2 % | 1 mM 71.2 % | 1 mM 73.2 % | 1 mM 58.2 % | 1 mM 64.7 % | 1 mM 61.6 % |

| | | hGAT-1 | mGAT1 | pGAT-1 | mGAT2 | mGAT3 | mGAT4 | pGAT-3 |
|----|---|----------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| 5 |  L- β -Homomethionin | 1 mM 66.4 % | 1 mM 61.5 % | 1 mM 66.9 % | 1 mM 88.0 % | 1 mM 56.7 % | 1 mM 72.0 % | 1 mM 66.7 % |
| 6 |  L- β -Homothreonin | 1 mM 119.6 % | 1 mM 103.5 % | 1 mM 84.8 % | 1 mM 102.2 % | 1 mM 70.2 % | 1 mM 76.5 % | 1 mM 73.9 % |
| 7 |  5-Amino-1-phenylpyrazol-4-carbonsäure | 1 mM 73.3 % | 1 mM 62.6 % | 1 mM 98.9 % | 1 mM 104.8 % | 1 mM 83.1 % | 1 mM 95.3 % | 1 mM 94.8 % |
| 8 |  (2-Amino-4-thiazolyl)-essigsäure | 1 mM 70.2 % | 1 mM 76.4 % | 1 mM 70.2 % | 1 mM 69.9 % | 191 \pm 8 μ M | 1 mM 68.4 % | 1 mM 66.0 % |
| 9 |  3-Amino-1H-1,2,4-thiazol-5-carbonsäure | 1 mM 116.9 % | 1 mM 68.8 % | 1 mM 70.3 % | 1 mM 111.6 % | 1 mM 106.2 % | 1 mM 103.3 % | 1 mM 75.1 % |
| 10 |  4-Amino-3,5,6-trichloropyridin-2-carbonsäure | 50 μ M 78.6 % | 50 μ M 101.4 % | 50 μ M 92.0 % | 50 μ M 102.8 % | 50 μ M 117.9 % | 50 μ M 108.2 % | 50 μ M 96.3 % |

Tab. 8: Screening möglicher GAT-Inhibitoren an den verschiedenen Transportern

Sämtliche untersuchte β -Aminosäuren (Tab. 8/1-6) erwiesen sich in einer Konzentration von 1 mM als äußerst schwache GABA-uptake Inhibitoren. Selbst wenn man die für GAT-Inhibitoren typischen lipophilen Reste in diese Moleküle einführte, dürfte sich die Wirkstärke dieser Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern nur geringfügig verbessern. Neue potente Stoffe sind dabei nicht zu erhoffen.

Auch 5-Amino-1-phenylpyrazol-4-carbonsäure (Tab. 8/7), 3-Amino-1H-1,2,4-thiazol-5-carbonsäure (Tab. 8/9) und 4-Amino-3,5,6-trichlorpyridin-2-carbonsäure (Tab. 8/10) hemmen den GABA-uptake an allen Transportersubtypen in einer Konzentration von 1 mM beziehungsweise 50 μ M nur sehr schwach oder gar nicht. Als Leitstrukturen für neue GAT-Inhibitoren sind diese Verbindungen somit ebenfalls nicht zu gebrauchen.

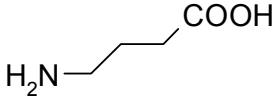
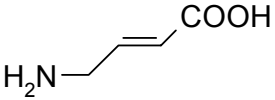
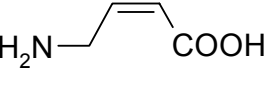
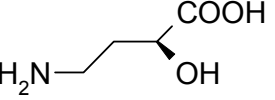
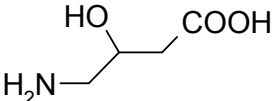
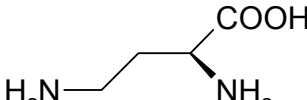
Daher ist es besonders erfreulich, dass mit der (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure (Tab. 8/8) eine Substanz gefunden werden konnte, die an mGAT3 einen IC_{50} -Wert von $191 \pm 8 \mu$ M besitzt. An den übrigen Transportern konnte kein IC_{50} -Wert ermittelt werden, da der [3 H]GABA-uptake in der höchsten einsetzbaren Konzentration von 1 mM bereits über 50 Prozent gegenüber der Gesamtaufnahme lag. Es steht aber zweifelsfrei fest, dass der IC_{50} -Wert von (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure an mGAT3 gegenüber den anderen Transportersubtypen mindestens um Faktor 5 besser ist. Da mGAT3 (hGAT-2) und mGAT4 (hGAT-3) in ihren pharmakologischen Eigenschaften einander sehr ähnlich sind^[13], ist es äußerst schwierig, Substanzen zu finden, die für den einen oder anderen Transporter selektiv sind. Für mGAT3 sind bisher nur äußerst wenige selektive Inhibitoren bekannt^[46]. Umso bedeutender ist es, dass in der (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure eine Leitstruktur für möglicherweise selektive mGAT3 (hGAT-2)-Inhibitoren gefunden wurde. Derivate der (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure mit geeigneten lipophilen Resten werden zeigen, ob diese Leitstruktur hält, was sie verspricht. Deren Synthese sollte im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr durchgeführt werden.

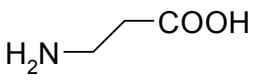
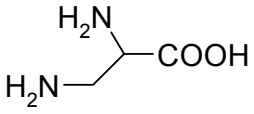
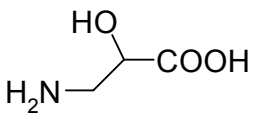
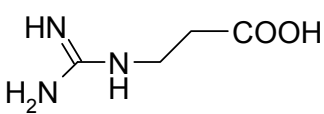
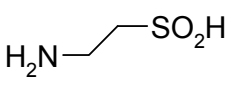
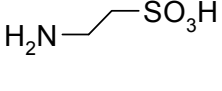
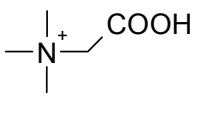
3.6.3. Screening von GAT-Inhibitoren an den vier murinen GABA-Transportern

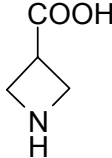
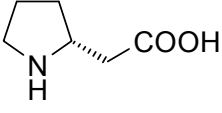
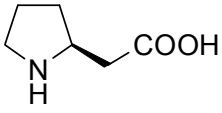
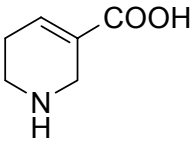
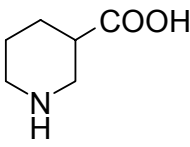
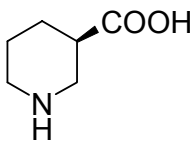
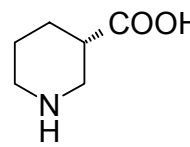
In der vorliegenden Arbeit sollten an den transient in COS-7 beziehungsweise HEK Zellen exprimierten vier murinen GABA-Transportern neben den bereits unter 3.6.2. beschriebenen Substanzen noch verschiedene andere Verbindungen auf ihre Potenz hin untersucht werden. Dazu wurde aus literaturbekannten GAT-Inhibitoren eine Auswahl getroffen. Daneben würden auch einige Stoffe getestet werden, die bisher nicht als GABA-uptake Inhibitoren veröffentlicht wurden.

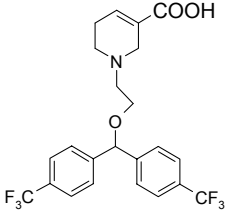
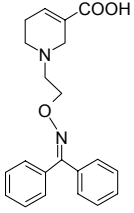
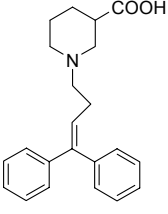
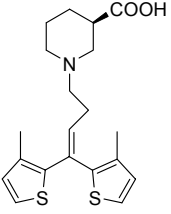
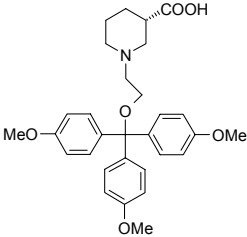
Ziel war es, neue GAT-Inhibitoren zu finden. Besonderes Interesse galt jedoch dem Vergleich der Subtypenselektivitäten der verschiedenen Verbindungen. Anhand dieser Befunde wäre es dann eventuell möglich, Struktur-Aktivitäts-Beziehungen zu erstellen (siehe unter 3.6.4. auf Seite 89ff.). Damit könnte in Zukunft wesentlich gezielter nach subtypenselektiven GAT-Inhibitoren gesucht werden. In die Literatur hat dieses Thema bisher noch keinen Eingang gefunden; so existieren keine Publikationen, in denen für eine Reihe *verschiedener* GAT-Inhibitoren deren inhibitorische Potenz an allen vier GAT-Subtypen einer Spezies *gleichzeitig* unter genau *denselben* Bedingungen bestimmt wurde.

Tabelle 9 zeigt die im Screening an den vier murinen GABA-Transportern ermittelten IC_{50} -Werte in der Übersicht.

| | | IC_{50} an mGAT1 | IC_{50} an mGAT2 | IC_{50} an mGAT3 | IC_{50} an mGAT4 |
|---|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 |  GABA | $2.82 \pm 0.32 \mu\text{M}$ | $13.9 \pm 2.0 \mu\text{M}$ | $3.88 \pm 0.44 \mu\text{M}$ | $3.35 \pm 0.49 \mu\text{M}$ |
| 2 |  <i>trans</i> -4-Aminocrotonsäure | $3.26 \pm 0.40 \mu\text{M}$ | $63.7 \pm 10.4 \mu\text{M}$ | $7.15 \pm 1.32 \mu\text{M}$ | $5.08 \pm 0.84 \mu\text{M}$ |
| 3 |  <i>cis</i> -4-Aminocrotonsäure | $282 \pm 44 \mu\text{M}$ | $284 \pm 47 \mu\text{M}$ | $9.54 \pm 1.58 \mu\text{M}$ | $9.22 \pm 1.35 \mu\text{M}$ |
| 4 |  <i>(S)</i> -(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure | $3.98 \pm 0.37 \mu\text{M}$ | $50.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$ | $19.5 \pm 4.1 \mu\text{M}$ | $11.8 \pm 1.5 \mu\text{M}$ |
| 5 |  DL-4-Amino-3-hydroxybuttersäure | $14.5 \pm 5.1 \mu\text{M}$ | $174 \pm 42 \mu\text{M}$ | $20.5 \pm 3.3 \mu\text{M}$ | $22.6 \pm 0.4 \mu\text{M}$ |
| 6 |  L-2,4-Diaminobuttersäure | $24.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$ | $591 \pm 58 \mu\text{M}$ | $228 \pm 23 \mu\text{M}$ | $148 \pm 48 \mu\text{M}$ |

| | | IC_{50} an mGAT1 | IC_{50} an mGAT2 | IC_{50} an mGAT3 | IC_{50} an mGAT4 |
|----|---|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 7 |  β -Alanin | $657 \pm 119 \mu\text{M}$ | $345 \pm 53 \mu\text{M}$ | $12.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$ | $21.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$ |
| 8 |  DL-2,3-Diaminopropionsäure | $323 \pm 69 \mu\text{M}$ | $185 \pm 28 \mu\text{M}$ | $11.3 \pm 2.4 \mu\text{M}$ | $5.56 \pm 0.36 \mu\text{M}$ |
| 9 |  DL-Isoserin | $2.48 \pm 0.57 \text{ mM}$ | $231 \pm 48 \mu\text{M}$ | $4.25 \pm 0.68 \mu\text{M}$ | $5.93 \pm 1.55 \mu\text{M}$ |
| 10 |  3-Guanidinopropionsäure | $26.3 \pm 3.3 \mu\text{M}$ | $23.6 \pm 5.4 \mu\text{M}$ | $3.59 \pm 0.32 \mu\text{M}$ | $3.73 \pm 0.95 \mu\text{M}$ |
| 11 |  Hypotaurin | $165 \pm 45 \mu\text{M}$ | $241 \pm 104 \mu\text{M}$ | $4.94 \pm 0.58 \mu\text{M}$ | $8.11 \pm 0.65 \mu\text{M}$ |
| 12 |  Taurin | 1 mM 92.8 % | $1.84 \pm 0.49 \text{ mM}$ | $168 \pm 33 \mu\text{M}$ | $215 \pm 80 \mu\text{M}$ |
| 13 |  Betain | $2.61 \pm 0.39 \text{ mM}$ | $347 \pm 46 \mu\text{M}$ | $2.60 \pm 0.12 \text{ mM}$ | $2.46 \pm 0.30 \text{ mM}$ |

| | | IC_{50} an mGAT1 | IC_{50} an mGAT2 | IC_{50} an mGAT3 | IC_{50} an mGAT4 |
|----|---|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
| 14 |  Azetidin-3-carbonsäure | 1.03 ± 0.24 mM | 139 ± 29 μ M | 21.7 ± 2.8 μ M | 29.3 ± 3.2 μ M |
| 15 |  (R)-Homoprolin | 60.0 ± 6.8 μ M | 1 mM 66.6 % | 202 ± 33 μ M | 402 ± 55 μ M |
| 16 |  (S)-Homoprolin | 112 ± 14 μ M | 1 mM 59.8 % | 74.5 ± 9.4 μ M | 52.5 ± 6.9 μ M |
| 17 |  Guvacin | 3.36 ± 0.94 μ M | 221 ± 23 μ M | 27.1 ± 6.1 μ M | 14.0 ± 0.8 μ M |
| 18 |  (RS)-Nipecotinsäure | 2.56 ± 0.34 μ M | 309 ± 44 μ M | 29.1 ± 6.8 μ M | 15.5 ± 2.0 μ M |
| 19 |  (R)-Nipecotinsäure | 2.24 ± 0.43 μ M | 141 ± 40 μ M | 13.8 ± 1.3 μ M | 10.5 ± 1.9 μ M |
| 20 |  (S)-Nipecotinsäure | 23.5 ± 4.6 μ M | 1 mM 61.5 % | 354 ± 32 μ M | 185 ± 37 μ M |

| | | IC_{50} an mGAT1 | IC_{50} an mGAT2 | IC_{50} an mGAT3 | IC_{50} an mGAT4 |
|----|---|-------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
| 21 |  <p>CI966</p> | 658 ± 181 nM | 100 μ M 72.4 % | 136 ± 41 μ M | 86.1 ± 18.2 μ M |
| 22 |  <p>NO711</p> | 137 ± 15 nM | 348 ± 43 μ M | 263 ± 38 μ M | 573 ± 49 μ M |
| 23 |  <p>SKF89976A</p> | 673 ± 251 nM | 142 ± 9 μ M | 131 ± 15 μ M | 341 ± 37 μ M |
| 24 |  <p>(R)-Tiagabin</p> | 217 ± 13 nM | 100 μ M 83.3 % | 100 μ M 57.4 % | 100 μ M 78.9 % |
| 25 |  <p>(S)-SNAP5114</p> | 84.7 ± 13.7 μ M | 35.2 ± 13.3 μ M | 22.3 ± 3.5 μ M | 2.96 ± 0.30 μ M |

Tab. 9: Screening verschiedener Substanzen an den vier murinen GABA-Transportern

Vergleicht man die in Tabelle 9 aufgeführten IC_{50} -Werte für GABA, Guvacin, (*RS*)-Nipecotinsäure, (*R*)-Nipecotinsäure, (*S*)-Nipecotinsäure und (*S*)-SNAP5114 mit den von Dhar *et al.*^[46] an hGAT-1, rGAT-2, hGAT-3 und hBGT-1 ermittelten, so kann gezeigt werden, dass die relative Abstufung der Wirkstärke der Substanzen bezüglich der Inhibition des GABA-uptakes identisch ist.

Nun aber sollen die in Tabelle 9 für die murinen GABA-Transporter dargestellten Ergebnisse im Einzelnen ausgewertet werden.

GABA (Tab. 9/1) zeigt an mGAT1, mGAT3 und mGAT4 IC_{50} -Werte von etwa 3 μ M. Nur an mGAT2 liegt der IC_{50} -Wert etwas höher, nämlich bei 14 μ M. Dass GABA selbst keine Subtypenselektivität an den verschiedenen Transportern zeigt, ist verständlich; schließlich handelt es sich hier um das natürliche Substrat.

Die für GABA ermittelten IC_{50} -Werte stellen wichtige Anhaltspunkte dar, wenn man eine Substanz hinsichtlich ihrer Potenz an den verschiedenen Transportern beurteilen will. Leitstrukturen für neue GAT-Inhibitoren sollten einen IC_{50} -Wert besitzen, der mindestens im Bereich von GABA selbst liegt oder sogar noch besser ist. Werden diese Leitsubstanzen dann mit für GAT-Inhibitoren geeigneten lipophilen Resten substituiert, müssten sich die ermittelten IC_{50} -Werte nochmals wesentlich verbessern. Ein weiteres wichtiges Kriterium, das GABA-uptake Inhibitoren erfüllen sollten, ist eine hohe Subtypenselektivität. Diese ist deshalb so bedeutend, weil neu entwickelte Arzneistoffe *in vivo* nur am gewünschten GABA-Transporter wirken und mit den anderen drei Transportern nicht wechselwirken sollen. So werden unerwünschte Nebenwirkungen vermieden, die sich aus der Interaktion des Arzneistoffs mit anderen GABA-Transportern ergeben könnten.

mGAT1

Unter den getesteten Substanzen findet man einige sehr potente Leitstrukturen für GAT-1-Inhibitoren. Insbesondere handelt es sich um:

- *trans*-4-Aminocrotonsäure (IC_{50} $3.26 \pm 0.40 \mu\text{M}$; Tab. 9/2)
- (*S*)-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure (IC_{50} $3.98 \pm 0.37 \mu\text{M}$; Tab. 9/4)
- DL-4-Amino-3-hydroxybuttersäure (IC_{50} $14.5 \pm 5.1 \mu\text{M}$; Tab. 9/5)
- L-2,4-Diaminobuttersäure (IC_{50} $24.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$; Tab. 9/6)

Mit Ausnahme der L-2,4-Diaminobuttersäure zeigen diese Stoffe keine Subtypenselektivität. Dennoch sollte es möglich sein, durch Substitution der genannten Substanzen mit geeigneten Resten zu subtypenselektiven Verbindungen zu gelangen, wie die Beispiele von CI966, NO711, SKF89976A, (*R*)-Tiagabin und (*S*)-SNAP5114 (Tab. 9/21-25) zeigen. Dies ist bereits ausführlich in der Literatur beschrieben^[40,41,42,45,46]. Die den Substanzen zugrunde liegenden Leitstrukturen, Guvacin (Tab. 9/17) und (*R*)-Nipecotinsäure (Tab. 9/19), besitzen IC_{50} -Werte, die im Bereich von GABA liegen oder geringfügig schlechter sind, und zeigen keine ausgeprägte Subtypenselektivität. Substituiert man am Aminstickstoff mit großen, lipophilen Resten (zur Struktur dieser Reste siehe Tab. 9/21-25), erhöht sich sowohl die Affinität als auch die Subtypenselektivität der Derivate zum jeweiligen Transporter. Die im Fall von CI966, NO711, SKF89976A und (*R*)-Tiagabin verwendeten Reste führten schließlich zu selektiven mGAT1-Inhibitoren (Tab. 9/21-24). Durch den bei (*S*)-SNAP5114 eingesetzten, sehr großen Rest gelangte man zu einem selektiven mGAT4-Inhibitor (Tab. 9/25).

Interessanterweise zeigen die beiden Enantiomere des Homoprolins unterschiedliche pharmakologische Profile. Während sich das (*R*)-Homoprolin (Tab. 9/15) eher als Inhibitor an mGAT1 erweist (IC_{50} -mGAT1 $60.0 \pm 6.8 \mu\text{M}$; IC_{50} -mGAT4 $402 \pm 55 \mu\text{M}$), wirkt das

(*S*)-Homoprolin (Tab. 9/16) an mGAT4 besser als an mGAT1 (IC_{50} -mGAT1 $112 \pm 14 \mu\text{M}$; IC_{50} -mGAT4 $52.5 \pm 6.9 \mu\text{M}$). Dies wurde bereits von Fülep gezeigt^[39]. Besonders hilfreich dürfte diese Tatsache sein, wenn untersucht werden soll, wie die GABA-Bindungsstelle der verschiedenen Transporter räumlich aufgebaut ist. Im Rahmen der hier durchgeführten Untersuchungen stellte sich weiterhin heraus, dass beide Enantiomere des Homoprolins an mGAT2 praktisch nicht als Inhibitoren wirken. (*S*)-Homoprolin erwies sich zudem als mittelstarker Inhibitor an mGAT3.

mGAT2

mGAT2 ist nicht nur ein Transporter für GABA sondern auch für Betain (Tab. 9/13). Umso auffallender ist deshalb, dass Betain an mGAT2 lediglich einen IC_{50} -Wert von $347 \pm 47 \mu\text{M}$ besitzt. Damit inhibiert Betain an mGAT2 zwar den GABA-uptake um etwa das Fünffache besser als an den übrigen Transportern, die in vivo Betain nicht transportieren^[13]. Gegenüber GABA mit einem IC_{50} -Wert von $13.9 \pm 2.0 \mu\text{M}$ an mGAT2 besitzt Betain aber eine wesentlich schwächere Affinität zu seinem Transporter. Yamauchi *et al.*^[33] erklären dies damit, dass mGAT2 überwiegend in der Niere vorkommt: Betain wird in der renalen Medulla aufgrund seiner Plasmakonzentration von etwa $180 \mu\text{M}$ signifikant akkumuliert, während GABA dort wegen seiner vergleichsweise geringen Plasmakonzentration von weniger als $1 \mu\text{M}$ nur relativ wenig anfällt. Daher spielt die auf den ersten Blick schlechte Affinität des Betains zu seinem Transporter hier keine Rolle.

Für mGAT2 sind bislang nur sehr wenige selektive Inhibitoren bekannt^[59]. Unter den hier untersuchten Substanzen konnten mit der *trans*-4-Aminocrotonsäure (IC_{50} $63.7 \pm 10.4 \mu\text{M}$; Tab. 9/2) und der (*S*)-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure (IC_{50} $50.2 \pm 2.9 \mu\text{M}$; Tab. 9/4) zwei Verbindungen gefunden werden, die sich als Ausgangspunkte für die Entwicklung von mGAT2-Inhibitoren eignen sollten. Beide Stoffe sind zwar nicht selektiv für mGAT2 und

inhibieren an den anderen GABA-Transportern den GABA-uptake zum Teil sogar noch stärker, doch könnte eine Substitution mit den von Thomsen *et al.*^[59] beschriebenen lipophilen Resten zu neuen potenten und selektiven mGAT2-Inhibitoren führen.

mGAT3 / mGAT4

Vergleicht man die IC_{50} -Werte, die für die verschiedenen Verbindungen an mGAT3 und mGAT4 ermittelt wurden (vgl. Tab. 9), so sieht man deutlich, dass sich beide Transporter in ihren pharmakologischen Eigenschaften sehr ähnlich sind. Die ermittelten IC_{50} -Werte unterscheiden sich maximal um den Faktor 2.5; einzig beim (*S*)-SNAP5114 liegen die IC_{50} -Werte um eine Zehnerpotenz auseinander. So wird erneut deutlich, wie bedeutsam es ist, für mGAT3 neue selektive Grundstrukturen zu finden, was mit der (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure offenbar gelungen ist (siehe S. 77, Tab. 8/8). Unter den getesteten Stoffen finden sich weitere potente Ausgangssubstanzen für neue mGAT3/mGAT4-Inhibitoren mit ausgesprochen hoher Selektivität gegenüber mGAT1. Diese sind in Tabelle 10 zusammengestellt:

| | | IC_{50} -mGAT3 | mGAT3: mGAT1 | IC_{50} -mGAT4 | mGAT4: mGAT1 |
|---|---|------------------|-----------------|------------------|-----------------|
| 1 | <i>cis</i> -4-Aminocrotonsäure (Tab. 9/3) | 9.54 ± 1.58 µM | 30 :1 | 9.22 ± 1.35 µM | 31 :1 |
| 2 | DL-2,3-Diaminopropionsäure (Tab. 9/8) | 11.3 ± 2.4 µM | 29 :1 | 5.56 ± 0.36 µM | 58 :1 |
| 3 | Azetidin-3-carbonsäure (Tab. 9/14) | 21.7 ± 2.8 µM | 47 :1 | 29.3 ± 3.2 µM | 35 :1 |
| 4 | DL-Isoserin (Tab. 9/9) | 5.93 ± 1.55 µM | 584 :1 | 5.93 ± 1.55 µM | 418 :1 |

Tab. 10: Grundstrukturen für mGAT3/mGAT4-Inhibitoren

Zwei andere als GAT-Inhibitoren literaturbekannte Substanzen, nämlich β -Alanin (IC_{50} -mGAT3 $12.1 \pm 2.1 \mu\text{M}$; IC_{50} -mGAT4 $21.5 \pm 3.0 \mu\text{M}$) und Hypotaurin (IC_{50} -mGAT3 $4.94 \pm 0.58 \mu\text{M}$; IC_{50} -mGAT4 $8.11 \pm 0.65 \mu\text{M}$) erweisen sich ebenfalls als selektive Inhibitoren an mGAT3 und mGAT4. Besonders interessant ist, dass beide Verbindungen an mGAT3 jeweils potenter sind als an mGAT4 und sich dadurch als mögliche Grundstrukturen für selektive mGAT3-Inhibitoren anbieten.

3-Guanidinopropionsäure (Tab. 9/10) ist an mGAT3 mit einem IC_{50} -Wert von $3.59 \pm 0.32 \mu\text{M}$ und an mGAT4 mit einem IC_{50} -Wert von $3.73 \pm 0.95 \mu\text{M}$ ein hervorragender Inhibitor. Die Potenz dieser Verbindung an mGAT4 kann als gleichwertig zu der des (*S*)-SNAP5114 (IC_{50} $2.96 \pm 0.30 \mu\text{M}$; Tab. 9/25) angesehen werden. Die Subtypenselektivität mGAT4:mGAT1 ist allerdings mit nur 7:1 im Vergleich zu der des (*S*)-SNAP5114 (mGAT4:mGAT1 = 29:1) bedeutend geringer.

Der bekannteste und potenteste Inhibitor an mGAT4 ist das (*S*)-SNAP5114 (Tab. 9/25) mit einem IC_{50} -Wert von $2.96 \pm 0.30 \mu\text{M}$. An mGAT1 wurde für das (*S*)-SNAP5114 ein IC_{50} -Wert von $84.7 \pm 13.7 \mu\text{M}$ ermittelt. Daraus resultiert eine Subtypenselektivität mGAT4:mGAT1 von 29:1. Dies bedeutet zwar, dass (*S*)-SNAP5114 relativ selektiv an mGAT4 wirkt, jedoch ist die Subtypenselektivität an den murinen GABA-Transportern längst nicht so ausgeprägt wie an den humanen. Dhar *et al.*^[46] geben als IC_{50} -Wert von (*S*)-SNAP5114 an hGAT-3 $5 \mu\text{M}$ und an hGAT-1 $388 \mu\text{M}$ an, also eine Selektivität von 78:1. Die Selektivitäten können an dieser Stelle miteinander verglichen werden, da es sich bei ihnen um Relativwerte handelt. An mGAT2 ist die Potenz von (*S*)-SNAP5114 um etwa eine Zehnerpotenz schlechter als an mGAT4. Jedoch ist (*S*)-SNAP5114 mit einem IC_{50} -Wert von $35.2 \pm 13.3 \mu\text{M}$ an mGAT2 auch an diesem Transporter ein guter Inhibitor.

3.6.4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Nachdem nun die Ergebnisse für die einzelnen Transporter vorliegen, können Struktur-Aktivitäts-Beziehungen abgeleitet werden.

Ein sehr wichtiges Kriterium für potente GAT-Inhibitoren ist, dass sie wie GABA unter physiologischen Bedingungen vollständig dissoziiert, das heißt als Zwitterionen vorliegen.

Offenkettige GAT-Inhibitoren, die keine ausgeprägte Subtypenselektivität für mGAT1, mGAT3 oder mGAT4 besitzen, enthalten meist eine GABA ähnliche Struktur in ihrem Molekül (Tab. 9/2,4-6). Für mGAT2 konnte keine Leitstruktur gefunden werden, die zu diesem Transporter gleich gute Affinität zeigt wie GABA. Deshalb ist es nicht möglich, an dieser Stelle eine Aussage zu treffen, welche Molekülstruktur mGAT2-Inhibitoren besitzen sollten.

Auffallend ist, dass im Molekül potenter und subtypenselektiver, offenkettiger mGAT3/mGAT4-Inhibitoren oft eine β -Alanin ähnliche Struktur enthalten ist (Tab. 9/8-11). Zwischen der Carboxyl- und der Aminogruppe befindet sich hier nur ein C_2 -Spacer (GABA: C_3). Das Verkürzen des Abstands zwischen beiden Funktionen verstärkt offensichtlich deutlich die Affinität zu mGAT3 und mGAT4, während gleichzeitig die Affinität zu mGAT1 und mGAT2 stark abnimmt.

Cyclische, potente, subtypenselektive mGAT1-Inhibitoren sollten eine Molekülstruktur besitzen, die dem Guvacin (Tab. 8/17), dem (*R*)-Homoprolin (Tab. 9/15) und den Enantiomeren der Nipicotinsäure (Tab. 9/19,20) ähnlich ist. Dagegen weisen cyclische, potente, subtypenselektive Inhibitoren an mGAT3 und mGAT4 eine Molekülstruktur auf, die

sich in der Azetidin-3-carbonsäure (Tab. 9/14) und dem (*S*)-Homoprolin (Tab. 9/16) widerspiegelt.

trans-4-Aminocrotonsäure (Tab. 9/2) gibt einen wichtigen Hinweis auf die Konformation, in der GABA durch die jeweiligen GAT-Proteine transportiert wird. Bedingt durch die Olefin-Struktur besitzt *trans*-4-Aminocrotonsäure eine relativ starre, gestreckte Konformation. Die IC_{50} -Werte von *trans*-4-Aminocrotonsäure an mGAT1, mGAT3 und mGAT4 sind vergleichbar mit den IC_{50} -Werten von GABA an diesen Transportern. An mGAT2 ist der IC_{50} -Wert von *trans*-4-Aminocrotonsäure deutlich schlechter als der von GABA. Hier liegt die Annahme nahe, dass GABA an mGAT1, mGAT3 und mGAT4 in einer der *trans*-4-Aminocrotonsäure ähnlichen, gestreckten Konformation transportiert wird, während die Transportkonformation an mGAT2 davon verschieden sein muss.

cis-4-Aminocrotonsäure (Tab. 9/3) zeigt schließlich, dass die eben genannte, gestreckte Transportkonformation von GABA für mGAT1 zwingend sein muss, da *cis*-4-Aminocrotonsäure an diesem Transporter nur mehr schlecht wirkt. An mGAT3 und mGAT4 ist dagegen neben der gestreckten Transportkonformation von GABA, die sich in der *trans*-4-Aminocrotonsäure widerspiegelt, parallel auch die gebogene Konformation der *cis*-4-Aminocrotonsäure als Transportkonformation möglich.

Weiterhin können durch Substitution mit geeigneten lipophilen Resten die Affinität und Subtypenselektivität von GAT-Inhibitoren für die verschiedenen GABA-Transporter deutlich gesteigert werden. Darauf wurde bereits ausführlich eingegangen (siehe dazu S. 50f.).

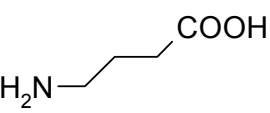
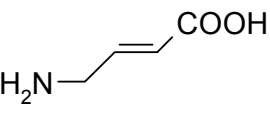
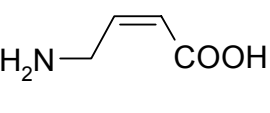
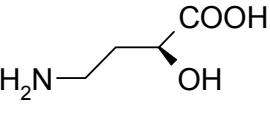
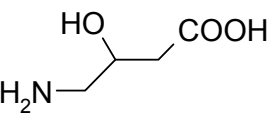
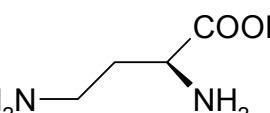
Die voranstehend aufgezeigten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen bieten äußerst wichtige Anhaltspunkte für Strukturmerkmale, die potente und subtypenselektive GABA-uptake Inhibitoren aufweisen sollten.

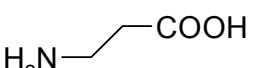
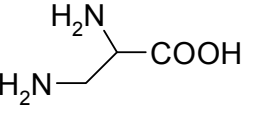
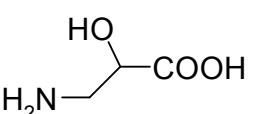
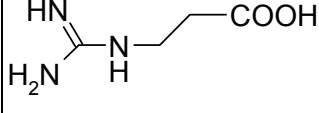
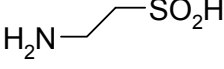
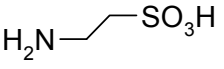
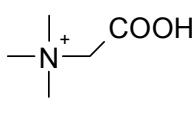
3.6.5. Screening von GAT-Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 bezüglich eventuell bestehender Speziesunterschiede

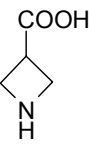
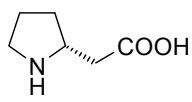
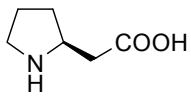
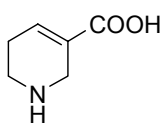
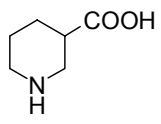
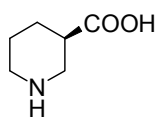
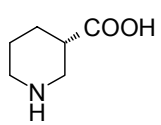
Zuletzt sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation untersucht werden, ob hinsichtlich der Potenz der unter 3.6.3. (siehe Seite 79ff.) beschriebenen GAT-Inhibitoren zwischen hGAT-1 und mGAT1 Speziesunterschiede bestehen. Wie bereits dargelegt wurde, besitzen die einzelnen GABA-Transporter-Subtypen innerhalb der Spezies relativ hohe Homologie in ihrer Primärstruktur^[37]. Dies schließt aber nicht aus, dass es durch die Unterschiede in der Primärstruktur zu veränderten Sekundär- und Tertiärstrukturen kommt, welche dann die Interaktion von Substrat und Transporter beeinflussen. So können Inhibitoren an demselben GABA-Transporter-Subtyp bei den einzelnen Spezies den GABA-uptake durchaus verschieden stark hemmen. Bei der Suche nach neuen Arzneistoffen werden erste Tests häufig nicht an den humanen Transportern, sondern zunächst am Tiermodell – meist an den GABA-Transportern von Maus oder Ratte – durchgeführt. Träten also Speziesunterschiede hinsichtlich der Potenz der GAT-Inhibitoren auf, so wären die *Tiermodelle* nur bedingt geeignet.

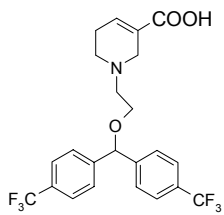
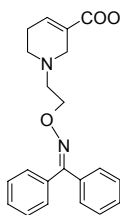
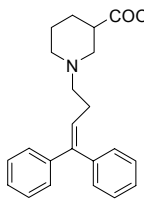
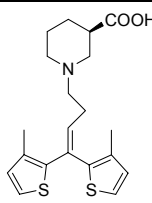
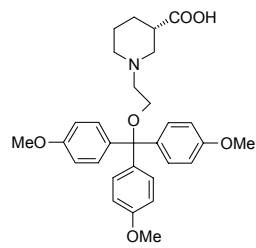
Mit dem Ziel, eventuell bestehende Speziesunterschiede aufzudecken, sollten nun die Substanzen, die bereits an den murinen GABA-Transportern untersucht worden waren, auch am humanen GABA-Transporter hGAT-1 getestet werden. So könnten Vergleiche hinsichtlich der Potenz der genannten Stoffe an hGAT-1 und mGAT1 gezogen werden.

In Tabelle 11 sind die IC_{50} -Werte im Überblick dargestellt:

| | | IC_{50} an hGAT-1 | IC_{50} an mGAT1 |
|---|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 1 |  GABA | $2.82 \pm 0.66 \mu\text{M}$ | $2.82 \pm 0.32 \mu\text{M}$ |
| 2 |  <i>trans</i> -4-Aminocrotonsäure | $2.64 \pm 0.52 \mu\text{M}$ | $3.26 \pm 0.40 \mu\text{M}$ |
| 3 |  <i>cis</i> -4-Aminocrotonsäure | $291 \mu\text{M}$ | $282 \pm 44 \mu\text{M}$ |
| 4 |  (<i>S</i>)-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure | $5.60 \pm 1.18 \mu\text{M}$ | $3.98 \pm 0.37 \mu\text{M}$ |
| 5 |  DL-4-Amino-3-hydroxybuttersäure | $16.8 \pm 4.7 \mu\text{M}$ | $14.5 \pm 5.1 \mu\text{M}$ |
| 6 |  L-2,4-Diaminobuttersäure | $60.8 \pm 13.9 \mu\text{M}$ | $24.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$ |

| | | IC_{50} an hGAT-1 | IC_{50} an mGAT1 |
|----|--|----------------------------|----------------------------|
| 7 |  β -Alanin | $540 \pm 131 \mu\text{M}$ | $657 \pm 119 \mu\text{M}$ |
| 8 |  DL-2,3-Diaminopropionsäure | $253 \pm 71 \mu\text{M}$ | $323 \pm 69 \mu\text{M}$ |
| 9 |  DL-Isoserin | $4.42 \pm 0.65 \text{ mM}$ | $2.48 \pm 0.57 \text{ mM}$ |
| 10 |  3-Guanidinopropionsäure | $19.1 \pm 1.4 \mu\text{M}$ | $26.3 \pm 3.3 \mu\text{M}$ |
| 11 |  Hypotaurin | $159 \pm 41 \mu\text{M}$ | $165 \pm 45 \mu\text{M}$ |
| 12 |  Taurin | $1 \text{ mM } 61.3 \%$ | $1 \text{ mM } 92.8 \%$ |
| 13 |  Betain | $4.41 \pm 0.53 \text{ mM}$ | $2.61 \pm 0.39 \text{ mM}$ |

| | | IC_{50} an hGAT-1 | IC_{50} an mGAT1 |
|----|---|-----------------------------|-----------------------------|
| 14 |  Azetidin-3-carbonsäure | $950 \pm 236 \mu\text{M}$ | $1.03 \pm 0.24 \text{ mM}$ |
| 15 |  (R)-Homoprolin | $69.8 \pm 11.9 \mu\text{M}$ | $60.0 \pm 6.8 \mu\text{M}$ |
| 16 |  (S)-Homoprolin | $125 \pm 19 \mu\text{M}$ | $112 \pm 14 \mu\text{M}$ |
| 17 |  Guvacin | $2.91 \pm 0.29 \mu\text{M}$ | $3.36 \pm 0.94 \mu\text{M}$ |
| 18 |  (RS)-Nipecotinsäure | $3.96 \pm 0.78 \mu\text{M}$ | $2.56 \pm 0.34 \mu\text{M}$ |
| 19 |  (R)-Nipecotinsäure | $2.82 \pm 0.92 \mu\text{M}$ | $2.24 \pm 0.43 \mu\text{M}$ |
| 20 |  (S)-Nipecotinsäure | $16.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$ | $23.5 \pm 4.6 \mu\text{M}$ |

| | | IC_{50} an hGAT-1 | IC_{50} an mGAT1 |
|----|--|-----------------------------|-----------------------------|
| 21 |  C1966 | $778 \pm 75 \text{ nM}$ | $658 \pm 181 \text{ nM}$ |
| 22 |  NO711 | $141 \pm 46 \text{ nM}$ | $137 \pm 15 \text{ nM}$ |
| 23 |  SKF89976A | $1.55 \pm 0.48 \mu\text{M}$ | $673 \pm 251 \text{ nM}$ |
| 24 |  (R)-Tiagabin | $147 \pm 28 \text{ nM}$ | $217 \pm 13 \text{ nM}$ |
| 25 |  (S)-SNAP5114 | $63.1 \pm 14.9 \mu\text{M}$ | $84.7 \pm 13.7 \mu\text{M}$ |

Tab. 11: Screening verschiedener Substanzen an hGAT-1 und mGAT1

Vergleich hGAT-1 mit mGAT1

Da beide Testsysteme unter denselben Versuchsbedingungen durchgeführt wurden, dürfen die erhaltenen IC_{50} -Werte absolut miteinander verglichen werden. Gäbe es keine Speziesunterschiede, so sollten sich für die verschiedenen Substanzen an den beiden Transportern identische IC_{50} -Werte ergeben. Tatsächlich treten bei den meisten der getesteten Substanzen hinsichtlich ihrer Potenz als Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 keine signifikanten Unterschiede auf. Nur bei zwei Substanzen sind die Wirkstärken unterschiedlich. Diese sind in Tabelle 12 einander gegenübergestellt:

| | | IC_{50} an hGAT-1 | IC_{50} an mGAT1 | Verhältnis |
|---|--------------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|-------------------|
| 1 | L-2,4-Diaminobuttersäure | $60.8 \pm 13.9 \mu\text{M}$ | $24.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$ | 2.5 |
| 2 | SKF89976A | $1.55 \pm 0.48 \mu\text{M}$ | $0.673 \pm 0.251 \mu\text{M}$ | 2.3 |

Tab. 12: Speziesunterschiede an hGAT-1 und mGAT1

L-2,4-Diaminobuttersäure und SKF89976A sind an mGAT1 potenter als am entsprechenden humanen Transporter. Hierbei dürfte es sich um einen Speziesunterschied handeln. Um die Potenz einer Substanz als GABA-uptake Inhibitor abzuschätzen, ist dieses Tiermodell damit nur bedingt geeignet, da immer mit Speziesunterschieden gerechnet werden muss. Untersuchungen sollten demzufolge möglichst von vornherein am humanen Transporter durchgeführt werden. In Zukunft verdient daher auch der Aufbau von Testsystemen für die drei hier nicht untersuchten humanen GABA-Transporter große Aufmerksamkeit.

4. Zusammenfassung

4.1. Transiente und stabile Expression von GABA-Transportern in Zelllinien, Aufbau subtypenselektiver Testsysteme

Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, neue subtypenselektive Testsysteme für die murinen GABA-Transporter mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 und für den humanen GABA-Transporter hGAT-1 zu entwickeln, die kloniertes Material verwenden. Dadurch kann die Anwesenheit anderer störender Transporter ausgeschlossen werden. Wichtiges Ziel war weiterhin, die bisher literaturbekannten Testsysteme, die ebenfalls mit kloniertem Material arbeiten, deutlich zu vereinfachen.

Bevor die genannten Testsysteme aufgebaut werden konnten, mussten die verschiedenen GABA-Transporter in Säugerzelllinien exprimiert werden. Dazu wurde zunächst die für den jeweiligen Transporter codierende cDNA in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1(+) umkloniert. Dieser ist für die transiente wie für die stabile Expression des entsprechenden Proteins in Säugerzelllinien geeignet.

Um Säugerzelllinien (COS-7, HEK) mit einem eukaryontischen Expressionsvektor zu transfizieren, wurde stets FuGENE6 verwendet. Diese Methode hatte sich bei mir im Vergleich zur Transfektion mit Calciumphosphat oder DEAE-Dextran als besonders effizient erwiesen.

In umfangreichen Versuchen wurde der Ablauf des GABA-uptake Assays optimiert. Dabei konnten neue, effektive und für den jeweiligen Transporter-Subtyp selektive Testsysteme für

GAT-Inhibitoren erstellt werden, die gegenüber den literaturbekannten Testsystemen deutlich vereinfacht sind und somit einen größeren Probendurchsatz in derselben Zeit ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten außerdem HEK-Zelllinien etabliert werden, die mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4 oder hGAT-1 stabil exprimieren. Die Expressionsrate wurde mittels GABA-uptake Assays überprüft. Pro Transporter konnte ein Hochleistungsstamm ermittelt und kryokonserviert werden.

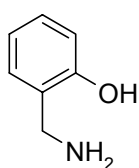
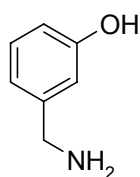
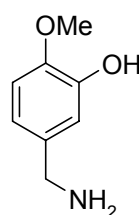
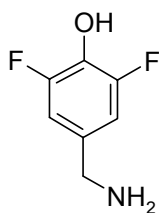
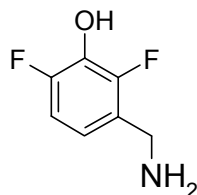
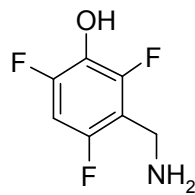
Die Expression der verschiedenen GABA-Transporter wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation kritisch geprüft. Zum Nachweis der GABA-Transporter wird in der Literatur stets eine Immunpräzipitation mit anschließender Autoradiographie durchgeführt. In dieser Arbeit konnten die verschiedenen GAT-Proteine erstmals durch Immunpräzipitation des entsprechenden Zelllysats und daran anschließenden Westernblot detektiert werden. Es ist gelungen, immer das Dimer oder höhermolekulare Aggregate des jeweiligen GABA-Transporters nachzuweisen. Bei stabil mGAT3 und mGAT4 exprimierenden Zellen ließ sich zudem sogar das Monomer erfassen, welches – wie aus der Literatur bekannt ist^[62,63] – in den meisten Fällen nur äußerst schwach oder gar nicht zu sehen ist.

4.2. Synthese neuer als GAT-Inhibitoren in Frage kommender Verbindungen

Im Rahmen der Arbeit sollten auch potentielle GAT-Inhibitoren neu synthetisiert werden. Als Leitstrukturen wurden die von Iversen *et al.* beschriebenen Aminomethylphenole ausgewählt, die als kompetitive Inhibitoren des neuronalen GABA-uptakes wirken^[47]. Aufgrund ihrer Molekülstruktur können die Aminomethylphenole als Bioisostere zu GABA gelten, wobei ihre Hydroxylgruppe die Carboxylfunktion von GABA imitiert. Die von Silverman *et al.*^[48] charakterisierten Aminomethylfluorphenole erfüllen aufgrund ihrer im Vergleich zu den Aminomethylphenolen höheren Acidität ein weiteres Kriterium für potente GAT-Inhibitoren: Sie liegen unter physiologischen Bedingungen – wie GABA selbst – vollständig zwitter-

ionisch vor. So war zu hoffen, dass die Potenz der Aminomethylfluorphenole als GAT-Inhibitoren gegenüber den Aminomethylphenolen wesentlich zunehmen würde.

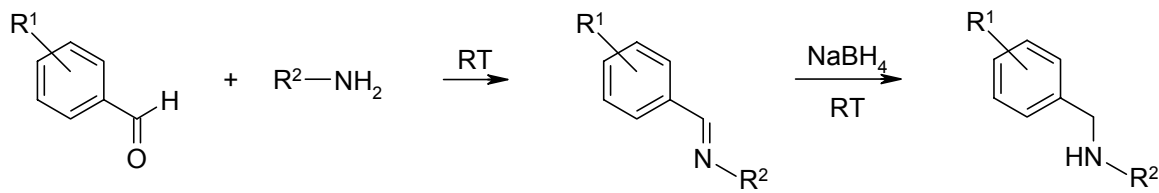
In der vorliegenden Arbeit wurden nun Derivate des 2-Aminomethylphenols (**62**), des 3-Aminomethylphenols (**63**) und des 5-Aminomethyl-2-methoxyphenols (**64**) als Vertretern der Aminomethylphenole sowie des 4-Aminomethyl-2,6-difluorphenols (**21**), 3-Aminomethyl-2,6-difluorphenols (**22**), und des 3-Aminomethyl-2,4,6-trifluorphenols (**23**) als Vertretern der Aminomethylfluorphenole synthetisiert.

**62****63****64****21****22****23**

Durch Substitution dieser Substanzen mit den für GAT-Inhibitoren typischen großen lipophilen Resten sollte die Affinität zu den Transportern und insbesondere die Subtypenselektivität der Verbindungen deutlich gesteigert werden. Hierzu wurden der 4,4-Diphenylbut-3-enyl- und der 3,3-Diphenylpropyl-Rest, die sich für selektive GAT-1-Inhibitoren eignen sollten, sowie der 2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl-Rest ausgewählt, der Kennzeichen selektiver GAT-3-Inhibitoren ist.

Alle neu hergestellten Verbindungen wurden durch reduktive Aminierung synthetisiert. Diese Methode erwies sich als vorteilhaft: Durch die Iminzwischenstufe gelangte man selektiv zu

sekundären Aminen, ohne als Nebenprodukte tertiäre Amine oder quartäre Ammoniumverbindungen zu erhalten. Schema 8 zeigt die Vorgehensweise bei der reduktiven Aminierung:



Schema 8: Reduktive Aminierung

Auf diese Weise wurden etliche, bisher nicht literaturbekannte Substanzen synthetisiert und vollständig charakterisiert, die alle aufgrund ihrer Struktur als GAT-Inhibitoren in Frage kamen.

4.3. Ermittlung von IC₅₀-Werten neuer und bekannter Substanzen an den verschiedenen GABA-Transportern

Ziel des letzten Teils der vorliegenden Dissertation war, die im Rahmen der Arbeit neu synthetisierten Substanzen auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren zu untersuchen. Außerdem sollten weitere – nur zum Teil literaturbekannte – GAT-Inhibitoren an den vier verschiedenen GABA-Transportern getestet und dabei insbesondere die Subtypenselektivität der einzelnen Verbindungen näher betrachtet werden.

Sämtliche IC₅₀-Werte von GAT-Inhibitoren an hGAT-1, mGAT1, mGAT2, mGAT3 und mGAT4 wurden an den im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Testsystemen ermittelt.

4.3.1. Screening der neu synthetisierten Aminomethylphenol- und Aminomethylfluorphenolderivate an den verschiedenen GABA-Transportern

Zunächst sollten die im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu synthetisierten Aminomethylphenol- und Aminomethylfluorphenolderivate auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren getestet werden. In dem im Assay verwendeten wässrigen Puffersystem waren diese nur in Konzentrationen von 5-10 μM löslich. Damit war es fraglich, ob für die neu synthetisierten Substanzen IC_{50} -Werte bestimmt werden könnten. Wegen der geringen Potenz der Verbindungen war dies dann in der Tat nicht möglich.

Die im Rahmen dieser Arbeit neu synthetisierten Aminomethylphenole inhibieren den GABA-uptake in den durch die Löslichkeit vorgegebenen Maximalkonzentrationen von 5-10 μM an keinem der vier Transporter nennenswert. Obwohl die Aminomethylfluorphenolderivate unter physiologischen Bedingungen zwitterionisch vorliegen und damit ein wichtiges Kriterium für potente GAT-Inhibitoren erfüllen, sind sie in den vorgegebenen Konzentrationen von 5-10 μM als GAT-Inhibitoren unwirksam.

Die unzureichende Potenz der Aminomethylphenol- und Aminomethylfluorphenolderivate als GAT-Inhibitoren kann eventuell dadurch erklärt werden, dass sie nicht, wie angenommen, mit der GABA-Bindungsstelle interagieren, sondern eine andere Domäne der Transporter bedienen. Dabei ist unter Umständen die Substitution mit großen, lipophilen Resten hinderlich.

4.3.2. Screening möglicher Leitsubstanzen für GAT-Inhibitoren an den vier verschiedenen GABA-Transportern

Mit dem Ziel, neue Leitstrukturen für GABA-uptake Inhibitoren zu finden, sollten im Rahmen der vorliegenden Arbeit verschiedene, bisher noch nicht als GAT-Inhibitoren getestete Substanzen auf ihre Potenz hin untersucht werden. Dabei konnte erfreulicherweise mit der (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure eine Verbindung gefunden werden, die an mGAT3 einen IC_{50} -Wert von $191 \pm 8 \mu\text{M}$ besitzt. An den übrigen Transportern liegt ihr IC_{50} -Wert um

mindestens Faktor 5 höher. Für mGAT3 sind bisher nur äußerst wenige selektive Inhibitoren bekannt^[45]. (2-Amino-4-thiazolyl)essigsäure ist damit eine sehr vielversprechende Leitstruktur für mGAT3 (hGAT-2)-Inhibitoren mit hoher Subtypenselektivität.

4.3.3. Screening von GAT-Inhibitoren an den vier murinen GABA-Transportern

Als weitere wichtige Aufgabe sollten an den transient in COS-7 beziehungsweise HEK Zellen exprimierten murinen GABA-Transportern Substanzen, die nur zum Teil als GAT-Inhibitoren bekannt sind, getestet werden. Dabei könnten neue Grundstrukturen für GAT-Inhibitoren gefunden werden. Insbesondere sollte untersucht werden, welche Subtypenselektivitäten die Substanzen zeigen. Ein solcher Vergleich ist bisher nicht literaturbekannt. Aus den Ergebnissen sollten dann Struktur-Aktivitäts-Beziehungen für die verschiedenen GABA-Transporter erstellt werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse des Screenings zusammengefasst:

GABA zeigt an mGAT1, mGAT3 und mGAT4 IC_{50} -Werte von etwa 3 μ M und an mGAT2 von 14 μ M und besitzt damit keine Subtypenselektivität. Dies ist nicht weiter verwunderlich, da GABA das natürliche Substrat der Transporter ist.

mGAT1

Mit *trans*-4-Aminocrotonsäure, (*S*)-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure, DL-4-Amino-3-hydroxybuttersäure und L-2,4-Diaminobuttersäure findet man unter den getesteten Substanzen potente Grundstrukturen für GAT-1-Inhibitoren, die jedoch mit Ausnahme der L-2,4-Diaminobuttersäure keine Subtypenselektivität zeigen.

Die beiden Enantiomere des Homoprolins zeigen unterschiedliche pharmakologische Profile: (*R*)-Homoprolin erweist sich als mGAT1-Inhibitor, (*S*)-Homoprolin als mGAT4-Inhibitor.

mGAT2

mGAT2 transportiert neben GABA auch Betain, das wesentlich schwächere Affinität zu seinem Transporter besitzt als GABA. Diese Tatsache wird bereits von Yamauchi *et al.*^[33] beschrieben.

Daneben wurden zwei Verbindungen gefunden, die als Ausgangssubstanzen für die Entwicklung neuer mGAT2-Inhibitoren dienen können: *trans*-4-Aminocrotonsäure und (*S*)-(-)-4-Amino-2-hydroxybuttersäure. Beide sind jedoch nicht selektiv für mGAT2 und inhibieren den GABA-uptake an anderen Transportern sogar noch stärker.

mGAT3 / mGAT4

mGAT3 und mGAT4 sind sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften sehr ähnlich^[13]. Unter den getesteten Substanzen wurden Grundstrukturen für neue mGAT3 und mGAT4 Inhibitoren mit hoher Selektivität gegenüber mGAT1 gefunden. Hierbei handelt es sich um *cis*-4-Aminocrotonsäure, DL-2,3-Diaminopropionsäure, Azetidin-3-carbonsäure, DL-Isoserin und 3-Guanidinopropionsäure.

Für (*S*)-SNAP5114 wurde nur eine Selektivität mGAT4:mGAT1 von 29:1 ermittelt. (*S*)-SNAP5114 wirkt also an den murinen GABA-Transportern nicht so subtypenselektiv wie von Dhar *et al.*^[46] für die humanen Transporter beschrieben (hGAT-3:hGAT-1 = 78:1).

4.3.4. Struktur-Aktivitäts-Beziehungen

Angesichts der Vielzahl untersuchter Substanzen schien es schließlich aussichtsreich, ausgehend von den ermittelten Subtypenselektivitäten Struktur-Aktivitäts-Beziehungen aufzuzeigen. Nach unseren Befunden gelten für GAT-Inhibitoren folgende wichtige Beziehungen:

- Potente, aber nicht subtypenselektive, offenkettige Inhibitoren an mGAT1, mGAT3 und mGAT4 haben oft eine GABA ähnliche Molekülstruktur.
- Potente, subtypenselektive, offenkettige mGAT3/mGAT4-Inhibitoren besitzen auffallend häufig eine β -Alanin ähnliche Struktur.
- Potente, subtypenselektive, cyclische Inhibitoren an mGAT1 weisen eine Molekülstruktur auf, welche der Nipicotinsäure, dem Guvacin und dem (*R*)-Homoprolin ähnlich ist.
- Potente, subtypenselektive, cyclische Inhibitoren an mGAT3 und mGAT4 besitzen eine Molekülstruktur, die der Azetidin-3-carbonsäure und dem (*S*)-Homoprolin ähnelt.

4.3.5. Screening von GAT-Inhibitoren an hGAT-1 und mGAT1 bezüglich eventuell bestehender Speziesunterschiede

Für die an den vier murinen GABA-Transportern untersuchten Substanzen wurden im letzten Teil der Arbeit auch die IC_{50} -Werte am humanen GABA-Transporter hGAT-1 bestimmt. In diesem Zusammenhang sollten beim Vergleich der Ergebnisse, die sich an hGAT-1 und mGAT1 ergeben hatten, eventuell bestehende Speziesunterschiede hinsichtlich der Potenz der verschiedenen GAT-Inhibitoren aufgedeckt werden.

Bei vielen der getesteten Substanzen zeigen die IC_{50} -Werte keine signifikanten Unterschiede. Dennoch konnte bei zwei Verbindungen bezüglich ihrer Potenz an hGAT-1 und mGAT1 ein Speziesunterschied festgestellt werden. mGAT1 ist damit als Modell für hGAT-1 nur bedingt geeignet, da immer mit dem Auftreten von Speziesunterschieden gerechnet werden muss.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die in der Zielsetzung genannten Aufgaben weitgehend erfüllt werden konnten:

- Es wurden neue subtypenselektive Testsysteme für GABA-Transporter erstellt; diese arbeiten mit kloniertem Material und sind gegenüber den literaturbekannten Testsystemen deutlich vereinfacht.
- Es wurden verschiedene neue Substanzen synthetisiert; diese zeigten allerdings nicht die erhoffte inhibitorische Wirkung an den vier GAT-Proteinen.
- Es wurde eine Vielzahl bekannter Substanzen an den neu entwickelten Testsystemen auf ihre Potenz als GAT-Inhibitoren untersucht. Dabei konnten
 - o Grundstrukturen für neue GAT-Inhibitoren gefunden,
 - o Struktur-Aktivitäts-Beziehungen erstellt und
 - o Speziesunterschiede aufgedeckt werden.

5. Praktischer Teil – Biologische Prüfung

5.1. Material

E.coli-Stamm

| | |
|-------------------------------|---|
| XL1-Blue MRF' (Stratagene) | $\Delta(\text{mcrA})183 \Delta(\text{mcrCB-hsdSMR-mrr})173\text{endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacI}^{\text{q}}\text{Z}\Delta\text{M15 Tn10 (tet}^{\text{r}}\text{)]}$ |
|-------------------------------|---|

Zelllinien

| | |
|---|--|
| COS-7 zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Biel | Nierenzellen der afrikanischen grünen Meerkatze, transformiert mit Deletionsmutanten des Simian Virus 40 (SV40). |
| HEK 293 (human embryonal kidney) zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Biel | Humane embryonale Nierenzellen, transformiert mit Adenovirus Typ 5 (Ad5). |

Plasmide

| | |
|--------------------|--|
| pRc/CMV-mGAT1 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Lüddens, Univ. Mainz. |
| pcDNA3.1(+) | Invitrogen |
| pGEMT-HJ-mGAT2 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Nelson, Univ. Tel Aviv. |
| pBluescript-mGAT3 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Nelson, Univ. Tel Aviv. |
| pBluescript-mGAT4 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Nelson, Univ. Tel Aviv. |
| pBluescript-hGAT-1 | Zur Verfügung gestellt von Prof. Nelson, Univ. Tel Aviv. |

Enzyme

| | |
|--|-----|
| Calf Intestine Phosphatase (CIP), 100000 U/ml | |
| Restriktionsendonukleasen | NEB |
| T4 DNA-Ligase, 400000 U/ml | NEB |
| Trypsin (als 10x Trypsin-EDTA-Lösung 0.5/0.2 % (m/V) in PBS) | PAA |

Antikörper

| | |
|---|------------|
| anti-GAT-1, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen | Calbiochem |
| anti-GAT-2, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen | Calbiochem |
| anti-GAT-3, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen | Calbiochem |
| anti-BGT-1, polyklonaler Antikörper aus Kaninchen | Biotrend |
| goat-anti-rabbit IgG-HRP | Santa Cruz |

DNA-Längenstandards, Primer, Proteinstandards

| | | |
|---------------------------------------|---|-------------|
| Cruz Marker Molecular Weight Standard | 23, 34, 43, 55, 90, 132 kDa | Santa Cruz |
| 1 kb DNA ladder | 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp | NEB |
| 2 kb DNA ladder | 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp | NEB |
| wide range DNA-Marker | 50, 100, 200, 300, 400, 500, 750, 1000, 1400, 1550, 2000, 3000, 4000, 6000, 8000, 10000 bp | Sigma |
| Primer | | MWG Biotech |

Lösungen und Puffer

| | | |
|--------------------------------------|---|--|
| Anodenpuffer I (Westernblot) | Tris | 300 mM |
| Anodenpuffer II (Westernblot) | Tris | 25 mM |
| 2x BBS | BES NaCl Na ₂ HPO ₄ | 50 mM 280 mM 1.5 mM pH 6.95, sterilfiltrieren |
| 2.5 M CaCl ₂ -Lösung | CaCl ₂ | 2.5 M sterilfiltrieren |
| Chloroquin-Lösung | Chloroquindiphosphat | 25 mM, sterilfiltrieren |
| DEAE-Dextran-Lösung | DEAE-Dextran | 1.0 % (m/V), autoklavieren |
| DNA-Elektrophorese-Probenpuffer (6x) | Bromphenolblau Xylencyanol Sucrose | 0.25 % (m/V) 0.25 % (m/V) 40 % (m/V) |
| Kathodenpuffer (Westernblot) | Tris D/L-Norleucin | 25 mM 40 mM |
| Krebs-Puffer | CaCl ₂ MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl Glucose Tris NaCl | 2.5 mM 1.2 mM 1.2 mM 4.7 mM 11 mM 25 mM 119 mM pH 7.2 (HCl) |
| Krebs-Puffer ohne Na ⁺ | CaCl ₂ MgSO ₄ KH ₂ PO ₄ KCl Glucose Tris | 2.5 mM 1.2 mM 1.2 mM 4.7 mM 11 mM 144 mM pH 7.2 (HCl) |

| | | |
|------------------------------------|---|--|
| LB-Agarplatten | Peptone Hefeextrakt NaCl D-(+)-Glucose Agar Ampicillin oder Tetracyclin | 1 % (m/V) 0.5 % (m/V) 0.5 % (m/V) 0.1 % (m/V) 1.5 % (m/V) autoklavieren 0.005 % oder 0.0012 % |
| LB(+) Medium | Peptone Hefeextrakt NaCl D-(+)-Glucose Ampicillin | 1 % (m/V) 0.5 % (m/V) 0.5 % (m/V) 0.1 % (m/V) autoklavieren 0.01 % (m/V) |
| LB(-) Medium | Wie LB(+), nur ohne Glucose | |
| PBS | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ | 137 mM 2.7 mM 8 mM 1.75 mM pH 7.4 (HCl), autoklavieren |
| RIPA-Puffer | Triton X-100 SDS Natriumdeoxycholat NaCl Tris | 1 % (m/V) 0.1 % (m/V) 1 % (m/V) 150 mM 50 mM pH 7.2 (HCl), sterilfiltrieren |
| SDS-PAGE-Elektrodenpuffer (10x) | Tris-Base Glycin SDS | 25 mM 190 mM 0.1 % (m/V) pH 8.35 (HCl) |
| SDS-PAGE-Lösung 1- Trenngel | Acrylamid Methylenbisacrylamid | 44 % (m/V) 0.8 % (m/V) |
| SDS-PAGE-Lösung 2- Trenngel | Tris-HCl SDS | 1.5 M 0.4 % (m/V) pH 8.8 (HCl) |
| SDS-PAGE-Lösung 3- Sammelgel | Acrylamid Methylenbisacrylamid | 29.2 % (m/V) 0.8 % (m/V) |

| | | |
|-----------------------------|--|--|
| SDS-PAGE-Lösung 4-Sammelgel | Tris-HCl SDS | 0.5 M 0.4 % (m/V) pH 6.8 (HCl) |
| SDS-PAGE-Probenpuffer (2x) | 1 M Tris-Base pH 6.8 SDS Glycerin ges. Bromphenolblaulösung | 40 % (v/v) 4 % (m/V) 20 % (m/V) 0.1 % (v/v) pH 6.8 (HCl) |
| TBE (10x) | Tris-Base Borsäure EDTA | 0.89 M 0.89 M 0.02 M |
| TBS-T | NaCl Tris Tween 20 | 200 mM 20 mM 0.1 % (v/v) pH 8.0 (HCl) |
| TSS | PEG 3350 (autoklaviert) MgCl ₂ DMSO LB(+) Medium | 10 % (v/v) 50 mM 5 % (v/v) |

Zellkulturmedien

| | |
|---|-----|
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (mit 1000 mg/l Glucose + L-Glutamin) | PAA |
| FCS-Gold (fötales Kälberserum) | PAA |

Chemikalien und Reagenzien

Alle verwendeten Salze, Lösungsmittel und Laborchemikalien entsprachen handelsüblicher Qualität. Unten aufgeführt sind nur die speziell benötigten Chemikalien und Reagenzien.

| | |
|---|---------------------------|
| Acrylamid, Methylbisacrylamid, SDS | Roth |
| Agar | Sigma |
| Agarose, EEO 0.16-0.19 | Sigma |
| Ammoniumperoxodisulfat | Roth |
| Ampicillin, Tetracyclin | Sigma |
| BES | Merck |
| Bromphenolblau | Amersham |
| Chloroquindiphosphat | Sigma |
| DEAE-Dextran | Sigma |
| ECL-Lösung | Perkin Elmer |
| FuGENE6 | Roche |
| G418-Sulfat-Lösung | PAA |
| [³ H]GABA, 3 TBq/mmol | Amersham |
| [³ H]GABA, 1 TBq/mmol | Biotrend |
| Hefeextrakt | Sigma |
| 2-Mercaptoethanol | Roth |
| Milchpulver | Biorad |
| NO711 | RBI |
| Penicillin-Streptomycin-Lösung | PAA |
| Peptone, enzymatisches Lysat aus tierischem Gewebe | Sigma |
| Probenpuffer für die Nukleinsäureelektrophorese (Bromphenolblau 0.25 % (m/V), XylencyanolFF 0.25 % (m/V), Sucrose 40 % (m/V)) | Sigma |
| Protease-Inhibitor-Cocktail (4-(2-Aminoethyl)benzenesulfonylfluorid, PepstatinA, E-64, Bestatin, Leupeptin, Aprotinin) | Sigma |
| Protein A-Sepharose CL-4B | Sigma |
| Rinderserumalbumin (BSA) | Sigma |
| Szintillationscocktail Rotiszint eco plus | Roth |
| TEMED | Amersham Life Sciences |
| Tween 20 | Calbiochem |
| Western Blot Chemiluminescence Reagent Plus | NEN Life Science Products |

Geräte

| | |
|---|--------------------------------|
| Autoklav VacuLab | MMM Medcenter |
| Biofuge Stratos | Heraeus |
| Trockenschrank Ecocell | MMM Medcenter |
| Brutschrank HeraCell | Heraeus |
| Cellharvester Brandel M-24R | Brandel |
| Easycast-Horizontalminielektrophorese, 7x8 cm | Owl scientific |
| -20°C Gefriertruhe | Siemens |
| -80°C Gefriertruhe HFU86 | Heraeus |
| Geldokumentationsgerät, Luminiszenzdokumentationsgerät | Kodak, Biorad |
| Inkubationsschüttler Certomat IS | B. Braun Biotech International |
| Muldestor | Wagner & Munz |
| Schütteltisch Polymax 1040 | Heidolph |
| Semi-dry Blotter UniBlot SC | Merck |
| Sorvall-Zentrifuge RC5C | Du Pont |
| Sterilbank Herasafe | Heraeus |
| Szintillationsmesser Canberra Packard triCarb 1600 | Canberra-Packard |
| Ultrazentrifuge CP56GII | Hitachi |
| UV/ VIS-Spektrometer Ultrospec plus, Küvettenlänge 1 cm | Pharmacia |
| Vertikal-Elektrophorese-Kammer, The Penguin, 10x10 cm | Owl scientific |

5.2. Methoden

5.2.1. Arbeiten mit DNA

Analytische DNA-Elektrophorese

Zur Herstellung der Gele (0.5 %) wurden 0.25 g Agarose in 50 ml 1x TBE in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach dem Abkühlen auf etwa 50°C versetzte man mit Ethidiumbromid (Endkonzentration 0.8 µg/ml). Anschließend wurde in den Gelträger der verwendeten Horizontal-Elektrophoresekammer ausgegossen. Die DNA-Proben wurden im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer versetzt und in die zehn zur Verfügung stehenden Geltaschen gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 150 V über etwa 60 Minuten in 1x TBE. Danach wurde das Gel bei 260 nm ausgewertet.

Präparative DNA-Elektrophorese

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten spezifischer Länge wurde eine präparative DNA-Elektrophorese durchgeführt. Dabei ging man wie oben beschrieben vor, wobei die Probe auf sechs Geltaschen gleichmäßig verteilt wurde. Die entsprechenden Banden wurden unter längerwelligem UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und mit einem Skalpell möglichst schnell aus dem Gel ausgeschnitten. Mit Hilfe des SpinPrep Gel DNA Kits (Fa. Novagen) konnten die gewünschten DNA-Fragmente aus dem Gel rückextrahiert werden. Dabei wurde nach Anleitung des Herstellers vorgegangen. Die rückgewonnene DNA wurde anschließend noch einer Ethanol-fällung unterzogen. Dazu gab man 1/10 der Volumenmenge 5 M NaCl-Lösung und die 2.5fache Volumenmenge eiskalten absoluten Ethanol zu der DNA-Lösung und stellte das Gemisch für 10 Minuten in den -80°C Gefrierschrank. Danach wurde 10

Minuten bei 13000 g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das DNA-Pellet nach dem Trocknen in 20-40 µl sterilem Wasser aufgenommen.

Restriktionsverdau von DNA

Zum Restriktionsverdau wurde die DNA mit 1.0 µl des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer mindestens über zwei Stunden, in der Regel über Nacht bei 37°C inkubiert. Für analytische Zwecke wurden dabei 500 ng, für präparative Zwecke 4 µg DNA eingesetzt.

Herstellung eines kurzen DNA-Stücks aus zwei Primern (Adapter)

Zur Herstellung eines kurzen DNA-Stücks aus zwei Primern wurden beide Oligonukleotide auf eine Konzentration von 10 pmol/µl verdünnt und je 10 µl davon gemischt. Der Reaktionsansatz wurde zwei Minuten im Wasserbad auf 75°C erhitzt und dann langsam über zwei Stunden auf Raumtemperatur abgekühlt.

Umklonierung

Sowohl Ursprungs- als auch Zielvektor wurden über Nacht bei 37°C durch geeignete Restriktionsendonukleasen aufgeschnitten (mGAT2: *BamH* I und *Xho* I; mGAT3: Insert: *Spe* I und *Pvu* I, Vektor: *Nhe* I und *BamH* I; mGAT4: *EcoR* I und *Xba* I; hGAT-1: *EcoR* I und *Xho* I). Der Zielvektor wurde darüber hinaus noch durch einstündige Inkubation bei 37°C mit CIP dephosphoryliert. Die CIP wurde anschließend durch zehnmütiges Erhitzen auf 75°C inaktiviert. Die gewünschten DNA-Fragmente konnten über eine präparative DNA-Elektrophorese isoliert werden. Zur Ligation wurden 50 fmol dephosphorylierter Zielvektor und 100 fmol Insert gemischt (bei mGAT3 zusätzlich noch ein Adapter, der die *BamH* I-

Schnittstelle von pcDNA3.1(+) mit der *Pvu* I-Schnittstelle des Inserts verbindet) und zusammen mit 1 μ l T4 DNA-Ligase im vom Hersteller empfohlenen Puffer drei Stunden bei 16°C inkubiert.

Herstellung transformationskompetenter *E.coli*

XL-1-Blue MRF' wurden auf LB-Agarplatten (Durchmesser: 9.4 cm; versetzt mit 12 μ g/ml Tetracyclin) vor dem Bunsenbrenner ausplattiert und über Nacht bei 37°C bebrütet. 7 ml LB(+) Medium (ohne Antibiotikum) wurden mit einer einzelnen Kolonie angeimpft und über Nacht bei 225 rpm und 37°C schüttelnd inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur überführte man in 100 ml LB(-) Medium. Nachdem eine OD₆₀₀ von 0.35-0.38 erreicht war (nach 2.5-3 Stunden), wurde die Bakteriensuspension fünf Minuten auf Eis gestellt, anschließend in 50 ml Röhrchen gefüllt und bei 400 g abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15 ml 4°C kaltem TSS aufgenommen und Aliquots davon bei -80°C schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

Transformation von TSS kompetenten *E.coli*

Kompetente *E.coli*-Zellen wurden im Eisbad langsam aufgetaut und 400 μ l davon vorsichtig auf 20 ng Plasmid (bei Retransformationen) beziehungsweise den kompletten Ligationsansatz pipettiert. Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis wurde für zwei Minuten auf 42°C (Wasserbad) erhitzt und anschließend nochmal fünf Minuten auf Eis gestellt. Der komplette Ansatz wurde zu 2.6 ml LB-Medium (ohne Selektionsantibiotikum) pipettiert und eine Stunde bei 37°C und 145 rpm geschüttelt. Es wurden zweimal je 150 μ l des Ansatzes auf LB-Platten (Durchmesser: 9.4 cm; versetzt mit 0.005% Ampicillin) vor dem Bunsenbrenner ausplattiert. Der Rest der Zellen wurde für fünf Minuten bei 500 g abzentrifugiert, in 150 μ l LB-Medium

resuspendiert und komplett ausplattiert (Sicherheitsplatte). Die Agar-Platten wurden über Nacht bei 37°C bebrütet.

Kryokonservierung von Bakterien

500 µl autoklaviertes Glycerol wurden in einem Eppendorfcap vorgelegt und 500 µl einer 100 ml-Übernachtskultur vor dem Bunsenbrenner zugegeben. Die Zellsuspension wurde in einer Styroporbox bei -20°C eingefroren und nach zwei Tagen in -80°C umgelagert.

Plasmid-DNA-Präparation

Minipräparation

Eine einzelne erfolgreich transformierte Bakterienkolonie wurde in 7 ml LB(+) Medium (mit 0.01 % Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C und 225 rpm schüttelnd inkubiert. 1.5 ml der Vorkultur wurden bei 5000 g pelletiert. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte mit dem SpinPrep Plasmid Kit (Fa. Novagen) nach Anleitung des Herstellers. Als Sicherheit wurde von jeder Vorkultur auch ein Glycerolstock angelegt.

Maxipräparation

Eine einzelne transformierte Bakterienkolonie beziehungsweise 50 µl Glycerolstock wurde am Morgen in 7 ml LB-Medium (mit 0.01 % Ampicillin) bei 37°C und 225 rpm angezogen. 500 µl dieser Vorkultur wurden am Abend in 100 ml LB-Medium (mit 0.01 % Ampicillin) überführt und über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Die Zellen wurden dann bei 5000 g sedimentiert. Die Gewinnung der Plasmid-DNA erfolgte dann mit dem Mobius1000 Plasmid Kit (Fa. Novagen) nach Anleitung des Herstellers. Das so isolierte DNA-Pellet wurde

in 1 ml sterilem Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Reinheit und Gehalt wurden sowohl photometrisch als auch durch Elektrophorese bestimmt.

Photometrische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Reinheitsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Bei doppelsträngiger DNA nimmt man für eine Konzentration von $50\ \mu\text{g/ml}$ eine $A_{260} = 1.0$ an. Als zusätzliche Reinheitsprüfung wurde außerdem noch das A_{260}/A_{280} -Verhältnis bestimmt. Während Nukleinsäuren ihr Absorptionsmaximum bei 260 nm haben, liegt das von Proteinen bei 280 nm. Bei reiner Plasmid-DNA beträgt das A_{260}/A_{280} -Verhältnis 1.75-1.95. Niedrigere Verhältnisse deuten auf eine Verunreinigung durch Protein hin, höhere auf eine Verunreinigung durch RNA^[71].

DNA-Sequenzierung

Sämtliche DNA-Sequenzierungen wurden von der Firma Sequiserve ausgeführt.

5.2.2. Zellkulturtechniken

Die Arbeiten mit Zellkulturen wurden ausschließlich unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche für die Zellkultivierung benötigten Flaschen und Schalen wurden von der Firma Greiner bezogen: 24-well-Platten ($1.9\ \text{cm}^2$ -Kulturfläche), 6-well-Platten ($9.6\ \text{cm}^2$ -Kulturfläche), $25\ \text{cm}^2$ -Flaschen, $75\ \text{cm}^2$ -Flaschen, $182\ \text{cm}^2$ -Flaschen (jeweils aus Polystyrol, Verschluss der Flaschen versehen mit einem $0.2\ \mu\text{M}$ -Filter). Es wurden stets auf 37°C erwärmte Medien und Puffer verwendet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C und $8\ \%$ CO_2 .

Subkultivierung der Zellen

Um Vitalität und logarithmisches Wachstum der Zellen aufrecht zu erhalten, mussten diese in regelmäßigen Abständen vereinzelt und in frisches Medium eingebracht werden. Die adhärent wachsenden COS-7 Zellen wurden dabei zunächst mit PBS gewaschen, anschließend durch fünfminütige Inkubation bei 37°C durch Trypsin-EDTA-Lösung (0.05 % Trypsin, 0.02 % EDTA) vom Flaschenboden gelöst und in der doppelten Volumenmenge frischem Medium aufgenommen. Die ebenfalls adhärent wachsenden HEK Zellen konnten ohne vorheriges Waschen durch kurze Behandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung (etwa 15 Sekunden, Raumtemperatur) vom Flaschenboden gelöst und in frischem Medium aufgenommen werden. Nach gründlicher Vereinzeln wurden die Zellen in der gewünschten Verdünnung in frisches Medium überführt. Nach höchstens sechs Wochen Kulturdauer wurden die Zellen verworfen und durch frisch aufgetaute ersetzt.

| Zelllinie | Kulturmedium | Subkultivierung |
|---|---|--|
| HEK | DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin | 1:15 montags und donnerstags verdünnt |
| HEK, stabil mGAT1, mGAT2, mGAT3, mGAT4, hGAT-1 | DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 500 µg/ml G418 | 1:15 montags und donnerstags verdünnt |
| COS-7 | DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin | 1:5 montags und donnerstags, verdünnt |

Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer (Zeiss) bestimmt. Zunächst mussten 10 µl einer Zellsuspension in die Kammer eingebracht werden. Danach erfolgte das Auszählen der vier seitlichen Großquadrate. Dabei sollten in jedem Großquadrat nicht mehr als 40 Zellen zugegen sein. Der erhaltene Wert wurde gemittelt (entsprechend der Zellzahl pro Großquadrat) und mit 10^4 multipliziert. So erhielt man die Zellzahl pro Milliliter Kultur.

Kryokonservierung der Zellen

Die Zellen einer dicht bewachsenen Kulturflasche wurden vom Boden mit Trypsin-EDTA abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 500 g). Das Zellsediment wurde in Einfriermedium (DMEM + 10 % FCS + 10 % DMSO) aufgenommen, gut resuspendiert und je 1ml aliquotiert. Die Zellsuspension wurde langsam in einer Styroporbox bei -80 °C eingefroren und nach einer Woche in flüssigen Stickstoff (Gasphase) umgelagert.

Zum Auftauen wurde der Inhalt eines Kryoröhrchens rasch im Wasserbad erwärmt und komplett in eine 75 cm^2 -Kulturflasche mit frischem Medium überführt. Nach etwa zwölf Stunden erfolgte ein Mediumwechsel, um tote Zellen sowie verbliebenes DMSO zu entfernen.

Transiente Transfektion mit FuGENE6

Pro Kulturflasche (182 cm^2 Kulturfläche) wurden 3 Millionen COS-7 beziehungsweise 3.5 Millionen HEK Zellen ausgesät und zu etwa 50 Prozent Konfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurden je Flasche 2.7 ml FuGENE6-Transfektionsreagenz hergestellt: Dazu wurden 2660 µl serumfreies Medium abzüglich der benötigten DNA-Menge vorgelegt und 40 µl FuGENE6 zugegeben (ohne dabei die Wand des Röhrchens zu berühren). Daraufhin

wurde die DNA-Lösung einpipettiert. Es wurde ein Verhältnis von 13.3 µg DNA : 40 µl FuGENE6 (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) beziehungsweise von 10.0 µg DNA : 60 µl FuGENE6 (mGAT2) gewählt. Das Transfektionsreagenz wurde bei Raumtemperatur 30 Minuten stehen gelassen und anschließend vollständig auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 48 Stunden weiterkultiviert (37°C, 8 % CO₂) und dann geerntet.

Transiente Transfektion mit DEAE-Dextran

Pro Kulturschale (145 cm² Kulturfläche) wurden 3 Millionen COS-7 ausgesät und zu etwa 50 Prozent Konfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurden je Flasche 1.75 ml Transfektionsreagenz hergestellt. Dazu wurde eine Verdünnung der Plasmid-DNA (in der Regel 20 µg) in PBS mit 85 µl DEAE-Dextran Stammlösung versetzt und diese Mischung auf die gewaschenen Zellen gegeben. Danach wurde 30 Minuten bei 37°C und 8 % CO₂ inkubiert. Dabei wurde alle zehn Minuten die Flasche umgeschwenkt, um zu verhindern, dass die Zellen austrocknen. Nach 30 Minuten wurde eine Mischung aus 15 ml Medium und 60 µl 25 mM Chloroquin-Lösung zugegeben und weitere 2.5 Stunden bei 37°C und 8 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurde der DEAE-Dextran-Mix abgesaugt und eine Mischung aus 13.5 ml Medium und 1.5 ml DMSO auf die Zellen gegeben. Diese ließ man exakt 2.5 Minuten bei Raumtemperatur auf die Zellen einwirken, ehe man die Zellen dreimal mit PBS wusch und frisches Medium zugab. Die Zellen wurden 48 Stunden weiterkultiviert (37°C, 8 % CO₂) und dann geerntet.

Transiente Transfektion mittels Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation

Pro Kulturschale (145 cm² Kulturfläche) wurden 3 Millionen COS-7 beziehungsweise 3.5 Millionen HEK Zellen ausgesät und zu etwa 50 Prozent Konfluenz wachsen gelassen. Daraufhin wurden je Flasche 2.7 ml Transfektionsreagenz hergestellt. Dazu wurden 135 µl

2.5 M CaCl₂-Lösung (Endkonzentration 125 mM), 1215 µl einer Verdünnung der Plasmid-DNA (20 µg) in sterilem Wasser und 1350 µl 2x BBS in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Transfektionsreagenz wurde anschließend vollständig auf die Zellen gegeben und diese in einem Brutschrank bei 35°C und 3 % CO₂ über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium gewechselt. Danach wurden die Zellen nochmals bis zu ihrer weiteren Verwendung 30 Stunden bei 37°C und 8 % CO₂ kultiviert.

Stabile Transfektion

Vor der eigentlichen Transfektion wurden 20 µg Plasmid-DNA durch eine geeignete Restriktionsendonuklease linearisiert (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1: *Sca* I, mGAT2: *Mfe* I, siehe dazu S. 112). Die geschnittene DNA wurde durch präparative Agarosegel-Elektrophorese gereinigt (siehe dazu S. 111) und anschließend zur Transfektion eingesetzt. Diese erfolgte mittels FuGENE6 wie auf S. 117f. beschrieben. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen 1:5 in Selektionsmedium (DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 500 µg/ml G418) gesplittet. Alle 48-72 Stunden wurde das Medium erneuert und die Zellen wachsen gelassen, bis etwa 30 Prozent Konfluenz erreicht war. Die Zellen wurden dann trypsinisiert, ein Aliquot der Zellsuspension 1:10000 verdünnt und in neue Gewebekulturschalen (145 cm² Kulturfläche) eingesät. Der Rest der Zellen wurde eingefroren. Nachdem einzelne Klone in den Schalen aufgetreten waren (etwa 14 Tage später), wurden diese mit Hilfe von Kloningzylindern isoliert. Dabei wurden sterile Plastikringe in Silikonfett getaucht und diese um die vorher mit PBS gewaschenen Zellkolonien gesetzt. In die einzelnen Vertiefungen wurde dann jeweils ein Tropfen Trypsin-EDTA-Lösung eingebracht, die man kurz einwirken ließ und anschließend mit der doppelten Volumenmenge Medium neutralisierte. Die Zellen konnten daraufhin in 24 well-Schalen überführt und entsprechend weitervermehrt werden. In GABA-uptake Assays wurde die

Expressionsrate der GAT-Proteine überprüft. Dazu ermittelte man den Quotienten aus Gesamtaufnahme und nichtspezifischer Aufnahme. So wurde jeweils ein Hochleistungsstamm selektioniert. Dieser wurde dann noch durch Immunpräzipitation und folgendem Westernblot vollständig charakterisiert. Zur Kultivierung der stabilen Zelllinien wurde immer Selektionsmedium (DMEM + 10 % FCS + 100 U/ml Penicillin + 100 µg/ml Streptomycin + 500 µg/ml G418) verwendet. Die Expression des jeweiligen GAT-Proteins wurde über die gesamte Kulturdauer von vier Wochen durch GABA-uptake Assays überprüft.

Proteinbestimmung

Protein wurde mit BSA als Standard nach der Vorschrift von Bradford^[72] bestimmt.

Zellyse

Die Zellen aus einer voll bewachsenen Flasche wurden trypsiniert (siehe S. 116), dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen und abzentrifugiert (4°C, 500 g). Das Pellet wurde in 250 µl RIPA-Puffer (versetzt mit 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail) aufgenommen und 30 Minuten auf Eis gestellt. Das Lysat wurde danach mehrfach mit einer Insulinspritze aufgezogen (Aufschluss von größeren Zelltrümmern) und anschließend 30 Minuten bei 4°C und 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, sofort weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren. Aus einem Aliquot wurde eine Proteinbestimmung durchgeführt.

Immunpräzipitation

100 µl Zellysat (entsprechend etwa 1000 µg Gesamtprotein) wurden mit 10 µl Primärantikörper versetzt (Verdünnung 1:100) und über Nacht bei 4°C schüttelnd inkubiert. Am nächsten Morgen wurde diese Mischung zu 10 mg gequollener Protein A-Sepharose gegeben

und weitere vier Stunden bei 4°C geschüttelt. Danach wurde viermal mit eiskaltem RIPA-Puffer gewaschen. Zuletzt gab man 40 µl SDS-PAGE Probenpuffer zu, erhitze fünf Minuten auf 95°C und pelletierte anschließend die Protein A-Sepharose. Der Überstand wurde sofort für Westernblots weiterverwendet.

Westernblot

Die Proben wurden in SDS-PAGE-Probenpuffer 1:1 verdünnt, fünf Minuten bei 95°C im Trockenschrank erhitzt und dann durch SDS-PAGE-Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wurde für das Trenngel eine Konzentration von 10 % gewählt. Das Sammelgel hatte eine Konzentration von 5 %. Nach erfolgter Auspolymerisation wurde das Gel (Geldicke: 0.8 mm) mit den Proben geladen. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein durch den Sekundärantikörper detektierbarer Marker eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 300 V und einer Stromstärke von 50 mA in SDS-PAGE-Elektrodenpuffer durchgeführt (etwa 40 Minuten). Nach der Elektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran durch einen diskontinuierlichen Blot bei einer Stromstärke von 140 mA in einem Semi-Dry-Blotter (30 Minuten, Membrangröße: 7x9 cm). Danach wurde die Membran bei 37°C eine Stunde getrocknet und anschließend in einer Schale mit 5 % Milchpulver in TBS-T über Nacht bei 4°C unter Schütteln geblockt. Am nächsten Tag wurde die Membran in eine Schale mit 1 % Milchpulver in TBS-T und dem Primärantikörper (Verdünnung: 1:1000 für mGAT3; 1:2000 für hGAT-1, mGAT1, mGAT2; 1:4000 für mGAT4) überführt und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-T über jeweils 10 Minuten unter Schwenken bei Raumtemperatur erfolgte die Überführung der Membran in eine Schale mit 1 % Milchpulver in TBS-T und dem zweiten Antikörper (Verdünnung 1:1000). Nach einer Inkubation über 45 Minuten bei Raumtemperatur unter Schütteln wurde dreimal je 10 Minuten mit TBS-T

gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit frisch rekonstruierter ECL-Lösung eine Minute lang in der Dunkelkammer inkubiert und dann über 5 bis 20 Minuten belichtet.

5.2.3. GABA-uptake Assay

GABA-uptake Assay in transfizierte Zellen

Transient transfizierte COS-7 (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) oder HEK Zellen (mGAT2) beziehungsweise stabil hGAT-1, mGAT1, mGAT2, mGAT3 oder mGAT4 exprimierende HEK Zellen wurden trypsiniert (siehe S. 116) und dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in kaltem Krebs-Puffer aufgenommen. Aliquots von je etwa 60000 Zellen (mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1) beziehungsweise je etwa 400000 Zellen (mGAT2) je Probenröhrchen inkubierte man dann in Gegenwart verschiedener Testsubstanzkonzentrationen in einem Gesamtvolumen von 225 µl Krebs-Puffer für zehn Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad. Hierauf wurden 25 µl eines Gemischs aus [³H]GABA und radioaktiv nicht markiertem GABA (Endkonzentration 13.3 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 26.7 nM nicht radioaktiv markiertes GABA für mGAT1, mGAT3, mGAT4, hGAT-1 beziehungsweise 26.7 nM [³H]GABA (3 TBq/mmol) und 13.3 nM nicht radioaktiv markiertes GABA für mGAT2) zugegeben und weitere zehn Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden anschließend unter vermindertem Druck mit dem Cellharvester filtriert (Filter: Whatman GF/C, eine Stunde in 0.9 % NaCl-Lösung eingeweicht) und viermal mit je 2 ml kalter 0.9 % NaCl-Lösung gespült. Die Filter wurden mit je 3 ml Szintillationscocktail versetzt und am nächsten Tag im Szintillationszähler je zwei Minuten vermessen. Jeder Einzelwert wurde als Triplikat bestimmt. Die nichtspezifische Aufnahme wurde durch Zusatz von 10 µM NO711 (Endkonzentration, bei hGAT-1 und mGAT1) beziehungsweise 1 mM GABA (Endkonzentration, bei mGAT2, mGAT3, mGAT4) zu transfizierten Zellen gemessen. Die Gesamtaufnahme wurde mit Hilfe einer Probe ohne

Zusatz eines uptake-Inhibitors ermittelt. Musste eine Testsubstanz in DMSO gelöst werden, so wurde im uptake-Assay auch bei allen Kontrollmessungen ein entsprechender Zusatz von DMSO verwendet.

Synaptosomaler GABA-uptake

Synaptosomenpräparation für pGAT-1

Schweinecortex („graue Substanz“ aus dem frontalen Bereich) wurde mit dem zehnfachen Volumen 4°C kalter 0.32 M Sucrose mit einem Potter homogenisiert (800 rpm, 12 Passagen). Das Homogenat wurde dann bei 3000 g zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser auf 1.2 M Sucrose aufgeschichtet. Anschließend wurde bei 4°C für 23 Minuten bei 250000 g zentrifugiert. Die Zwischenschicht wurde abgezogen und auf 0.8 M Sucrose aufgeschichtet. Es wurde nochmals 23 Minuten bei 4°C und 250000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets resuspendierte man darauf in Krebs-Puffer und stellte sie bis zur weiteren Verwendung auf Eis. Ein Pellet wurde für die Negativkontrolle in Krebs-Puffer ohne Natrium resuspendiert.

Synaptosomenpräparation für pGAT-3

Schweine Stammhirn (bevorzugt Pons) wurde mit dem zehnfachen Volumen auf 4°C gekühlter 0.32 M Sucrose mit einem Potter homogenisiert (800 rpm, 12 Passagen). Das Homogenat wurde dann bei 3000 g zehn Minuten bei 4°C zentrifugiert, der Überstand abgenommen und dieser auf 1.2 M Sucrose aufgeschichtet. Anschließend wurde bei 4°C für 23 Minuten bei 250000 g zentrifugiert. Die Zwischenschicht wurde abgezogen und auf 0.8 M Sucrose aufgeschichtet. Es wurde nochmals 23 Minuten bei 4°C und 250000 g zentrifugiert, die Zwischenschicht abgezogen und diese wiederum 23 Minuten bei 4°C und 250000 g zentrifugiert. Die Zwischenschicht zog man wiederum ab und füllte mit Krebs-Puffer auf. Danach wurde 23 Minuten bei 4°C und 250000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Pellets wurden dann in

Krebs-Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Ein Pellet wurde für die Negativkontrolle in Krebs-Puffer ohne Natrium resuspendiert.

Durch pGAT-1 bzw. pGAT-3 vermittelter GABA-uptake

Aliquots von etwa 50 µg (pGAT-1) beziehungsweise 30 µg (pGAT-3) Protein in Krebs-Puffer wurden in Gegenwart verschiedener Testsubstanzkonzentrationen (sowie 10 µM des GABA-Transaminase-Inhibitors Aminooxyessigsäure beim pGAT-1- und pGAT-3-Assay und 10 µM NO711 beim pGAT-3-Assay) in einem Gesamtvolumen von 225 µl Krebs-Puffer für zehn Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad vorinkubiert. Hierauf wurden 25 µl eines Gemischs aus [³H]GABA und radioaktiv nicht markiertem GABA (Endkonzentration 3.6 nM [³H]GABA (1 TBq/mmol) und 23 nM nicht radioaktiv markiertes GABA für pGAT-1, 15.6 nM [³H]GABA (1 TBq/mmol) und 90 nM nicht radioaktiv markiertes GABA für pGAT-3) zugegeben und weitere vier Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Proben wurden anschließend unter vermindertem Druck mit dem Cellharvester filtriert (Filter: Whatman GF/C, eine Stunde in 0.9 % NaCl-Lösung eingeweicht) und viermal mit je 2 ml kalter 0.9 % NaCl-Lösung gespült. Die Filter wurden mit je 3 ml Szintillationscocktail versetzt und am nächsten Tag im Szintillationszähler je zwei Minuten vermessen. Jeder Einzelwert wurde als Triplikat bestimmt. Die Negativkontrolle (nichtspezifische Aufnahme) wurde in Abwesenheit von Na⁺ (Verwendung von Krebs-Puffer ohne Na⁺) gemessen. Die Gesamtaufnahme wurde mit Hilfe einer Probe ohne Zusatz eines uptake-Inhibitors ermittelt. Musste eine Testsubstanz in DMSO gelöst werden, so wurde im uptake-Assay in alle Kontrollmessungen ein entsprechender Zusatz von DMSO verwendet.

Auswertung

Spezifische Aufnahme wurde definiert als Gesamtaufnahme abzüglich der nichtspezifischen Aufnahme. Die IC₅₀-Werte wurden mit Prism 2.01 durch nichtlineare Regression ermittelt.

6. Praktischer Teil – Synthese

6.1. Allgemeine Angaben

Schmelzpunkte

Schmelzpunktapparatur nach Dr. Tottoli (Fa. Büchi, Nr. 510).

IR-Spektren

FT-IR Spektrometer 1600 und Paragon 1000 (Fa. Perkin Elmer). Die Aufnahme der Spektren erfolgte als KBr-Pressling bei Feststoffen beziehungsweise als Film zwischen NaCl-Platten bei Ölen.

NMR-Spektren

JNMR-GX 400 (400 MHz, Fa. Jeol), JNM-ECP 500 (500 MHz, Fa. Jeol), Tetramethylsilan als interner Standard. Die Kopplungskonstanten wurden mit einer Genauigkeit von 0.5 Hz angegeben. Die Nachbearbeitung der Spektren erfolgte mit der NMR-Software NUTS (2D Version 5.097, Fa. Acron NMR, 1995).

Massenspektren

Mass Spectrometer 5989 A mit 59980 B Particle Beam LC/MS Interface (Fa. Hewlett-Packard). LC-MS/MS-Massenspektrometer API 2000 (Fa. Applied Biosystems).

CHN-Analysen

CHN-Elementaranalysator Rapid (Fa. Heraeus) und Vario EL (Fa. Elementar).

Dünnschichtchromatographie

DC-Fertigplatten Kieselgel 60 F-254 (Fa. Merck). Die Detektion erfolgte durch UV-Löschung (254 nm) oder durch Verwendung eines Cer-(IV)-ammoniummolybdat-Tauchreagenzes (5 % $(\text{NH}_4)_x\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ und 0.2 % $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$, gelöst in 5 % wäßriger H_2SO_4) und anschließendes Erhitzen.

Säulenchromatographie

Flash-Chromatographie^[73] auf Kieselgel 60 (Korngröße 0.040-0.063 mm, Fa. Merck).

Reagenzien und Lösungsmittel

Alle Reagenzien waren von handelsüblicher Qualität. Für die Reaktionen wurden getrocknete und destillierte Lösungsmittel verwendet. THF und Toluol wurden in Umlaufapparaturen über Natrium mit Benzophenon als Indikator absolutiert und bei Bedarf frisch destilliert. Dimethylformamid wurde über Calciumhydrid absolutiert und ebenfalls frisch destilliert. Für die Chromatographie wurden destillierte Lösungsmittel verwendet.

6.2. Allgemeine Arbeitsvorschriften

AAV 1: Reduktive Aminierung 1

1.0 mmol Benzaldehydderivat und 1.2 mmol Amin wurden mit 10 ml Ethanol versetzt und zusammen mit einem 3 Å-Molekularsieb 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach filtrierte man über Kieselgur (Elution mit Ethanol) und engte im Vakuum ein. Der Rückstand wurde dann in 10 ml Ethanol aufgenommen. Nach langsamer Zugabe von 1.2 mmol NaBH₄ wurde weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Das Ethanol wurde abgezogen und der Rückstand in 15 ml Ethylacetat gelöst. Danach wurde dreimal mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und anschließend zur Trockene eingengt. Das erhaltene Rohprodukt wurde wie bei den einzelnen Substanzen angegeben gereinigt.

AAV 2: Reduktive Aminierung 2

1.0 mmol Benzaldehydderivat und 1.2 mmol Amin wurden mit 10 ml Ethanol versetzt und zusammen mit einem 3 Å-Molekularsieb 20 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurde über Kieselgel filtriert (Elution mit Ethanol, soweit nicht anders angegeben) und im Vakuum eingengt. Der Rückstand wurde dann in 10 ml Ethanol (soweit nicht anders angegeben) aufgenommen. Dazu gab man langsam 1.2 mmol NaBH₄ und rührte weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur. Danach wurde fast zur Trockene eingengt; zum Rückstand fügte man 10 ml Wasser hinzu. Der erhaltene Niederschlag wurde abfiltriert und aus einem geeigneten Lösungsmittel umkristallisiert.

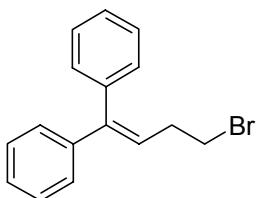
AAV 3: meta-Formylierung vom Phenolderivaten

9.0 mmol Phenol, 10.0 mmol Trimethylsilylchlorid und 10.5 mmol Imidazol wurden in 10 ml DMF gelöst und bei Raumtemperatur über Nacht unter Stickstoff gerührt. Danach gab man 15 ml Wasser zu und schüttelte dreimal mit je 10 ml Isohexan aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden einmal mit 5 ml Wasser, dreimal mit je 5 ml 10 % K_2CO_3 und dreimal mit je 5 ml Wasser gewaschen. Es wurde über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und das Lösungsmittel abgezogen.

3.0 mmol des erhaltenen Trimethylsilylethers wurden ohne weitere Reinigung in 25 ml trockenem THF gelöst und unter Stickstoff 30 Minuten auf $-78\text{ }^\circ\text{C}$ gekühlt. Dann tropfte man über 15 bis 20 Minuten 3 ml einer 1.3 M Lösung von *sec*Butyllithium zu, rührte dreißig Minuten und tropfte anschließend 2 ml Dimethylformamid zu. Nach weiteren dreißig Minuten gab man langsam 3.5 ml einer 1 M Lösung von Tetrabutylammoniumfluorid zu und ließ das Reaktionsgemisch eine Stunde auf Raumtemperatur erwärmen. Es wurden 10 ml Wasser zugefügt und das THF fast zur Gänze abgezogen. Danach gab man 10 ml 1N NaOH zu und wusch dreimal mit je 25 ml Ether. Die Etherphasen wurden zweimal mit je 20 ml 1N NaOH rückextrahiert. Dann säuerte man die vereinigten wässrigen Phasen mit konzentrierter Salzsäure an und extrahierte viermal mit je 25 ml Ether. Die vereinigten organischen Phasen wurden über $MgSO_4$ getrocknet, filtriert und eingeeengt. Der Rückstand wurde wie bei den einzelnen Substanzen angegeben gereinigt.

6.3. Analytische Daten

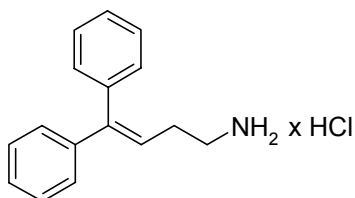
4,4-Diphenylbut-3-enylbromid (28)^[40]



Darstellung nach Literaturvorschrift^[40]: 100 ml HBr 47 % und 100 ml CH₂Cl₂ wurden auf 4°C abgekühlt (Zweiphasensystem), 25.3 g (0.113 mol) Cyclopropyldiphenylcarbinol (**27**) zugegeben und vier Stunden bei 4°C gerührt. Die organische Phase trennte man ab und extrahierte die wässrige Phase zweimal mit CH₂Cl₂. Die vereinigten organischen Phasen wurden dreimal mit Wasser gewaschen, über Na₂SO₄ getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt.

Ausbeute: 31.21 g (97 %) {Lit.^[40]: 99 %}. – Gelbes Öl. – DC: $R_f = 0.42$ (Isohexan/EtOAc, 9:1). – Die spektroskopischen Daten (¹H NMR) stimmten mit den in der Literatur^[69] angegebenen überein. – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.69$ (q, $J = 7.0$ Hz, 2 H, =CHCH₂), 3.43 (t, $J = 7.0$ Hz, 2 H, CH₂Br), 6.09 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H, =CH), 7.17-7.38 (m, 10 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3055$ cm⁻¹, 3023, 2962, 1598, 1494, 1444. – MS (EI, 70eV); m/z (%): 287 (23) [M⁺], 207 (13), 193 (40), 129 (100), 115 (54), 91 (77).

4,4-Diphenylbut-3-enylamin x HCl (**31**)^[69]

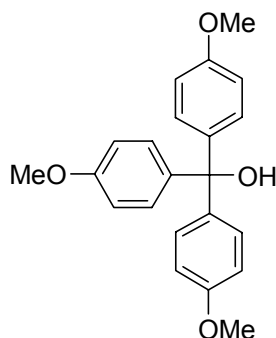


Darstellung des Phthalimidderivats **30** nach Literaturvorschrift^[68]: 5.74 g (20 mmol) **28**, 2.94 g (20 mmol) Phthalimid (**29**) und 2.76 g (20 mmol) K₂CO₃ wurden in 100 ml

wasserfreiem DMF gelöst und über Nacht unter N₂ auf 120°C erhitzt. Nach Abfiltrieren des Rückstands wurde zur Trockene eingengt. Der Rückstand wurde in 100 ml CH₂Cl₂ gelöst und je zweimal mit 0.2 N NaOH und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über MgSO₄ getrocknet, filtriert und eingengt. Die Ausbeute betrug 5.657 g (80 %, Lit.^[68]: 80 %). Das Phthalimidderivat (**30**) wurde ohne Reinigung verwendet.

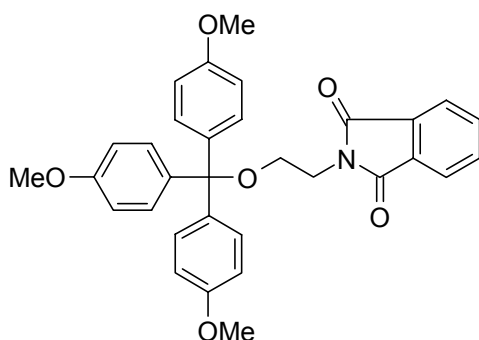
Darstellung von **31** aus **30** nach Literaturvorschrift^[69]: 5.657 g (16 mmol) des Phthalimidderivats (**30**) wurden in 40 ml Ethanol suspendiert, 1.10 g (22 mmol, 1.38 eq) Hydrazinhydrat 100 % zugeben und zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Man ließ auf Raumtemperatur abkühlen, gab 20 ml Ethanol zu und stellte mit HCl pH 3 ein. Anschließend wurde filtriert und das Filtrat zu 3-5 ml einrotiert. Danach wurden 10 ml Wasser zugegeben, erneut filtriert und das Filtrat zur Trockene eingengt. Umkristallisieren aus einer Mischung von Diethylether und Ethanol (1:1) lieferte **31**. Zur reduktiven Aminierung wurde die freie Base eingesetzt, die durch Ausschütteln der soda-alkalischen Lösung von **31** gegen CH₂Cl₂ gewonnen wurde.

Ausbeute: 4.01 g (97 %) {Lit.^[69]: 2. Teilreaktion: 52 %}. – Hellgelbe Kristalle, Schmp.: 189-191°C. – DC: $R_f = 0.12$ (CH₂Cl₂/MeOH, 10:1). – Die spektroskopischen Daten (¹H NMR) stimmten mit den in der Literatur^[69] angegebenen überein. – 400 MHz ¹H NMR (Methanol-d₄): $\delta = 2.50$ (q, $J = 7.6$ Hz, 2 H, =CHCH₂), 3.03 (t, $J = 7.6$ Hz, 2 H, CH₂NH₂), 6.11 (t, $J = 7.3$ Hz, 1 H, =CH), 7.17–7.42 (m, 10 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3022$ cm⁻¹, 1598, 1490. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 224 (100) [M⁺H⁺], 207 (11), 194 (6), 129 (6).

Tris-(4-methoxyphenyl)methanol (34)^[46]

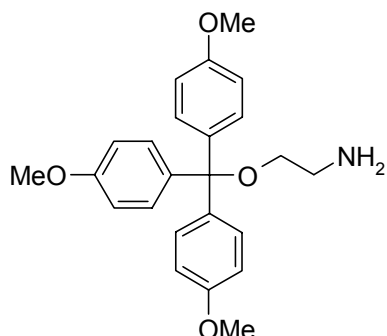
Darstellung nach Literaturvorschrift^[46]: 560 mg (23.0 mmol) Magnesium-Späne wurden in 30 ml wasserfreiem THF suspendiert. Danach wurde langsam 4.0 ml (32.0 mmol) Bromanisol zugetropft und 20 Minuten unter Rückfluss erhitzt (80°C). Anschließend wurde auf 0°C abgekühlt und 1.825 g (11.0 mmol) Anissäuremethylester (**33**) zugegeben. Nach 10 Minuten Rühren bei Raumtemperatur wurde zwei Stunden zum Rückfluss erhitzt (80°C). Nach Abkühlen auf 0°C wurden 20 ml gesättigte NH₄Cl-Lösung sowie so viel Wasser zugegeben, daß sich der entstandene Niederschlag gerade auflöste. Es wurde dreimal mit Ethylacetat ausgeschüttelt und die vereinigten organischen Phasen nochmals mit gesättigter NaCl-Lösung gewaschen. Danach trocknete man über MgSO₄, filtrierte und engte das Filtrat zur Trockene ein. Der gelbe ölige Rückstand wurde durch Säulenchromatographie gereinigt (SiO₂, Isohexan/EtOAc, 75:25).

Ausbeute: 3.255 g (85 %). – Gelbe Kristalle, Schmp.: 80-81°C {Lit.^[74]: 81°C}. – DC: $R_f = 0.21$ (Isohexan/EtOAc, 75:25). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.67$ (s, 1 H, OH), 3.80 (s, 9 H, OCH₃), 6.82-7.18 (m, 12 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3541$ cm⁻¹, 3014, 2956, 2836, 1608, 1508, 1249, 1173, 1030. – MS (EI, 70eV); m/z (%): 350 (36) [M⁺], 333 (30), 243 (93), 215 (21), 135 (100), 107 (11).

2-{2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethyl}isoindol-1,3-dion (36)

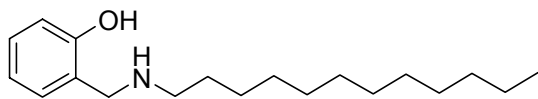
2.80 g (8.0 mmol) **34** wurden in 15 ml trockenem Toluol gelöst und 0.15 ml konzentrierte Schwefelsäure zugegeben. Nach fünf Minuten Rühren bei 65°C wurden 2.29 g (12.0 mmol, 1.5 eq) N-Hydroxyethylphthalimid (**35**) zugefügt und weitere drei Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Darauf wurden 10 ml CH₂Cl₂ und 10 ml Wasser zugegeben, filtriert und dreimal mit CH₂Cl₂ extrahiert. Die vereinigten CH₂Cl₂-Phasen wurden über MgSO₄ getrocknet und eingengt. Der gelbe feste Rückstand wurde durch Säulenchromatographie (SiO₂, Isohexan/EtOAc, 6:4) gereinigt.

Ausbeute: 4.19 g (76 %) – Hellgelbe Kristalle, Schmp.: 105-106°C – DC: $R_f = 0.27$ (Isohexan/EtOAc, 6:4). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 3.35$ (t, $J = 5.6$ Hz, 2 H, CH₂N), 3.75–3.80 (d, $J = 19.6$ Hz, 9 H, OCH₃), 3.90 (t, $J = 5.6$ Hz, 2 H, OCH₂), 6.71-6.84 (m, 6 H, H_{aromat.}), 7.22–7.26 (m, 6 H, H_{aromat.}), 7.71-7.85 (m, 4 H, H_{aromat.}-Phthalyl). – IR: $\tilde{\nu} = 2953$ cm⁻¹, 2834, 1712, 1508, 1390, 1248, 1176, 1032. – MS (EI, 70eV); m/z (%): 523 (4) [M⁺], 333 (100), 174 (12), 135 (8). – C₃₂H₂₉NO₆ (523.59): ber.: C 73.41, H 5.58, N 2.68; gef.: C 73.41, H 5.84, N 2.55.

2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamin (37)

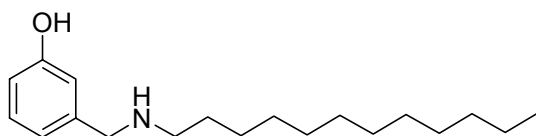
Darstellung analog zu einer Literaturvorschrift^[70]: 2.1 g (4.0 mmol) **36** wurden in 40 ml Methanol suspendiert und 2.0 g (40.0 mmol, 10 eq) Hydrazin-Hydrat zugegeben. Nach etwa einer Stunde entstand eine klare Lösung, aus der nach etwa vier Stunden das Phthallylhydrazid auszufallen begann. Insgesamt wurde sieben Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Danach filtrierte man und engte das Filtrat fast zur Trockene ein. Man gab 40 ml Wasser zu und schüttelte viermal mit CH_2Cl_2 aus. Die vereinigten organischen Phasen wurden über MgSO_4 getrocknet, filtriert und zur Trockene eingengt. Eine weitere Reinigung war nicht erforderlich.

Ausbeute: 1.10 g (70 %). – Gelbes Öl. – DC: $R_f = 0.24$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25 %, 100:2:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.86$ (t, $J = 5.4$ Hz, 2H, CH_2N), 3.13 (t, $J = 5.5$ Hz, 2 H, OCH_2), 3.79 (s, 9 H, OCH_3), 6.83 (m, 6 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$), 7.32 (m, 6 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3380$ cm^{-1} , 2932, 2835, 1607, 1504, 1302, 1249, 1175, 1035. – MS (EI, 70eV); m/z (%): 393 (2) [M^+], 333 (100), 243 (5), 135 (11). – $\text{C}_{19}\text{H}_{33}\text{NO}$ (291.48): ber.: C 73.26, H 6.92, N 3.56; gef.: C 72.87, H 6.62, N 3.52.

2-Dodecylaminomethylphenol (38)^[75]

AAV 1 – 1.22 g (10.0 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd und 4.63 g (25.0 mmol) Dodecylamin, 0.446 g (12.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1).

Ausbeute: 1.45 g (50 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 53-54°C {Lit.^[75]: 47°C}. – DC: $R_f = 0.40$ (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7$ Hz, 3 H, CH₃), 1.25–1.31 (m, 18 H, 9xCH₂), 1.54 (quin, $J = 7$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂), 2.68 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, ArCH₂NHCH₂), 3.99 (s, 2 H, ArCH₂NH), 6.75-7.16 (m, 4 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3285$ cm⁻¹, 2916, 2848, 1608, 1462, 1379, 1262. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 292 (100) [M⁺H⁺], 136 (5), 107 (4).

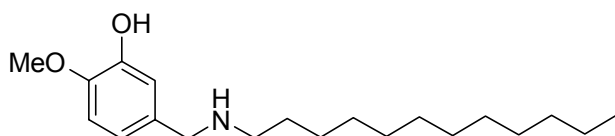
3-Dodecylaminomethylphenol (39)^[76]

AAV 1 – 1.22 g (10.0 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 4.63 g (25.0 mmol) Dodecylamin, 0.446 g (12.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1).

Ausbeute: 1.06 g (37 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 92-93°C – DC: $R_f = 0.30$ (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1). – Die spektroskopischen Daten (¹H NMR) stimmten mit den in der Literatur^[76] angegebenen überein. – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7$ Hz, 3 H, CH₃), 1.24–1.31 (m, 18 H, 9xCH₂), 1.54 (quin, $J = 7$ Hz, 2 H,

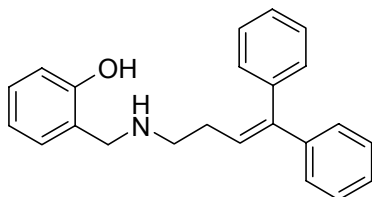
NHCH₂CH₂CH₂), 2.66 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, ArCH₂NHCH₂), 3.69 (s, 2 H, ArCH₂NH), 6.69-7.15 (m, 4 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3274$ cm⁻¹, 2918, 2851, 2530, 1583, 1485, 1339, 1284. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 292 (100) [M⁺H⁺], 136 (9), 107 (3). – C₁₉H₃₃NO (291.48): ber.: C 78.29, H 11.41, N 4.81; gef.: C 78.05, H 11.46, N 4.76.

5-Dodecylaminomethyl-2-methoxyphenol (40)



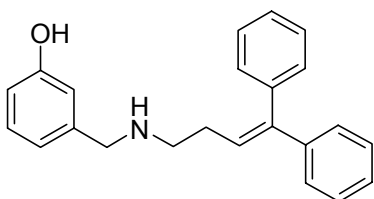
AAV 1 – 1.52 g (10.0 mmol) 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd und 4.63 g (25.0 mmol) Dodecylamin, 0.446 g (12.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1).

Ausbeute: 697 mg (22 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 76-77°C. – DC: $R_f = 0.35$ (CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 90:9:1). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 0.88$ (t, $J = 7$ Hz, 3 H, CH₃), 1.25–1.31 (m, 18 H, 9xCH₂), 1.54 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂CH₂), 2.62 (t, $J = 7$ Hz, 2 H, ArCH₂NHCH₂), 3.72 (s, 2 H, ArCH₂NH), 3.88 (s, 3H, OCH₃), 6.69-7.15 (m, 4 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3318$ cm⁻¹, 2916, 2852, 2353, 1504, 1284, 1223, 1131, 1034. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 322 (100) [M⁺H⁺], 166 (7), 137 (27). – C₂₀H₃₅NO₂ (321.51): ber.: C 74.72, H 10.97, N 4.36; gef.: C 74.59, H 11.21, N 4.36.

2-[(4,4-Diphenylbut-3-enylamino)methyl]phenol (41)

AAV 1 – 122 mg (1.0 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd und 260 mg (1.0 mmol der freien Base) **31**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; Isohexan/EtOAc/EDMA, 50:50:1).

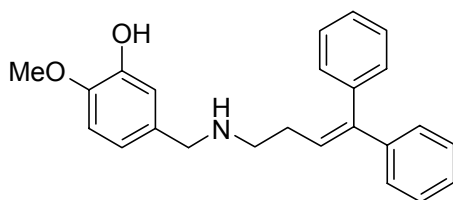
Ausbeute: 216 mg (66 %). – Hellgelbes Öl. – DC: $R_f = 0.42$ (EtOAc/Isohexan/EDMA, 50:50:1). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.38$ (q, $J = 6.9$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂), 2.78 (t, $J = 6.9$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂), 3.92 (s, 2 H, ArCH₂NH), 6.05 (t, $J = 6.9$ Hz, 1 H, CH=), 6.76-7.38 (m, 14 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3321$ cm⁻¹, 3053, 2843, 1589, 1493, 1258, 1104. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 330 (100) [M⁺H⁺], 236 (3), 224 (5), 136 (15), 107 (5). – C₂₃H₂₃NO (329.45): ber.: C 83.85, H 7.04, N 4.25; gef.: C 83.87, H 7.07, N 4.22.

3-[(4,4-Diphenylbut-3-enylamino)methyl]phenol (42)

AAV 1 – 122 mg (1.0 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 260 mg (1.0 mmol der freien Base) **31**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH/NH₃ 25%, 100:5:1).

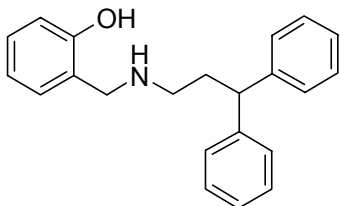
Ausbeute: 186 mg (57 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 129-130°C. – DC: $R_f = 0.29$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25%, 100:5:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.38$ (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 2.78 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 3.92 (s, 2 H, ArCH_2NH), 6.06 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{)$, 6.75-7.38 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3282$ cm^{-1} , 2856, 2573, 1580, 1481, 1343, 1278, 1102. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 330 (100) [M^+H^+], 136 (25), 107 (4). – $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{NO}$ (329.45): ber.: C 83.85, H 7.04, N 4.25; gef.: C 84.00, H 6.98, N 4.25.

5-[(4,4-Diphenylbut-3-enylamino)methyl]-2-methoxyphenol (43)



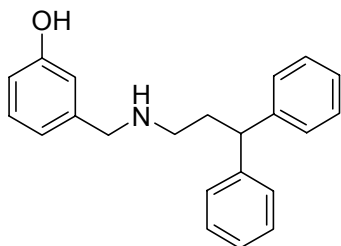
AAV 1 – 152 mg (1.0 mmol) 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd und 260 mg (1.0 mmol der freien Base) **31**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH_4 . Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO_2 ; $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25%, 100:3:1).

Ausbeute: 251 mg (70 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 81-82°C. – DC: $R_f = 0.16$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$, NH_3 25%, 100:3:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.35$ (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 2.73 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 3.65 (s, 2 H, ArCH_2NH), 3.87 (s, 3 H, OCH_3), 6.07 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{)$, 6.77-7.36 (m, 13 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3287$ cm^{-1} , 2928, 2857, 1503, 1437, 1276, 1224, 1131, 1028. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 360 (100) [M^+H^+], 166 (69), 137 (55). – $\text{C}_{24}\text{H}_{25}\text{NO}$ (359.47): ber.: C 80.19, H 7.01, N 3.90; gef.: C 80.25, H 6.96, N 3.87.

2-[(3,3-Diphenylpropylamino)methyl]phenol (44)

AAV 1 – 126 mg (1.0 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd und 230 mg (1.0 mmol) 3,3-Diphenylpropylamin, 45 mg (1.2 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; Isohexan/EtOAc/EDMA, 70:30:3).

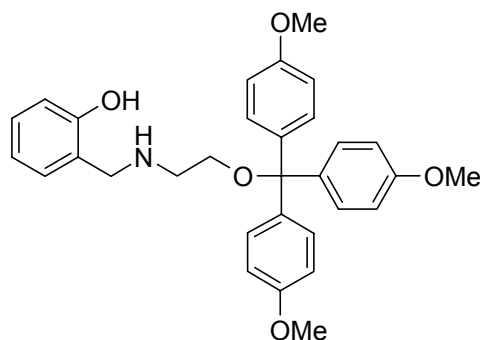
Ausbeute: 220 mg (69 %). – Hellgelbes Öl. – DC: $R_f = 0.33$ (Isohexan/EtOAc/EDMA, 70:30:3). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.30$ (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂), 2.66 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH₂CH₂), 3.91 (s, 2 H, ArCH₂), 3.99 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, NHCH₂CH₂CH), 6.75-7.28 (m, 14 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3334$ cm⁻¹, 3024, 2913, 2850, 1590, 1450, 1260, 1104. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 318 (100) [M⁺H⁺], 212 (13), 107 (17). – C₂₂H₂₃NO (317.43): ber.: C 83.24, H 7.30, N 4.41; gef.: C 83.18, H 7.30, N 4.38.

3-[(3,3-Diphenylpropylamino)methyl]phenol (45)

AAV 1 – 126 mg (0.75 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 230 mg (0.75 mmol) 3,3-Diphenylpropylamin, 38 mg (1.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; CH₂Cl₂/MeOH/EDMA, 100:3:3).

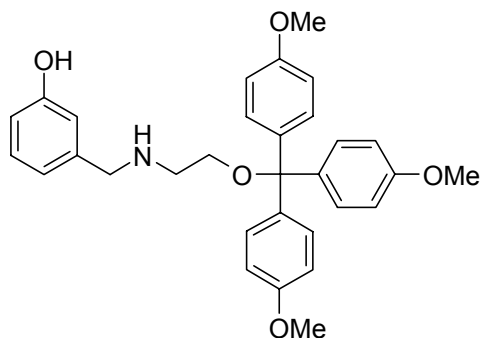
Ausbeute: 219 mg (69 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 144-145°C. – DC: $R_f = 0.33$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{EDMA}$, 100:3:3). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.29$ (q, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 2.62 (t, $J = 7.5$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 3.62 (s, 2 H, ArCH_2), 3.98 (t, $J = 7.5$ Hz, 1 H, $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{CH}$), 6.61-7.26 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3446$ cm^{-1} , 3278, 3023, 2905, 2848, 1598, 1450, 1275. – MS (EI, 70eV); m/z (%): 317 (32) [M^+], 136 (57), 107 (100). – $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{NO}$ (317.43): ber.: C 83.24, H 7.30, N 4.41; gef.: C 82.99, H 7.29, N 4.39.

2-({2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)phenol (46)



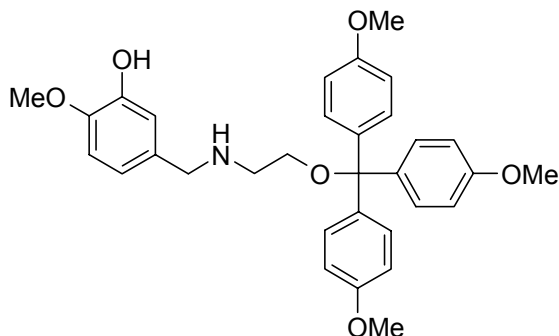
AAV 1 – 92 mg (0.75 mmol) 2-Hydroxybenzaldehyd und 295 mg (0.75 mmol) **37**, 38 mg (1.0 mmol) NaBH_4 . Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO_2 ; Isohexan/EtOAc/EDMA, 65:35:2).

Ausbeute: 323 mg (86 %). – Farbloses Öl. – DC: $R_f = 0.18$ (Isohexan/EtOAc/EDMA, 65:35:2). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.82$ (t, $J = 5.1$ Hz, 2 H, OCH_2), 3.27 (t, $J = 5.1$ Hz, 2 H, OCH_2CH_2), 3.78 (s, 9 H, OCH_3), 3.94 (s, 2 H, ArCH_2), 6.76-7.31 (m, 16 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3430$ cm^{-1} , 2931, 2836, 1608, 1506, 1250, 1175, 1034. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 333 (100), 227 (16), 168 (22), 107 (34). – $\text{C}_{31}\text{H}_{33}\text{NO}_5$ (499.61): ber.: C 74.53, H 6.66, N 2.80; gef.: C 74.20, H 6.70, N 2.67.

3-({2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)phenol (47)

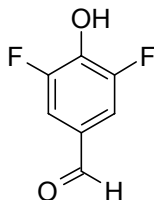
AAV 1 – 92 mg (0.75 mmol) 3-Hydroxybenzaldehyd und 295 mg (0.75 mmol) **37**, 38 mg (1.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; EtOAc/EDMA, 100:2).

Ausbeute: 298 mg (80 %). – Gelbe Kristalle, Schmp.: 62-63°C. – DC: $R_f = 0.12$ (EtOAc/EDMA, 100:2). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.83$ (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, OCH₂CH₂), 3.27 (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, OCH₂), 3.67 (s, 2 H, ArCH₂), 3.77 (s, 9 H, OCH₃), 6.71-7.32 (m, 16 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3407$ cm⁻¹, 2931, 2834, 1607, 1508, 1249, 1175, 1034. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 333 (22), 227 (83), 168 (100), 145 (21), 127 (22), 107 (24). – C₃₁H₃₃NO₅ x 0.5 H₂O (508.62): ber.: C 73.21, H 6.74, N 2.75; gef.: C 73.31, H 6.67, N 2.67.

5-({2-[Tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)-2-methoxyphenol (48)

AAV 1 – 114 mg (0.75 mmol) 3-Hydroxy-4-methoxybenzaldehyd und 295 mg (0.75 mmol) **37**, 38 mg (1.0 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte über Säulenchromatographie (SiO₂; EtOAc/EDMA, 100:2).

Ausbeute: 297 mg (75 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 122-123°C. – DC: $R_f = 0.12$ (EtOAc/EDMA, 100:2). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.80$ (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, OCH₂CH₂), 3.23 (t, $J = 5.4$ Hz, 2 H, OCH₂), 3.68 (s, 2 H, ArCH₂), 3.78 (s, 9 H, OCH₃), 3.88 (s, 3 H, OCH₃), 6.80-7.32 (m, 16 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3431$ cm⁻¹, 2954, 2834, 1608, 1507, 1247, 1177, 1096, 1036. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 333 (40), 257 (40), 225 (45), 198 (36), 137 (92), 105 (100). – C₃₂H₃₅N₃O₆ (529.64): ber.: C 72.57, H 6.66, N 2.64; gef.: C 72.64, H 6.74, N 2.61.

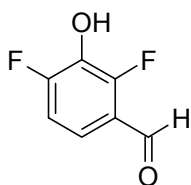
3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd (51)^[67]

Darstellung nach Literaturvorschrift^[67]: 7.156 g (55.0 mmol) 2,6-Difluorphenol wurden in 50 ml Trifluoressigsäure gelöst, 8.412 g (60.0 mmol) Hexamethylentetramin zugegeben und fünf

Stunden unter Stickstoff bei 80°C erhitzt. Nach dem Abkühlen gab man 120 ml CH₂Cl₂ zu und schüttelte aus. Nachdem die TFA-Phase abgetrennt worden war, wurde die CH₂Cl₂-Phase einmal mit 70 ml Wasser, einmal mit 50 ml 10 % K₂CO₃-Lösung und einmal mit 30 ml Wasser gewaschen. Die mit der TFA-Phase vereinigten wässrigen Phasen wurden bis auf etwa 75 ml eingengt und danach fünf mal mit je 75 ml Diethylether extrahiert. Nach Trocknen des Etherphase über MgSO₄ engte man zur Trockene ein. Der erhaltene Rückstand wurde aus Ethylacetat umkristallisiert.

Ausbeute: 5.398 g (62 %) {Lit.^[67]: 55 %}. – Farblose Kristalle, Schmp.: 120°C {Lit.^[67]: 120-121°C}. – DC: $R_f = 0.28$ (Isohexan/EtOAc, 6:4). – Die spektroskopischen Daten (¹H NMR, IR) stimmten mit den in der Literatur^[67] angegebenen überein. – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 7.50$ (dd, $J = 6.7/1.7$ Hz, 2 H, H_{aromat.}), 9.82 (s, 1 H, CHO). – IR: $\tilde{\nu} = 3100$ cm⁻¹, 1669, 1533, 1337, 1126, 1022. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 159 (100) [M⁺H⁺], 105 (4).

2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd (54)^[67]

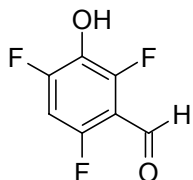


Darstellung nach Literaturvorschrift^[67] gemäß AAV 3 – 1.17 g (9.0 mmol) 2,6-Difluorphenol, 1.086 g (10.0 mmol) Trimethylsilylchlorid, 0.715 g (10.5 mmol) Imidazol. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Ethylacetat.

Ausbeute: 370 mg (51 %) {Lit.^[67]: 49 %}. – Farblose Kristalle, Schmp.: 143-145°C {Lit.^[67]: 142-146°C}. – DC: $R_f = 0.39$ (Isohexan/EtOAc, 6:4). – Die spektroskopischen Daten (¹H NMR, IR, MS) stimmten mit den in der Literatur^[67] angegebenen überein. – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 7.03$ (dddt, $J = 8.9/1.8/0.7$ Hz, 1 H, H₅), 7.44 (ddd, $J = 8.9/7.2/6.1$ Hz,

1 H, $H_{\text{aromat.}}$), 10.25 (s, 1 H, CHO). – IR: $\tilde{\nu} = 3183 \text{ cm}^{-1}$, 1681, 1593, 1320, 1035. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 159 (100) [M^+H^+], 157 (12).

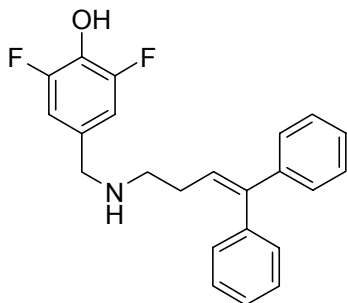
2,4,6-Trifluor-3-hydroxybenzaldehyd (55)



AAV 3 – 1.33 g (9.0 mmol) 2,4,6-Trifluorphenol, 1.086 g (10.0 mmol) Trimethylsilylchlorid, 0.715 g (10.5 mmol) Imidazol. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO_2 , Isohexan/EtOAc, 6:4).

Ausbeute: 230 mg (22 %). – Orange Kristalle, Schmp.: 158-159°C. – DC: $R_f = 0.27$ (Isohexan/EtOAc, 6:4). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 5.19$ (s, 1 H, OH), 6.83 (m, 1 H, $H_{\text{aromat.}}$), 10.25 (s, 1 H, CHO). – IR: $\tilde{\nu} = 3078 \text{ cm}^{-1}$, 1672, 1504, 1249, 1121, 1048. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 177 (100) [M^+H^+], 145 (5), 127 (5). – hochaufl. Masse (EI): ber.: 176.0085, gef.: 176.0129. – $\text{C}_7\text{H}_3\text{F}_3\text{O}_2$ (176.10): ber.: C 47.45, H 1.72; gef.: C 48.10, H 1.71.

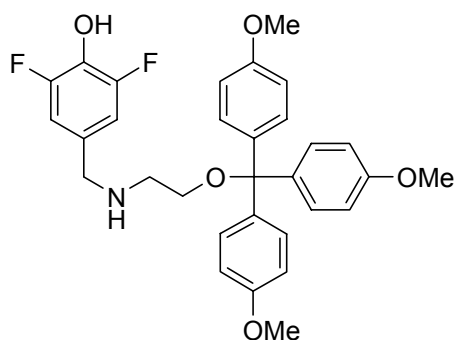
4-[(4,4-Diphenylbut-3-enylamino)methyl]-2,6-difluorphenol (56)



AAV 2 – 158 mg (1.0 mmol) 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd und 260 mg (1.0 mmol der freien Base) **31**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH_4 . Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Ethanol.

Ausbeute: 112 mg (31 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 160-161°C. – DC: $R_f = 0.28$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25%, 90:10:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.41$ (q, $J = 7.2$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 2.80 (t, $J = 7.2$ Hz, 2 H, NHCH_2CH_2), 3.69 (s, 2 H, ArCH_2), 6.07 (t, $J = 7.2$ Hz, 1 H, $\text{CH}=\text{C}$), 6.77 (d, $J = 7.8$ Hz, 2 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$), 7.13-7.39 (m, 10 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3442$ cm^{-1} , 3024, 2362, 1612, 1505, 1445, 1334, 1013. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 366 (26) [M^+H^+], 224 (46), 172 (14), 143 (100). – $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{F}_2\text{NO}$ (365.43): ber.: C 75.60, H 5.79, N 3.83; gef.: C 75.35, H 5.82, N 3.82.

2,6-Difluor-4-({2-[tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)phenol (57)

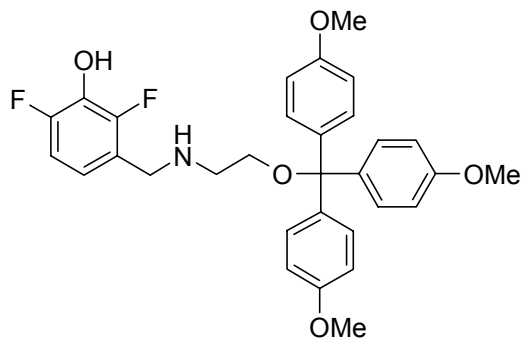


AAV 2 – 158 mg (1.0 mmol) 3,5-Difluor-4-hydroxybenzaldehyd und 394 mg (1.0 mmol) **37**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH_4 . Folgende Änderungen wurden gegenüber AAV 2 vorgenommen: Die Filtration über Kieselgel erfolgte mit Ethylacetat als Elutionsmittel. Die Reduktion fand in Isopropanol als Lösungsmittel statt. Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Ethanol/Diethylether = 3:1.

Ausbeute: 144 mg (54 %). – Farblose Kristalle, Schmp: 199-200°C. – DC: $R_f = 0.30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25%, 90:10:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.86$ (t, $J = 5.3$ Hz, 2 H, OCH_2CH_2), 3.33 (t, $J = 5.3$ Hz, 2 H, OCH_2), 3.58 (s, 2 H, ArCH_2), 3.78 (s, 9 H, OCH_3), 6.67 (d, $J = 8.4$ Hz, 2 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$), 6.81-6.86 (d, $J = 6.6$ Hz, 6 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$), 7.26-7.33 (d, $J = 6.6$ Hz, 6 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3446$ cm^{-1} , 2951, 2834, 1608, 1508, 1463, 1327, 1252,

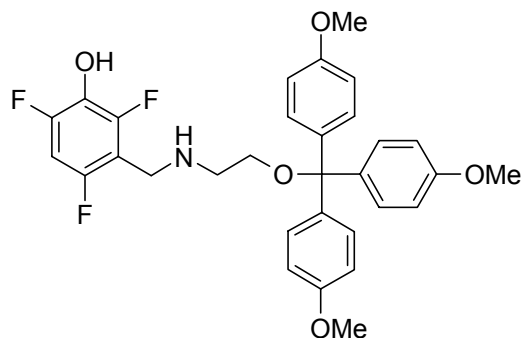
1176, 1035. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 333 (100), 227 (49), 204 (59), 144 (44). – $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{NO}_5$ (535.59): ber.: C 69.52, H 5.83, N 2.62; gef.: C 69.56, H 5.95, N 2.44.

2,6-Difluor-3-({2-[tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)phenol (58)



AAV 2 – 158 mg (1.0 mmol) 2,4-Difluor-3-hydroxybenzaldehyd und 394 mg (1.0 mmol) **37**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH_4 . Die Reinigung erfolgte durch Umkristallisieren aus Ethanol/Diethylether = 3:1.

Ausbeute: 149 mg (56 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 151-152°C. – DC: $R_f = 0.30$ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{NH}_3$ 25%, 90:10:1). – 400 MHz ^1H NMR (CDCl_3): $\delta = 2.83$ (t, $J = 5.2$ Hz, 2 H, OCH_2CH_2), 3.28 (t, $J = 5.2$ Hz, 2 H, OCH_2), 3.72 (s, 2 H, ArCH_2), 3.78 (s, 9 H, OCH_3), 6.71-7.32 (m, 14 H, $\text{H}_{\text{aromat.}}$). – IR: $\tilde{\nu} = 3440$ cm^{-1} , 2930, 2835, 1608, 1509, 1252, 1175, 1034. – MS (CI, CH_5^+); m/z (%): 333 (11), 227 (88), 204 (100), 143 (23). – $\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{F}_2\text{NO}_5 \times 0.25 \text{H}_2\text{O}$ (5.10): ber.: C 68.91, H 5.92, N 2.59; gef.: C 69.02, H 5.98, N 2.49.

2,4,6-Trifluor-3-({2-[tris-(4-methoxyphenyl)methoxy]ethylamino}methyl)phenol (59)

AAV 1 – 175 mg (1.0 mmol) 2,4,6-Trifluor-3-hydroxybenzaldehyd und 394 mg (1.0 mmol) **37**, 45 mg (1.2 mmol) NaBH₄. Die Reinigung erfolgte durch Säulenchromatographie (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH, 100:3).

Ausbeute: 342 mg (62 %). – Farblose Kristalle, Schmp.: 128-129°C. – DC: $R_f = 0.30$ (CH₂Cl₂/MeOH, 100:3). – 400 MHz ¹H NMR (CDCl₃): $\delta = 2.88$ (t, $J = 5.1$ Hz, 2 H, OCH₂CH₂), 3.32 (t, $J = 5.1$ Hz, 2 H, OCH₂), 3.70 (s, 2 H, ArCH₂), 3.77 (s, 9 H, OCH₃), 6.46-7.35 (m, 13 H, H_{aromat.}). – IR: $\tilde{\nu} = 3436$ cm⁻¹, 2934, 2836, 1608, 1506, 1250. – MS (CI, CH₅⁺); m/z (%): 333 (7), 227 (100), 222 (59), 145 (45), 127 (49). – C₃₁H₃₁F₂NO₅ x H₂O (571.60): ber.: C 65.14, H 5.64, N 2.45; gef.: C 65.42, H 5.49, N 2.35.

7. Verzeichnis der Abkürzungen

| | |
|-----------|-----------------------------|
| Abb. | Abbildung |
| ber. | berechnet |
| bp | Basenpaar |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| cDNA | copyDesoxyribonukleinsäure |
| CI | chemical ionisation |
| CIP | calf intestinal phosphatase |
| d | Dublett |
| DMF | Dimethylformamid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dpm | Zerfälle pro Minute |
| EDMA | Ethyldimethylamin |
| EI | Elektronenstoßionisation |
| EtOAc | Ethylacetat |
| FCS | fötales Kälberserum |
| GABA | γ -Aminobuttersäure |
| GAT | GABA-Transporter |
| hGAT | humaner GABA-Transporter |
| gef. | gefunden |
| hochaufl. | hochauflösend |
| HRP | horseradish peroxydase |
| Ig | Immunglobulin |
| IR | Infrarot |

| | |
|-----------------|----------------------------|
| kDa | Kilodalton |
| m | Multipllett |
| MCS | multiple cloning site |
| MeOH | Methanol |
| mGAT | muriner GABA-Transporter |
| NMR | nuclear magnetic resonance |
| pGAT | porciner GABA-Transporter |
| q | Quartett |
| quin | Quintett |
| R_f | Retentionsfaktor |
| rGAT | GABA-Transporter der Ratte |
| s | Singulett |
| <i>sec</i> BuLi | <i>sec</i> -Butyllithium |
| Smp. | Schmelzpunkt |
| t | Tripllett |
| Tab. | Tabelle |
| TBAF | Tetrabutylammoniumfluorid |
| TFA | Trifluoressigsäure |
| THF | Tetrahydrofuran |
| U | Unit |
| vgl. | vergleiche |

8. Literaturverzeichnis

- [1] Costa, E. *J. Psychiat. Res.* **1992** 26, 449-460.
- [2] Lippa, A. S.; Coupet, J.; Greenblatt, E. N.; Klepner, C. A.; Beer, B. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1979**, 11, 99-106.
- [3] Collelo, G. D.; Hockenbery, D. M.; Bosmann, H. B.; Fuchs, S.; Folkers, K. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1978**, 75, 6319-6323.
- [4] Sandler, M.; Glover, V.; Clow, A.; Armano, I. *Pharmacology of the Benzodiazepines* **1982**, MacMillan, London.
- [5] Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W.; Starke, K. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 7. Auflage; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, Berlin, Oxford, **1996**.
- [6] Johnston, G. A. R.; Chebib, M.; Duke, R. K.; Mewett, K. N.; Mitrovic, A. D.; Vandenberg, R. *J. Drug Development Research* **1999**, 46, 255-260.
- [7] McKernan, R. M.; Whiting, P. J. *Trends Neurosci.* **1996**, 19, 139-143.
- [8] Curtis, D. R.; Duggan, A. W.; Felix, D.; Johnston, G. A. R. *Brain Res.* **1971**, 32, 69-96.
- [9] Enna, S. J.; Bowery, N. G. *The GABA Receptors*, 2nd ed.; Humana Press: Totowa, NJ, **1997**.
- [10] Bowery, N. G.; Hill, D. R.; Hudson, A. L. *Neuropharmacology* **1985**, 24, 207-210.
- [11] Sabers, A.; Gram, L. *Pharmacol. Toxicol.* **1992**, 70, 237-243.
- [12] Borden, L.; Smith, K.; Vaysse, P.; Gustafson, E.; Weinshank, R.; Branchek, T. *Receptors and Channels* **1995**, 3, 129-146.
- [13] Borden, L. *Neurochem. Int.* **1996**, 29, 335-356.
- [14] Kanner, B. I.; Bennet, E. R. *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 1203-1210.
- [15] Lester, H. A.; Yu, N.; Cao, Y.; Mager, S. *FEBS Letters* **1998**, 426, 174-178.
- [16] Soudijn, W.; van Wijngaarden, I. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, 7, 1063-1079.

- [17] Palacín, M.; Estévez, R.; Bertran, J.; Zorzano, A. *Physiological reviews* **1998**, *78*, 969-1054.
- [18] Kanner, B. I.; Keynan, S.; Radian, R. *Biochemistry* **1989**, *28*, 3722-3727.
- [19] Mabjeesh, N. J.; Kanner, B. I. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 2563-2568.
- [20] Kanner, B. I.; Bendahan, A.; Pantanowitz, S.; Su, H. *FEBS Letters* **1994**, *356*, 191-194.
- [21] Tamura, S.; Nelson, H.; Tamura, A.; Nelson, N. *J. Biol. Chem.*; **1995**, *270*, 28712-28715.
- [22] Pantanowitz, S.; Bendahan, A.; Kanner, B. I. *J. Biol. Chem.*; **1993**, *268*, 3222-3225.
- [23] Bismuth, Y.; Kavanaugh, M. P.; Kanner, B. I. *J. Biol. Chem.*; **1997**, *272*, 16096-16102.
- [24] Kanner, B. I. *J. Exp. Biol.* **1994**, *196*, 237-249.
- [25] Mager, S.; Kleinberger-Doron, N.; Keshet, G. I.; Davidson, N.; Kanner, B. I.; Lester, H. A. *J. Neuroscience* **1996**, *16*, 5405-5414.
- [26] Nelson N. *J. Neurochem.* **1998**, *71*, 1785-1803.
- [27] Guastrella, J.; Nelson, N.; Nelson, H.; Czyzyk, L.; Keynan, S.; Miedel, M. C.; Davidson, N.; Lester, H. A.; Kanner, B. I. *Science* **1990**, *249*, 1303-1306.
- [28] Liu, Q.-R.; Mandiyan, S.; Nelson, H.; Nelson, N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1992**, *89*, 6639-6643.
- [29] Nelson, H.; Mandiyan, S.; Nelson, N. *FEBS Lett.* **1990**, *269*, 181-184.
- [30] Borden, L. A.; Smith, K. E.; Hartig, P. R.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 21098-21104.
- [31] Liu, Q.-R.; López-Corcuera, B.; Mandiyan, S.; Nelson, H.; Nelson, N. *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 2106-2112.
- [32] Borden, L.; Dhar, T.; Smith, K.; Branchek, T.; Gluchowski, C.; Weinshank, R. *Receptors and Channels* **1994**, *2*, 207-213.
- [33] Yamauchi, A.; Uchida, S.; Kwon, H.; Preston, A.; Robey, R.; Garcia-Perez, A.; Burg, M.; Handler, J. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 649-652.

- [34] Lopez-Corcuera, B.; Liu, Q.-R.; Mandiyan, S.; Nelson, H.; Nelson, N. *J. Biol. Chem.* **1992**, *267*, 17491-17493.
- [35] Borden, L. A.; Smith, K. E.; Gustafson, E. L.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. *J. Neurochem.* **1995**, *64*, 977-984.
- [36] Amara, S. G.; Kuhar, M. J. *Annu. Rev. Neurosci.* **1993**, *16*, 73-93.
- [37] Smith, K.; Gustafson, E.; Borden, L.; Dhar, M.; Durkin, M.; Vaysse, P.; Branchek, T.; Gluchowski, C.; Weinshank R. *GABA: Receptors, Transporters and metabolism*, ed. by C. Tanaka & N. G. Bowery, Birkhäuser Verlag Basel/ Switzerland, **1996**, 63-72.
- [38] Krogsgaard-Larsen, P.; Falch, E.; Larsson, O. M.; Schousboe, A. *Epilepsy Res.* **1987**, *1*, 77-93.
- [39] Fülep, G. H. Dissertation, LMU München **1998**.
- [40] Ali, F.; Bondinell, W.; Dandridge, P.; Frazee, J.; Garvey, E.; Girard, G.; Kaiser, C.; Ku, T.; Lafferty, J.; Moonsammy, G.; Oh, H.-J.; Rush, J.; Setler, P.; Stringer, O.; Venslavsky, J.; Volpe, B.; Yunger, L.; Zirkle, C. *J. Med. Chem.* **1985**, *28*, 653-660.
- [41] Bjorge, S.; Black, A.; Bockbrader, H.; Chang, T.; Gregor, V.; Lobbestael, S.; Nugiel, D.; Pavia, M.; Radulovic, L.; Woolf, T. *Drug Dev. Res.* **1990**, *21*, 189-193.
- [42] Suzdak, P.; Frederiksen, K.; Andersen, K.; Sorensen, P.; Knutsen, L.; Nielsen, E. *Eur. J. Pharmac.* **1992**, *223*, 189-198.
- [43] Armer, R. *Current Medicinal Chemistry* **2000**, *7*, 199-209.
- [44] Borden, L.; Dhar, T. G. M.; Smith, K.; Weinshank, R.; Branchek, T.; Gluchowski, C. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, *269*, 219-224.
- [45] Schachter, S. *Drugs of today* **1998**, *34*, 283-288.
- [46] Dhar, T.; Borden, L.; Tyagarajan, S.; Smith, K.; Branchek, T.; Weinshank, R.; Gluchowski, C. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 2334-2342.
- [47] Breckenridge, R.; Nicholson, S.; Nicol, A.; Suckling, C.; Leigh, B.; Iversen, L. *Biochemical pharmacology* **1981**, *30*, 3045-3049.

- [48] Qiu, J.; Stevenson, S.; O'Beirne, M.; Silverman, R. *J. Med. Chem.* **1999**, *42*, 329-332.
- [49] Web-Katalog der Fa. Invitrogen.
- [50] Okayama, H.; Berg, P. *Mol. Cell Biol.* **1983**, *3*, 280-289.
- [51] NCBI number AW160496.
- [52] NCBI number BI668431.
- [53] Dingermann, T. *Gentechnik, Biotechnik*, 1. Auflage; Wiss. Verl.-Ges.: Stuttgart, **1999**.
- [54] Höfner, G.; Wanner, K. Th. bisher nicht publiziert.
- [55] Ahn, J.; Mundigl, O.; Muth, Th.; Rudnick, G.; Caplan, M. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 6917-6924.
- [56] Clark, J.; Deutch, A.; Gallipoli, P.; Amara, S. *Neuron* **1992**, *9*, 337-348.
- [57] Old, R. W.; Primrose, S. M. *Principles of Gene Manipulation: an Introduction to Genetic Engineering*, 4th ed.; Blackwell Scientific Publications, **1989**.
- [58] Sussmann, D. J.; Milmann, G. *Mol. Cell Biol.* **1986**, *4*, 1641-1643.
- [59] Thomsen, C.; Sorensen, P.; Egebjerg, J. *Brit. J. Pharmacol.* **1997**, *120*, 983-985.
- [60] Keynan, S.; Suh, Y.-J.; Kanner, B.; Rudnick, G. *Biochemistry* **1992**, *31*, 1974-1979.
- [61] Bendahan, A.; Kanner, B. *FEBS Letters* **1993**, *318*, 41-44.
- [62] Bennett, E.; Kanner, B. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 1203-1210.
- [63] Worrall, M.; Williams, C. *Biochem. J.* **1994**, *297*, 425-436.
- [64] Ikegaki, N.; Saito, N.; Hashima, M.; Tanaka, C. *Mol. Brain Res.* **1994**, *26*, 47-54.
- [65] Stefanidis, D.; Cho, S.; Dhe-Paganon, S.; Jencks, W. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 6109-6116.
- [66] Gotteland, J.-P.; Brunel, I.; Gendre, F.; Désiré, J.; Delhon, A.; Junquéro, D.; Oms, P.; Halazy, S. *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 3207-3216.
- [67] Songca, S.; Bonnett, R.; Maes, C. *S. Afr. Tydskr. Chem.* **1997**, *50*, 40-47.
- [68] Cardiola, P.; van der Goot, H.; Timmerman, H. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 571-579.

- [69] van der Bent, A.; Blommaert, A.; Melman, C.; Ijzerman, A.; Wijngaarden, I.; Soudijn, W. *J. Med. Chem.*; **1992** *35*, 1042-1049.
- [70] Breipohl, G.; Will, D.; Peyman, A.; Uhlmann, E. *Tetrahedron* **1997**, *53*, 14671-14686.
- [71] Ausubel, F.; Brent, R.; Kingston, R.; Moore, D.; Seidman, J.; Smith, J.; Struhl, K. *Short protocols in molecular biology*, 4th ed.; John Wiley & Sons, **1999**.
- [72] Bradford, M. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248-259
- [73] Still, W.; Kahn, M.; Mitra, A. *J. Org. Chem.* **1978**, *43*, 2923-2925.
- [74] Blumenstock, H.; Dickert, F.; Fackler, H., Hammerschmidt, A. *Z. Phys. Chem.* **1983**, *135*, 157-170.
- [75] Kudryavtseva, L.; Molodykh, Z.; Ryzhkina, I.; Shagidullina, R.; Timofeeva, I.; Bel'skii, V. *Pharm. Chem. J.* **1997**, *31*, 33-37.
- [76] Breckenridge, R.; Nicholson, S.; Nicol, A.; Suckling, C.; Leigh, B.; Iversen, L. *J. Neurochem.* **1981**, *37*, 837-844.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Andrea Kragler
Geburtstag: 09.06.1976
Geburtsort: Neuburg a. d. Donau
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Werdegang

1982 – 1986 Grundschule Neuburg-Ost
1986 – 1995 Descartes-Gymnasium Neuburg (humanistischer Zweig)
05/1995 Abitur
1995 – 1999 Studium der Pharmazie an der Ludwig-Maximilians-Universität
München
10/1999 Abschluß des Universitätsstudiums mit dem zweiten pharmazeutischen
Examen
11/1999 – 04/2000 Pharmaziepraktikantin im Klinikum Innenstadt, München (Chirurgische
Klinik – Abteilung für klinische Chemie und klinische Biochemie)
05/2000 – 10/2000 Pharmaziepraktikantin in der Marien-Apotheke, Neuburg a. d. Donau
12/2000 Drittes pharmazeutisches Examen
01/2001 – 04/2003 Promotionsstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München,
Department Pharmazie, Arbeitskreis Prof. Wanner