

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

Entwicklung von MS-Transport-Assays für die humanen γ -Aminobuttersäure-Transporter

Sebastian Schmitt

aus

Neuwied, Deutschland

2014

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner betreut.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 18.11.2014

Sebastian Schmitt

Dissertation eingereicht am:

18. November 2014

1. Gutachter:

Prof. Dr. Klaus T. Wanner

2. Gutachter:

Prof. Dr. Franz Bracher

Mündliche Prüfung am:

16. Dezember 2014

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von Dezember 2010 bis Dezember 2014 am Department für Pharmazie – Zentrum für Pharmaforschung – der Ludwig-Maximilians-Universität München auf Anregung und unter Leitung von

Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner

Für die engagierte Betreuung und Förderung meiner Arbeit, sowie die ausgezeichneten Forschungsbedingungen danke ich Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner sehr herzlich.

Herrn Prof. Dr. Franz Bracher danke ich herzlich
für die Übernahme des Koreferats.

Danksagung

Ich danke allen Mitarbeitern und Kollegen des Arbeitskreises von Herrn Prof. Dr. Klaus T. Wanner für die gute und harmonische Zusammenarbeit.

Besonderer Dank gilt der Abteilung für die biologische Prüfung für ihre Mithilfe.

Ein ganz spezieller Dank gilt Herrn Dr. Georg Höfner, für viele fachliche und sonstige Diskussionen, sowie die Unterstützung, die ich durch Ihn erfahren habe.

Herrn Dr. Lars Allmendinger danke ich für den freundschaftlichen Meinungs austausch.

Für die gemeinsame Zeit im Labor, während Konferenzen und anderen „Chefterminen“ danke ich Frau Stefanie Heidrun Grimm, die mich immer unterstützt und motiviert hat. Diese Freundschaft war eine gute Basis für diese Arbeit.

Herrn Tim Hellenbrand danke ich ebenfalls für seine Freundschaft und die vielen Diskussionen über die Chemie im Allgemeinen und den Pharmazeuten im Speziellen.

Mein größter Dank gilt meiner geliebten Frau, die mich immer gestützt und mir so viel geschenkt hat!

„O glücklich, wer noch hoffen kann,
Aus diesem Meer des Irrtums aufzutauchen!
Was man nicht weiß, das eben brauchte man,
Und was man weiß, kann man nicht brauchen.“

Johann Wolfgang von Goethe, Faust

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	
1.1.	GABAerge Neurotransmission	2
1.2.	Neuronale Erkrankungen in Zusammenhang mit GABA	4
1.3.	GABA-Transporter	5
1.3.1.	Histologische Verteilung der GABA-Transporter	5
1.3.2.	Architektur der SLC6-Transporter	6
1.3.3.	Funktionsweise der SLC6-Transporter	9
1.4.	Testsysteme für GABA-Transporter	12
1.4.1.	Elektrophysiologische Assays	12
1.4.2.	Bindungsassays	13
1.4.3.	Transportassays	14
1.5.	Bedeutung von LC-MS/MS in biologischen Screeningverfahren	16
2.	ZIELSETZUNG	
3.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	
3.1.	Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für GABA mittels LC-MS/MS	24
3.1.1.	Allgemeiner Hintergrund zur Quantifizierung von Aminosäuren	24
3.1.2.	Entwicklung einer MS/MS-Methode zur Detektion von GABA	25
3.1.2.1.	Technischer Hintergrund zum verwendeten API 5000™ Triple Quadrupol Massenspektrometer	25
3.1.2.2.	Optimierung der Massenübergänge von GABA, (² H ₂)GABA und (² H ₆)GABA	27
3.1.3.	Entwicklung einer geeigneten Chromatographie zur Quantifizierung von GABA	33
3.1.3.1.	Allgemeine Überlegungen zur HPLC-MS/MS	33
3.1.3.2.	Bestimmung der Totzeit der verwendeten Säulen	35
3.1.3.3.	ZIC-HILIC und ZIC-pHILIC	36
3.1.3.3.1.	Art und Zusammensetzung der mobilen Phase	37
3.1.3.3.2.	Einfluss der Temperatur auf die Retention	41
3.1.3.3.3.	Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase auf die Chromatographie	43
3.1.3.3.4.	Untersuchungen zur Flussrate der mobilen Phase	47
3.1.3.3.5.	Untersuchungen zum Injektionsmedium	49
3.1.3.4.	YMC-Pack PVA-Sil	50
3.1.3.4.1.	Art und Zusammensetzung des Laufmittels	50
3.1.3.4.2.	pH-Abhängigkeit der YMC-Pack PVA-Sil	52
3.1.3.4.3.	Injektionsmedium	53
3.1.3.4.4.	Variation des Injektionsvolumens	54
3.1.3.4.5.	Dimension der YMC-Pack PVA-Sil-Säule	55
3.1.3.4.6.	Matrixsuppression	56
3.1.3.5.	Untersuchung weiterer Säulen des YMC-Pack Column Development Kits (Pack Diol und Pack Polyamin-II) sowie der ZIC-cHILIC (Merck)	57
3.1.3.6.	Gegenüberstellung der finalen HPLC-Methoden für die Quantifizierung von (² H ₆)GABA mit der ZIC-pHILIC und der YMC-Pack PVA-Sil	58
3.1.4.	Kopplung von LC und MS	60

3.1.4.1.	APCI-Quelle des API 5000™	60
3.1.4.2.	APPI-Quelle des API 5000™	62
3.1.4.3.	TurboV-ESI-Ionenquelle des API 5000™	67
3.1.4.4.	Zusammenfassung und Vergleich der verwendeten API-Quellen	74
3.2.	MS-Transport-Assay	76
3.2.1.	Uptake Assays mit HEK-mGAT1-Zellen in Suspension	76
3.2.1.1.	Bestimmung der endogenen GABA in HEK-mGAT1 Zellen	77
3.2.1.1.1.	Bestimmung des Gehaltes an endogener GABA im Bulk-Ansatz	77
3.2.1.1.2.	Interferenzen der natürlichen Isotopologe der endogenen GABA mit dem internen Standard (² H ₂)GABA	79
3.2.1.1.	Filtrieren und Waschen	81
3.2.1.2.	Uptake-Puffer	85
3.2.1.3.	Wiederfindung der erwarteten Menge endogener GABA	86
3.2.1.4.	Endogene GABA als nativer interner Standard zur Korrektur von Zellverlusten während der Probenaufbereitung	88
3.2.1.5.	Eintrocknen der Elutionsplatten zur Aufkonzentrierung von (² H ₆)GABA und Rekonstituierung in geeignetem Injektionsmedium	89
3.2.2.	Transport-Assays mit adhärenenten COS-hGAT1-Zellen	91
3.2.2.1.	Endogene GABA in COS-7-Zellen	93
3.2.2.2.	Generierung der COS-hGAT1 Zelllinie	94
3.2.2.2.1.	Klonierung eines pTracer-hGAT1-Vektors	95
3.2.2.2.2.	Transiente Transfektion und Vorversuche	98
3.2.2.2.3.	Stabile Transfektion	99
3.2.2.3.	Waschen der Zellen am Platewasher	101
3.2.2.4.	Lyse der Zellen	103
3.2.2.5.	Temperaturabhängigkeit	104
3.2.2.6.	Natriumabhängigkeit	105
3.2.2.7.	Vorinkubation der Zellen	107
3.2.2.8.	Transportdauer	108
3.2.2.9.	Optimierung der Zellzahl	110
3.2.2.10.	pH-Wert des HEPES-Uptake-Puffers	112
3.2.2.11.	Ermittlung des nicht-spezifischen Transportes	113
3.2.3.	Zusammenfassung der MS-Transport-Assays	116
3.3.	Validierung der Methode zur Quantifizierung von (²H₆)GABA in MS-Transport-Assays	117
3.4.	Anwendung der entwickelten MS-Transport-Assays	122
3.4.1.	Generierung der COS-Zelllinien zur Expression von hGAT2, hGAT3 und hBGT1	122
3.4.2.	Sättigungsexperimente an hGAT1, hGAT2, hGAT3 und BGT1	123
3.4.3.	Bestimmung der Transportrate von hGAT1	127
3.4.4.	Kompetitive MS-Transport-Assays	129
3.4.4.1.	Design der kompetitiven MS-Transport-Assays	129
3.4.4.2.	Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat und Inhibitor in Konkurrenzexperimenten	133
3.4.4.3.	Evaluierung der pIC ₅₀ -Werte von Inhibitoren an hGAT1-3 und hBGT1	134
3.4.4.3.1.	Fitting von Konkurrenzkurven	138
3.4.4.3.2.	Resultate der kompetitiven MS-Transport-Assays	144
3.4.5.	Verifizierung von GAT-Substraten	152
3.4.6.	Efflux-Experimente an hGAT1	156

3.5.	Zusammenfassung	159
4.	EXPERIMENTELLER TEIL	
4.1.	HPLC-MS/MS	164
4.1.1.	Geräte und Material	164
4.1.2.	Vorgehen während der LC-MS/MS Methodenentwicklung	166
4.1.3.	Anwendung der validierten HPLC-MS/MS-Methode mit der YMC-Pack PVA-Sil	167
4.2.	Molekularbiologie und Zellkultur	169
4.2.1.	Geräte und Material	169
4.2.2.	Analytische DNA-Gelelektrophorese	174
4.2.3.	Präparative DNA-Gelelektrophorese	174
4.2.4.	Gelextraktion mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega	175
4.2.5.	Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden	175
4.2.6.	Ligation von DNA	175
4.2.7.	Transformation TSS kompetenter E. coli	175
4.2.8.	Glycerol Stocks transformierter Bakterienkolonien	176
4.2.9.	DNA Extraktion mit PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega	176
4.2.10.	DNA Extraktion mit PureYield™ Plasmid Midiprep System von Promega	176
4.2.11.	Reinheit und Gehaltsbestimmung der Plasmid-DNA Präparation	177
4.2.12.	Zellkulturtechniken	177
4.2.12.1.	Auftauen von COS-Zellen und HEK-Zellen	177
4.2.12.2.	Passagieren von HEK-Zellen	177
4.2.12.3.	Passagieren von COS-Zellen	178
4.2.12.4.	Aussäen von COS-Zellen für den Assay	178
4.3.	Assay mit HEK-Zellen	179
4.3.1.	Geräte und Material	179
4.3.2.	Versuchsdurchführung	179
4.3.2.1.	Gewinnung von Matrix für die Optimierung der Chromatographie	180
4.3.2.2.	Gewinnung von Proben für die Bestimmung von endogener GABA (Bulk Ansatz)	180
4.4.	MS-Transport-Assays mit COS-Zellen	181
4.4.1.	Geräte und Material	181
4.4.2.	Transientes Transfektionsprotokoll	182
4.4.3.	Messung der Fluoreszenz von COS-hGAT1-Zellen	182
4.4.4.	Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays	183
4.4.5.	Herstellen von Kalibrierungen und QC-Proben	184
4.4.5.1.	Kalibrierlösungen zur Validierung nach CDER	185
4.4.5.2.	QC-Lösungen für Validierung nach CDER	185
4.4.5.3.	QC-Lösungen für Konkurrenzexperimente	185
4.4.6.	MS-Bindungs-Assay zur Bestimmung der Transporterzahl	185
4.4.1.	Sättigungsexperimente	186
4.4.2.	Konkurrenzexperimente	187

4.4.3.	Substratidentifizierung	188
4.4.4.	Efflux-Experimente	189
4.5.	Software und Datenanalyse	190
4.5.1.	Analyst Daten	190
4.5.2.	Kalibrierung und QC-Proben	190
4.5.3.	Sättigungsexperimente	190
4.5.4.	Kompetitionsexperimente	191
5.	LITERATUR	
6.	ANHANG	
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	I
6.2.	Lebenslauf	III
6.3.	Publikationsliste	IV

1. Einleitung

1.1. GABAerge Neurotransmission

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste Vertreter der inhibitorischen Neurotransmitter. Es wird in den Axonen GABAerger Neuronen durch Decarboxylierung durch das Enzym Glutamatdecarboxylase (GAD) aus Glutamat, einem potenten exzitatorischen Neurotransmitter, gewonnen.¹ GABA wird in den Synapsen der Nervenendigungen in Vesikeln gespeichert, welche bei Eintreffen eines Aktionspotentials in den synaptischen Spalt entleert werden. Dort kann GABA an die postsynaptischen GABA Rezeptoren binden. GABA_A-Rezeptoren sind Chloridionenkanäle, welche nach Bindung von GABA den Einstrom von Cl⁻-Ionen in das postsynaptische Neuron ermöglichen und somit zu einer Hyperpolarisation und damit einer Hemmung des Nervenreizes führen. Im Gegensatz zu GABA_A-Rezeptoren sind GABA_B-Rezeptoren G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche nach Bindung von GABA eine G-Protein vermittelte Stimulation des Effluxes von Kalium durch K⁺-Kanäle aus der Zelle bewirken. Außerdem wird die Öffnungswahrscheinlichkeit für Ca²⁺-Ionenkanäle verringert, sodass ein verminderter Einstrom von Ca²⁺-Ionen resultiert, der zusammen mit dem vermehrten Efflux von Kalium ebenfalls zu einer Hyperpolarisation der Nervenzelle führt.²

Die Termination der GABAergen Neurotransmission wird durch die Eliminierung von GABA aus dem synaptischen Spalt erreicht. Dies erfolgt durch die GABA-Transporter (GAT), von denen mehrere Subtypen beschrieben sind. Der im ZNS wichtigste Vertreter der GABA-Transporter ist GAT1, welcher sich hauptsächlich in den Nervenendigungen der präsynaptischen Neuronen befindet, wohingegen GAT3 vermehrt auf den die Neuronen umgebenden Gliazellen zu finden ist.³⁻⁶ Der überwiegende Teil der extrazellulären GABA wird in die präsynaptischen Neuronen aufgenommen und kann dort wieder in Vesikeln gespeichert werden.⁷ Ein geringerer Teil der GABA wird in Gliazellen aufgenommen und dort metabolisiert oder dem GABA-Glutamat-Glutamin-Zyklus zugeführt, in dem es via Glutamat zu Glutamin umgesetzt wird. Dieses kann in das präsynaptische Neuron transferiert werden, wo es wiederum über Glutamat zu GABA umgesetzt wird und somit erneut als Neurotransmitter zur Verfügung steht.^{8,9} Eine vereinfachte Darstellung einer GABAergen Synapse mit den wichtigsten Interaktionspartnern von GABA ist in Abbildung 1 dargestellt.

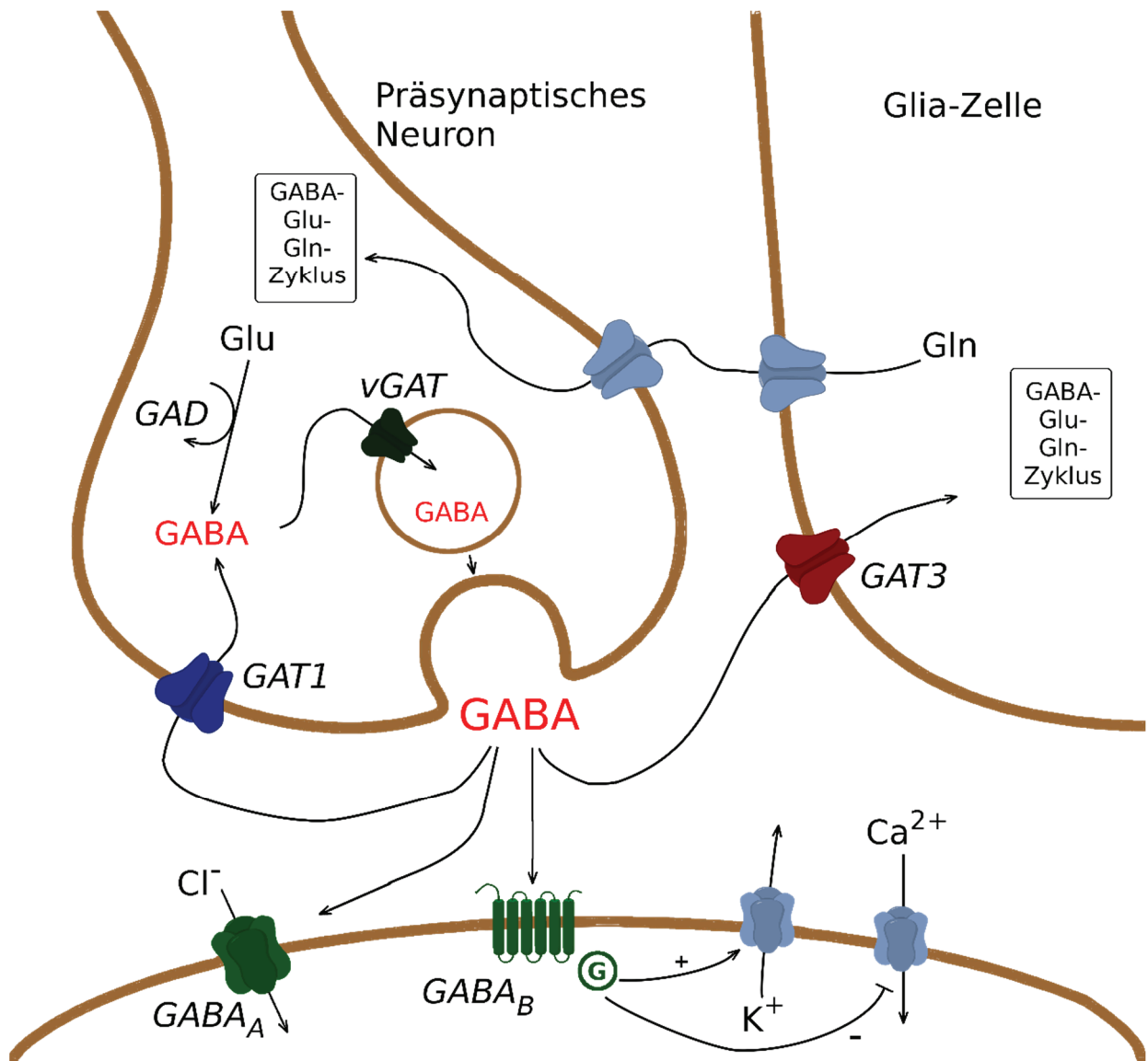


Abbildung 1: Schematische Darstellung einer GABAergen Synapse mit wichtigen Interaktionspartnern.
Zusammengestellt auf der Grundlage von ^{8,10}

1.2. Neuronale Erkrankungen in Zusammenhang mit GABA

Ist die Reizweiterleitung GABAerger Neuronen gestört, kann dies zu schwerwiegenden Krankheiten führen. So sind Epilepsie, Schizophrenie, Angstzustände, Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätssyndrom (ADHS),^{11,12} Neuralgien, Krämpfe,¹³ sowie Parkinson und Chorea Huntington¹⁴ als auch Depression¹⁵ und Alzheimer¹⁶ mit einer gestörten GABAergen Neurotransmission assoziiert. Therapeutische Ansätze zur Behandlung dieser Krankheiten bieten unter anderem die verschiedenen Interaktionspartner von GABA. Beispielsweise gehen Krämpfe mit einer erhöhten exzitatorischen und synchronisierten Aktivität vieler Neuronen und einer reduzierten GABAergen Neurotransmission einher.¹⁷ Als therapeutischer Ansatz wäre eine Steigerung der GABAergen Neurotransmission denkbar. Dies kann durch eine Erhöhung oder Verlängerung des inhibitorischen GABAergen Signales erfolgen. Zur Steigerung des GABAergen Signales sind verschiedene Angriffspunkte, sogenannte Targets, möglich (vergleiche auch Abbildung 1). Die therapeutischen Targets reichen von der Modulation der GABA Synthese durch die Glutamat-Decarboxylase (GAD), über das Verpacken von GABA in Vesikeln durch vesikuläre GABA-Transporter (vGAT) und die direkte Aktivierung der GABA-Rezeptoren (GABA_A, GABA_B), bis hin zur Hemmung der Wiederaufnahme von GABA über die GABA-Transporter (GAT).^{18,19} Darunter bieten sich die GABA-Transporter ganz besonders an. Sie treten in verschiedenen Subtypen auf, die unterschiedlich lokalisiert sind und über die unterschiedliche pharmakologische Wirkungen hervorgerufen werden können.¹⁴

1.3. GABA-Transporter

Die GABA-Transporter gehören zu der Familie der „Solute Carrier 6“ (SLC6), welche auch als „Neurotransmitter Sodium Symporter“ (NSS) Familie bezeichnet wird. Vier Subtypen der GABA-Transporter wurden kloniert. Je nach Ursprung unterscheidet sich die Nomenklatur der Transporter, was leicht zu Verwirrungen führt.²⁰ Eine Übersicht über die Nomenklatur der GABA-Transporter ist in Tabelle 1 gegeben.

Tabelle 1: Nomenklatur der GABA-Transporter. Nach Madsen et al.²⁰

Ursprung				
Maus	mGAT1	mGAT2	mGAT3	mGAT4
Ratte	rGAT-1	rBGT-1	rGAT-2	rGAT-3
Mensch	hGAT-1	BGT-1	hGAT-2	hGAT-3
„HUGO“	GAT1	BGT-1	GAT2	GAT3
Gen-Symbol	Slc6A1	Slc6a12	Slc6a13	Slc6a11

In dieser Dissertation wird grundsätzlich die von der „Human Genome Organisation“ (HUGO) vorgeschlagene Nomenklatur der GABA-Transporter verwendet, wie sie in Tabelle 1 wiedergegeben ist. Ist der Ursprung des Transporters von besonderer Relevanz, so wird in diesen Fällen das entsprechende Präfix der Spezies mit der entsprechenden Nomenklatur wie in Tabelle 1 verwendet.

1.3.1. Histologische Verteilung der GABA-Transporter

Wie bereits angedeutet, lassen sich die vier GABA-Transporter an verschiedenen Loci in unterschiedlicher Konzentration finden. GAT1 ist der wichtigste und am häufigsten vorkommende GABA-Transporter im Zentralen Nervensystem (ZNS) und findet sich hauptsächlich an den präsynaptischen Neuronen und in geringerem Ausmaß auf den die Synapsen umgebenden Astrozyten.^{21,22} GAT1 findet sich jedoch nicht in allen Regionen des ZNS. So kann keine nennenswerte Expression in striatonigralen Neuronen und Purkinjezellen gefunden werden.^{3,23,24} Allerdings wird eine sehr hohe Expression in der Korbzellen, welche die Purkinjezellen umgeben, gefunden.³

Auch im Thalamus wurde GAT1 nicht auf den Nervenendigungen gefunden, sondern zusammen mit GAT3 auf den Astrozyten.²⁵ Der gliale GABA Transport wird hauptsächlich durch GAT3 vermittelt, welches im gesamten ZNS auf Astrozyten in der Nähe der Synapsen zu finden ist. Diese Lokalisation

legt nahe, dass GAT3 an der Regulation der Verteilung von GABA und somit dessen Basalkonzentration im synaptischen Spalt beteiligt ist.^{25,26} Im Gegensatz zu GAT1 und GAT3 scheinen GAT2 und BGT1 keinen bedeutenden Beitrag bei der Terminierung des Nervenreizes im ZNS zu leisten.³ GAT2 und BGT1 sind vielmehr in Hepatozyten in der Leber sowie in der Niere zu finden.²⁷⁻²⁹

1.3.2. Architektur der SLC6-Transporter

Für eine gezielte Wirkstoffentwicklung ist die Kenntnis der räumlichen Anordnung der Zielstruktur äußerst hilfreich, da anhand dieser Vorhersagen über mögliche Interaktionen möglich werden. In den 1990er Jahren wurden durch die Klonierung des rGAT1 Proteins erste Einblicke in die Familie der SLC6-Transporter ermöglicht. Aufgrund der Aminosäuresequenz und der Hydrophobie mancher Sequenzabschnitte konnten 12 transmembranäre Helices identifiziert werden.³⁰ Der C- sowie der N-Terminus des Proteins sind im Zytoplasma lokalisiert. Die Transporter der SLC6 Familie sind als membranständige Proteine nur in geringer Konzentration zu gewinnen und schwer zu kristallisieren. Da einige bakterielle Proteine eine große Homologie zu den SLC6-Transportern aufweisen^{31,32} wurden prokaryotische Homologe genutzt, um Eigenschaften der SLC6-Transporter zu studieren. Ein Durchbruch im Verständnis dieser Transporter gelang mit der Kristallisation des prokaryotischen Homologes des Leucin-Transporters aus *Aquifex aeolicus* (LeuT_{Aa}).³³ Der LeuT weist eine Sequenzidentität von 20 bis 25% zu den eukaryotischen SLC6-Transportern auf. Zudem hat er einige hochkonservierte Cluster, besonders in Regionen, die für die Funktion der Transporter entscheidend sind und dient seither als Modell für die Transporter der SLC6-Familie.^{33,34} Anhand dieser Kristallstruktur konnte die Existenz der 12 transmembranären Domänen bestätigt, sowie deren räumliche Anordnung konstruiert werden. Eine Darstellung der Topologie des LeuT_{Aa} sowie die von Yamashita et al.³³ gewonnene Kristallstruktur sind in Abbildung 2 gegeben.

1 EINLEITUNG

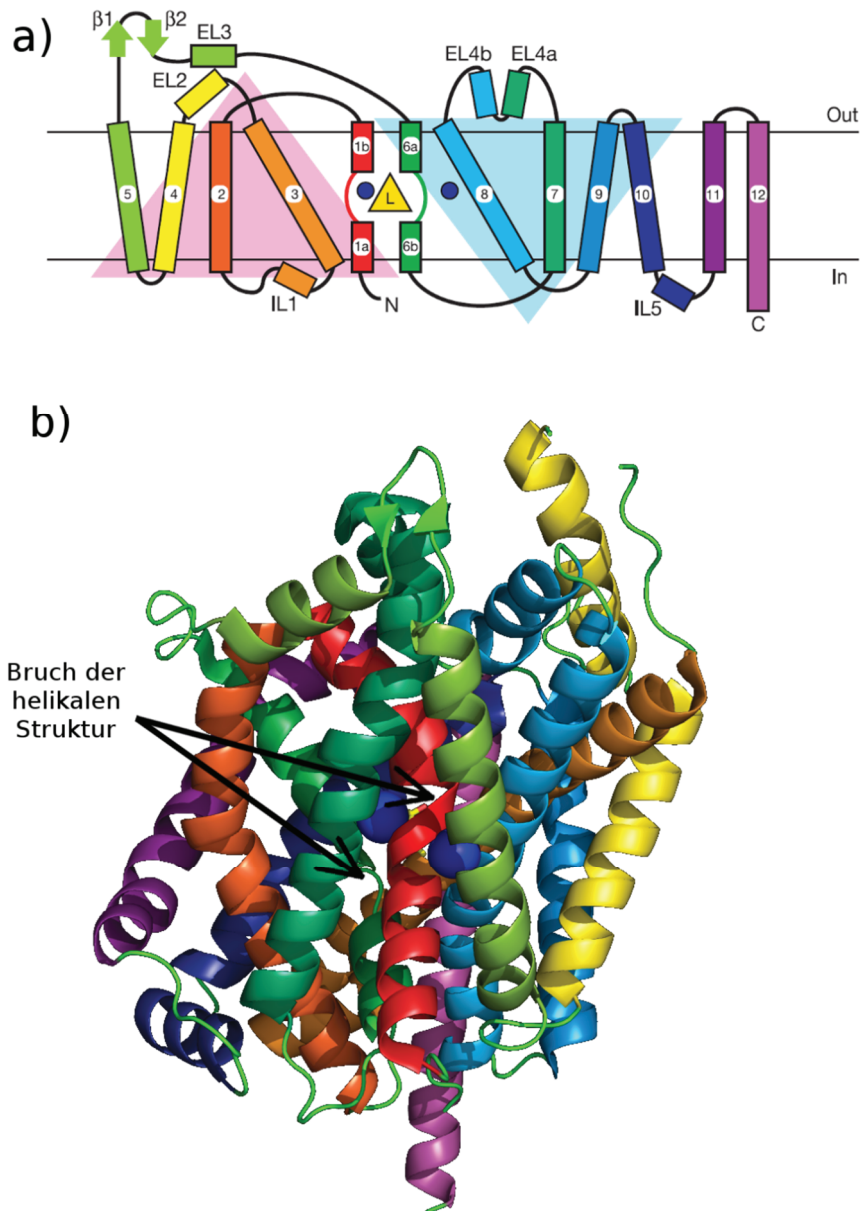


Abbildung 2: **a)** Darstellung der Topologie der 12 transmembranären Helices aus LeuT_{A0} (aus Yamashita et al.³³). Das Substrat Leucin ist in seiner Bindetasche als gelbes Dreieck dargestellt. Die blauen Kreise bezeichnen die beiden an der Bindung beteiligten Na⁺-Ionen **b)** Kristallstruktur des LeuT_{A0} wie von Yamashita et al.³³ im „Outward occluded state“ kristallisiert. Die Farbkodierung der transmembranären Domänen entspricht derjenigen für die Topologie des LeuT_{A0} in Abbildung 2a.

Darin lässt sich erkennen, dass der Transporter einem „5+5 inverted repeat“ Motiv folgt, welches aus den ersten 10 Helices aufgebaut wird, die den Kern des Transporters bilden. Dabei können die Domänen TM1 bis TM5 durch eine Drehung um 176,5° auf den Domänen TM6 bis TM10 abgebildet werden.³³ Dieses Motiv lässt sich bei einer Vielzahl von Co-Transportern finden, wobei davon

1 EINLEITUNG

ausgegangen wird, dass diese aufgrund des „5+5 inverted repeat“ Motivs einem ähnlichen Transportmechanismus folgen.³⁵ Die transmembranären Domänen TM1 und TM6 bilden zusammen mit TM3 und TM8 die Substrat- sowie die Natrium-Bindestellen, was in Abbildung 2b durch die blauen Kugeln (Na-Ionen) dargestellt ist. Bemerkenswert ist, dass TM1 und TM6 den größten Anteil konservierter Aminosäuren tragen und deren helikale Struktur in etwa der Mitte der Membran bei Val23 und Gly24 (TM1) bzw. Ser256 bis Gly260 (TM6) unterbrochen wird. Durch diesen Bruch der helikalen Struktur werden Carbonyl-Sauerstoffe sowie Stickstoffatome des Peptidrückgrates für Wasserstoffbrückenbindungen und zur Koordination von Ionen exponiert.³³ Eine für die Funktion des GAT1 wichtige Aminosäure ist ein in der SLC6-Familie stark konserviertes Tyrosin140 in der transmembranären Domäne 3 (TM3), welches für die Substratbindung essenziell ist.³⁶ Weitere in der Familie der SLC6-Transporter konservierte Aminosäuren sind unter anderem Arg5, Trp8, Asp369, Ser267 und Tyr268 (Bezeichnungen für LeuT), welche ein Netzwerk ausbilden, das als Barriere zur Zellinnenseite fungiert, so den Zugang zur Bindungstasche von der zytoplasmatischen Seite her versperrt³³ (vergleiche auch Abbildung 3 auf Seite 11) und am „Gating“ des Substrates beteiligt sein soll.¹²

Der Zugang zur Substratbindestelle von der extrazellulären Seite wird von den aromatischen Aminosäuren Phenylalanin253 (F253, TM6a) und Tyrosin108 (Y108, TM3), die eine hydrophobe Barriere ausbilden und so die S1 Tasche vom der extrazellulären Seite abtrennen, sowie einer Salzbrücke zwischen Arginin30 (R30, TM1) und Aspartat404 (D404, TM10) kontrolliert³³ (vergleiche hierzu auch Abbildung 3, OFo und OFc*). Anhand der Kristallstruktur von LeuT_{Aa} wurde eine hochaffine Substratbindestelle (S1) in der Mitte des Transporters identifiziert.³³ Jedoch fanden Javitch et al. anhand von MD-Simulationen, FRET-Studien, Bindungs- und Uptake-Experimenten eine weitere Substratbindestelle (secondary binding site, S2) mit vergleichbarer Affinität.³⁷⁻⁴⁰ Diese zweite Substratbindestelle soll durch ihre Besetzung für eine allosterische Regulierung der Substratfreisetzung aus S1 in den intrazellulären Raum nötig sein.³⁹ Das Vorhandensein einer zweiten Bindestelle gilt mittlerweile als gesichert,^{41,42} jedoch ist weiterhin umstritten, ob es sich dabei um eine hochaffine oder eine weniger affine Bindestelle handelt und ob diese den Substrattransport beeinflusst³⁹ oder nicht.⁴³⁻⁴⁵

Auf der Grundlage der Kristallstruktur von LeuT_{Aa} wurden Homologiemodelle für hGAT1 sowie für die anderen Vertreter der SLC6-Familie erstellt.^{33,46,47} Kürzlich gelang der Arbeitsgruppe um Eric Gouaux, welche auch den LeuT_{Aa} kristallisierte, ein weiterer bedeutender Schritt hin zu einem besseren Verständnis der eukaryotischen SLC6-Transporter. Sie veröffentlichten 2013 die erste Kristallstruktur eines eukaryotischen SLC6-Transporters, des Dopamin-Transporters (DAT) aus *Drosophila melanogaster*.⁴⁸ Dadurch wurden neue Sichtweisen auf die Funktion des DAT sowie dessen Funktionsweise und Regulierung ermöglicht. Des Weiteren wurden verschiedene Kristallstrukturen

eines konstruierten LeuT gewonnen, welcher durch Mutation von Aminosäuren mit entsprechenden Aminosäuren des SERT in der S1 Bindetasche modifiziert wurde, um den Eigenschaften der eukaryotischen Transporter näher zu kommen. Dieser modifizierte LeuT stellt ein verbessertes Modell für SERT dar, weil es in der Lage ist, Sertralin in der S1 Tasche zu binden, wohingegen der Wildtyp LeuT Sertralin im extrazellulären Vestibül bindet.⁴⁹

1.3.3. Funktionsweise der SLC6-Transporter

Der Transport von GABA (**1**) über die Zellmembran erfolgt über die GABA-Transporter, welche das Substrat durch einen aktiven Transport aufnehmen. Für den Transport wird Energie benötigt, da das Substrat gegen einen Konzentrationsgradienten befördert werden muss. Dazu nutzen alle SLC6-Transporter den Na⁺-Gradienten der Zelle, um Substrat zusammen mit Na⁺ zu transportieren, weshalb diese Klasse der Transporter auch als Familie der natriumabhängigen Neurotransmitter-Symporter (Neurotransmitter Sodium Symporter, NSS) bezeichnet wird. Im Fall von GAT1 werden zusammen mit GABA (**1**) zwei Na⁺-Ionen sowie ein Cl⁻-Ion transportiert.^{50,51} Diese Stöchiometrie findet sich auch für die GABA-Transporter GAT2 und GAT3, wohingegen der BGT1 eine Stöchiometrie von 1:3:(1 oder 2) (Substrat : Na⁺ : Cl⁻) aufweist.^{52,53} Die Rolle von Chlorid für den Transport ist allerdings umstritten, so wird ein Austausch von Chloridionen während eines Transportzyklus diskutiert, bei dem diese zwar für den Transport notwendig sind,⁵⁴ jedoch innerhalb eines Transportzyklus kein netto Cl⁻-Strom über die Membran auftritt.⁵⁵ Der für den Transport von Substrat benötigte Natriumgradient der Zelle wird durch die Na⁺/K⁺-ATPase aufrechterhalten.⁵⁶ Ein Modell, das den Transport der SLC6-Transporter beschreibt, wird als „alternating access“ bezeichnet. Dabei wird der Transportmechanismus der SLC6-Transporter so verstanden, dass das Substrat und die entsprechenden Cosubstrate an ihren spezifischen Bindungsstellen binden. Eine anschließende Konformationsänderung des Transporters macht diesen entweder von der extrazellulären oder der cytoplasmatischen Seite zugänglich.⁵⁷⁻⁶⁰ Dies bedeutet, dass die Transporter zwei definierte Zustände haben, zum einen den sogenannten „open-to-out“, bei dem die Substratbindestellen von der extrazellulären Seite zugänglich sind und den „open-to-in“, bei der die extrazelluläre Seite verschlossen und der Transporter zur intrazellulären Seite geöffnet ist. Zu keinem Zeitpunkt ist die Substratbindestelle sowohl von der extrazellulären als auch von der intrazellulären Seite zugänglich. Dieses Modell wurde durch verschiedene elektrophysiologische Experimente an GAT1 untermauert.^{61,62} Das Modell des „alternating access“ kann um einen weiteren Zustand, den „occluded state“ erweitert werden, in dem die Substratbindestelle weder von der extra- noch von der intrazellulären Seite zugänglich ist. Dieser Zustand lässt sich für LeuT im Komplex mit Clomipramine, einem trizyklischen Antidepressivum, beobachten⁶³, jedoch bleibt dieser Zustand für die eukaryotischen SLC6-Transporter eine Hypothese.³⁴

1 EINLEITUNG

Auf der Grundlage der Kristallstrukturen, die in Gegenwart und in Abwesenheit verschiedener Substrate oder Inhibitoren gewonnen wurden, welche das Protein in verschiedenen Konformationen stabilisieren, wurde ein erweitertes Modell des Transportzyklus der SLC6-Transporter erarbeitet.⁴¹ Die einzelnen Abläufe dieses Zyklus sind in Abbildung 3 schematisch wiedergegeben. Darin wird der Substrattransport in mehrere Stufen unterteilt. Der eigentliche Transport über die Membran erfolgt demnach wie auch im „alternating access“ Modell beschrieben über eine globale Bewegung des Proteins.^{35,41} Kleinere Konformationsänderungen des Transporters sorgen für ein Öffnen und Schließen des Transportkanals auf der extra- bzw. intrazellulären Seite. Demnach würde der Transporter aus dem „Outward facing open state“ (OFo) nach Bindung von Substrat und Ionen (OFo*) in einen „Outward facing closed state“ (OFc*) übergehen. Kristallstrukturen dieser drei Zustände wurden für LeuT erhalten (OFo⁴³, OFo*⁶⁴, OFc*³³). Die Substratbindung in der S1 Tasche des LeuT verursacht eine Rotation des Phenylalanins (F253) auf TM6a, wodurch das Schließen des Transporters auf der extrazellulären Seite initiiert wird. Überdies wird die Salzbrücke zwischen Arginin30 (R30, TM1) und Aspartat404 (D404, TM10) stabilisiert.^{12,41} Für den eigentlichen Transport des Substrates über die Membran wurden verschiedene Modelle erarbeitet, welche sich hauptsächlich in der Art der Bewegung der inneren Pore aus TM1 und TM6 unterscheiden.¹² Ein Modell beruht auf dem sequenziellen Hin- und Herklappen der transmembranären Domänen TM1 und TM6 um ihre unstrukturierten Bereiche (TM1a/b bzw. TM6a/b,^{12,33-35} vergleiche auch Abbildung 3 OFc* und Ifo). Ein ähnliches Modell geht von einer konzertierten Bewegung der transmembranären Domänen TM1 und TM6 mit den Domänen TM2 und TM7 aus, um den Zugang der Substratbindestelle zur intrazellulären Seite zu öffnen.^{65,66} Ist der Transporter zur intrazellulären Seite hin geöffnet (IFo*) kann das Substrat und die Ionen freigesetzt werden (IFo⁴³) und der Transporter in die „outward facing open“ (OFo) Position zurückkehren, um den Transportzyklus abzuschließen. Die in diesem spekulativen Transportmodell vorkommenden Transporterzustände „inward facing closed“ (IFc*) und „inward facing open, substrate bound“ (IFo*) konnten bisher noch nicht kristallisiert werden.⁴¹

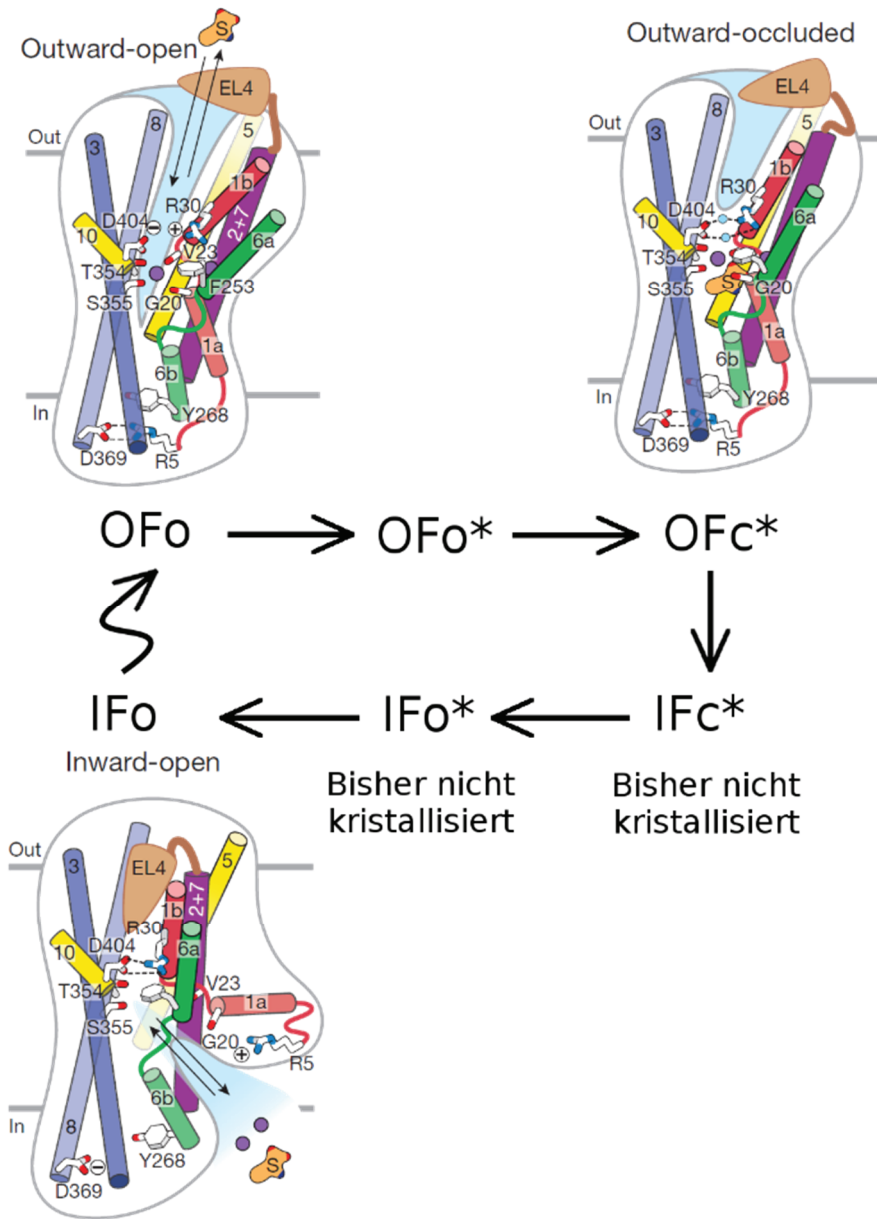


Abbildung 3: Postulierter Transportzyklus nach Cheng et al.⁴¹ mit 6 Zuständen. Modifiziert nach (Krishnamurthy 2012⁴³). * deutet an, dass das Substrat an seiner Bindestelle gebunden ist. OFo: „Outward facing open state“; OFc: „Outward facing closed state“; IFc: „Inward facing closed state“; IFo: „Inward facing open state“.

1.4. Testsysteme für GABA-Transporter

Zur Charakterisierung der GABA-Transporter und zur Identifizierung potenter Inhibitoren kommen in der Wirkstoffentwicklung eine Vielzahl von Methoden zum Einsatz. Ein großer Teil dieser Methoden basiert auf Radioaktivitätsmessungen wie bei Transport-⁶⁷⁻⁷³ oder Bindungsassays^{74,75} mit radioaktiv markierten Substanzen. Auch elektrophysiologische^{36,62,76,77} sowie fluoreszenzbasierte⁷⁸ Assays kommen zum Einsatz. Letztere können den Abfall des Membranpotentials mit Hilfe verschiedener Fluorophore erfassen. Prinzipiell lassen sich funktionelle und nicht funktionelle Assays unterscheiden. Funktionelle Assays messen den Effekt, der durch die entsprechende Testsubstanz verursacht wurde, wohingegen nicht funktionelle Assays die reine Interaktion von Ligand und Target bestimmen, jedoch streng genommen keine Aussage über dessen Wirkung erlauben. Dennoch bieten nicht funktionelle Assays, wie beispielsweise Bindungsassays, gewisse Vorteile, da sie schnell und einfach zu realisieren sind und sich deren Resultate einfacher interpretieren lassen. Im Falle der GABA-Transporter lassen sich durch die Wahl eines entsprechenden Markers, welcher im Transportkanal bindet auch Rückschlüsse auf die inhibitorische Potenz einer Verbindung ziehen, solange diese in Konkurrenz mit dem Marker steht.

1.4.1. Elektrophysiologische Assays

Elektrophysiologische Untersuchungen eines Transportereignisses sind nur dann möglich, wenn es während des Substrattransportes zu einer Ladungsverschiebung kommt. Bei diesen Untersuchungen wird eine Glaskapillare mit einem inneren Durchmesser von ungefähr 1 µm verwendet, welche auf die Oberfläche einer intakten Zelle aufgesetzt oder mit einem Stück der Zellmembran bestückt wird (patch clamp). Wird nun Substrat über diese Membran transportiert, können die mit dem Transport einhergehenden Ladungsverschiebungen, die einen Stromfluss verursachen, gemessen werden. Dieser Fluss liegt in der Größenordnung von wenigen Pikoampere. Mit elektrophysiologischen Messungen lassen sich diverse Informationen über den untersuchten Transporter und den Transportzyklus,^{70,79} sowie dessen Abhängigkeit von Substraten und Cosubstraten^{62,79} studieren. Des Weiteren lassen sich maximale Transportraten für Transporter ermitteln,^{76,77,80} die anderweitig nur schwer zugänglich sind. Das Elegante an elektrophysiologischen Messungen ist, dass nur eine sehr geringe Anzahl an Transportern notwendig ist und im Extremfall ein einzelnes Transportermolekül untersucht werden kann.⁸¹ Allerdings sind die Messungen sehr aufwendig und anspruchsvoll, sodass diese sich nicht für ein Screening von Inhibitoren eignen.

1.4.2. Bindungsassays

Bindungsassays sind wichtige Werkzeuge in der Wirkstoffentwicklung, da mit ihrer Hilfe Affinitäten von Substanzen zu ihrem Target bestimmt werden können.⁸² Das Prinzip eines Bindungsassays beruht auf der Quantifizierung des Anteils an Ligand, welcher an das Target gebunden ist, um daraus zum Beispiel Rückschlüsse über Affinitätskonstanten zu gewinnen. Dieses Prinzip kann nicht nur zur Bestimmung der Affinität des quantifizierten Liganden dienen, sondern kann in kompetitiven Bindungsassays auch dazu genutzt werden, Affinitäten anderer Inhibitoren indirekt zu ermitteln. Dazu wird eine Markersubstanz mit bereits bekannter Affinität verwendet, welche mit der zu charakterisierenden Verbindung um freie Bindestellen am Target konkurriert. Je nachdem wie ein solcher Versuch aufgebaut wird, ob mit konstanter Markerkonzentration oder konstanter Inhibitorkonzentration, lassen sich dann anhand der Cheng-Prusoff-Gleichung⁸³ (Gleichung 1) die Inhibitionskonstante (K_i) des Inhibitors ermitteln.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_d}}$$

Gleichung 1: Cheng-Prusoff-Gleichung. K_i : Dissoziationskonstante des Inhibitors, IC_{50} : Konzentration bei halbmaximaler Wirkung; $[S]$: konstante Markerkonzentration, K_d : Dissoziationskonstante des Markers

Ein Ligand, welcher als Marker in kompetitiven Bindungsassays zum Screening von Inhibitoren genutzt werden kann, sollte eine hohe Selektivität und eine ausreichenden Affinität zum Target besitzen. Kann das Target in hoher Dichte selektiv gewonnen werden (z.B. durch Überexpression in Zellkulturen), so können ebenfalls Marker geringerer Selektivität verwendet werden. Dies ist besonders dann von Vorteil, wenn ein für einen Marker entwickelter Assay auf mehrere Targets angewendet werden kann.

Die Affinität eines Liganden ist für die Wahl als Markersubstanz ebenfalls entscheidend, diese sollte allerdings nicht zu hoch sein, da hochaffine Marker nur in geringen Konzentrationen eingesetzt werden können ($[S] \ll K_d$). Dies ist allerdings nur solange möglich, wie sich der Marker in den resultierenden geringen Konzentrationen noch sicher quantifizieren lässt. Außerdem muss bei derartigen Versuchen dafür Sorge getragen werden, dass die nominelle Markerkonzentration nahezu unverändert konstant bleibt (Änderung < 10%), damit eine Markerdepletion ausgeschlossen werden kann und die Cheng-Prusoff-Gleichung ihre Gültigkeit behält. Bindungsassays für GABA-Transporter sind bisher ausschließlich für GAT1 etabliert, da für die anderen Transportersubtypen bisher keine geeigneten Markersubstanzen verfügbar sind. So wird sowohl $[^3H]$ Tiagabin in Bindungsstudien mit radioaktiven Liganden^{74,75} als auch natives NO 711 in Kombination mit LC-MS/MS Detektion⁸⁴ zur Charakterisierung

von Inhibitoren an GAT1 verwendet. Für GAT3, welcher mit dem glialen GABA-Uptake assoziiert ist, ist bisher weder ein Bindungsassay basierend auf radioaktiven noch fluoreszenzmarkierten Liganden beschrieben, jedoch wurde ein potentieller MS-Bindungsassay vorgeschlagen.⁸⁵ Der von M. Polley verwendete Marker hat allerdings eine sehr hohe nicht-spezifische Bindung, was dessen Anwendung zur Charakterisierung von Inhibitoren an GAT3 stark einschränkt. Für die anderen GAT-Subtypen sind bisher keine Bindungsassays beschrieben.

Wie bereits erwähnt ist für einen Inhibitor nicht nur dessen Affinität zu seinem Target entscheidend, sondern ebenso dessen Selektivität. So ist es von großem Interesse, die Affinität eines potentiellen GAT-Inhibitors für alle vier GAT-Subtypen zu ermitteln, um die Selektivität eines Inhibitors zu bestimmen. Aus diesem Grund sind Transportassays eines der wichtigsten Werkzeuge bei der Entwicklung von GAT-Inhibitoren, da sie aktuell die einzige Möglichkeit zur Untersuchung aller vier GAT-Subtypen darstellen.

1.4.3. Transportassays

Transportassays sind als funktionelle Assays für die Entwicklung von Wirkstoffen enorm wichtig, da sie einen direkten Einblick in die Potenz eines Wirkstoffes geben. Somit lassen sich nicht nur die Affinität eines Liganden an sein Target bestimmen, wie dies beispielsweise in Bindungsassays der Fall ist, sondern man kann einen direkten Rückschluss auf dessen Effekt, sowie durch die Aufnahme mehrerer Sättigungsisothermen in Gegenwart von Inhibitor, dessen Wirkmechanismus – ob kompetitiv, allosterisch oder gemischt kompetitiv – ableiten. Mit Transportexperimenten können sowohl kinetische Charakteristika des Targets ermittelt, als auch Potenzen von Inhibitoren in Konkurrenzexperimenten bestimmt werden. Das Prinzip eines Transportassays beruht auf der Quantifizierung der Substratmenge, welche über das Target in eine Zelle transportiert wird. Dazu wird das Target - meist in Form von Zellen, welche den zu untersuchenden Transporter exprimieren - in Gegenwart des Substrates inkubiert. Anschließend wird das überschüssige externe Substrat entfernt und die intrazelluläre Substratkonzentration bestimmt. Der Vorteil gegenüber Bindungsassays liegt unter anderem darin, dass auch Targets untersucht werden können, für die kein potenter und selektiver Inhibitor bekannt ist. Des Weiteren ist die Konzentration des Substrates um ein Vielfaches höher als die eines Markers in Bindungsstudien, was eine Quantifizierung transportierten Substrates erleichtert. Die Verwendung von radioaktiv markierten Substraten in Transportassays ist weit verbreitet, da sich nach Abtrennung des überschüssigen Substrates die Quantifizierung der Radioaktivität in den Zelllysaten recht einfach realisieren lässt.

So sind für die Untersuchung von GABA-Transportern und deren Inhibitoren mittels Transportassays fast ausschließlich Methoden mit [³H]GABA als Substrat berichtet worden.^{67-70,86} Diese sind robust, quantifizieren transportiertes Substrat mit hoher Sensitivität und haben einen hohen Probendurchsatz, wenn sie in Mikrotiterplatten durchgeführt werden. Besonders effizient sind [³H]GABA Transportassays basierend auf adhären Zellen in beschichteten 96-Well Platten, da eine Vielzahl von Proben parallel generiert und mit Hilfe von automatisierten Waschrobotern bearbeitet werden können.^{71-73,87} Nichtsdestotrotz ist die Verwendung von radioaktiven Substanzen mit erheblichen Nachteilen, wie gesundheitlichen Gefahren, hohen Kosten für radioaktive Substanzen und die Entsorgung radioaktiven Mülls, Risiken bezüglich der Sicherheit und strengen gesetzlichen Vorschriften verbunden. Dennoch sind radiometrische Uptake-Assays in der GAT-Forschung weit verbreitet, da es an geeigneten Alternativen mangelt.

Für andere Transportproteine wurden Methoden beschrieben, die durch den Einsatz von LC-MS/MS für die Substratquantifizierung auf die Verwendung radioaktiv markierter Substanzen verzichten konnten.⁸⁸⁻⁹² So beschrieben Katona et al. einen Assay zur Charakterisierung des Methotrexat-Transports via ABC-Transporter unter Verwendung einer LC-ESI-MS/MS- und DESI-MS-Methode.⁸⁸ Allerdings war zur Quantifizierung des Substrates im Falle der LC-MS/MS-Methode eine zeitaufwendige Probenvorbereitung und eine lange chromatographische Laufzeit nötig, wohingegen bei der schnelleren DESI-Methode – vermutlich aufgrund eines fehlenden internen Standards – die Reproduzierbarkeit vergleichsweise schlecht war. Grigat et al. untersuchten die Akkumulation von 12 verschiedenen Substraten des „Organic Cation Transporters“ OCTN2 mittels eines LC-MS/MS-Verfahrens.⁹¹ Dabei war die Substratquantifizierung durch Kalibrierproben und die Verwendung von internen Standards gesichert, jedoch war für den Transportassay teures und zeitaufwendiges Beschichten von Zellkulturplatten notwendig. Fujita et al. beschrieben eine LC-MS/MS-basierte Methode zur Quantifizierung von (²H₃)γ-Butyrobetain als Substrat für OCTN2 und GAT2.⁹⁰ Dabei verwendeten sie das deuterierte Substrat um transportiertes von endogenem Butyrobetain zu differenzieren. Allerdings haben alle zuvor beschriebenen LC-MS/MS-Transportassays eine Gemeinsamkeit, welche ihren Einsatz in Screeningverfahren limitiert. So werden die Proben oben beschriebener Assays einzeln prozessiert, was ein Screening größerer Substanzbibliotheken zeit- und arbeitsintensiv macht. Kürzlich veröffentlichten Krumpochova et al. eine LC-MS/MS-basierte Methode zum Screening von ABCC2 Transporter Substraten in einem 96-Well Format und machte damit einen Schritt hin zu einem höheren Probendurchsatz.⁹³ Allerdings bedarf es teurer Filtrationsplatten zur Terminierung des Transports, sowie umfangreicher Probenvorbereitungsschritte vor der Quantifizierung mittels LC-MS/MS. Außerdem verhindert die lange Chromatographiedauer von 45 min ein effizientes Screening.

1.5. Bedeutung von LC-MS/MS in biologischen Screeningverfahren

Massenspektrometer sind ein wichtiges Werkzeug für die Analytik von Wirkstoffen und sind für pharmakokinetische und metabolische Studien in der Wirkstoffentwicklung von großer Bedeutung. Dies kann an der enormen Zahl an Publikationen in den letzten Jahren erkannt werden, welche in vielen Reviews behandelt werden.⁹⁴⁻¹⁰⁰ Im Bereich der quantitativen Bioanalytik haben Methoden wie die LC-MS/MS seit den 1990er Jahren aufgrund ihrer systemimmanenten Spezifität und ihrer Sensitivität sowie schnellen Analysenzeiten für einen gewaltigen Durchbruch in der quantitativen Bioanalytik gesorgt. Dieser ist nicht zuletzt der Entwicklung immer leistungsfähigerer „Atmospheric Pressure Ionization-“ (API-) Quellen zu verdanken. Diese Ionenquellen erlauben es, einen Analyten unter Atmosphärendruck zu ionisieren und diesen in das Massenspektrometer zu überführen. API-Quellen sind des Weiteren in der Lage, große Mengen Flüssigkeit zu tolerieren und eignen sich daher in idealer Weise zur Kopplung einer Flüssigchromatographie an ein Massenspektrometer. John Bennett Fenn wurde 2002 zusammen mit Koichi Tanaka „für Ihre Entwicklung einer sanften Desorptions-Ionisationsmethode zur massenspektrometrischen Analyse von biologischen Makromolekülen“ mit dem Nobelpreis für Chemie ausgezeichnet.¹⁰¹ Die von Fenn entwickelte ESI-Quelle¹⁰² erlaubt eine sanfte Ionisation chemischer Verbindungen, ohne dass die Mutterionen fragmentiert werden, was sogar für Makromoleküle funktioniert. Mit den immer sensitiver werdenden Massenspektrometern können bereits geringe Mengen Substanz bis hin zu einigen attomol nachgewiesen werden. Massenspektrometer, die sich für eine Quantifizierung im Ultraspurenbereich eignen, sind vor allem die sensitiven Triple-Quadrupol-Massenspektrometer, die von dem enormen Selektivitätsgewinn durch die MS²-Messungen profitieren. Dabei ist man bei der Verwendung von Massenspektrometern nicht auf den Nachweis einer einzelnen Substanz beschränkt, sondern hat die Möglichkeit eine Vielzahl an Analyten parallel zu erfassen. Diese Stärke wird zunehmend auch in „High Throughput Screening-“ (HTS-) Verfahren genutzt. Auch hat es die LC-MS/MS-Analytik zur bevorzugten Technik bei der Quantifizierung kleiner Moleküle, von Metaboliten und Biomolekülen in einer Vielzahl biologischer Matrices gemacht.⁹⁹ Entscheidend für eine erfolgreiche LC-MS/MS-Methode ist die Probenvorbereitung der Analyse, da biologische Proben in der Regel nicht direkt per MS analysiert werden können.^{94,103-105}

Die Probenvorbereitungen für Analysen via LC-MS/MS zielen hauptsächlich auf eine Abtrennung des Analyten aus der biologischen Matrix ab und können außerdem zur Aufkonzentrierung des Analyten dienen. Die Matrix ist selten für eine direkte Analyse geeignet, da sie oft aus einer Vielzahl komplexer Substanzen wie Lipiden, Proteinen und Salzen besteht, die sowohl das Säulenmaterial belasten, als auch starke Matrixeffekte verursachen können, sodass eine sichere Quantifizierung erschwert ist. Eine Vielzahl von Probenvorbereitungstechniken ist verfügbar, die sich für die verschiedenen

Fragestellungen eignen. Bei der Auswahl einer Probenvorbereitung sollten die Art des Analyten und der Probe, die Selektivität des Gesamtprozesses, die Anzahl der Arbeitsschritte, der Zeit- und Materialaufwand, sowie die Möglichkeit automatisierte Verfahren nutzen zu können, berücksichtigt werden. Neben den klassischen Probenvorbereitungstechniken wie der Proteinpräzipitation (PP), der Festphasenextraktion (SPE) und der Flüssig-Flüssig Extraktion (LLE) werden vermehrt moderne Techniken zur Probenvorbereitung eingesetzt. Dazu zählen optimierte Mikroextraktionsmethoden sowie selektive Extraktionen durch „Molecular Imprinted Polymers“ (MIP) oder Immunoaffinitätsäulen, als auch On-line-Verfahren wie die „in-Tube solid Phase Extraction“ oder die „Turbulent Flow Chromatography“ (TFC).¹⁰⁴ Die Probenvorbereitung stellt oft den arbeits- und zeitaufwendigsten Schritt in bioanalytischen Methoden und den Flaschenhals moderner LC-MS/MS-Methoden dar.¹⁰⁴ Moderne Techniken erlauben eine schnelle, effiziente, kostengünstige und automatisierbare Probenvorbereitung und beschleunigen zusammen mit immer sensitiver und robuster werdenden Massenspektrometern den Fortschritt bioanalytischer Nachweis- und Quantifizierungsmethoden.

2. Zielsetzung

2 ZIELSETZUNG

Transportassays stellen, wie bereits in der Einleitung behandelt, einen elementaren Baustein für die Wirkstoffentwicklung neuer GAT-Inhibitoren dar, da aktuell nur sie die Möglichkeit bieten, die Wirkung einer Substanz an allen vier GAT-Subtypen zu bestimmen. Für das Studium der GABA-Transporter durch Transportassays stehen bisher ausschließlich Assays mit radioaktiv markiertem Substrat zur Verfügung, was, wie in der Einleitung behandelt, mit diversen Nachteilen verbunden ist. Deswegen war es das Ziel der vorliegenden Dissertation, einen Transportassay für GABA-Transporter zu entwickeln, welcher auf den Einsatz von Radioaktivität verzichtet. Dies sollte durch die Verwendung von nativem Substrat und dessen Quantifizierung mittels HPLC-MS/MS realisiert werden. Dabei sollten bereits im Arbeitskreis vorhandene HEK-Zelllinien verwendet werden, welche die vier verschiedenen Subtypen der murinen GABA-Transporter (mGAT1-4) exprimieren. Diese sollten nach der Inkubation mit Substrat durch Filtration von überschüssigem Substrat getrennt und gewaschen werden. Anschließend sollten die Zellen aufgeschlossen, internalisiertes Substrat eluiert und mit möglichst geringem Probenvorbereitungsaufwand per LC-MS/MS quantifiziert werden. Bei der Entwicklung einer massenspektrometrischen Quantifizierungsmethode sind verschiedene Aspekte zu berücksichtigen. Die Quantifizierung transportierten Substrates sollte im analytischen Sinne richtig, präzise, robust aber auch schnell sein, damit der MS-Transport-Assay für das Screening von Inhibitoren eingesetzt werden kann und mit bereits etablierten radiometrischen Uptake-Assays hinsichtlich der Qualität der Daten als auch dem Durchsatz konkurrieren kann. Deshalb sollte die Quantifizierung mittels internem Standard erfolgen, wobei hier bevorzugt stabilisotopenmarkierte GABA (**1**) verwendet werden sollte. Die entwickelte LC-MS/MS-Methode sollte anhand der „CDER Guidance“¹⁰⁶ für bioanalytische Arbeiten der „Food and Drug Administration“ (FDA) validiert werden, um deren Eignung für den geplanten Einsatz zu verifizieren. Aufgrund von bereits im Arbeitskreis bekannten Charakteristika wurde abgeschätzt, dass das Substrat mindestens bis zu einer Konzentration von 1 nM in der biologischen Matrix sicher quantifiziert werden müsse, um die geplante Anwendung realisieren zu können. Außerdem sollte anhand der entwickelten HPLC-MS/MS-Methode überprüft werden, ob native, endogene GABA (**1**) in den Zellen vorhanden ist und ob diese die Quantifizierung des Substrattransportes beeinflusst. Die MS-Transport-Assays sollten in der Lage sein, sowohl Proteincharakteristika in Sättigungsexperimenten zu ermitteln, als auch das Screening potenter GAT-Inhibitoren in Konkurrenzexperimenten ermöglichen. Die Effizienz des entwickelten MS-Transport-Assays sollte abschließend anhand einer Auswahl an Testsubstanzen für die vier GABA-Transporter demonstriert und durch Vergleich mit Daten aus radioaktiven Transportassays validiert werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Entwicklung einer Quantifizierungsmethode für GABA mittels LC-MS/MS

Um den angestrebten MS-Transport-Assay aufbauen zu können, war eine leistungsfähige LC-MS/MS Methode notwendig, die es erlaubt, transportiertes Substrat akkurat und sensitiv nachzuweisen. Im Hinblick auf die spätere Anwendung als Screeningmethode war es ebenfalls von enormer Bedeutung, dass die Quantifizierung präzise und robust ist, um große Probenmengen bearbeiten zu können. In den folgenden Abschnitten wird die Entwicklung einer nachweisstarken, robusten HILIC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) beschrieben.

3.1.1. Allgemeiner Hintergrund zur Quantifizierung von Aminosäuren

Die Quantifizierung von Aminosäuren ist eine häufige Fragestellung, für die verschiedene Methoden entwickelt wurden, die unterschiedlichen Ansprüchen gerecht werden. Für GABA (**1**), einen Vertreter der Aminosäure-Neurotransmitter sind Methoden beschrieben, die von enzymatischen Nachweisreaktionen bis hin zu LC-MS/MS-Methoden eine Quantifizierung in unterschiedlichster biologischer Matrix mit Nachweisgrenzen bis 1 nM ermöglichen. So berichteten Tsukatani et al. von einem enzymbasierten spektroskopischen Assay zur Quantifizierung von GABA (**1**) in Milchsäurebakterien mit einem Arbeitsbereich von 500 μM bis 10 mM.¹⁰⁷ Deutlich nachweisstärkere Methoden basieren auf der Verwendung der HPLC, entweder mit elektrochemischer¹⁰⁸⁻¹¹⁰, UV- oder Fluoreszenz-¹¹¹⁻¹¹³ oder MS-Detektion.¹¹⁴⁻¹¹⁶ Da GABA (**1**) weder elektrochemisch noch UV- oder Fluoreszenz-aktiv ist, sind diese Methoden immer mit einer Derivatisierung verbunden. Des Weiteren lässt sich GABA (**1**) kaum auf den gängigen Umkehrphasen retinieren. Deswegen wird es häufig durch Vorsäulenderivatisierungen modifiziert¹¹⁷⁻¹¹⁹ oder zusammen mit Ionenpaarreagenzien^{116,120-122} chromatographiert. Allerdings sind Ionenpaarreagenzien bekannt dafür, Suppressionen in ESI-Ionenquellen zu verursachen,^{123,124} was deren Anwendung in der LC-MS/MS-Analytik stark einschränkt. Eine in letzter Zeit zunehmend an Beliebtheit gewinnende Möglichkeit polare Analyten mittels HPLC zu untersuchen, beruht auf der Verwendung von „Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography“, kurz HILIC. Bei den Phasen, welche zur HILIC eingesetzt werden können, sind neben Verteilungsphänomenen auch Wasserstoffbrückenbindungen, Dipol-Dipol- und elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Analyt und stationärer Phase für die Retention maßgeblich.¹²⁵⁻¹²⁷ Im Gegensatz zu Normalphasen werden diese Phasen mit den gängigen mobilen Phasen Methanol, Acetonitril und Wasser, wie sie in der RP-Chromatographie Anwendung finden, betrieben werden. Dies erlaubt eine perfekte Kopplung zwischen HILIC und ESI-MS, da diese Lösemittel die Ionisierung per ESI positiv beeinflussen. Für die Quantifizierung von GABA (**1**) wurden bisher sowohl HILIC-HPLC-MS/MS-,^{114,115} als auch HILIC-CE-MS/MS-¹²⁸ Methoden entwickelt.

Buck et al. berichteten von einer Methode zur Quantifizierung von underivatisierter GABA (1) in Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) mittels ZIC-HILIC und Tandem-MS mit einer Bestimmungsgrenze von 1 nM.¹¹⁵ Diese schien mir als Grundlage für die Entwicklung der angestrebten LC-MS/MS-Quantifizierung geeignet. Um den in dieser Dissertation zum Ziel gesetzten GABA-Transport-Assay auch zum Screening von Inhibitoren einsetzen zu können, war aufgrund des dafür erforderlichen hohen Probendurchsatzes eine Methode mit wenigen Arbeitsschritten und robusten Bedingungen notwendig. Deshalb sollte eine isokratische HILIC-Methode mit MS/MS-Detektion entwickelt werden, mit der die nötige Bestimmungsgrenze von erwartungsgemäß 1 nM zusammen mit einem hohen Probendurchsatz erreicht werden sollte.

3.1.2. Entwicklung einer MS/MS-Methode zur Detektion von GABA

3.1.2.1. Technischer Hintergrund zum verwendeten API 5000™ Triple Quadrupol Massenspektrometer

Zur Quantifizierung von Substanzen kommen häufig Massenspektrometer zum Einsatz, die in der Lage sind, Ionen aufgrund ihres Masse-zu-Ladungs-Verhältnisses (m/z) zu trennen. Es gibt verschiedene Bauarten von Massenspektrometern, welche sich unterschiedlicher physikalischer Eigenschaften zur Trennung der Ionen bedienen und sich in Ihrer Sensitivität und Ihrem Auflösungsvermögen unterscheiden. Hybrid-Massenspektrometer, welche eine Serie von Analysatoren vereinen, sind aufgrund des enormen Selektivitätsgewinns aus heutigen Forschungslaboratorien kaum noch wegzudenken. Für die hier vorliegende Arbeit wurde hauptsächlich das API 5000™, ein Triple-Quadrupol-Massenspektrometer der Firma ABSciex, verwendet, welches in Abbildung 4 schematisch dargestellt ist. Es besteht aus zwei Quadrupol-Analysatoren und einer LINAC®-Kollisionszelle, die linear hintereinander angeordnet sind. Diese Anordnung erlaubt die Fragmentierung eines in Q1 selektierten Mutterions in der Kollisionszelle q2 durch eine „collisionally activated dissociation“ (CAD) mit Stickstoff. Die entstandenen Tochterionen, welche für ein Analytmolekül spezifisch sind, können anschließend im dritten Quadrupol Q3 analysiert werden. Das Curtain Gas (CUR) flutet die Ionenquelle und sorgt neben einer sauberen und definierten Ionisationsregion auch dafür, dass keine Neutralteilchen wie Lösemitteldämpfe in das Massenspektrometer gelangen. Das Declustering-Potential (DP) bewirkt ein Aufbrechen von Ionenclustern und reduziert dadurch das Hintergrundsignal. Ein zu hohes Declustering-Potential kann allerdings bereits zu einer Fragmentierung des Analytmoleküls vor dem Q1 führen und somit die Sensitivität beeinträchtigen. Die Collision-Energy (CE) beschleunigt die Ionen in die Kollisionszelle, wo diese mit dem Kollisionsgas (CAD) zusammenstoßen. Die Collision-Energy hat Einfluss auf die Art der Fragmentierung, da der Fragmentierungsgrad mit steigender Energie zunimmt.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

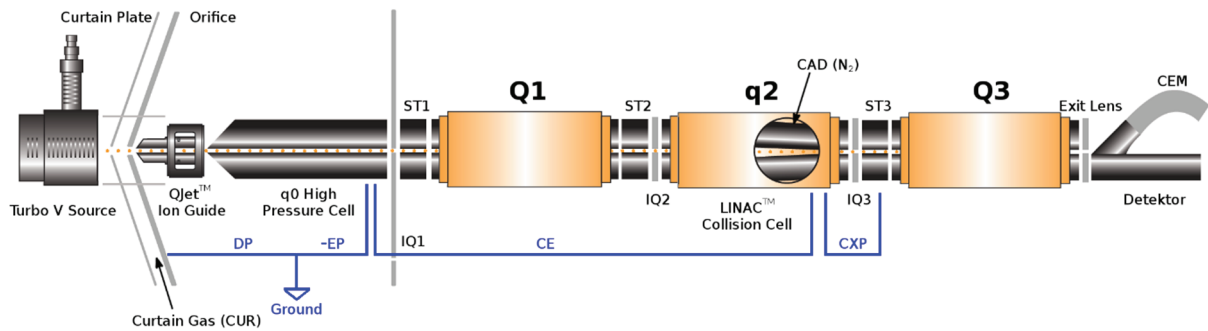


Abbildung 4: Schematische Darstellung des API 5000™ mit den entsprechenden Potentialdifferenzen (blau).
Modifiziert nach ABSciex¹²⁹

Das Entrance Potential (EP) leitet und fokussiert die Analytionen durch die „high-pressure“ q0-Zelle und hat nur einen geringen Einfluss auf die Signalintensität. Das Collision-Cell-Exit-Potential (CXP) ist eine Potentialdifferenz, welche die in der Kollisionszelle q2 entstandenen Fragmentationen in den zweiten Massenanalysator Q3 weiter beschleunigen. Die Linsen IQ1, IQ2 und IQ3, sowie die „stubbies“ ST1, ST2 und ST3 stellen technische Bauteile dar, die die Fokussierung des Ionenstrahls innerhalb des Massenspektrometers justieren und welche – wenn einmal kalibriert – nicht variiert werden. Am Ende des Ionenpfades befindet sich der Detektor, welcher die auftreffenden Ionen in ein elektrisches Signal wandelt. Dieser besteht bei dem API 5000™ aus einem Kanalelektronenvervielfacher (Channel Electron Multiplier CEM).

Für quantitatives Arbeiten mit einem Triple-Quadrupol-Massenspektrometer müssen zuerst geeignete Massenübergänge für einen Analyten identifiziert und die zugehörigen Parameter entsprechend optimiert werden. Dabei ist nicht zwingend der sensitivste Massenübergang am besten geeignet, vielmehr sollte ein Massenübergang mit gutem Signal-zu-Rausch-Verhältnis gewählt werden. Der sogenannte „Product-Ion-Scan“ erfasst die Produktionen eines in Q1 selektierten Precursors und wird eingesetzt, um möglichst spezifische und dominante Massenübergänge für einen Analyten zu identifizieren. Durch die Messung eines spezifischen Massenüberganges kann für die Quantifizierung eines Analyten eine große Sensitivität erreicht werden, indem nur dieser spezifische Massenübergang kontinuierlich gemessen wird. Dazu betreibt man das Triple-Quadrupol-Massenspektrometer im „Selected-Reaction-Monitoring“ (SRM) Mode, bei dem die Quadrupole Q1 und Q3 als Massenfilter verwendet werden und ausschließlich das Mutter- (Q1) und das gewählte Tochterion (Q3) passieren lassen. Beobachtet man verschiedene solcher Massenübergänge im „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM) für wenige Millisekunden hintereinander, so lassen sich mehrere Analyten quasi zeitgleich mit großer Sensitivität und Selektivität nebeneinander erfassen und quantifizieren.

3.1.2.2. Optimierung der Massenübergänge von GABA, (²H₂)GABA und (²H₆)GABA

Die Quantifizierung von transportiertem Substrat sollte mit Hilfe eines internen Standards realisiert werden. Dazu bieten sich die stabilisotopenmarkierten Isotopologe von GABA (**1**), nämlich das 2,2-(²H₂)GABA (**2**) und das 2,2,3,3,4,4-(²H₆)GABA (**3**) an, die käuflich sind und in Abbildung 5 zusammen mit der Struktur von GABA (**1**) dargestellt sind. Wie in Kapitel 3.2.1.1 „Bestimmung der endogenen GABA in HEK-mGAT1 Zellen“ auf Seite 77 beschrieben wird, sind in HEK-Zellen hohe Konzentrationen an endogener GABA (**1**) vorhanden, sodass eine genaue Bestimmung transportierter GABA (**1**) verhindert wird. Aus diesem Grund wurde (²H₆)GABA (**3**) als Substrat für den MS-Transport-Assay, sowie (²H₂)GABA (**2**) als interner Standard verwendet.

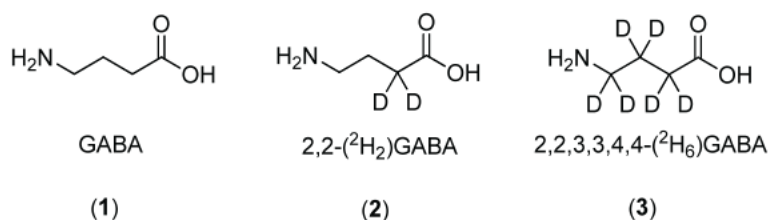


Abbildung 5: Strukturen von GABA (**1**), (²H₂)GABA (**2**) und (²H₆)GABA (**3**)

Um die drei Analyten GABA (**1**), (²H₂)GABA (**2**) und (²H₆)GABA (**3**) per LC-MS/MS quantifizieren zu können, wurden für alle Analyten entsprechende Massenübergänge identifiziert und die analytspezifischen-Parameter („Compound-Dependent-Parameter“) im „Quantitative-Optimization-Mode“ der Analyst Software optimiert. Dazu wurde eine Lösung von je 400 nM Analyt in MeOH/0,1% Ameisensäure (50/50; v/v) mit einer Spritzenpumpe in die TurboV-Quelle des API 5000™ mit einer Flussrate von 10 µL/min infundiert und es wurden die Produktionen von GABA (**1**) [M+H]⁺ $m/z = 104$, (²H₂)GABA (**2**) [M+H]⁺ $m/z = 106$ und (²H₆)GABA (**3**) [M+H]⁺ $m/z = 110$ im „Product-Ion-Scan“ aufgenommen, welche in Abbildung 6 dargestellt sind.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

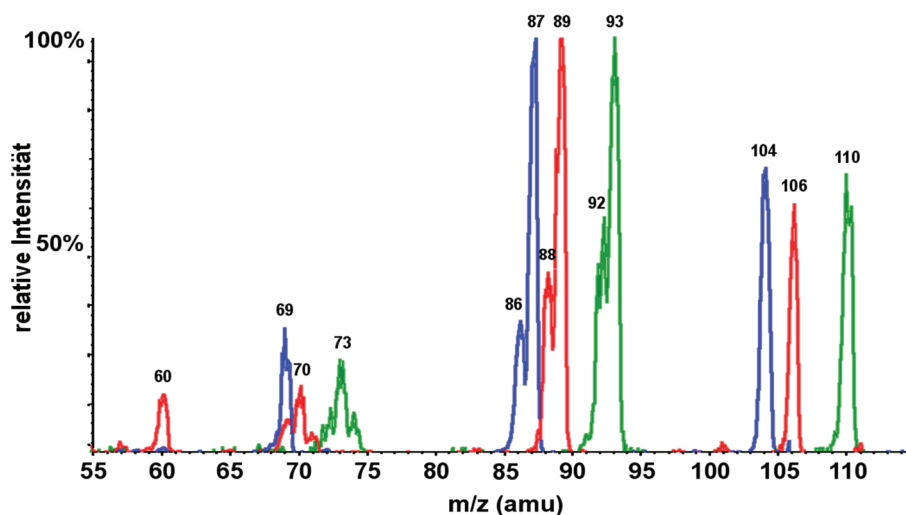


Abbildung 6: Produktionenspektren von GABA (1) (blau), ($^2\text{H}_2$)GABA (2) (rot) und ($^2\text{H}_6$)GABA (3) (grün) im ESI(+)-Mode.

Für alle GABA-Isotopologe sind im Produktionenspektrum drei Gruppen deutlich erkennbar. Zum einen gibt es einen Teil nicht fragmentierter Ionen (m/z 104-110). Außerdem lässt sich für jedes GABA-Isotopolog eine Abspaltung von 17 bzw. 18 Masseneinheiten beobachten, was formal einer Abspaltung von Ammoniak bzw. Wasser gleichkommt (m/z 86-93).¹²² Des Weiteren ist für GABA (1) der Übergang m/z 104/69 zu beobachten, was einer Kombination aus beiden Abspaltungen (H_2O und NH_3) entspricht. Für ($^2\text{H}_2$)GABA (2) ist dieser kombinierte Übergang zwar auch zu beobachten (m/z 106/71), jedoch sind ebenfalls die Übergänge m/z 106/69 und m/z 106/70 zu finden, bei denen formal ein bzw. zwei Deuteriumatome involviert sind. Für ($^2\text{H}_6$)GABA (3) sind für die kombinierte Abspaltung ebenfalls drei Übergänge m/z 110/74, m/z 110/73 und m/z 110/72 zu detektieren, die allerdings formal einer Abspaltung unter Einschluss von ein bis drei Deuteriumatomen gleichkommen. Das Produktionenspektrum von ($^2\text{H}_2$)GABA (2) zeigt zusätzlich noch den Übergang m/z 106/60, welcher dem Verlust von H_2O und CO entspricht, der von Piraud et al. berichtet wird.¹²² Für GABA (1) und ($^2\text{H}_6$)GABA (3) ist dieser unter den gewählten Bedingungen nicht zu beobachten. Eine Aufstellung der beobachteten Produktionen und die Interpretation der Fragmente ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 2: Fragmente der Produktionenscans von GABA (1), (²H₂)GABA (2) und (²H₆)GABA (3)

Massenverlust von	Möglicher Verlust von	Fragmentationen		
		GABA (1) (m/z 104)	(² H ₂)GABA (2) (m/z 106)	(² H ₆)GABA (3) (m/z 110)
17	NH ₃	87	89	93
18	H ₂ O, (NH ₂ D)	86	88	92
35	H ₂ O + NH ₃	69	71	
36	H ₂ O+NH ₂ D, HDO+NH ₃		70	74
37	H ₂ O+NHD ₂ , HDO+NH ₂ D, D ₂ O+NH ₃		69	73
38	D ₂ O+NH ₂ D, HDO+NHD ₂ , H ₂ O+ND ₃			72
46	H ₂ O+CO		60	

Die Optimierung der „Compound-Dependent-Parameter“ im „Quantitative-Optimization-Mode“ lieferte die in Tabelle 3 zusammengefassten Werte. Um diese zu ermitteln, wurden die entsprechenden Parameter nacheinander in verschiedenen Scan-Modi variiert. Das Declustering-Potential (DP), welches am Orifice des Massenspektrometers anliegt (siehe Abbildung 4), hat nur Einfluss auf die Precursor-Ionen und sollte idealerweise keinen Einfluss auf die Fragmentierung ebendieser haben. Zur Optimierung des Declustering-Potentials (DP) wird dieses daher im „Selected-Ion-Monitoring“ (SIM) schrittweise um 2 V erhöht und dabei die Veränderung der Signalintensitäten der Analyten beobachtet. Ein optimales DP liefert maximale Signalintensitäten. Alle weiteren Potentiale beeinflussen entweder die Fragmentierung des Analyten oder das entstandene Produkt, weswegen sie für einen Massenübergang charakteristisch sind und im „Selected-Reaction-Monitoring“ (CXP) bzw. „Multiple-Reaction-Monitoring“ (CE) optimiert werden.

Tabelle 3: „Compound-Dependent-Parameter“ des API 5000™ für die verschiedenen GABA-Isotopologe

Compound-Dependent-Parameter	GABA (1)		(² H ₂)GABA (2)		(² H ₆)GABA (3)	
	104/87	104/69	106/89	106/71	110/93	110/73
DP (V)	40		40		40	
CE (V)	15	21	15	21	15 (30)*	21
EP (V)	10	10	10	10	10	10
CXP (V)	12	12	12	12	12	12

*) Die optimale CE für (²H₆)GABA (3) von 15 V wurde auf 30 V erhöht, um den Detektor vor zu hohen Ionenintensitäten zu schützen.

Es wurden pro GABA-Isotopolog zwei Massenübergänge gewählt, von denen jeweils einer der Quantifizierung und einer der Überprüfung der Selektivität diene. Für GABA (**1**) und ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) wurde der intensivste Massenübergang m/z 104/87 bzw. m/z 106/89 für die Quantifizierung verwendet. Für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) wurde aufgrund der höheren Selektivität und des besseren Signal-zu-Rausch-Verhältnisses der Massenübergang m/z 110/73 zur Quantifizierung verwendet, da der Massenübergang m/z 110/93 auch in Zellmatrix-Proben beobachtet werden konnte. Die weiteren Massenübergänge – m/z 104/69 für GABA (**1**), 106/71 für ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) und 110/93 für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) – wurden zur Qualifizierung der Selektivität verwendet, indem das Verhältnis der beiden Massenübergänge zueinander überprüft wurde. Wie in Tabelle 3 beschrieben, wurde die Kollisionsenergie (CE) für den Massenübergang m/z 110/93 so gewählt, dass keine maximale Ionenausbeute erzielt wurde, um den Detektor des Massenspektrometers vor zu hohen Ionenintensitäten zu schützen.

Beim Tuning des Massenspektrometers mit Hilfe einer Spritzenpumpe sollte unbedingt darauf geachtet werden, dass Pulsationen, welche meistens durch den Antrieb der Spritzenpumpe verursacht werden, vermieden werden. Wie sich solche Pulsationen auf die Ionisation eines Analyten auswirken können, ist in Abbildung 7 für drei verschiedene Flussraten gezeigt. Darin ist zu erkennen, dass mit zunehmender Flussrate die Frequenz der Pulsation abnimmt, während die Amplitude des Signales zunimmt. Dies ist besonders im Hinblick auf die Optimierung der „Compound-Dependent-Parameter“ problematisch. Bemerkenswert ist auch der antizyklische Effekt auf verschiedene Massenübergänge. Dies lässt sich in Abbildung 7 besonders gut für die Signalintensitäten bei 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ Flussrate erkennen. Erreichen die Massenübergänge m/z 104/87 und 110/93, welche mit einem Verlust von Ammoniak assoziiert sind (siehe Tabelle 2 auf Seite 29) ein Minimum, ist das Signal für den Massenübergang m/z 104/86, assoziiert mit einer Wasserabspaltung, maximal.

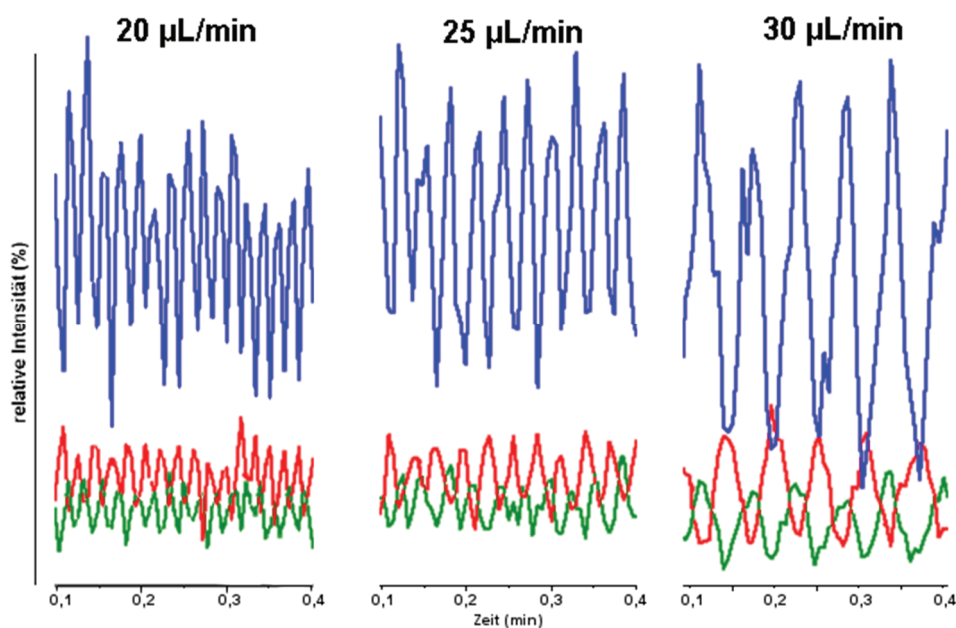


Abbildung 7: Pulsation der Signalintensitäten von m/z 104/87 (blau), m/z 104/86 (rot) und m/z 110/93 (grün) bei Infusion einer 100 nM Lösung von GABA (**1**) und ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in MeOH/0,1% HCOOH (v/v) mit einer Spritzenpumpe bei den Flussraten 20 µL/min, 25 µL/min und 30 µL/min.

Die beiden Analysatorquadrupole Q1 und Q3 wurden mit „Unit-Resolution“ betrieben. Dies bedeutet, dass sowohl Q1 als auch Q3 eine Transmissionsfensterbreite von 0,7 Da haben. Daraus lässt sich für GABA (**1**) eine Auflösung von etwa $R = \frac{m}{\Delta m} = \frac{104}{0,7} = 148$ abschätzen. Die Verwendung einer geringeren Auflösung, also eines breiteren Transmissionsfensters, wie bei der „Low-Resolution“ kann die Empfindlichkeit der Messmethode steigern, wie von Bourcier et al. beschrieben.¹³⁰ Allerdings nimmt dadurch die Selektivität der Methode ab, was einen gegenteiligen Effekt bewirken kann. Für die Quantifizierung von GABA (**1**) konnte durch eine Verringerung der Auflösung keine gesteigerte Signalintensität im Spritzenpumpenexperiment erzielt werden, weswegen mit der „Unit-Resolution“ weiter verfahren wurde.

Die Dwell-time beschreibt die Dauer, welche das Massenspektrometer einen bestimmten Zustand, wie beispielsweise einen Massenübergang, beobachtet. Eine lange Dwell-time geht mit einem präziseren Messsignal, jedoch nicht mit einem intensiveren einher. Durch die bei höheren Dwell-times reduzierten Schwankungen der Signalintensität ist das Rauschen und somit das Signal/Rausch-Verhältnis verbessert. Die Dwell-time ist jedoch durch die Anzahl der Zustände und der Breite des chromatographischen Peaks limitiert, da ein chromatographischer Peak durch eine ausreichende Anzahl an Messpunkten (mindestens 10-15 Datenpunkte je Peak) beschrieben sein sollte,¹³¹ um diesen sicher zu quantifizieren. Der Einfluss der Dwell-time auf die Eigenschaften des Signals sind in Abbildung 8 illustriert. Darin ist zu erkennen, dass die Signalintensität unverändert bleibt, das Signal-zu-Rausch-

Verhältnis jedoch mit längerer Dwell-time zunimmt. Da die Intensität in „counts per second“, also in Ereignissen pro Zeitintervall gemessen wird, wird durch eine längere Messzeit (längere Dwell-time) das Signal nicht intensiver, dafür aber akkurater (höheres S/N) bestimmt.

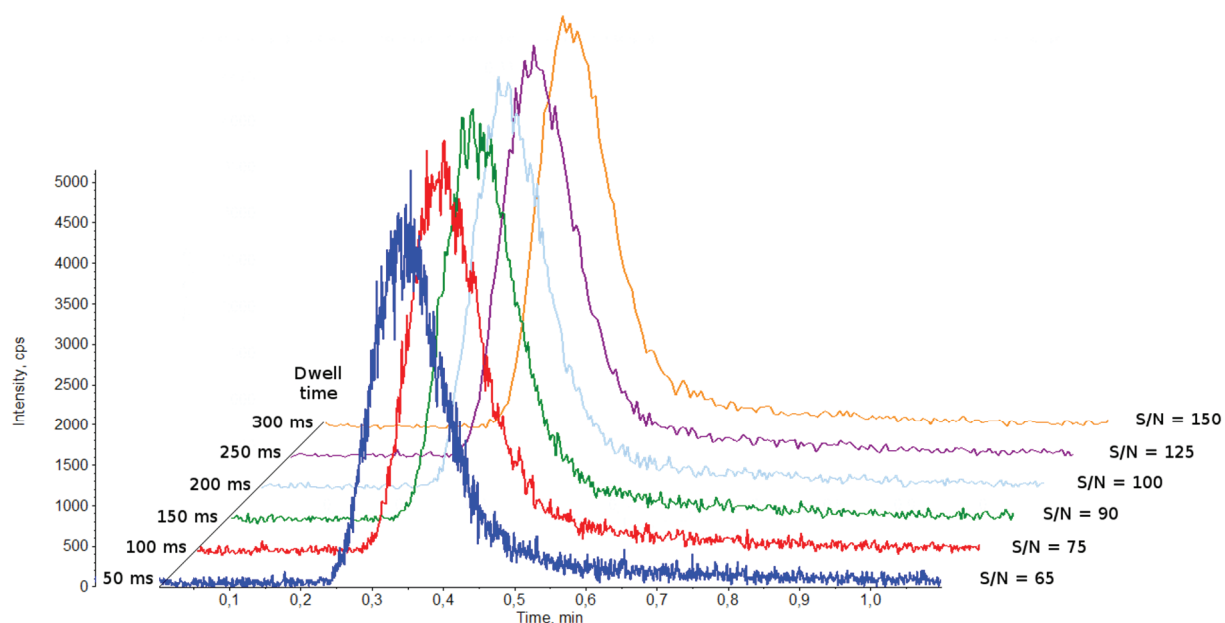


Abbildung 8: Einfluss der Dwell-time auf Peakform und Signal-zu-Rausch-Verhältnis des Massenübergangs m/z 104/87. Dieser Versuch wurde am API 3200™ ohne Verwendung einer Säule bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ MeCN/MeOH/HCOONH₄, 10 mM, pH 7, 30/20/50 (v/v/v) mit einer Injektion von 5 μL einer Lösung von 100 nM GABA (**1**) durchgeführt.

Da sechs Massenübergänge (drei Qualifier- und drei Quantifier-Übergänge) gleichzeitig erfasst werden sollten, wurde die Dwell-time für alle Quantifier-Übergänge auf 100 ms und für alle Qualifier-Übergänge auf 50 ms eingestellt, was zusammen mit den zum Einstellen des neuen Massenübergangs nötigen Pause von 5 ms zu einer „total-cycle-time“ von 0,48 s, oder 2 Messpunkten je Sekunde führt.

3.1.3. Entwicklung einer geeigneten Chromatographie zur Quantifizierung von GABA

3.1.3.1. Allgemeine Überlegungen zur HPLC-MS/MS

Eine direkte Infusion eines Zellextraktes in das Massenspektrometer zur Quantifizierung der Analyten ist zwar theoretisch möglich, jedoch aus mehreren Gründen nicht empfehlenswert. Zum einen würde es aufgrund der Vielzahl an Substanzen zu einer Ionensuppression der Analyten und somit zu einer schlechten Nachweisgrenze kommen. Zum anderen ist es wahrscheinlich, dass ein Massenübergang nicht ausreichend spezifisch ist, um den Analyten aus der komplexen Matrix selektiv zu erfassen. Des Weiteren würde ein hoher Matrixanteil in die Quelle des Massenspektrometers gelangen und diese kontaminieren und somit die Robustheit und den Reinigungsaufwand stark beeinflussen. Aus diesen Gründen wurde die Entscheidung getroffen, Matrix und Analyt vor der MS/MS-Detektion durch HPLC zu trennen. Dabei wurde die Aufkonzentrierung des Analyten und die damit verbundene Steigerung der Empfindlichkeit als ein weiterer möglicher Vorteil gesehen. Ferner war es das Ziel, dass die Chromatographie eine schnelle und robuste Quantifizierung des Substrates erlaubt. Deswegen sollte die Elution isokratisch erfolgen, um unnötig lange Laufzeiten und breite Peaks zu vermeiden. Daher sollte der Kapazitätsfaktor des Analyten idealerweise zwischen 1 und 5 liegen.

Um die Auflösung zweier chromatographischer Peaks – in diesem Falle von GABA (**1**) als Analyt und der Zellmatrix als abzutrennendes Komponentengemisch – zu beeinflussen, stehen mehrere Parameter zur Verfügung, deren Zusammenhang aus der Fundamentalgleichung der Chromatographie (Gleichung 2) hervorgeht.

$$R = \overbrace{\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)}^{\text{Term I}} \times \overbrace{\left(\frac{k_2}{k_2 + 1}\right)}^{\text{Term II}} \times \overbrace{\frac{\sqrt{N}}{4}}^{\text{Term III}}$$

Gleichung 2: Fundamentalgleichung der Chromatographie.¹³² N: Trennstufenzahl

$$\text{mit } \alpha = \left(\frac{k_2}{k_1}\right)$$

Gleichung 3: Selektivitätsfaktor

$$\text{und } k_i = \left(\frac{t_i - t_0}{t_0}\right)$$

Gleichung 4: Kapazitätsfaktor

mit t_0 als Totzeit und t_i als Bruttoretenionszeit von Peak i .

Die Fundamentalgleichung der Chromatographie besteht aus drei Haupttermen, dem Selektivitätsterm (I), dem Verzögerungsterm (II) und dem Dispersionsterm (III), welche die Auflösung zweier Peaks beeinflussen. So führt die Erhöhung der Trennstufenzahl N , wie sie zum Beispiel durch eine längere Chromatographiestrecke, kleineres Säulenmaterial oder optimierte Fließgeschwindigkeiten erreicht werden können, zu einer Steigerung der Auflösung. Verzögerungsterm (II) sowie Selektivitätsterm (I) lassen sich unter anderem durch die Art und Zusammensetzung der mobilen und der stationären Phasen beeinflussen.

Wie im Kapitel 3.1.1 „Allgemeiner Hintergrund zur Quantifizierung von Aminosäuren“ auf Seite 24 bereits erläutert, handelt es sich bei GABA (**1**) um eine polare Aminosäure, die mittels Chromatographie an einer HILIC-Phase von der Zellmatrix getrennt werden sollte. “Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography” erlaubt die Trennung polarer Substanzgemische, welche an Umkehrphasen nur schlecht retiniert werden. Außerdem werden in der HILIC häufig hohe Anteile leichtflüchtiger organischer Lösemittel zur Elution verwendet, welche sich gut für die Analyse mit API-Massenspektrometern eignen. Allgemein gilt, dass bei den eingesetzten HILIC-Phasen, im Gegensatz zu RP-Phasen, Wasser das Laufmittel mit hoher Elutionskraft ist. Der Anteil an organischem Lösemittel in der mobilen Phase beeinflusst neben der Retention auch die Ionisation des Analyten in der Ionenquelle. Aber auch mit HILIC-Phasen ist die Abtrennung von GABA (**1**) aus der biologischen Matrix problematisch, da polare Substanzen einen Großteil der Matrix darstellen, welche nicht mit der Laufmittelfront eluiert, sondern ebenfalls retiniert werden. Außerdem gibt es Berichte, nach denen bei HILIC die Reproduzierbarkeit gering ist und die Säule lange Äquilibrierungszeiten erfordert.¹¹⁹ Zum besseren Verständnis der für die Wahl der Chromatographiebedingungen wichtigen Faktoren sollen im Folgenden einige Eigenschaften des Analyten näher betrachtet werden.

γ -Aminobuttersäure enthält sowohl eine Carbonsäure- als auch eine primäre Aminofunktion. Für die Carboxygruppe liegt der pK_a bei 4,23, für die Aminofunktion bei 10,43.^{133,134} Der Protonierungsgrad der Carboxygruppe und der Aminogruppe in Abhängigkeit des pH-Wertes lässt sich anhand der Henderson-Hasselbalch-Gleichung (siehe Gleichung 5) berechnen. Der daraus resultierende Verlauf des Ladungszustandes der verschiedenen GABA-Spezies in Abhängigkeit des pH-Wertes ist in Abbildung 9 dargestellt. Wie daraus ersichtlich, liegt GABA (**1**) im Bereich von pH 5.5 - 9 überwiegend als Zwitterion, im Bereich unterhalb von pH 3 überwiegend in positiv und im Bereich oberhalb von pH 11,5 überwiegend in negativ geladener Form vor.

$$pH = pK_a + \lg \frac{[A^-]}{[HA]}$$

Gleichung 5: Henderson-Hasselbalch-Gleichung

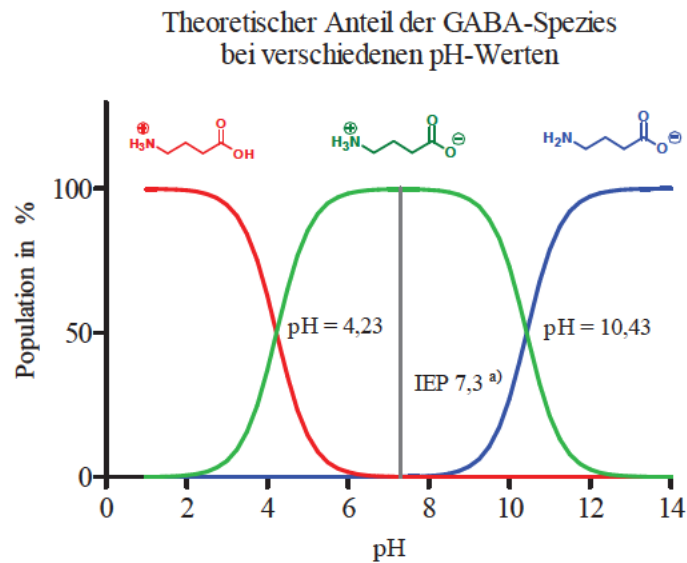


Abbildung 9: Theoretische Population von GABA-Spezies. Berechnet nach der Henderson-Hasselbalch-Gleichung. a)¹³⁵

Der isoelektrische Punkt (IEP), welcher den pH-Wert beschreibt, bei dem sich ein Molekül in einem elektrischen Feld nicht zu einem der Pole bewegt, also netto neutral geladen ist, beträgt bei GABA (1) 7,3.¹³⁵ Anhand des in Abbildung 9 dargestellten Verlaufes des Ionisierungszustandes von GABA (1) lassen sich leichter geeignete Bedingungen für die chromatographische Trennung von GABA (1) aus der Zellmatrix ableiten. So läge GABA im pH-Bereich von 6 bis 8,5 als Zwitterion vor und wäre damit komplementär zu der in Kapitel 3.1.3.3 „ZIC-HILIC und ZIC-pHILIC“ auf Seite 36 behandelten ZIC-HILIC-Phase, was eine höhere Wechselwirkung zwischen dem Analyt und der stationären Phase bewirken kann. Um experimentell eine chromatographische Methode zur Quantifizierung von (²H₆)GABA zu entwickeln, wurden Zelllysate aus HEK-mGAT1-Zellen hergestellt und mit 100 nM GABA (1) versetzt. Wie diese Matrix gewonnen wurde, ist in Kapitel 4.3.2.1 „Gewinnung von Matrix für die Optimierung der Chromatographie“ auf Seite 180 näher beschrieben. Diese Proben wurden dann chromatographisch mit verschiedenen stationären und mobilen Phasen getrennt und GABA, (²H₂)GABA und (²H₆)GABA am API 5000™ detektiert. Die Entwicklung einer chromatographischen Methode wird in den nachfolgenden Kapiteln genauer beschrieben.

3.1.3.2. Bestimmung der Totzeit der verwendeten Säulen

Die Kenntnis der Totzeit eines chromatographischen Systems ist wichtig, um belastbare Aussagen über die effektive Retention eines Analyten auf einer stationären Phase – beschrieben durch den Kapazitätsfaktor, siehe Gleichung 4 – treffen zu können. Die Totzeit eines Systems ist allerdings von der Flussrate abhängig, wohingegen die Beschreibung des Totvolumens eines Systems universell ist.

Die Totvolumen der in dieser Arbeit verwendeten chromatographischen Systeme wurden durch Addition des Systemtotvolumens der Anlagenbauteile und der Totvolumen der verwendeten Säulen bestimmt. Das Systemtotvolumen des API 5000™ mit ESI-Quelle beträgt in der verwendeten Konfiguration 90 µL vom Injektor bis zum Detektor. Dieses wurde durch die Bestimmung der Retentionszeit von GABA (**1**) bei Verwendung eines volumenfreien Kopplungsstückes, welches die Säule ersetzte, ermittelt. Das Totvolumen der Säulen (ZIC-*p*HILIC, siehe 3.1.3.3 „ZIC-HILIC und ZIC-*p*HILIC“ auf Seite 36 und YMC-Pack PVA-Sil, siehe 3.1.3.4 „YMC-Pack PVA-Sil“ auf Seite 50) wurde anhand der Retentionszeiten von Toluol an einer Agilent 1100 Series HPLC System in Triplikaten bei 254 nM bestimmt. Dazu wurden 1 µL Toluol bei einer Flussrate von 400 µL/min (ZIC-*p*HILIC) bzw. 600 µL/min (YMC-Pack PVA-Sil) mit einem Fließmittel bestehend aus MeCN/H₂O (80/20, v/v) sowohl mit der Säule, als auch mit einem volumenfreien Kopplungsstück chromatographiert, um das Totvolumen der Säule nach Gleichung 6 zu berechnen.

$$V_{\text{Säule}} = (t_r \text{ mit Säule} - t_r \text{ ohne Säule}) \times \text{Flussrate}$$

Gleichung 6: Berechnung des Totvolumens einer Chromatographiesäule

Das Totvolumen der ZIC-*p*HILIC betrug 40 µL das der YMC-Pack PVA-Sil (50x3 mm) 190 µL, das der YMC-Pack PVA-Sil (50x2,1 mm) 100 µL.

3.1.3.3. ZIC-HILIC und ZIC-*p*HILIC

Die von Buck et al.¹¹⁵ vorgestellte Methode zur Quantifizierung von GABA (**1**) aus einer CSF-Probe mittels einer SeQuant® ZIC®-HILIC (3,5µm, 100Å) PEEK 20 x 2,1 mm Säule wurde als Ausgangspunkt für die Optimierung der Chromatographie gewählt. Die verwendete ZIC®-HILIC-Phase ist in Abbildung 10 schematisch dargestellt. Diese stationäre Phase besteht aus annähernd sphärischen Silica-Partikeln, welche durch die Modifikation mit Sulfobetain eine zwitterionische Funktionalität erhalten. Die zu Grunde liegenden chromatographischen Eigenschaften der Phase können überwiegend als verteilungschromatographisch beschrieben werden, wobei ein multimodaler Mechanismus diskutiert wird¹²⁷, bei dem sowohl Wasserstoffbrücken als auch Dipol-Dipol-Interaktionen und elektrostatische Wechselwirkungen zur Retention beitragen. Die Verteilung erfolgt zwischen der mobilen Phase und dem mit Wasser angereicherten stationären Flüssigkeitsfilm um die Partikel. Aus diesem Grund sollte die mobile Phase mindestens 3% Wasser enthalten. Da GABA (**1**) über einen großen pH-Bereich hinweg ebenfalls eine zwitterionische Struktur annehmen kann (siehe Abbildung 9), sollte sie gut mit den zwitterionischen Sulfobetain-Gruppen der ZIC-HILIC wechselwirken können.

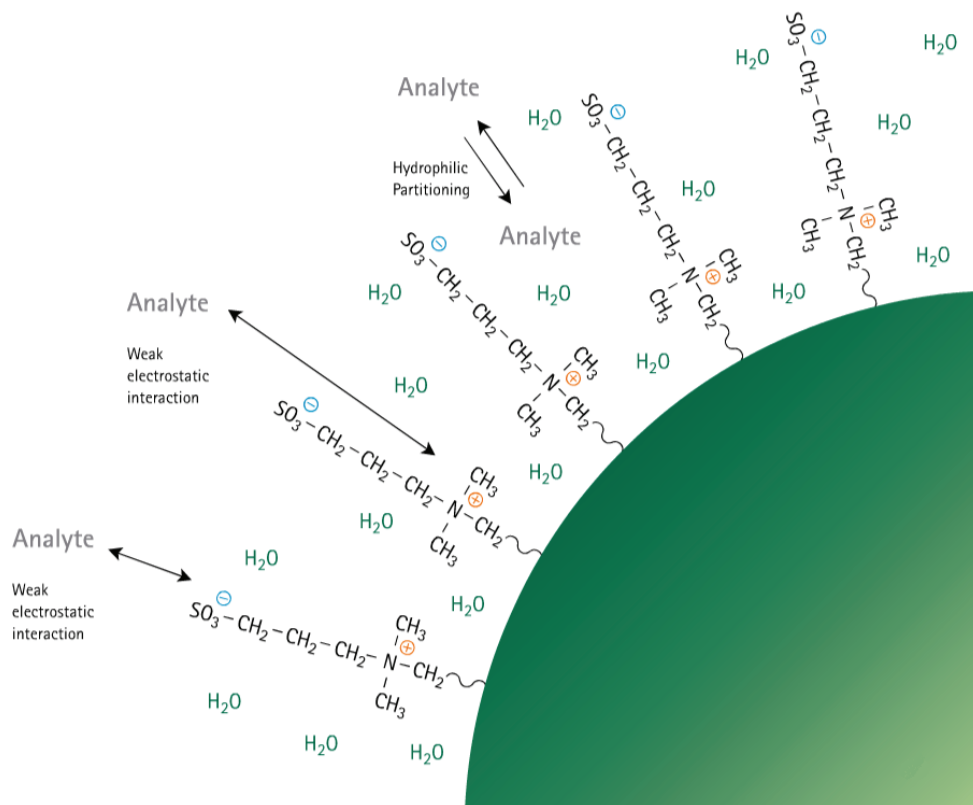


Abbildung 10: Schematische Darstellung der ZIC-HILIC Phase von Merck-SeQuant¹³⁶

3.1.3.3.1. Art und Zusammensetzung der mobilen Phase

Verschiedene Zusammensetzungen mobiler Phasen wurden getestet und hinsichtlich ihres Einflusses auf die Säulenkapazität und die Intensität des GABA-Signales untersucht. Wie bereits erwähnt, sollte eine isokratische Elutionsmethode entwickelt werden. Dazu wurden sowohl binäre Mischungen aus einer organischen (MeOH oder MeCN) und einer wässrigen Phase, als auch ternäre Kompositionen aus Methanol, Acetonitril und wässriger Phase in verschiedenen Zusammensetzungen untersucht. Dabei zeigte sich ganz allgemein, dass eine Erhöhung des organischen Anteils im Laufmittel sowohl die Retention von GABA (**1**) erhöhte, als auch die Signalintensität steigerte. Eine stärkere Retention auf HILIC-Phasen kann durch Reduktion der Polarität der mobilen Phase erreicht werden. Dies kann entweder durch Reduktion des wässrigen Anteils oder durch Verwendung eines apolareren organischen Laufmittels, wie MeCN im Vergleich zu MeOH, erzielt werden. Um eine robuste, schnelle und sensitive Quantifizierungsmethode zu entwickeln, musste ein Kompromiss zwischen schneller Chromatographie – was mit höheren wässrigen Anteilen einhergeht – und hoher Sensitivität – assoziiert mit einem hohen Anteil organischen Laufmittels – erzielt werden.

Während der Untersuchungen zur Fließmittelzusammensetzung fiel auf, dass nach der Elution von GABA (**1**) eine Suppression der Basislinie von m/z 104/87 ab einer Retentionszeit von etwa 7,7 min

auftrat und das Hintergrundsignal von m/z 104/87 von etwa 1500 cps (Retentionszeit 6-7 min) auf 500 cps (Retentionszeit 9,3 min) reduzierte. Außerdem war diese Suppression mit einem zusätzlichen Peak für die Massenübergänge m/z 104/86 und 104/87 überlagert (siehe Abbildung 11a, Retentionszeit 8,5 min). Dabei handelt es sich jedoch nicht um GABA (1), da sowohl eine andere Retentionszeit, als auch ein anderes Verhältnis der Massenübergänge zueinander beobachtet wurde. Zudem wurde die korrekte Retentionszeit von GABA (1) (rt 2,9 min) mit Hilfe von ($^2\text{H}_6$)GABA (3) (m/z 110/93 und m/z 110/92) bestätigt. Der in Abbildung 11b dargestellte Produktionenscan des Precursors m/z 104 zeigt, dass diese Suppression ein von GABA (1) verschiedenes Produktionenspektrum liefert (vergleiche dazu das Produktionenspektrum von GABA (1) in Abbildung 6 auf Seite 28), welches von einem Massenübergang m/z 104/56 dominiert wird. Da während der Suppression des Hintergrundsignales von GABA (1) m/z 104/87 gleichzeitig immer ein Signal von m/z 104/86 beobachtet werden konnte, wurde letzteres dazu verwendet, die auftretende Suppression weiter zu beobachten und zu lokalisieren.

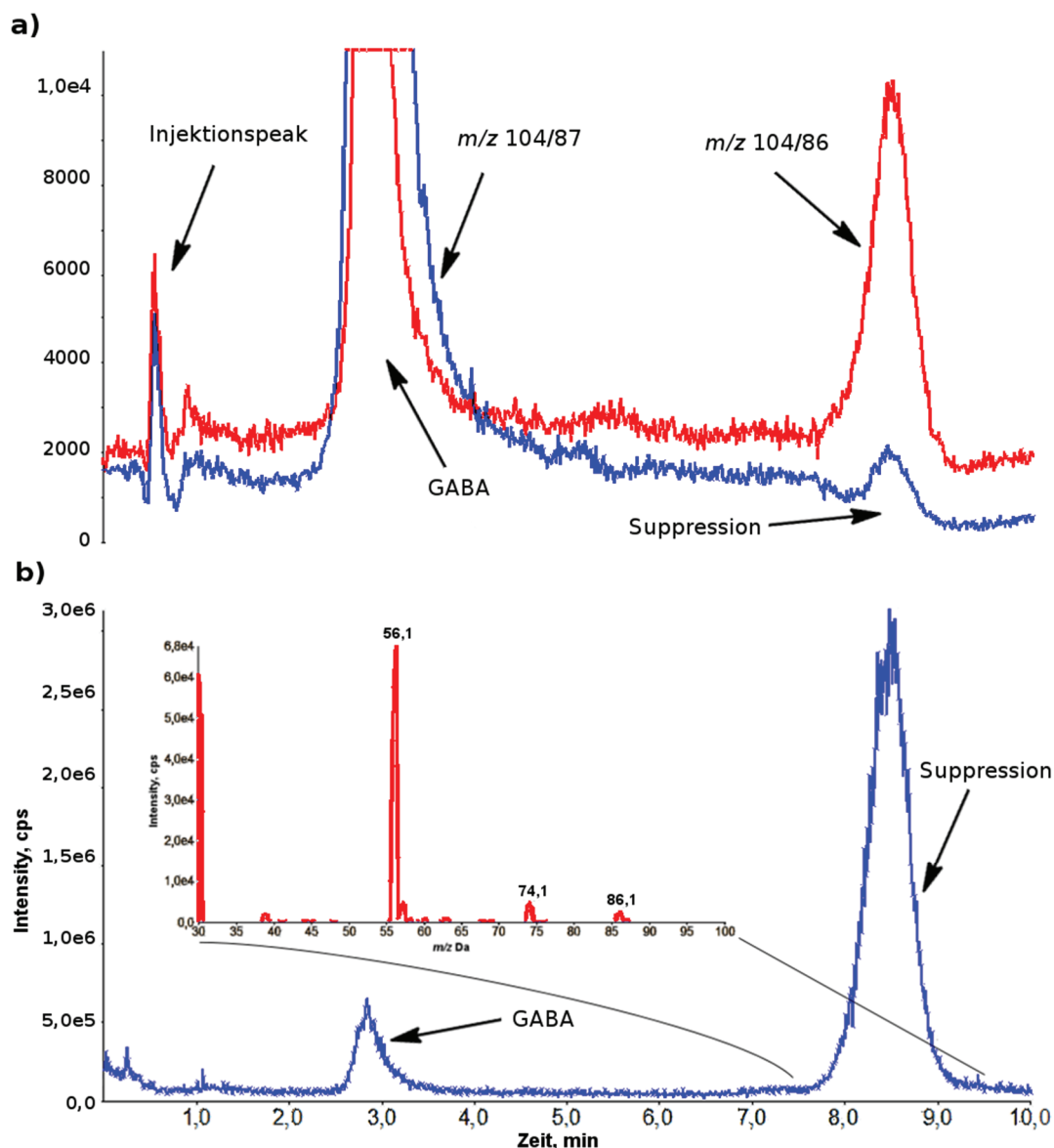


Abbildung 11: Auftreten einer Suppression bei der Chromatographie mit der ZIC-HILIC bei einer mobilen Phase bestehend aus MeCN/CH₃COONH₄ pH 6,8, 75/25 (v/v) bei einer Flussrate von 200 μ L/min. a) MRM-Chromatogramme von m/z 104/87 (blau) und m/z 104/86 (rot) einer HEK-Zellmatrix mit zusätzlich 100nM GABA (1). b) Total-Ion-Current (TIC) eines Q1-Scans einer HEK-Zellmatrix mit zusätzlich 100 nM GABA (1) (blau) und dem Massenspektrum zwischen 7.5 und 9.5 min (rot).

Es war wichtig, diese Suppression zu beachten und dafür Sorge zu tragen, dass am Ende eines chromatographischen Laufes keine Substanzen mehr auf der Säule verblieben waren, die Einfluss auf die nachfolgende Chromatographie hätten. Außer eine Suppression zu verursachen, würde dieses Signal aufgrund seiner Massenübergänge m/z 104/87 und m/z 104/86 auch mit der Quantifizierung von GABA (1) interferieren.

Der Einfluss der Zusammensetzung der mobilen Phase auf die Retention von GABA (1) und des mit der Suppression assoziierten Signales wurde für verschiedene binäre Mischungen aus MeOH bzw. MeCN

und einer wässrigen Phase, bestehend aus 5 mM HCOONH₄, pH 4 studiert und ist in Abbildung 12 dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass Methanol als organisches Laufmittel im Vergleich zu Acetonitril zu deutlich kürzeren Retentionszeiten von GABA (1) führte (vergleiche Abbildung 12 rote und grüne Kurve). Außerdem führte eine Steigerung des Anteils an MeOH nur zu einer moderaten Erhöhung der Retention. Der Peak des Massenüberganges m/z 104/86, welcher während der auftretenden Suppression beobachtet wurde, ließ sich durch die Verwendung von MeOH schlechter von den Analyten trennen, wobei die Selektivität (siehe Gleichung 3, Seite 33) annähernd unabhängig vom Anteil an MeOH im Laufmittel war (vergleiche rote und blaue Kurve). Verwendete man hingegen MeCN als organische Laufmittelkomponente, so nahm die Retention von GABA (1) merklich mit steigendem Anteil an MeCN im Laufmittel zu (grüne Kurve). Auch die Selektivität zwischen GABA (1) und des während der Suppression auftretenden Signales bei m/z 104/86 wurde durch die Verwendung von MeCN im Laufmittel beeinflusst und es kam ab einem Anteil von etwa 80% MeCN zu einer Umkehr der Elutionsreihenfolge (vergleiche Abbildung 12 grüne und orange Kurve).

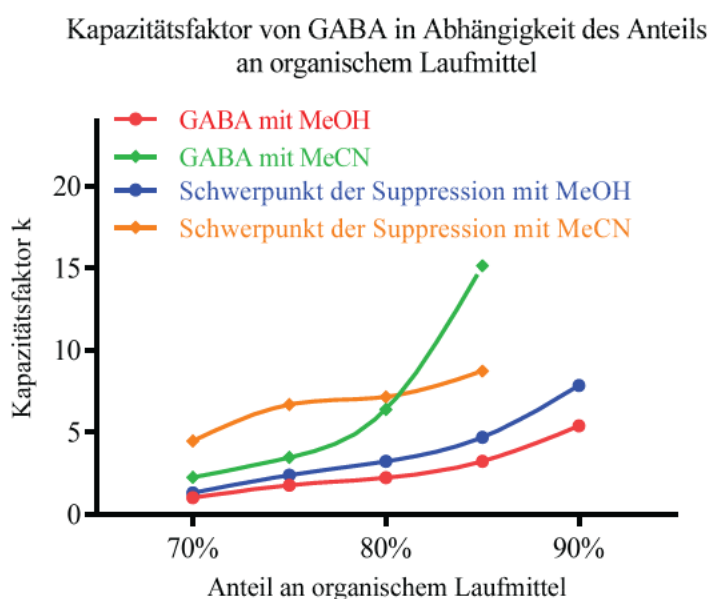


Abbildung 12: Kapazitätsfaktoren von GABA (1) und der beobachteten Suppression in Abhängigkeit des Anteils an organischem Lösemittel (MeOH oder MeCN) eines binären Fließmittels mit einer wässrigen Phase bestehend aus 5 mM HCOONH₄ pH 4.

Außerdem ergaben sich bei der Verwendung von MeCN anstelle von MeOH symmetrischere Peaks mit höherer Intensität. Da eher eine schnelle, robuste Chromatographie das Ziel war, waren lange Laufzeiten nicht erwünscht. Ein Anteil von mehr als 80% Acetonitril erschien daher unpraktikabel. Auch verschiedene ternäre Laufmittelzusammensetzungen aus Acetonitril/Methanol/Puffer wurden

untersucht, allerdings ließ sich der GABA-Peak damit schlechter von den suppressionsverursachenden und störenden Peaks abtrennen. Daher war im Hinblick auf die Robustheit der Methode ein binäres Laufmittelgemisch zu bevorzugen.

3.1.3.3.2. Einfluss der Temperatur auf die Retention

Die Säulentemperatur kann die chromatographische Trennung durch eine erhöhte Diffusionsrate der Analyten oder eine reduzierte Viskosität des Laufmittels positiv beeinflussen.¹³⁷ Dadurch kann bei erhöhter Säulentemperatur im Regelfall mit einer schnelleren Elution, sowie schärferen und intensiveren Peaks gerechnet werden. Der Einfluss der Säulentemperatur auf den Kapazitätsfaktor in der RP-Chromatographie wird häufig durch die van't Hoff-Gleichung beschrieben. Sie gilt idealerweise für Systeme, die hauptsächlich über eine Verteilungschromatographie bestimmt werden, weshalb sie auch auf die hier beschriebene HILIC angewendet werden kann.^{126,127,138}

$$\ln(k) = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln(\Phi)$$

Gleichung 7: van't Hoff-Gleichung. ΔH : Retentionsenthalpieänderung, ΔS : Retentionsentropieänderung; R : universelle Gaskonstante; Φ : Phasenverhältnis.

Die verwendete ZIC-HILIC Säule ist nach Angaben des Herstellers bis zu einer Temperatur von 70 °C stabil, weshalb das Retentionsverhalten von GABA (**1**) auf dieser Säule im Temperaturbereich von 25 °C bis 70 °C mit einer Laufmittelzusammensetzung von MeCN/CH₃COONH₄, 5 mM, pH 5, 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 200 µL/min untersucht wurde. Der resultierende van't Hoff-Plot ist in Abbildung 13 wiedergegeben. Darin erkennt man, dass die Retention von GABA (**1**) praktisch nicht von der Temperatur beeinflusst wird (rote Kurve), wohingegen das Signal von m/z 104/86, welches zusammen mit der bereits beschriebenen Suppression auftritt, mit steigender Temperatur schneller eluiert wird (grüne Kurve). Dies bedeutet, dass den Komponenten, welche das Signal von m/z 104/86 während der Suppression verursachen, eine eher exotherme Retentionsenthalpie zugrunde liegt ($\Delta H < 0$), wohingegen die Retention von GABA (**1**) kaum durch enthalpische Beiträge ($\Delta H \approx 0$), sondern eher durch entropische Effekte, evtl. durch Wasserstoffbrückenbindungen oder Solvatationseffekte bestimmt wird.¹²⁶

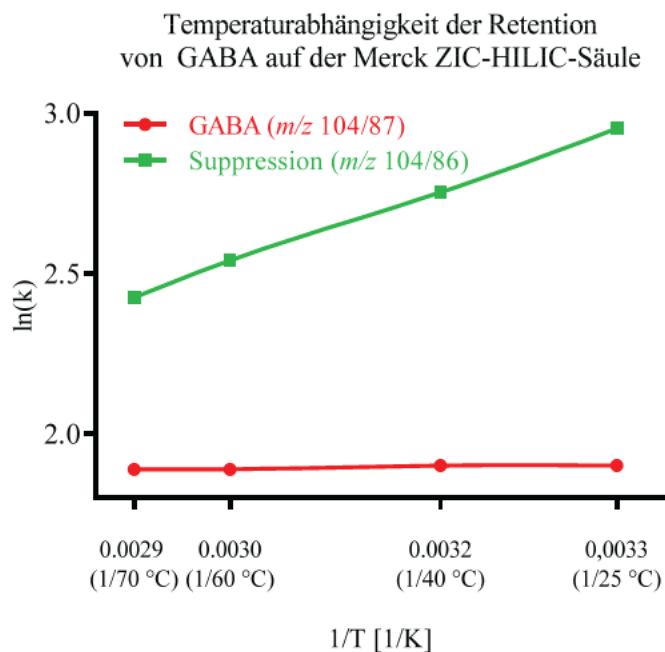


Abbildung 13: van't Hoff-Plot der Temperaturabhängigkeit des Kapazitätsfaktors von GABA (**1**) und des mit der Suppression einhergehenden Signals (m/z 104/86) auf der ZIC-HILIC Säule mit einer mobilen Phase bestehend aus MeCN/CH₃COONH₄ 5 mM pH 5 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 200 μ L/min.

Eine erhöhte Temperatur sorgt für eine schnellere Elution des Signales von m/z 104/86, welches zusammen mit der Suppression auftritt, wodurch die Gesamtlaufzeit reduziert wird. Des Weiteren war die Signalintensität von GABA (**1**) (m/z 104/87) bei einer Säulentemperatur von 70 °C etwa doppelt so hoch wie bei einer Temperatur von 25 °C. Dennoch wurden die weiteren Versuche bei 25 °C Säulentemperatur durchgeführt, um die Robustheit und die Standzeit der Säule nicht unnötig zu strapazieren.

Es fällt auf, dass die Kapazitätsfaktoren von GABA (**1**) in den temperaturabhängigen Experimenten ungefähr den Kapazitätsfaktoren entsprechen, welche bei den Versuchen zur Laufmittelzusammensetzung (siehe Abbildung 12) zu finden sind ($\ln(k)=1,9$ vs. $k = 6,4$). Allerdings ist der Kapazitätsfaktor für m/z 104/86 für das Signal während der auftretenden Suppression extrem abweichend (vergleiche Abbildung 12 orange Kurve bei 80% MeCN ($k=7$) mit Abbildung 13 grüne Kurve bei 1/25 °C ($\ln(k) = 2,95$)). Dies scheint an den abweichenden pH-Werten der wässrigen Phase zu liegen, welche zur Untersuchung der Laufmittelzusammensetzung bei pH 4 und zur Untersuchung der Temperaturabhängigkeit bei pH 5 lagen. Demnach hätte der pH-Wert einen großen Einfluss auf die Chromatographie, weshalb im folgenden Abschnitt die pH-Abhängigkeit der Chromatographie von GABA (**1**) näher untersucht wurde.

3.1.3.3.3. Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase auf die Chromatographie

Der pH-Wert der mobilen Phase hat neben der Laufmittelzusammensetzung einen entscheidenden Einfluss auf das Retentionsverhalten eines Analyten. Dabei sollte beachtet werden, dass sich pH-Werte ausschließlich auf die wässrige Phase des Laufmittelgemisches beziehen, da der pH-Wert nur für wässrige Lösungen definiert ist.

Der Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase wurde mit einem Laufmittel bestehend aus einer organischen Phase (MeOH oder MeCN) und einer wässrigen Phase (5 mM HCOONH₄) im Verhältnis 80/20 (v/v) untersucht. Der Verlauf der Kapazitätsfaktoren für GABA (**1**) und des mit der Suppression assoziierten Signals m/z 104/86 sind in Abbildung 14 dargestellt. Es zeigte sich, dass der pH-Wert der wässrigen Phase im Bereich von pH 3,3 bis pH 6,3 bei Verwendung von MeCN die Retention von GABA (**1**) nicht beeinflusst (siehe grüne Kurve in Abbildung 14). Im Gegensatz dazu wurde die Retention des mit der Suppression assoziierten Signals m/z 104/86 stark durch den pH-Wert der wässrigen Phase beeinflusst (orange Kurve in Abbildung 14). Kam es bei pH 4 zu einer Co-Elution von GABA (**1**) und des mit der Suppression assoziierten Signales m/z 104/86 ($\alpha = 1$) und folglich zu einer Suppression des GABA-Signales m/z 104/87, war die Selektivität bei pH 4,5 bereits $\alpha = 2,5$. Interessanterweise ließ sich das Signal m/z 104/86, welches während der Suppression auftrat durch das Absenken des pH-Wertes unter pH 4 nicht noch früher eluieren, stattdessen war die Retention bei pH 3,3 wieder deutlich erhöht.

Wurde Methanol als organische Laufmittelkomponente gewählt, so konnte für GABA (**1**) bei sauren pH-Werten (pH < 4) eine Retention von $k = 4,5$ beobachtet werden (rote Kurve in Abbildung 14). Wurde der pH-Wert der wässrigen Phase jedoch angehoben, so wurde GABA (**1**) ab pH 5 schneller eluiert ($k = 1,5$, siehe dazu auch Abbildung 15). Das mit der Suppression assoziierte Signal m/z 104/86 wurde bei Verwendung von MeOH als organischem Laufmittel im Vergleich zu MeCN ebenfalls schneller eluiert, wodurch die Selektivität bezüglich GABA (**1**) mit steigendem pH-Wert zunahm (vergleiche blaue und rote Kurve in Abbildung 14).

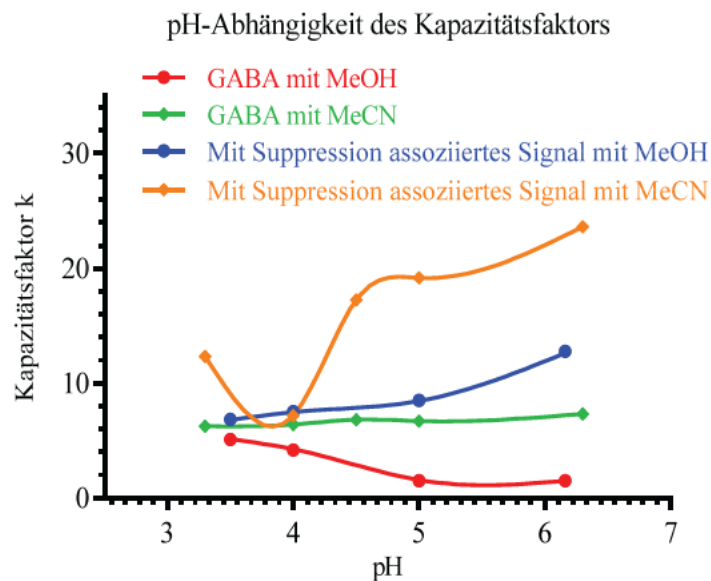


Abbildung 14: Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase auf den Kapazitätsfaktor von GABA (**1**) und des mit der Suppression assoziierten Signales von m/z 104/86 auf der ZIC-HILIC-Säule. Verhältnis MeCN bzw. MeOH zu HCOONH_4 , 5mM 80/20 (v/v).

Der mit der Suppression in Verbindung gebrachte Peak bei m/z 104/86 wurde bei Verwendung von MeOH und sauren pH-Werten der wässrigen Phase schneller eluiert als bei höheren pH-Werten der wässrigen Phase, sodass die Auflösung dieses mit der Suppression assoziierten Signales und GABA (**1**) mit steigendem pH-Wert zunahm. Gleichzeitig nahm, wie bereits beschrieben, die Retentionszeit von GABA (**1**) bei niedrigen pH-Werten der wässrigen Phase zu, sodass eine Überlagerung beider Signale bei niedrigen pH-Werten der wässrigen Phase beobachtet werden konnte, wohingegen durch die Anhebung des pH-Wertes die Auflösung der beiden Signale gesteigert werden konnte. Dies ist in Abbildung 15 anhand der MRM-Chromatogramme für m/z 104/86 (rot) und m/z 104/87 (blau) für die pH-Werte von 3,3 bis 6,3 dargestellt.

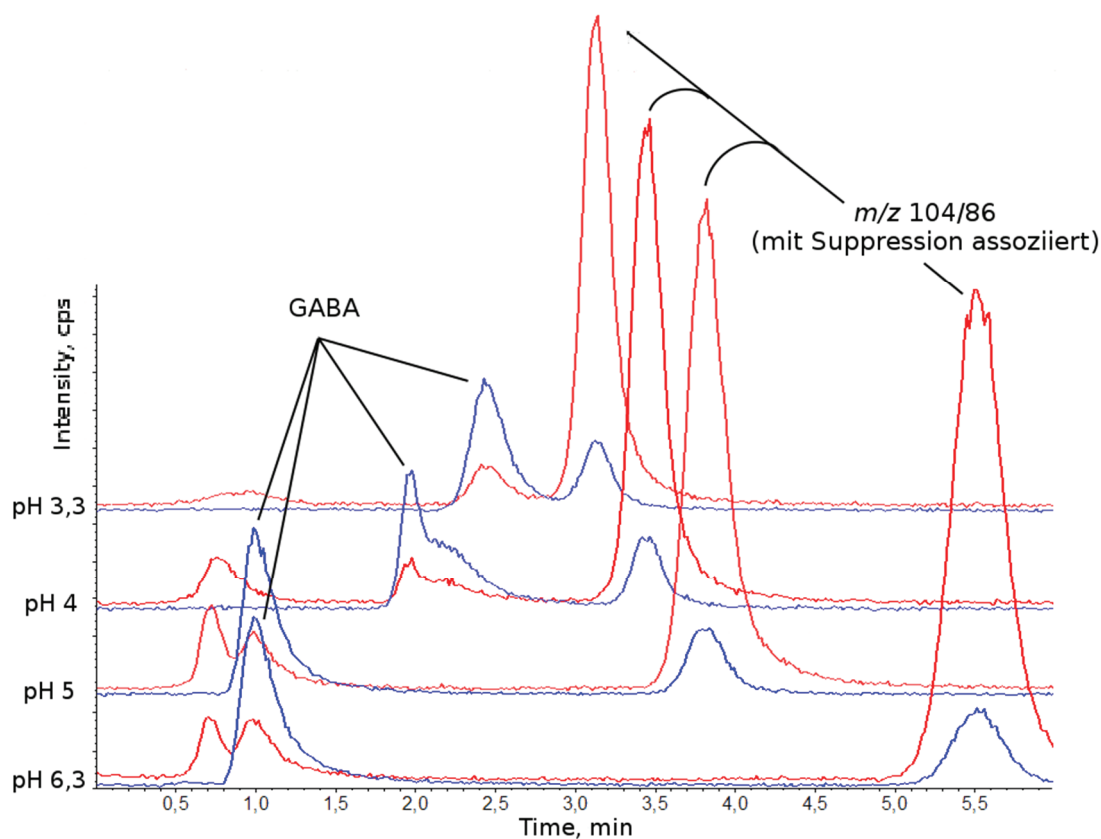


Abbildung 15: MRM-Chromatogramme von m/z 104/87 (blau) und m/z 104/86 (rot) einer HEK-Zellmatrix mit zusätzlich 100 nM GABA (**1**). Als mobile Phase wurde MeOH/HCOONH₄ 80/20 (v/v) bei verschiedenen pH-Werten bei einer Flussrate von 200 μ L/min verwendet. Die Ionisation erfolgte mit der DA-APPI-Quelle bei einer Toluol-Flussrate von 20 μ L/min.

In Kombination mit MeOH ist bei der Verwendung der ZIC-HILIC-Säule eine schnelle Elution von GABA (**1**) bei neutralen bis leicht sauren pH-Werten (pH 6,3 - 5) zu beobachten ($k = 1,5$), jedoch macht die spätere Elution der Matrix lange Laufzeiten nötig (siehe auch Abbildung 15). Bei pH 4 der wässrigen Phase hat GABA (**1**) einen höheren Kapazitätsfaktor, sodass diese nicht mehr mit der Totzeit von der Säule eluiert ($k = 4$). Ebenfalls wird bei pH 4 eine ausreichende Trennung von GABA (**1**) und den interferierenden Signalen der Suppression erreicht ($R = 3$, siehe Abbildung 15, pH 4). Wird der pH-Wert der wässrigen mobilen Phase weiter gesenkt, kommt es allerdings zur Co-Elution beider Signale, was eine Quantifizierung von GABA (**1**) unmöglich macht (siehe Abbildung 15, pH 3,3).

Wird hingegen Acetonitril als organische Laufmittelkomponente verwendet, so hat der pH-Wert, wie bereits beschrieben, keinen Einfluss auf die Retention von GABA (**1**) (siehe Abbildung 14 grüne Kurve). Jedoch lässt sich durch die Wahl des pH-Wertes die Retention des Signales m/z 104/86, welches mit der Suppression assoziiert ist, beeinflussen (siehe Abbildung 14 orange Kurve). Des Weiteren wird die Retention von GABA (**1**) durch den Anteil an Acetonitril im Laufmittel stärker beeinflusst als die der

Suppression (siehe Kapitel 3.1.3.3.1 „Art und Zusammensetzung der mobilen Phase“ auf Seite 37, sowie Abbildung 12 grüne und orange Kurve auf Seite 40), sodass man durch eine entsprechende Wahl beider Parameter die Retention von GABA (**1**) und die des mit der Suppression assoziierten Signals m/z 104/86 separat kontrollieren kann.

Die bisher verwendete SeQuant™ ZIC®-HILIC (3,5 μm , 100 Å) PEEK 20 x 2,1 Säule wurde im Folgenden durch eine polymerbasierte SeQuant™ ZIC®-pHILIC (5 μm) PEEK 20 x 2,1 mm Guard-column ersetzt, da Letztere eine bessere pH-Stabilität besitzt und sich somit auch alkalische wässrige Phasen untersuchen lassen. Hierbei sollte beachtet werden, dass die polymerbasierte Phase ausschließlich mit einer Partikelgröße von 5 μm erhältlich ist, was keinen direkten Vergleich mit der bisher verwendeten Silica-basierten Phase mit 3,5 μm Partikeln erlaubt. Laut Herstellerangaben ist diese ZIC-pHILIC-Phase aufgrund ihres polymerbasierten Trägermaterials bis pH 10 stabil, was die Verwendung alkalischer wässriger Phasen ermöglicht. Dies erlaubt die Verwendung von Ammoniumbicarbonat-gepufferten mobilen Phasen im alkalischen pH-Bereich. Nach Mansoori et al.¹³⁹ kann somit die Ionisierung von GABA (**1**) in einer ESI-Quelle nach dem Prinzip des „wrong way around ESI“ – welches eine gesteigerte Ionenausbeute eines Analyten im ESI(+)-Mode bei alkalischen pH-Werten beschreibt – verbessert werden, was im Kapitel 3.1.4.3 „TurboV-ESI“ auf Seite 67 näher behandelt wird.

In Abbildung 16 ist die Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors von GABA (**1**) vom pH-Wert der wässrigen Phase sowohl für die ZIC®-HILIC (Kreise) als auch für die ZIC®-pHILIC (Quadrate) dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass auch für alkalische pH-Werte (bis pH 9) keine oder nur geringe Änderungen des Kapazitätsfaktors von GABA (**1**) zu beobachten sind. Die auffällig kleineren Kapazitätsfaktoren der ZIC-pHILIC-Phase können mit einer wahrscheinlich effektiveren Derivatisierung der Silicapartikel der ZIC-HILIC Säule mit den Sulfobetaineinheiten erklärt werden.

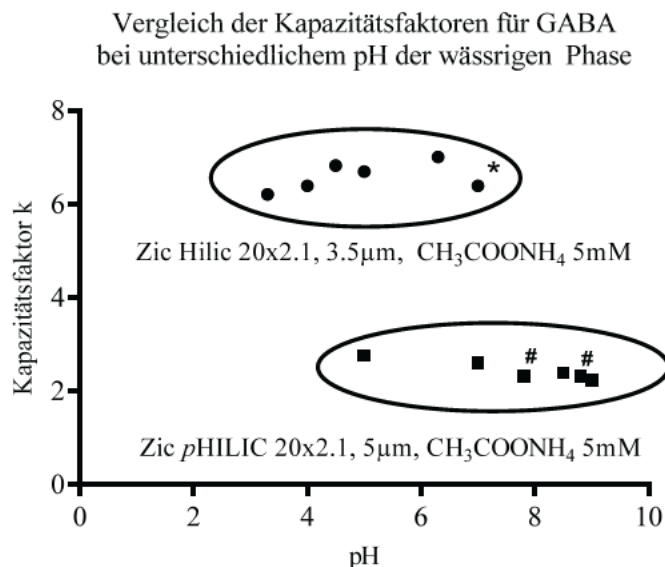


Abbildung 16: pH-Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors von GABA (1) auf der ZIC-HILIC (Kreise), sowie der ZIC-pHILIC (Quadrate). Als mobile Phase wurde MeCN/CH₃COONH₄, 5 mM 80/20 (v/v) verwendet. * kein Puffersalz (reines Wasser); #: NH₄HCO₃, 5 mM.

Bei der Verwendung der ZIC-pHILIC Säule wurde im Weiteren Acetonitril in Kombination mit einer wässrigen Phase bestehend aus 5 mM CH₃COONH₄, pH 7,8 im Verhältnis 80/20 (v/v) verwendet, da sich damit das Signal m/z 104/86, welches während der Suppression beobachtet wurde von den Analyten gut abtrennen ließ und ein Anteil von 80% Acetonitril gute Signalintensitäten lieferte. Aufgrund der mit den kleineren Kapazitätsfaktoren einhergehenden schnelleren Chromatographie der ZIC®-pHILIC im Vergleich zur ZIC®-HILIC Säule, ließen sich mit der ZIC®-pHILIC Säule moderate Laufzeiten von etwa 5 min (bei einer Flussrate von 400 µL/min) realisieren. Die verschiedenen Additive Ammoniumformiat, Ammoniumacetat und Ammoniumhydrogencarbonat hatten keinen Einfluss auf die Retention oder Peakform von GABA (1). Allerdings war bei der Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat eine deutlich gesteigerte Signalintensität zu beobachten. Bei Verwendung einer mobilen Phase basierend auf MeCN/NH₄HCO₃ 5 mM pH 7,8, 80/20 (v/v) wurde somit eine schnelle Elution und eine gute Signalintensität erhalten, weswegen diese schließlich als Laufmittel für die ZIC®-pHILIC Phase bei den im Folgenden beschriebenen Versuchen verwendet wurde, soweit nichts anderes erwähnt wird.

3.1.3.3.4. Untersuchungen zur Flussrate der mobilen Phase

Der Einfluss der Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase auf die Peakform und die Bodenzahl N der Chromatographie von GABA (1) mit der ZIC-pHILIC wurde anhand eines Lösemittelstandards von 20 nM GABA (1) mit einer mobilen Phase bestehend aus MeCN/NH₄HCO₃ 10 mM, pH 7,8, 80/20 (v/v) bei

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

einem Injektionsvolumen von 10 µL für die Flussraten 400 µL/min, 600 µL/min und 800 µL/min untersucht. Der Gegendruck bei einer Flussrate von 800 µL/min lag bei etwa 100 bar, bei 600 µL/min bei 75 bar und bei 400 µL/min bei 50 bar. In Abbildung 17 sind die resultierenden GABA (1) Peaks für m/z 104/87, die bei Verwendung der ZIC-pHILIC mit verschiedenen Flussraten erhalten wurden, dargestellt. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Flussrate die Intensität des GABA-Signals zunahm, die Peakfläche hingegen abnahm. Anhand der Retentionszeit und der Halbwertsbreite der GABA-Peaks konnte nach Gleichung 8 die Bodenzahl N berechnet werden, wobei sich zeigte, dass mit steigenden Flussraten die Bodenzahl abnahm.

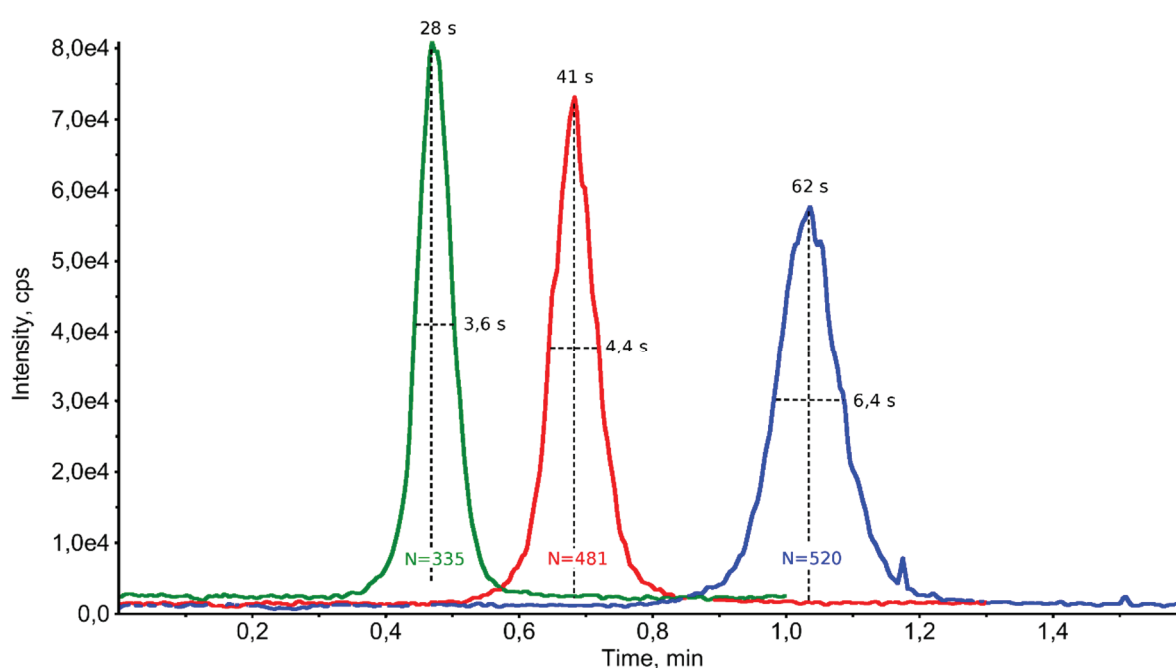


Abbildung 17: Einfluss verschiedener Flussraten auf die Chromatographie von GABA (1) auf der ZIC-pHILIC. Lösemittelstandards von 20 nM GABA (1) bei einem Injektionsvolumen von 10 µL. Mobile Phase: MeCN/NH₄HCO₃ 10 mM pH 7,8, 80/20 (v/v). Flussrate 400 µL/min (blau), 600 µL/min (rot), 800 µL/min (grün).

$$N = 5,54 \times \left(\frac{t_R}{b_{0,5}} \right)^2$$

Gleichung 8: Berechnung der Plattenzahl anhand der Retentionszeit t_R und der Halbwertsbreite $b_{0,5}$ eines Peaks.

Für die Quantifizierung von GABA (1) wurde schließlich für die ZIC-pHILIC eine Flussrate von 400 µL/min verwendet, da bei 400 µL/min zum einen eine höhere Trennleistung, zum anderen eine größere Peakfläche erzielt wurde, welche sich akkurater quantifizieren lässt.

3.1.3.3.5. Untersuchungen zum Injektionsmedium

Bei einer Chromatographie ist allgemein darauf zu achten, dass die Probe, die auf die Säule aufgegeben wird, in einem Medium gelöst ist, welches eine schwächere Elutionskraft als die mobile Phase besitzt, da es sonst zu unerwünschten Effekten, wie dem Durchbruch des Analyten, Peakfronting oder Peaksplitting kommen kann. Im Gegensatz dazu kann die Verwendung eines Injektionsmediums geringerer Elutionskraft zur Aufkonzentrierung der Probe auf der Säule führen. Für die ZIC-*p*HILIC-Säule bedeutet dies, dass das Probenlösungsmittel apolarer als das Laufmittel sein muss. Dies ist im Hinblick auf die spätere Anwendung wichtig, da ein aus biologischen Proben resultierendes Probenmilieu eventuell angepasst werden muss.

In Abbildung 18 ist der Einfluss verschiedener Injektionsmedien auf die Peakform von GABA (m/z 104/87) auf der ZIC®-*p*HILIC Säule für eine mobile Phase aus MeCN/NH₄HCO₃ 5 mM, pH 7,8, 80/20 (v/v) dargestellt. Es lässt sich erkennen, dass die Injektion von GABA (1) in MeCN/H₂O im Verhältnis des Laufmittels in einem symmetrischen Peak resultiert (blau), wohingegen die Injektion in MeOH/H₂O zu einem Durchbruch des Analyten und somit zu einem Fronting des Peaks führt (grün). Durch Ansäuern dieses Injektionsmediums kann ein Großteil des Analyten am Säulenkopf retiniert werden (siehe Kapitel 3.1.3.3.3 „Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase auf die Chromatographie“ auf Seite 43) und es kommt zu einem Doppelpeak (rot).

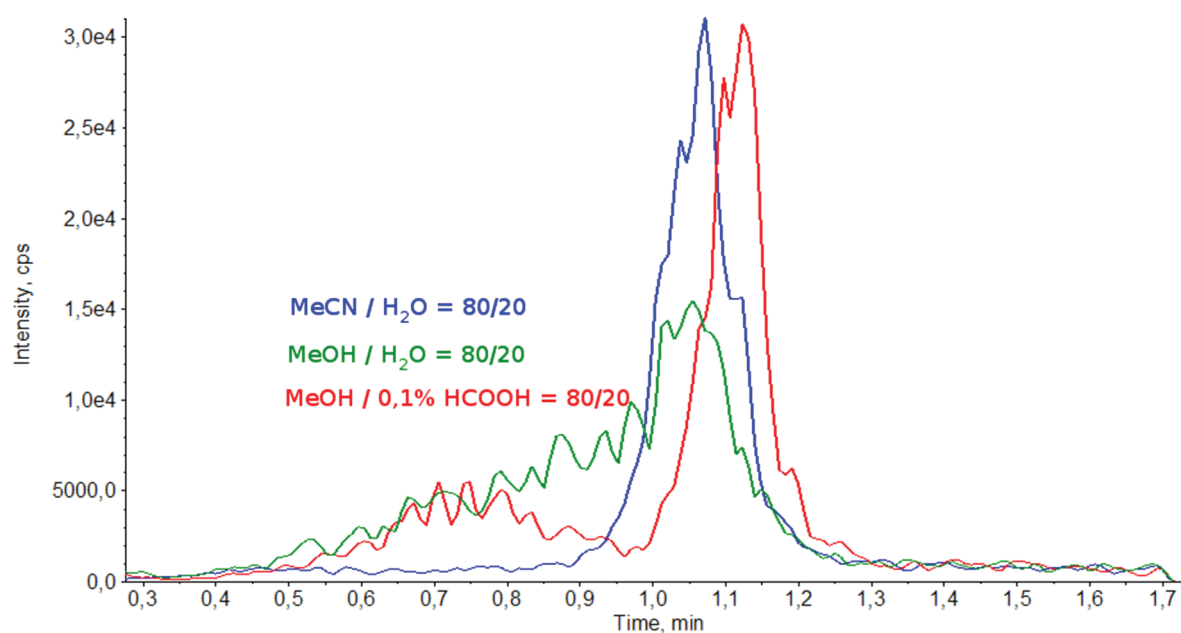


Abbildung 18: Verwendung verschiedener Injektionsmedien auf der ZIC-*p*HILIC. Dargestellt ist der Massenübergang m/z 104/87 mit einem Laufmittel bestehend aus MeCN/NH₄HCO₃ 5 mM pH 7,8, 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 400 μ L/min und einem Injektionsvolumen von 10 μ L.

Die hier verwendete ZIC-pHILIC-Phase von Merck wies eine für unsere Zwecke zu hohe Affinität für polare Substanzen wie GABA (**1**), vor allem aber für die polaren Matrixbestandteile auf, sodass lange Laufzeiten nötig wurden. Außerdem ergab sich für diese Säule eine relativ kurze Standzeit, was sich durch einen starken Druckanstieg bemerkbar machte. Aus diesem Grund wurde darüber hinaus die YMC-Pack PVA-Sil-Phase (YMC Europe) auf Ihre Eignung hin untersucht.

3.1.3.4. YMC-Pack PVA-Sil

Die stationäre Phase der YMC-Pack PVA-Sil besteht aus Polyvinylalkohol-überzogenen, sphärischen Silicapartikeln. Im Gegensatz zu nicht-modifiziertem Siliciumdioxid sind die Hydroxylgruppen der PVA-Sil weniger acide als die der freien Silanolgruppen von underivatisiertem Siliciumdioxid. Dadurch wird die bei Siliciumdioxid oft beobachtete unspezifische Adsorption unterbunden, was eine schnellere, vollständige Elution einer Probe wahrscheinlicher macht und die Problematik eines „Carryovers“ reduzieren sollte.¹⁴⁰ Für die folgenden Untersuchungen wurde eine YMC-Pack PVA-Sil-Säule (5 µm, 12 nm, 50 x 3 mm i.d) verwendet.

3.1.3.4.1. Art und Zusammensetzung des Laufmittels

Wie bereits erwähnt ist es für die Ionisation des Analyten in der Ionenquelle des Massenspektrometers prinzipiell von Vorteil, wenn das Laufmittel leicht flüchtig ist und sich schnell verdampfen lässt. Für die Untersuchungen mit der YMC-Pack PVA-Sil wurden binäre Fließmittel aus Acetonitril bzw. Methanol und 10 mM Ammoniumacetatpuffer, pH 8, in variierenden Verhältnissen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt. Bei der Verwendung von Methanol als organischer Fließmittelkomponente konnte im Bereich von 70% bis 90% Methanol im Fließmittel keine Retention von GABA (**1**) erzielt werden, auch nicht durch Variation des pH-Wertes zwischen pH 4 und pH 8, siehe Kapitel 3.1.3.4.2 „pH-Abhängigkeit der YMC“ auf Seite 52, sodass der Analyt unmittelbar nach der Totzeit von der Säule eluiert wurde (siehe Abbildung 19, rote Kurve). Eine weitere Steigerung des Methanol-Anteils wurde nicht vorgenommen, da die mobile Phase einen gewissen Gehalt an Wasser haben muss, um die stationäre Phase ausreichend zu hydratisieren. Die Verwendung von Methanol im Laufmittel ist somit für die Analytik von GABA (**1**) auf der YMC-Pack PVA-Sil nicht geeignet. Wurde hingegen Acetonitril als organische Laufmittelkomponente verwendet, konnte abhängig vom Gehalt an Acetonitril eine Retention erreicht werden (siehe grüne Kurve in Abbildung 19). GABA (**1**) zeigte auf dieser Säule mit steigendem Anteil an Acetonitril eine stärkere Retention. Die durch die Matrix verursachte Suppression wurde bei diesen Untersuchungen nicht wie bei den Untersuchungen auf der ZIC-HILIC (siehe Kapitel 3.1.3.3 „ZIC-HILIC und ZIC-pHILIC“ auf Seite 36) durch den Massenübergang m/z 104/86 beobachtet, sondern direkt anhand des Suppressionsbauches, welcher sich bei dem Massenübergang m/z 104/87 beobachten ließ. Die Suppression des Massenüberganges m/z 104/87

folgte einem ähnlichen Retentionsverhalten wie GABA (1). Obwohl das Signal für GABA und die Matrixsuppression des Massenüberganges m/z 104/87 relativ nahe beieinander lagen, konnte eine ausreichende Trennung bei allen untersuchten Laufmittelverhältnissen für pH 8 der wässrigen Phase erzielt werden (vgl. grüne und orange Kurve in Abbildung 19).

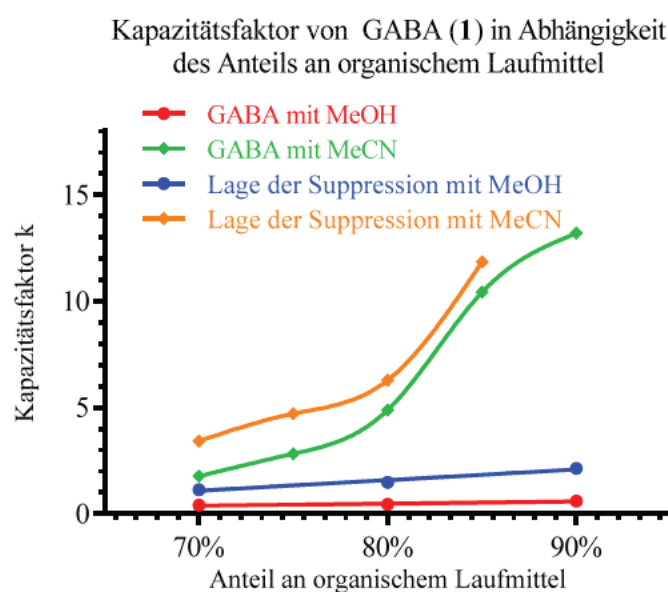


Abbildung 19: Abhängigkeit des Kapazitätsfaktors von GABA (1) vom Anteil organischen Laufmittels auf der YMC-Pack PVA-Sil 50 x 3 mm. Wässrige Phase: 10 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$, pH 8, organische Phase wie im Diagramm angegeben. Flussrate 800 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Auch ternäre Laufmittel bestehend aus einer Mischung aus MeCN/MeOH/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10 mM, pH 6,8 wurden untersucht. Dabei zeigte sich, dass bei einer teilweisen Substitution von MeCN durch MeOH der Kapazitätsfaktor von GABA (1) stark reduziert wurde (vergleiche rote mit grüner, bzw. blauer Kurve in Abbildung 20).

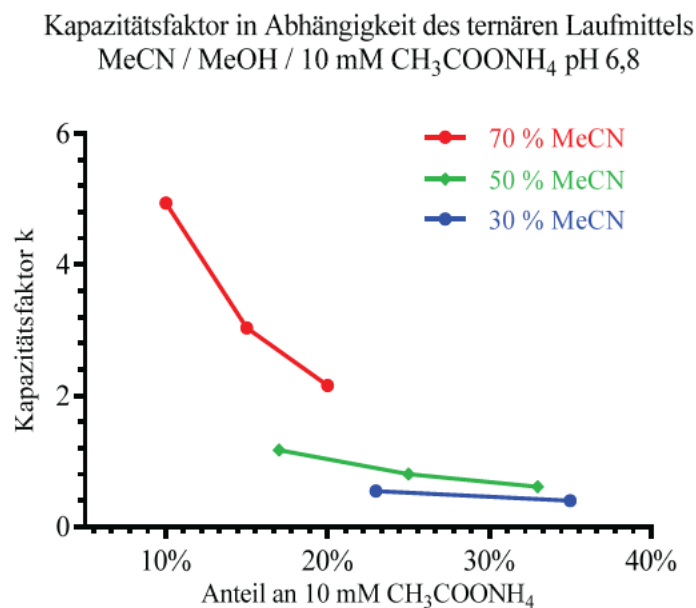


Abbildung 20: Einfluss ternärer Fließmittel bestehend aus MeCN/MeOH/CH₃COONH₄ 10 mM auf die Retention von GABA. Verhältnis MeCN/MeOH/CH₃COONH₄ rot: 70/(30-x)/x; grün: 50/(50-x)/x; blau: 30/(70-x)/x; jeweils (v/v/v).

3.1.3.4.2. pH-Abhängigkeit der YMC-Pack PVA-Sil

Die pH-Abhängigkeit der Retention von GABA (1) und der Suppression wurde auf der YMC-Pack PVA-Sil-Säule für Laufmittelzusammensetzungen von 70/30, 80/20 und 90/10 (v/v) MeOH/CH₃COONH₄ 10 mM bzw. MeCN/CH₃COONH₄ 10 mM untersucht. Wie auch bei der ZIC-HILIC-Säule konnte bei Verwendung der YMC-Pack PVA-Sil-Säule sowohl für MeOH als auch für MeCN als organischem Laufmittel kein Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase im Bereich von pH 4 bis pH 8 auf die Retention von GABA (1) beobachtet werden. Der Verlauf der pH-Abhängigkeit der wässrigen Phase des Laufmittels ist für eine Zusammensetzung von MeOH/CH₃COONH₄, 10 mM 70/30 (v/v) bzw. MeCN/CH₃COONH₄, 10 mM 70/30 (v/v) in Abbildung 21 wiedergegeben. Bei Verwendung von Acetonitril mit einem wässrigen Puffer bei ~pH 4 wurde das Signal von GABA (1) von der Matrixsuppression überlagert, was sich negativ auf die Signalintensität von GABA (1) auswirkte. Wurde der pH-Wert der wässrigen Phase angehoben, so trat die Matrixsuppression erst später auf, sodass GABA (1) vor dem Auftreten der Suppression eluiert wurde (vergleiche Abbildung 21 grüne und orange Kurve). Zwar eluierte GABA (1) mit MeOH als organischem Laufmittel fast unmittelbar nach der Totzeit ($k=0,3$; rote Kurve in Abbildung 21), jedoch trat die beobachtete Matrixsuppression des Messsignals m/z 104/87 ebenfalls deutlich früher auf, als bei der Verwendung von MeCN als organischem Laufmittel (siehe blaue Kurve in Abbildung 21), sodass es im untersuchten pH-Bereich nicht gelang, GABA (1) vollständig von dem Bereich der auftretenden Matrixsuppression abzutrennen.

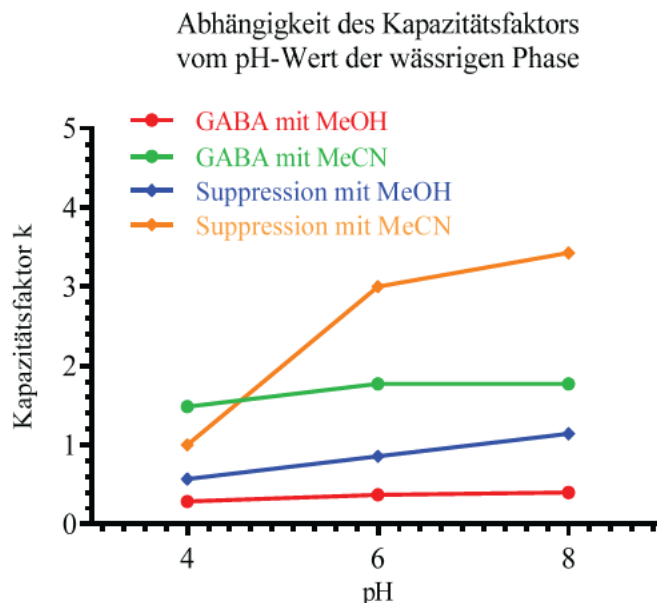


Abbildung 21: Abhängigkeit der Retention von GABA (1) und der Matrixsuppression auf der YMC-Pack PVA-Sil 50 x 3 mm vom pH-Wert der wässrigen Phase. Laufmittel: MeCN/CH₃COONH₄, 10 mM 70/30 (v/v) (grün und orange), bzw. MeOH/CH₃COONH₄, 10 mM 70/30 (v/v) (rot und blau).

Aufgrund der schnellen Elution von GABA (1) bei einer Laufmittelzusammensetzung von MeCN/CH₃COONH₄ 10 mM, 70/30 (v/v) welche bei pH 8 dennoch eine Abtrennung von der Suppression erlaubt (siehe Abbildung 21), wurde diese Zusammensetzung für die Quantifizierung von (²H₆)GABA (3) gewählt. Im Weiteren wurde 10 mM NH₄HCO₃ als Puffersalz der wässrigen Phase verwendet, da dies, wie auch bei der ZIC-*p*HILIC (siehe Kapitel 3.1.4.3 „TurboV-ESI“ auf Seite 67 und Abbildung 38 auf Seite 73) die Signalintensität von GABA (1) in der ESI-Quelle steigerte. Da eine Lösung von 10 mM NH₄HCO₃ einen pH-Wert von 7,8 hat und sich kein Unterschied zwischen der Verwendung von NH₄HCO₃ 10 mM bei pH 8 und pH 7,8 zeigte, wurde ein pH-Wert von 7,8 für die wässrige Phase gewählt, um das Einstellen des pH-Wertes mit NH₄OH-Lösung zu vermeiden.

3.1.3.4.3. Injektionsmedium

Wie auch für die ZIC-*p*HILIC-Säule wurde für die YMC-Pack PVA-Sil-Säule der Einfluss verschiedener Injektionsmedien auf die Peakform und Signalintensität untersucht. Auch für die YMC-Pack PVA-Sil-Säule war die Wahl des Injektionsmediums entscheidend für die Peakform und Intensität. So führte ein Injektionsmedium mit höherer Elutionskraft als der der mobilen Phase zu einer Peakdeformation und breiten, wenig intensiven Peaks (siehe Abbildung 22, MeOH/H₂O = 80/20 (v/v), rot) wohingegen scharfe, intensive Peaks bei einer Injektion von GABA (1) in einem Injektionsmedium geringerer Elutionskraft (MeCN/H₂O = 80/20, v/v) erzielt wurden (siehe Abbildung 22, blau).

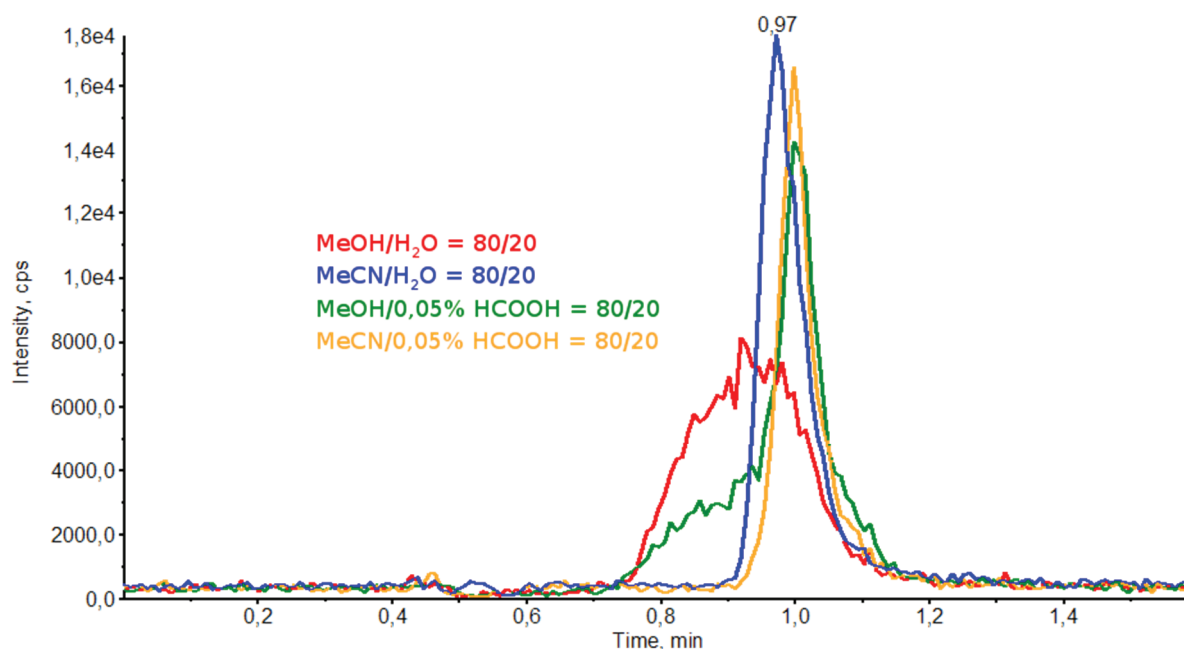


Abbildung 22: MRM-Chromatogramme von m/z 104/87 bei Injektion von 10 nM GABA (**1**) in verschiedenen Injektionsmedien auf der YMC-Pack PVA-Sil 50 x 3 mm mit einem Laufmittel bestehend aus MeCN/MeOH/ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 5 mM pH 6,8, 50/30/16 (v/v/v) bei einer Flussrate von 600 $\mu\text{L}/\text{min}$. Injektionsmedien jeweils 80/20 (v/v): Blau: MeCN/ H_2O ; rot: MeOH/ H_2O ; grün: MeOH/0,05% HCOOH, orange: MeCN/0,05% HCOOH.

Wurden dem Injektionsmedium 0,05% Ameisensäure zugesetzt, ergab sich für die Injektion in acetonitrilhaltiger Lösung kaum ein Unterschied (orange), wohingegen es bei der Injektion in methanolischem Medium zwar immer noch zu einem extremen Fronting des GABA-Peaks kam, jedoch ein Großteil der GABA (**1**) in einem intensiven Signal resultierte (grün). Dies zeigt, dass bei der Wahl des Injektionsmediums nicht nur das Verhältnis, sondern auch der pH-Wert der Injektionslösung einen Einfluss auf die Peakform haben kann.

3.1.3.4.4. Variation des Injektionsvolumens

Durch Steigerung des Injektionsvolumens konnte eine Steigerung der Signalintensität erreicht werden, die proportional zum Injektionsvolumen zunahm. In Abbildung 23 ist zu erkennen, dass mit zunehmendem Injektionsvolumen die Retentionszeit von (²H₆)GABA (**3**) konstant war und die Peakbreite erwartungsgemäß mit dem Injektionsvolumen zunahm. Außerdem lässt sich ein annähernd linearer Zusammenhang zwischen der Signalintensität von m/z 110/73 von (²H₆)GABA (**3**) und des Injektionsvolumens erkennen. Durch ein gesteigertes Injektionsvolumen wird allerdings auch mehr

Matrix auf die Säule aufgebracht, was die Standzeit einer Säule reduzieren kann. Aus diesem Grund wurde, da durch die Injektion von 10 µL Probe eine ausreichende Sensitivität erreicht wurde, dieses Injektionsvolumen für die weitere Entwicklung des MS-Transport-Assays gewählt, um die Robustheit der Analytik im Vergleich zu einem gesteigerten Injektionsvolumen nicht unnötig zu strapazieren. Es sei hier jedoch angemerkt, dass eine Steigerung des Injektionsvolumens durchaus genutzt werden kann, um die Sensitivität der Methode weiter zu steigern.

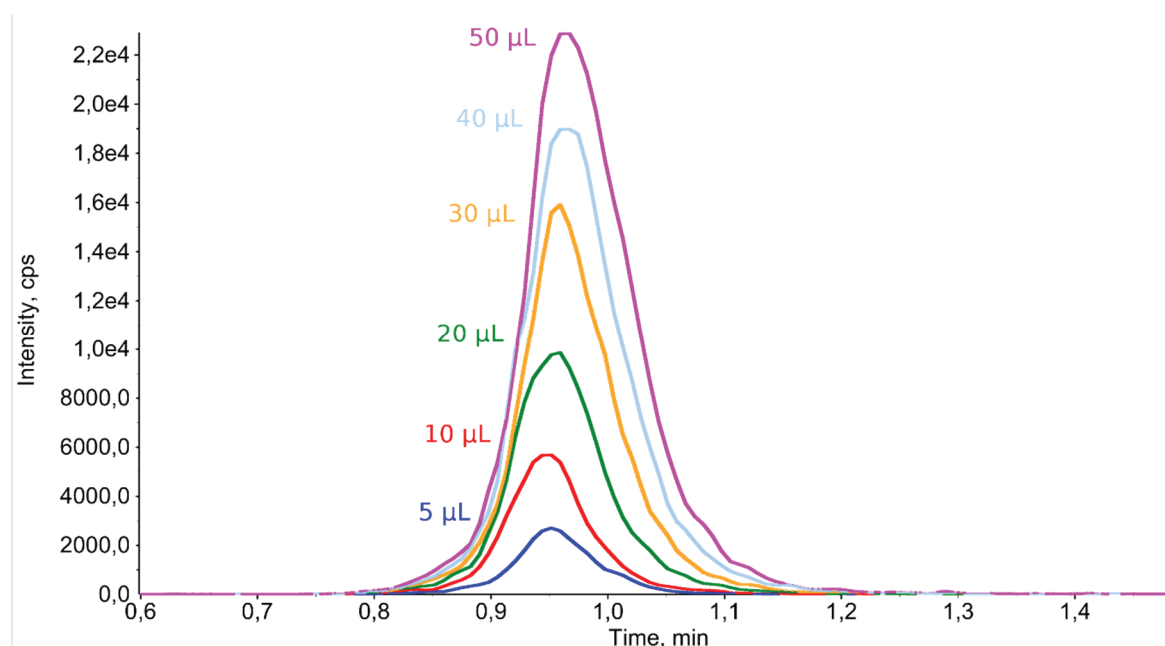


Abbildung 23: MRM-Chromatogramme von m/z 110/73 bei verschiedenen Injektionsvolumen einer Lösung von 20 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in MeCN/ H_2O 70/30 (v/v) auf der YMC-Pack PVA-Sil 50 x 2,1 mm mit einem Laufmittel bestehend aus MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM, pH = 7,8 70/30 (v/v) bei einer Flussrate von 600 µL/min am API 5000™ mit ESI-Quelle.

Die Untersuchungen zum Injektionsvolumen wurden nicht mehr auf der bisher verwendeten YMC-Pack PVA-Sil-Säule mit einer Dimension von 50 x 3 mm, sondern bereits auf der YMC-Pack PVA-Sil-Säule mit einer Dimension von 50 x 2,1 mm durchgeführt. Der geringere Säulendurchmesser hat mehrere Vorteile bei der Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**), was im folgenden Abschnitt behandelt wird.

3.1.3.4.5. Dimension der YMC-Pack PVA-Sil-Säule

Um die Analysenzeit zu verkürzen und den Lösemittelverbrauch zu reduzieren, wurde die bisher verwendete YMC-Pack PVA-Sil-Säule (50 x 3 mm) im Weiteren in einer Dimension von 50 x 2,1 mm verwendet, wodurch aufgrund des kleineren Innendurchmessers die Laufzeit und somit der

Lösemittelverbrauch um knapp 50% reduziert wurde. Für die nun verwendete YMC-Pack PVA-Sil (5 μ M, 12 nm) 50 x 2,1 mm wurde ebenfalls eine Flussrate von 600 μ L/min gewählt, bei der das Chromatographiesystem einen moderaten Druck von etwa 75 bar aufbaute und eine schnelle Analysenzeit von 3 Minuten erzielt werden konnte.

3.1.3.4.6. Matrixsuppression

Die Matrixsuppression unter den final gewählten Chromatographiebedingungen mit MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM, pH 7,8 70/30 (v/v) mit einer Flussrate von 600 μ L/min wurde durch ein Infusionsexperiment untersucht. Dabei wurden 10 μ L einer Matrixblank-Probe injiziert und mit Hilfe einer Spritzenpumpe über ein T-Stück kontinuierlich eine Lösung von 10 nM (²H₆)GABA (**3**) mit einer Flussrate von 10 μ L/min hinter der Säule in die Ionenquelle des API 3200™ infundiert. Der Verlauf der Signalintensität von (²H₆)GABA (*m/z* 110/73) ist in Abbildung 24 dargestellt. Darin erkennt man nach etwa 0.4 min eine starke Suppression, welche vermutlich durch den Injektionsprozess verursacht wird. Zur erwarteten Retentionszeit von GABA (0,9 min) ist keine Suppression zu beobachten. Erst nach etwa 1,5 min tritt eine weitere starke Signalsuppression auf, welche durch Matrixkomponenten verursacht wird. Diese beeinflusst die Analytik von GABA (**1**) aber nicht. Somit wurde eine Laufzeit für die Chromatographie auf der YMC-Pack PVA-Sil (5 μ m, 12 nm) 50 x 2,1 mm unter den oben angegebenen Bedingungen von 3 min gewählt, um Matrixbestandteile vollständig von der Säule zu eluieren, bevor eine weitere Messung durchgeführt wird.

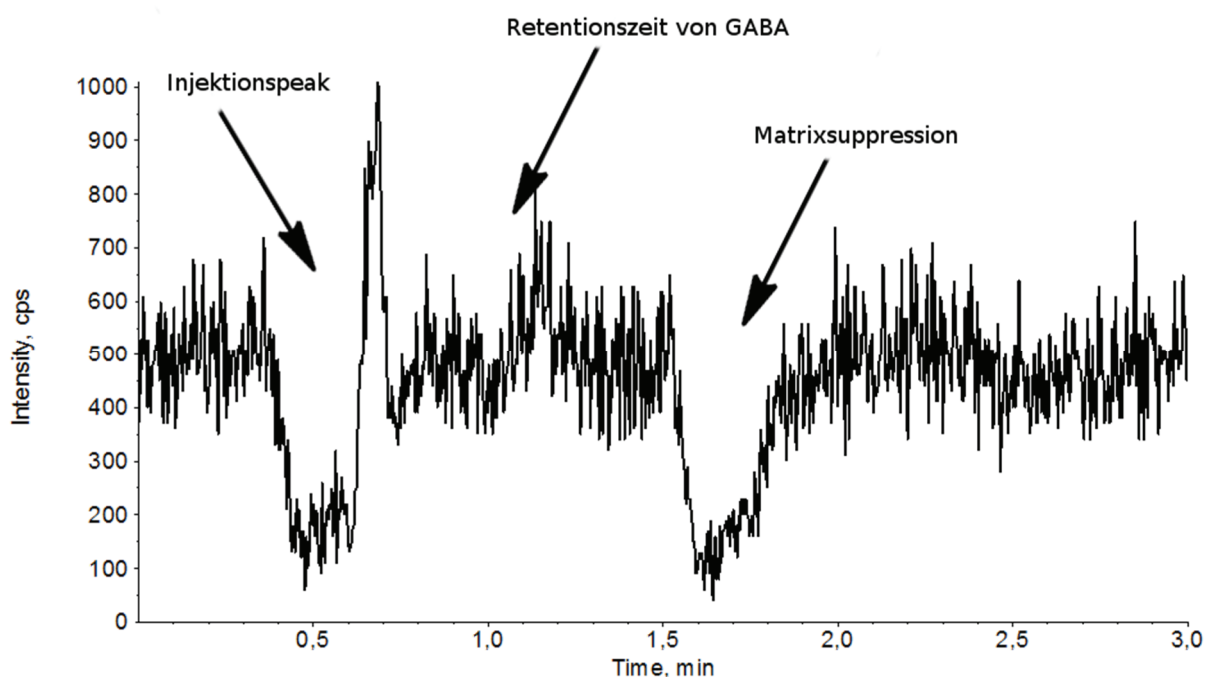


Abbildung 24: MRM-Chromatogramm zur Illustration des Matrixeffekts auf der YMC-Pack PVA-Sil 50x2,1mm mit einer mobilen Phase bestehend aus MeCN/NH₄HCO₃ 70/30 (v/v) mit einer Infusion von 10 μ L/min einer 10 nM GABA (**1**) am API 3200™ und Injektion eines Matrixblanks.

3.1.3.5. Untersuchung weiterer Säulen des YMC-Pack Column Development Kits (Pack Diol und Pack Polyamin-II) sowie der ZIC-cHILIC (Merck)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden auch die YMC-Pack Diol-Säule (5 μm , 6 nm 50 x 3 mm), die YMC-Pack Polyamin-II-Säule (5 μm , 12 nm 50 x 3 mm) und die ZIC[®]-cHILIC-Säule (3 μm , 100 Å, 50 x 2,1 mm; Merck) untersucht. Die YMC-Pack Polyamin-II-Säule in Kombination mit MeCN/CH₃COONH₄ 10 mM pH 6,8, 80/20 (v/v) als Laufmittel zeigte ein unerwartet hohes Hintergrundsignal für den Massenübergang m/z 104/87 (ca. 2×10^5 cps) und wurde deshalb von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

Die YMC-Pack Diol-Säule lieferte bei Verwendung von MeCN/CH₃COONH₄, 10 mM, pH 6,8, 80/20 (v/v) als Laufmittel symmetrische Peaks für GABA (**1**) bei einer Retentionszeit von etwa 2 min, allerdings waren dazu Laufzeiten von 4,5 min bei einer Flussrate von 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ nötig, um eine spät auftretende Suppression zu eluieren. Dies ist im Hinblick auf die spätere Anwendung als schnelle Analysenmethode zum Screening von Inhibitoren der GAT nachteilig.

Gleiches gilt auch für die ZIC-cHILIC Phase von Merck, welche zu dem Zeitpunkt der Entwicklung noch nicht auf dem Markt verfügbar war, aber dankenswerter Weise von der Firma SeQuant (heute Merck) zu Testzwecken kostenlos zur Verfügung gestellt wurde. Diese Phase weist im Gegensatz zur ZIC-HILIC Phase eine Modifikation mit Phosphorylcholin auf, welches der Phase ebenfalls eine zwitterionische Struktur verleiht, allerdings mit umgekehrter Polarität. Die ZIC-cHILIC Phase ist zusammen mit der ZIC-HILIC Phase in Abbildung 26 schematisch dargestellt.

Erwähnenswert ist bei der ZIC-cHILIC, dass bei Verwendung von MeCN/CH₃COONH₄, 10 mM, pH 6,8 80/20 (v/v) als Laufmittel eine beginnende Auftrennung der verschiedenen deuterierten GABA (**1**) Isotopologe beobachtet werden konnte, was in Abbildung 25 dargestellt ist. So kann man erkennen, dass GABA mit zunehmendem Deuterierungsgrad später eluiert wird. Aufgrund der längeren Laufzeiten und der bereits vorhandenen guten alternativen (ZIC-pHILIC und YMC-Pack PVA-Sil) wurden keine weiteren Untersuchungen mit diesen Säulenmaterialien durchgeführt.

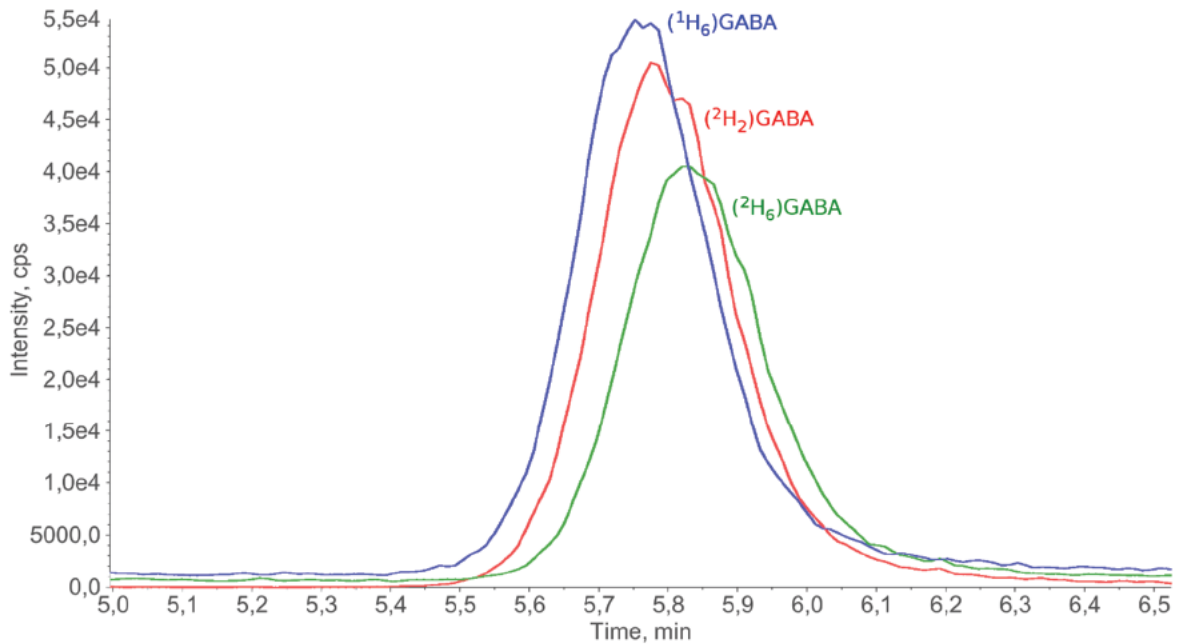


Abbildung 25: MRM-Chromatogramme für m/z 104/87 (blau), m/z 106/89 (rot) und m/z 110/93 (grün) auf der ZIC-cHILIC mit einer mobilen Phase bestehend aus MeCN/CH₃COONH₄ 10 mM, pH 6,8 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 300 μ L/min und einer Injektion von 10 μ L eines Lösemittelstandards mit jeweils 10 nM GABA (1), (²H₂)GABA (2) und (²H₆)GABA (3).

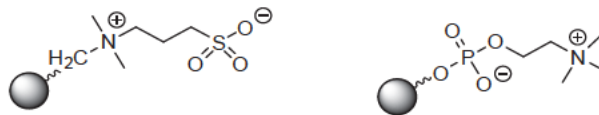


Abbildung 26: Schematische Darstellung der ZIC-HILIC- (links) und der ZIC-cHILIC-Phase (rechts)

3.1.3.6. Gegenüberstellung der finalen HPLC-Methoden für die Quantifizierung von (²H₆)GABA mit der ZIC-pHILIC und der YMC-Pack PVA-Sil

Die HPLC-Methoden zur Quantifizierung von GABA (1) aus Zellextrakten basierend auf der Verwendung der ZIC-pHILIC (siehe 3.1.3.3 „ZIC-HILIC und ZIC-pHILIC“ auf Seite 36) und der YMC-Pack PVA-Sil (siehe 3.1.3.4 „YMC-Pack PVA-Sil“ auf Seite 50) waren am vielversprechendsten. Beide Methoden sind mit ihren wichtigsten finalen Parametern in Tabelle 4 gegenübergestellt.

Bei Verwendung der YMC-Pack PVA-Sil ließ sich ein niedrigeres Quantifizierungslimit (LLOQ 200 pM) erreichen. Die mit 50 mm mehr als doppelt so lange Trennstrecke der YMC-Pack PVA-Sil (im Vergleich zu 20 mm der ZIC-pHILIC) erreichte dennoch nur vergleichbare Bodenzahlen und aufgrund des höheren wässrigen Anteils im Laufmittel vergleichbare Kapazitätsfaktoren. Der größere Anteil wässriger Phase bei Verwendung der YMC-Pack PVA-Sil schien für die spätere Probenvorbereitung interessant, da die

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Probe bei dieser Methode leichter in einem Laufmittel geringerer Elutionskraft eingesetzt werden kann, was entscheidend für eine gute Chromatographie ist (siehe Kapitel 3.1.3.3.5 „Untersuchungen zum Injektionsmedium“ auf Seite 49 und 3.1.3.4.3 „Injektionsmedium“ auf Seite 53).

Zu Beginn der Entwicklung des MS-Transport-Assays wurde die ZIC-*p*HILIC Säule zur Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) verwendet, jedoch zeigte sich, dass die ZIC-*p*HILIC Säule eine kurze Standzeit hatte und bereits nach etwa 2000 Proben durch einen massiven Druckanstieg unbrauchbar wurde. Bei Verwendung der YMC-Pack PVA-Sil konnten hingegen weit über 10.000 Proben mit einer Säule prozessiert werden, ohne Einbußen in der Leistungsfähigkeit der Methode zu beobachten. Schlussendlich wurde die YMC-Pack PVA-Sil Säule mit den in Tabelle 4 angegebenen Parametern für den MS-Transport-Assay verwendet und wie in Kapitel 3.3 „Validierung der Methode“ auf Seite 117 beschrieben validiert.

Tabelle 4: Gegenüberstellung der chromatographischen Parameter der ZIC-*p*HILIC und der YMC-Pack PVA-Sil.

Säule	ZIC- <i>p</i> HILIC	YMC-Pack PVA-SIL
Hersteller	Merck	YMC-Europe
Länge	20 mm	50 mm
Innendurchmesser	2,1 mm	2,1 mm
Trägermaterial	Polymer	Silica
Partikelmodifikation	Sulfobetain	Polyvinylalkohol
Partikelgröße	5 µm	5 µm
Porengröße	100 Å	120 Å
Totvolumen Säule	40 µL	60 µL
organische Phase	MeCN	MeCN
wässrige Phase	5 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 7,8	10 mM NH ₄ HCO ₃ , pH 7,8
Anteil organische Phase	80%	70%
Anteil wässrige Phase	20%	30%
Flussrate	400 µL/min	600 µL/min
Druck	~60 bar	~75 bar
LLOQ (S/N >10)	625 pM	200 pM
Kapazitätsfaktor von GABA	2,3	1,9
Bodenzahl N	~525	~560
Laufzeit	5 min	3 min

3.1.4. Kopplung von LC und MS

Die „Sampling Efficiency“ einer LC-MS-Methode ist einer der Parameter, die die Sensitivität einer Methode entscheidend beeinflussen. Sie drückt aus, wie viele der theoretisch vorhandenen Analytmoleküle schlussendlich das Massenspektrometer erreichen. Um die „Sampling Efficiency“ zu maximieren, ist neben einer effizienten Überführung der generierten Ionen in das Massenspektrometer ein möglichst effizientes Transferieren und Ionisieren der Analytmoleküle aus der Lösung in die Gasphase nötig. Für die Ionisation von freien Aminosäuren wird bei höheren Flussraten, wie sie in der LC typisch sind, generell eine bessere Sensitivität mit APCI Quellen erwartet.^{141,142} Ein Bericht von Kauppila et al. zeigte, dass sich GABA (**1**) mittels Dopant-Assisted-Atmospheric-Pressure-Photo-Ionisation (DA-APPI) für eine Vielzahl an Lösemittelzusammensetzungen effizienter ionisieren ließ, als mittels APCI oder ESI.¹⁴³

Das API 5000™ verfügt über drei API-Quellen, welche hinsichtlich ihrer Ionenausbeuten für GABA (**1**) bei verschiedenen Flussraten und Lösemittelzusammensetzungen untersucht wurden, um eine gute Ionenausbeute und somit eine gute Sensitivität der späteren Analytik zu gewährleisten. Alle drei Ionisationsquellen des API 5000™ sind technisch so realisiert, dass das entstehende Spray nicht direkt auf die Curtainplate des Massenspektrometers, sondern orthogonal dazu ausgerichtet ist, wie in Abbildung 34 auf Seite 69 für die ESI-Quelle schematisch dargestellt ist. Diese Bauart reduziert das Hintergrundrauschen sowie die Gefahr der Kontamination des Massenspektrometers. Außerdem sollte, um stabile und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, die verwendete Ionenquelle vor ihrer Benutzung ausreichend equilibriert und temperiert werden.

3.1.4.1. APCI-Quelle des API 5000™

Die „Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation“ (APCI) Ionenquelle des API 5000™ besteht aus einer Zerstäuberkammer, in der das Lösemittel bei hohen Temperaturen von etwa 300 °C bis 500 °C verdampft und mit Hilfe eines Zerstäubergases vernebelt wird. Dadurch wird der Analyt aus der Lösung in die Gasphase überführt und dort anschließend durch Gasphasenreaktionen mittels Entladung einer Corona-Nadel ionisiert. APCI Quellen eignen sich besonders zur Ionisation von neutralen und wenig polaren Analyten,¹⁴⁴ können aber auch zur Ionisation von Aminosäuren eingesetzt werden.^{141,142}

Die Eignung der APCI-Quelle zur Ionisierung von GABA (**1**) wurde anhand der Signalintensität von m/z 104/87 am API 3200™ untersucht. Dazu wurden verschiedene Volumen (2 µL, 5 µL, 10 µL, 15 µL, 20 µL und 25 µL) einer Lösung von 200 nM GABA (**1**) bei verschiedenen Flussraten (200 µL/min, 500 µL/min und 800 µL/min) nach dem Optimieren der Quellenparameter mittels des „Quantitative-Optimization-Modes“ der Analyst Software ohne Verwendung einer Säule vermessen. Zur Untersuchung des Einflusses der Flussrate wurde ein Laufmittel bestehend aus Methanol bzw.

Acetonitril und 0,1% HCOOH 50/50 (v/v) verwendet. Bei Verwendung von Methanol in der mobilen Phase nahm mit zunehmender Flussrate die Signalintensität zu, wie in Abbildung 27 am roten Verlauf zu erkennen ist. Die Peakfläche nahm bei der Steigerung der Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ deutlich zu, fiel bei einer weiteren Steigerung der Flussrate auf 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ allerdings wieder geringer aus als bei einer Flussrate von 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (blau). Wurde Acetonitril anstelle von Methanol im Laufmittel verwendet, so nahm bei einer Steigerung der Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ auf 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Signalintensität zwar zu, jedoch konnte diese durch eine weitere Erhöhung der Flussrate auf 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ nicht weiter gesteigert werden (Abbildung 27, rosa Verlauf). Außerdem nahm die Peakfläche bei steigenden Flussraten kontinuierlich ab (Abbildung 27, cyan), was sich negativ auf die Präzision der angedachten Quantifizierung von GABA (1) auswirken würde.

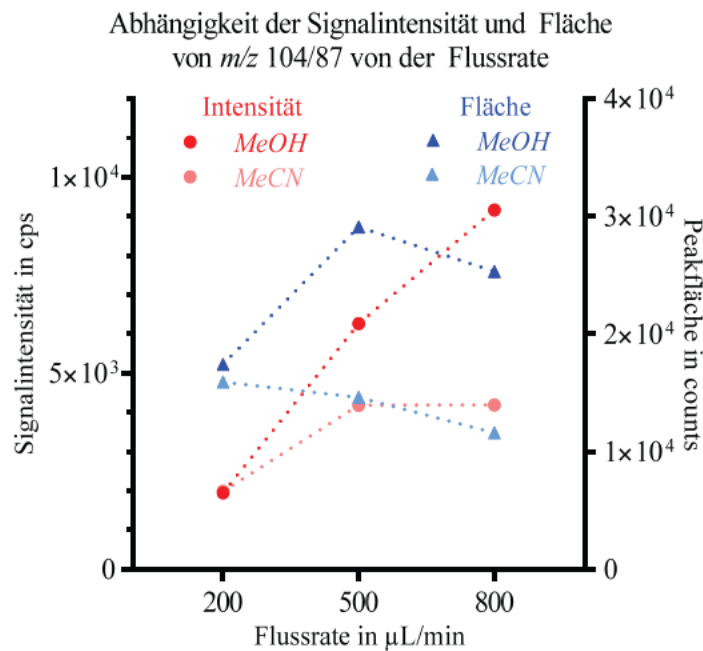


Abbildung 27: Abhängigkeit der Signalintensität und Peakfläche von der Flussrate bei Verwendung der APCI-Ionenquelle für die mobilen Phasen MeOH/0,1% HCOOH 50/50 (v/v) (rot und blau) und MeCN/0,1% HCOOH 50/50 (v/v) (rosa und cyan) bei einem Injektionsvolumen von 10 μL .

Der Einfluss eines erhöhten Injektionsvolumens wurde mit einem Laufmittel bestehend aus 0,1% HCOOH in MeOH bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ bzw. 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ untersucht. In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ die Peakfläche von m/z 104/87 mit steigendem Injektionsvolumen linear zunimmt (blau), wohingegen die Signalintensität zwar steigt, sich jedoch einer oberen Grenze annähert (rot). Dies ist aufgrund des Versuchsaufbaus, in dem die Lösung direkt in die APCI-Quelle geleitet und nicht über eine Säule chromatographiert wird auch zu erwarten, da sich

die Konzentration der Lösung nicht ändert, jedoch aufgrund des gesteigerten Injektionsvolumens ein breiteres Peakprofil resultiert. Steigert man hingegen die Flussrate auf 500 $\mu\text{L}/\text{min}$, so lässt sich kein Unterschied sowohl in der Signalintensität (rosa) als auch in der Peakfläche (cyan) bei Variation des Injektionsvolumens beobachten.

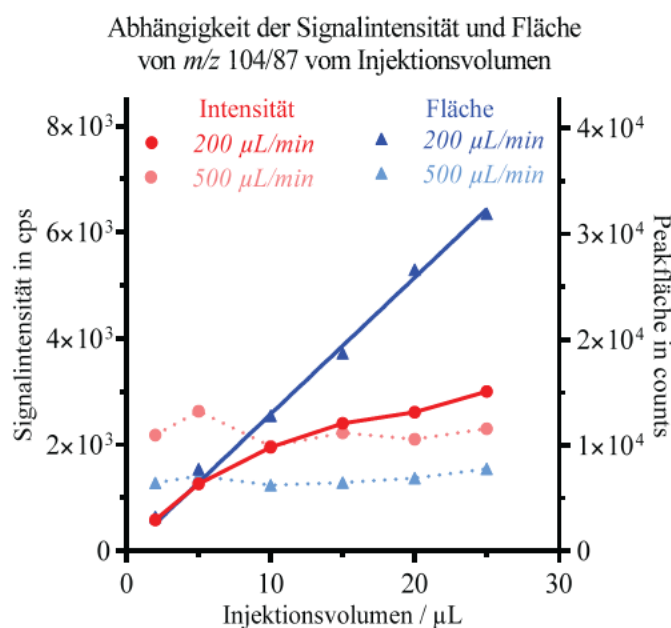


Abbildung 28: Abhängigkeit der Signalintensität und Peakfläche von m/z 104/87 vom Injektionsvolumen bei Verwendung der APCI-Quelle bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ (rot und blau) und 500 $\mu\text{L}/\text{min}$ (rosa und cyan) $\text{MeOH}+0,1\% \text{HCOOH}$.

Allgemein lieferte die Verwendung der APCI Quelle moderate Signalintensitäten und eine relativ instabile Ionisierung des Analyten, was in Abbildung 39 auf Seite 75 anhand der starken Signalschwankungen gut zu erkennen ist.

3.1.4.2. APPI-Quelle des API 5000™

Einen vergleichbaren Aufbau wie die APCI-Quelle hat die APPI-Quelle des API 5000™, welche anstelle einer elektrischen Entladung an einer Corona-Nadel die Moleküle durch das einstrahlen von UV-Licht einer Krypton-Lampe ionisiert. Die Besonderheit der Photoionisation liegt darin, kleine, wenig polare Substanzen, die sich schwer durch ESI oder APCI ionisieren lassen für die LC-MS Analytik zugänglich zu machen.¹⁴⁵⁻¹⁴⁷ Der Ionisationsprozess der Photoionisation lässt sich hauptsächlich durch zwei Phänomene beschreiben. Zum einen kann die Ionisation des Analyten durch einen „Charge-Transfer“ und zum anderen durch einen „Proton-Transfer“ erfolgen.¹⁴⁸ Bei einer direkten Ionisation des Analyten

mittels UV-Strahlung entsteht zuerst ein Radikalkation, welches in protischer Umgebung (MeOH, H₂O) ein Wasserstoffatom abstrahiert.¹⁴⁴ Die Ionenausbeute einer APPI-Quelle lässt sich durch Verwendung eines Dopants steigern, welches dem Zerstäubergas zugegeben und in einem ersten Schritt von der UV-Strahlung ionisiert wird. Anschließend kann das ionisierte Dopant durch eine chemische Ionisation den Analyten ionisieren.¹⁴⁵ Die Ionisation bei einer solchen Dopant-Assisted-APPI (DA-APPI) in Gegenwart von Acetonitril oder Methanol als Lösemittel wird durch den Prozess des Protonentransfers dominiert. Dabei werden bevorzugt Lösemittelcluster aus MeCN, bzw. MeOH durch das ionisierte Dopant (z.B. Toluol) protoniert, da die Protonenaffinitäten von MeCN- und MeOH-Clustern ausreichend hoch sind. Dabei wird das gesamte Dopant vom Solvens (d.h. MeCN oder MeOH) konsumiert. In einem weiteren Schritt wird dann ein Proton von den protonierten Lösemittelclustern auf den Analyten übertragen.¹⁴⁹ Die Gasphasenbasizität für GABA (**1**) wird von Kauppila et al. anhand von 1-Aminobutan mit 921,5 kJ/mol abgeschätzt,¹⁴³ was einer relativ hohen Protonenaffinität entspricht (vergleiche PA von MeCN: 779,2 kJ/mol; MeOH: 754,3 kJ/mol; NH₃: 853,6 kJ/mol).¹⁵⁰ Obwohl die Ionisierungsenergie von GABA (**1**) 9,6 eV beträgt,¹⁵¹ ließ sich GABA (**1**) unter den gegebenen Bedingungen nicht mit der in dieser Arbeit eingesetzte UV-Lampe der APPI-Quelle mit einer Ionisationsenergie von 10 eV direkt ionisieren. Deshalb wurden für die Ionisation von GABA (**1**) mit der APPI-Quelle sowohl Toluol (IE = 8,8 eV¹⁵²) als auch Aceton (IE = 9,7 eV¹⁵³) als Dopant eingesetzt. Dabei ließ sich kein Unterschied in der Effizienz der beiden eingesetzten Dopants erkennen. Die verwendeten Laufmittel lassen sich aufgrund ihrer hohen Ionisierungsenergien nicht direkt durch die UV-Strahlung ionisieren (MeOH: IE = 10,9 eV¹⁵⁴, MeCN: IE > 12 eV¹⁵⁵). Die Flussrate des Dopants sollte in etwa 1/10 der gesamten Flussrate betragen.¹⁵⁰ Bei der Verwendung einer Dopant-Assisted-APPI sollte bevorzugt eine HPLC-Pumpe mit Pulsationsdämpfer für geringe Flussraten zur Dosierung des Dopants genutzt werden, da zum einen das Dopant gegen den hohen Druck des Zerstäubergases gefördert werden muss, zum anderen, um ein Pulsieren des Signales zu vermeiden, wie es auch beim Tuning von Analyten mittels Spritzenpumpe auftreten kann (siehe Abbildung 7 auf Seite 31). Solche Pulsationen wurden bei Verwendung einer HPLC-Pumpe ohne Pulsationsdämpfer zur Zugabe des Dopants beobachtet und sind in Abbildung 29 für verschiedene Flussraten des Dopants Toluol dargestellt.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

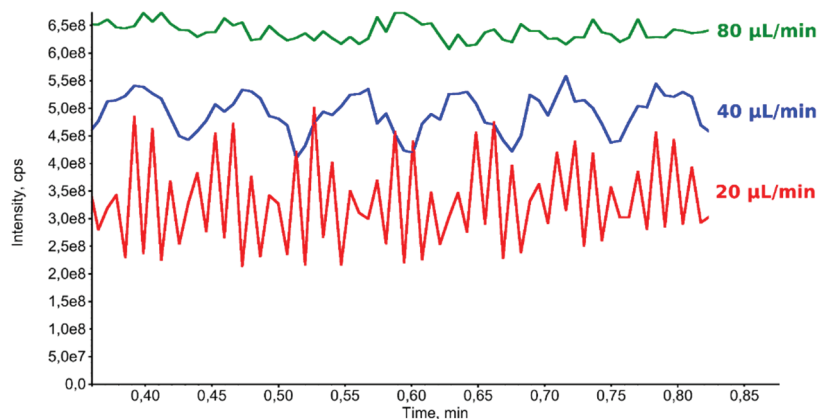


Abbildung 29: Total-Ion-Current (TIC) eines Q1-Scans von 50-250 Th bei einer Flussrate von 200 µL/min MeOH und variierenden Dopant-Flussraten von 20 µL/min (rot), 40 µL/min (blau) und 80 µL/min (grün) ohne Injektion einer Probe.

Das Verhalten der Photospray-Ionenquelle wurde für verschiedene Laufmittelkompositionen aus MeOH bzw. MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8 durch Injektion von 10 µL einer Lösung von 200 nM GABA (**1**) in entsprechendem Laufmittel unter Verwendung von Toluol als Dopant mit einer Dopant-Flussrate von 10% der verwendeten Flussrate untersucht, wobei ein volumenfreies Kopplungsstück anstelle einer Säule verwendet wurde. Außerdem wurden für jede verwendete Laufmittelkomposition die Quellenparameter mittels Flow-Injektion-Analyse (FIA) optimiert. Die Signalintensität von *m/z* 104/87 von GABA (**1**) war sowohl bei der Verwendung von Methanol als auch von Acetonitril als organischer Laufmittelkomponente von der Flussrate abhängig, und das Signal wurde mit zunehmender Flussrate intensiver, wie in Abbildung 30a und b dargestellt. Bei Verwendung von Acetonitril als organischer Laufmittelkomponente wurden im Vergleich zu Methanol deutlich intensivere Signale erhalten. Diese waren bei den Flussraten von 600 µL/min und 800 µL/min auch von der Komposition des Laufmittels abhängig, wobei die Signalintensität mit steigendem wässrigen Anteil am Laufmittel zunahm (siehe Abbildung 30a). Bei der Peakfläche von *m/z* 104/87 ergab sich ein weniger deutlicher Zusammenhang zur Flussrate (siehe Abbildung 30c und d). Bei Verwendung von Acetonitril schien die Peakfläche mit steigender Flussrate sogar leicht zuzunehmen (siehe Abbildung 30c), wohingegen die Peakfläche bei Verwendung von Methanol eher konstant blieb und sich kaum mit der Flussrate änderte, wobei für eine Flussrate von 400 µL/min ein leichtes Maximum beobachtet wurde (siehe Abbildung 30d).

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

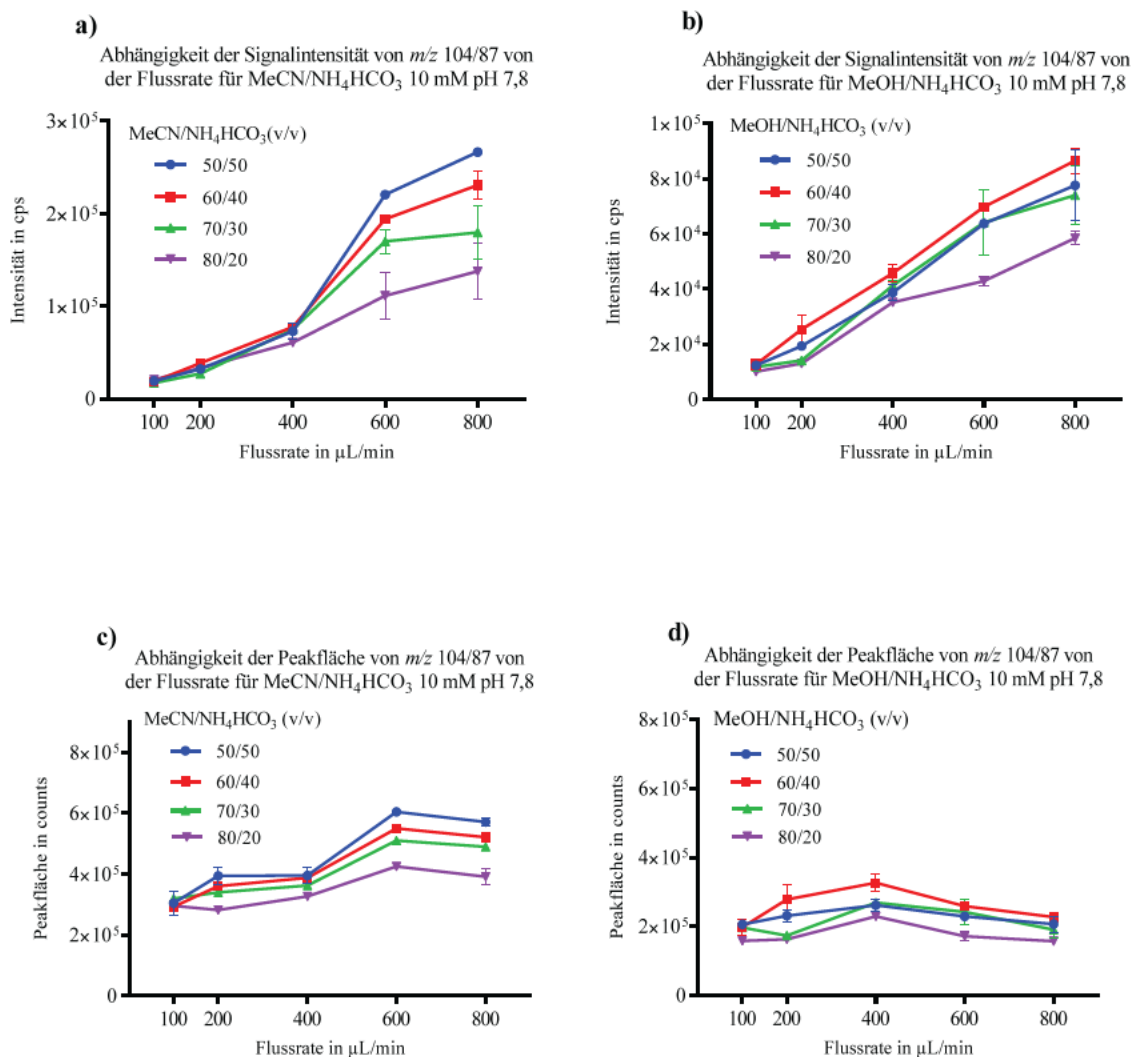


Abbildung 30: Abhängigkeit der Signalintensität und der Peakfläche von m/z 104/87 eines Lösemittelstandards mit 200 nM GABA (**1**) von der Flussrate bei Verwendung der DA-APPI-Quelle mit einer Dopant-Flussrate von 10% Toluol und einem Injektionsvolumen von 10 μ L. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten mit ihren Standardabweichungen. a) Signalintensität für verschiedene Verhältnisse von MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8; b) Signalintensität für verschiedene Verhältnisse von MeOH/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8; c) Peakfläche für verschiedene Verhältnisse von MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8; d) Peakfläche für verschiedene Verhältnisse von MeOH/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8.

In einem weiteren Experiment wurde die Abhängigkeit der Signalintensität und der Peakfläche von dem Anteil an Dopant im Zerstäubergas untersucht. Dazu wurden 10 μ L einer Lösung von 200 nM GABA (**1**) in entsprechendem Laufmittel bestehend aus MeOH/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8 bzw. MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM pH 7,8 70/30 (v/v) bei einer Flussrate von 600 μ L/min verwendet. Die Flussrate von Toluol als Dopant wurde von 10 μ L/min (1,6%) bis 250 μ L/min (41,6%) variiert. Dabei ergab sich, dass für die Ionisation von GABA (**1**) mittels DA-APPI eine Dopant-Flussrate von etwa 10% der Flussrate für ein maximales Signal sowohl bei der Verwendung von Methanol als auch von Acetonitril als organische Laufmittelkomponente ausreichend ist (Abbildung 31a bzw. b). Ein

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

geringerer Anteil an Dopant führt einerseits zu schlechten Signalintensitäten und zum anderen zu Pulsationen im Dopant-Fluss und somit zu Schwankungen des GABA-Signals, was eine präzise Quantifizierung erschwert (siehe Abbildung 29 auf Seite 64). Bei höheren Dopant-Flussraten nimmt die Signalintensität und Peakfläche ebenfalls ab, aber nur leicht.

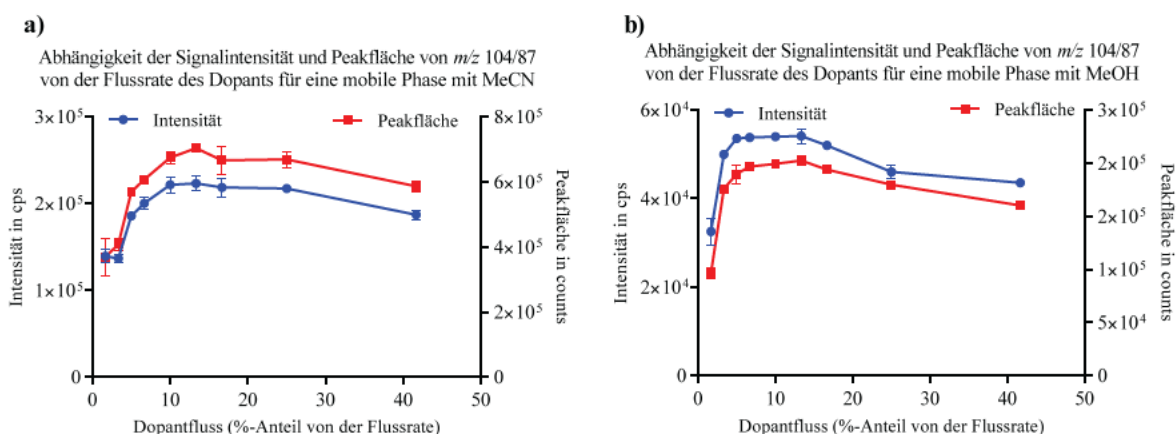


Abbildung 31: Abhängigkeit der Signalintensität und der Peakfläche von m/z 104/87 eines Lösemittelstandards von 200 nM GABA (**1**) von der Flussrate Toluol (Dopant) bei einer Flussrate der mobilen Phase von 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Injektionsvolumen von 10 μL . Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, $n=2$. a) mobile Phase bestehend aus MeCN/ NH_4HCO_3 10 mM, pH 7,8, 70/30 (v/v); b) mobile Phase bestehend aus MeOH/ NH_4HCO_3 10 mM, pH 7,8, 70/30 (v/v).

Die optimierten Quellenparameter für die verwendeten chromatographischen Methoden wurden per FIA bestimmt und sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 5: Optimierte Quellenparameter für die Ionisation von GABA (**1**) mit der Photospray-Ionenquelle

Parameter		ZIC-pHILIC 400 μL , org./wässr. 80/20 (v/v)	YMC-Pack PVA-Sil 600 μL , org./wässr. 70/30 (v/v)	
Schutzgas	CUR	20	20	psi
Kollisionsgas	CAD	5	5	psi
Zerstäubergas	GS1	50	50	psi
Trocknungsgas	GS2	15	15	psi
Ion-Transfer-Voltage	IS	750	750	V
Temperatur	TEM	350	500	$^{\circ}\text{C}$

Die Ionisation mit der Photospray-Quelle des API 5000™ lieferte somit bei einem Dopantfluss von 10% Toluol gute Signalintensitäten für GABA (**1**), welche bei einer Kopplung mit der ZIC-pHILIC Säule ein Quantifizierungslimit für GABA (**1**) in Lösemittelstandards von etwa 10 nM ($S/N > 10$, Abbildung 32a) und bei Kopplung mit der YMC-Pack PVA-Sil von etwa 2.5 nM ($S/N=8$, Abbildung 32b) erreichte.

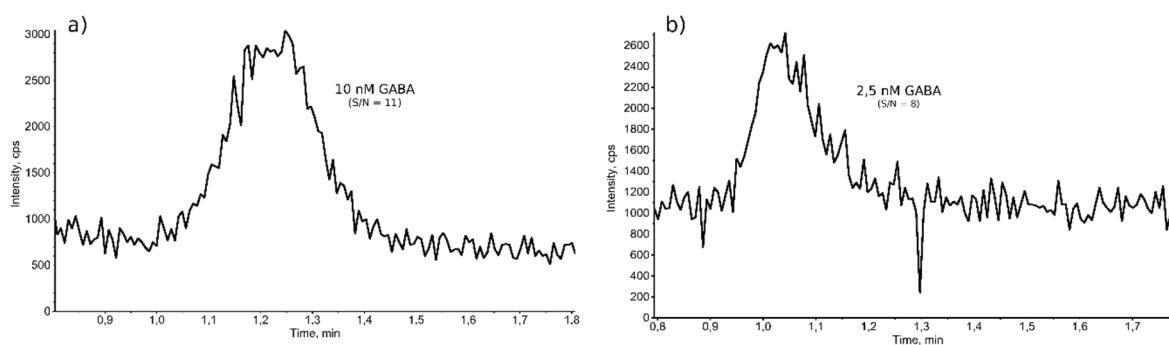


Abbildung 32: MRM-Chromatogramm von m/z 104/87 eines Lösemittelstandards von GABA (**1**) bei a) 10 nM auf der ZIC-pHILIC und bei b) 2.5 nM auf der YMC-Pack PVA-Sil (50 x 2,1 mm), unter den in Tabelle 4 auf Seite 59 angegebenen Bedingungen.

Die Photospray-Ionenquelle des API 5000™ ist für hohe Flussraten ($> 600 \mu\text{L}/\text{min}$) sehr gut geeignet und toleriert hohe wässrige Anteile im Laufmittel (Siehe Abbildung 30a und b). Bei geringeren Flussraten wie etwa die für die ZIC-pHILIC gewählten $400 \mu\text{L}/\text{min}$ ist die Intensität deutlich geringer.

3.1.4.3. TurboV-ESI-Ionenquelle des API 5000™

Die APCI Quelle des API 5000™ lässt sich durch Auswechseln der sogenannten „Probe“ (siehe Abbildung 34b auf Seite 69), einer Edelstahlkanüle, welche die Kapillare umfasst, in eine ESI-Quelle umwandeln. Das Prinzip der Elektro-Spray-Ionisation ist schon lange bekannt und beschrieben.¹⁵⁶⁻¹⁵⁸ Dabei bildet sich bei Anlegen eines elektrischen Feldes an der Spitze einer flüssigkeitsführenden Kapillare ein Konus, der sogenannte Taylor Konus. Ist das elektrische Feld groß genug, entsteht ein Jet welcher den Konus axial verlässt. Die entstehenden Flüssigkeitströpfchen tragen eine Vielzahl an Ladungen und werden im elektrischen Feld beschleunigt. Durch Verdampfen von Lösemittel nimmt der Durchmesser der Lösemitteltröpfchen ab, wobei die verbleibende Ladungsdichte des Tröpfchens zunimmt. Ist eine gewisse Ladungsdichte erreicht, kommt es aufgrund der abstoßenden Kräfte gleicher Ladung zur Coulomb-Explosion des Tröpfchens.

Die ESI-Quelle bringt den Analyten ausgehend von Ionen in Lösung in die Gasphase, wohingegen APPI- oder APCI-Ionenquellen den Analyten erst in der Gasphase ionisieren. Bei ESI-Quellen wird die Bildung

des Analytens in der Gasphase abhängig von den Moleküleigenschaften durch verschiedene Modelle beschrieben.¹⁵⁹ Das Charge-Residue-Model besagt, dass die Solvathülle um das Analytmolekül so lange verdunstet, bis nur noch der Analyt zurückbleibt und die Ladungen trägt. Dieses Modell scheint eher bei großen Molekülen, wie Proteinen gültig zu sein, welche eine Mehrfachladung erlauben. Für kleinere Moleküle scheint das Ion-Evaporation-Model zutreffender zu sein. Dabei geht man davon aus, dass das entsprechende Analyt das Tröpfchen in die Gasphase verlässt. Beide Modelle sind in Abbildung 33 schematisch dargestellt.

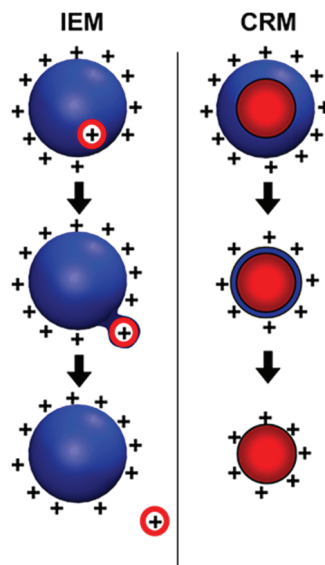


Abbildung 33: Ion-Evaporation-Model (IEM) und Charge-Residue-Model (CRM). Modifiziert nach Konermann et al.¹⁵⁹

ESI erzeugt typischerweise mehrfach geladene Analytionen, sofern dies möglich ist, was den weit verbreiteten Einsatz in der Proteinanalytik erklärt. Bei pneumatisch-unterstützten ESI-Quellen, wie der hier vorliegenden TurboV®-Ionenquelle, wird dieser Prozess durch die Zerstäubung der Flüssigkeit mit Hilfe von Gas unterstützt. Der Ionisationsprozess dieser ESI-Quelle ist in Abbildung 34a schematisch dargestellt. Die TurboV®-Ionenquelle des API 5000™ besteht aus einer Kapillare, welche in einen Probenkopf gefasst ist. Entlang des Probenkopfes wird das Zerstäubergas GS1 geleitet (siehe Abbildung 34), welches eine pneumatische Zerstäubungshilfe darstellt. Zusätzlich wird das entstandene Spray von zwei Heißluftföns mit Stickstoff getrocknet (GS2), um die Ionisation des Analyten zu unterstützen. Ein für die Ionisation in der ESI-Quelle wichtiger Parameter ist die sogenannte Ionisationsspannung, welche typischerweise in einem Bereich von 1-5 kV liegt. Jedoch ist nicht alleine die Spannung zwischen ESI-Kapillare und Curtainplate entscheidend für den Ionisationsprozess, sondern viel mehr das elektrische Feld, welches dadurch erzeugt wird. Da bei einer Vielzahl von ESI-Ionenquellen ein

inhomogenes Feld erzeugt wird (ESI-Kapillarenspitze zur Curtainplate) kann es besonders beim Arbeiten im negativen Ionisationsmodus zum Austritt von Elektronen aus der ESI-Kapillare kommen, da die Feldstärke dort am größten ist. Somit kann es zu einer elektrischen Entladung zwischen ESI-Kapillare und Curtainplate kommen, die folglich ein instabiles Spray und somit eine stark schwankende Ionenausbeute verursachen würde.

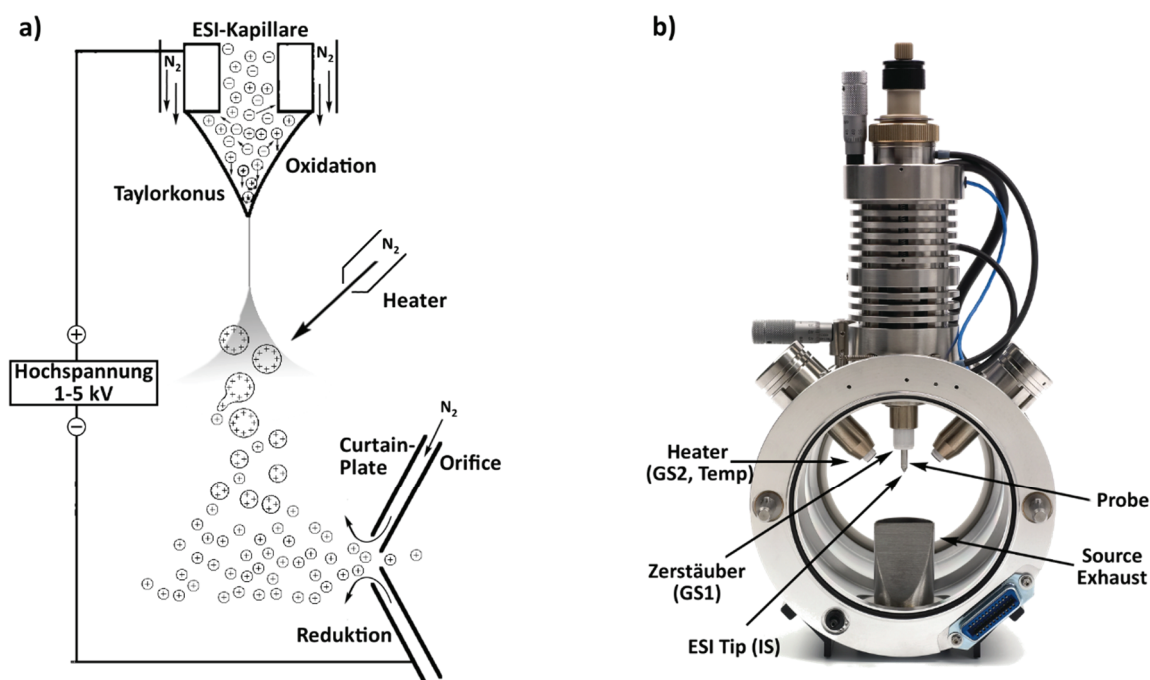


Abbildung 34: a) Schematische Darstellung einer pneumatisch unterstützten ESI. Modifiziert nach¹⁵⁸ b) Photographie der verwendeten TurboV®-Ionenquelle mit ESI-Probenkopf.

Zur Untersuchung der Eigenschaften der verwendeten TurboV®-ESI-Ionenquelle wurden 10 µL einer Lösung von 100 nM GABA (1) in entsprechendem Laufmittel mittels eines totvolumenfreien Kopplungsstückes, welche die Säule ersetzte, bei verschiedenen Flussraten von 200 µL/min bis 800 µL/min und Laufmittelkompositionen von MeOH/NH₄HCO₃ 10 mM pH 7,8 bzw. MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM, pH 7,8 von 60/40, 70/30 und 80/20 (v/v) analysiert. Für jede Flussrate und Laufmittelkomposition wurden im Vorfeld die Quellenparameter mittels FIA optimiert. Bei Verwendung von MeCN als organischer Laufmittelkomponente wurden im Vergleich zu MeOH allgemein deutlich höhere Signalintensitäten erhalten (vergleiche Signalintensitäten in Abbildung 35a mit b). Bei MeCN wurde eine deutliche Steigerung der Signalintensität bei Verdopplung der Flussrate von 200 µL/min auf 400 µL/min für alle Laufmittelkompositionen beobachtet, jedoch ließen sich diese

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

nicht durch eine Erhöhung der Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ bis 800 $\mu\text{L}/\text{min}$ weiter steigern (siehe Abbildung 35a), wohingegen die Peakfläche mit steigender Flussrate abnahm (siehe Abbildung 35c). Das auffällig andere Verhalten der Signalintensität und der Peakfläche bei einer Flussrate von 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ für die Laufmittelzusammensetzungen MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM, pH 7,8 70/30 und 80/20 (v/v) liegt vermutlich an einem instabilen Spray der ESI-Quelle, welches sich durch ein extrem verrauschtes, schwankendes Signal äußerte (siehe Abbildung 36). Wurde MeOH als organische Fließmittelkomponente gewählt, so ließ sich kaum ein Unterschied in der Signalintensität von GABA (**1**) für alle untersuchten Flussraten und Lösemittelzusammensetzungen beobachten, wohingegen die Peakflächen kontinuierlich mit steigender Flussrate abnahmen (siehe Abbildung 35b und d). Einzig für die Laufmittelzusammensetzung von MeOH/ NH_4HCO_3 , 10 mM, pH 7,8 60/40 (v/v) ist eine leicht reduzierte Signalintensität zu beobachten.

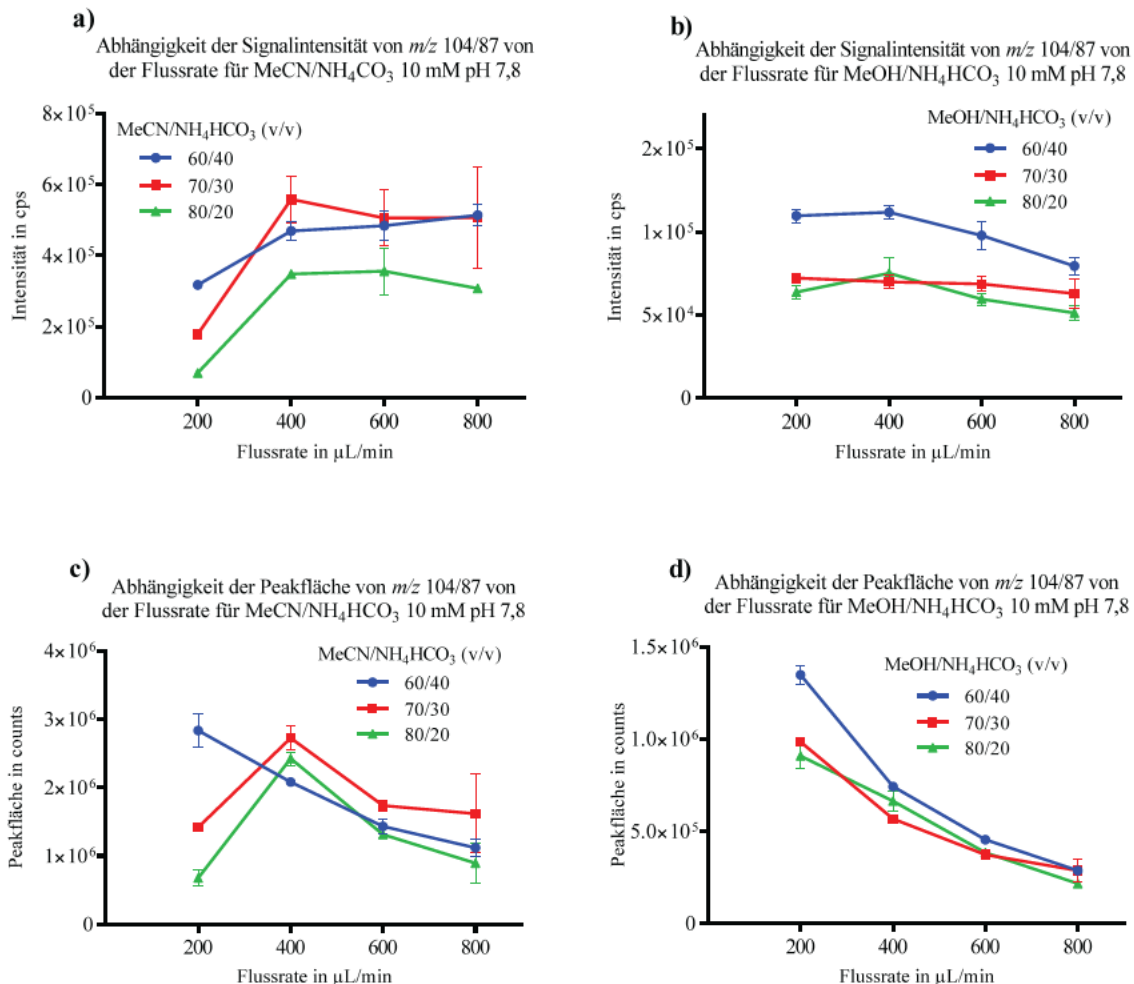


Abbildung 35: Abhängigkeit der Signalintensität und der Peakfläche von m/z 104/87 eines Lösemittelstandards mit 100 nM GABA (**1**) von der Flussrate bei Verwendung der ESI-Quelle und einem Injektionsvolumen von 10 μL . Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten mit ihren Standardabweichungen. a) Signalintensität für verschiedene Verhältnisse von MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8; b) Signalintensität für verschiedene Verhältnisse von MeOH/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8; c) Peakfläche für verschiedene Verhältnisse von MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8; d) Peakfläche für verschiedene Verhältnisse von MeOH/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

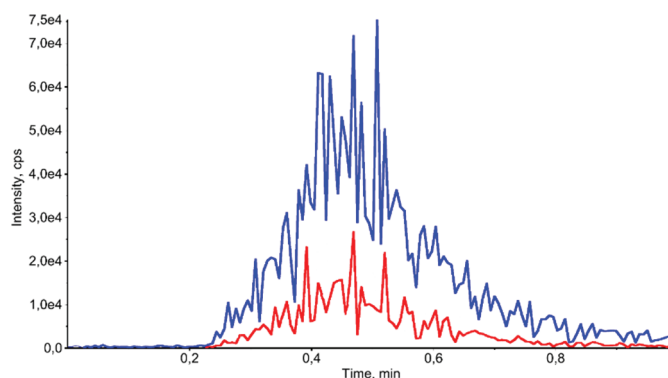


Abbildung 36: Signal einer Probe von 100 nM GABA (1) bei Verwendung der ESI-Quelle mit einem Fließmittel aus MeCN/NH₄HCO₃ 10 mM, pH 7,8 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 200 µL/min. blau: m/z 104/87, rot: m/z 104/86.

Wie bereits erwähnt erzeugt die ESI Gasphasen-Ionen ausgehend von Ionen in Lösung, weswegen der Einfluss des pH-Wertes der wässrigen Phase des Laufmittels auf die Signalintensität von m/z 104/87 von GABA (1) im Bereich von pH 3,6 bis pH 9,7 bei einer Laufmittelzusammensetzung von MeOH/HCOONH₄ 10 mM bzw. MeCN/HCOONH₄ 10 mM 70/30 (v/v) bei einer Flussrate von 600 µL/min untersucht wurde. Bei pH 3,6 der wässrigen Phase des Laufmittels liegt GABA (1) überwiegend als Kation, bei pH 9,7 teilweise als Anion vor (siehe Abbildung 9 auf Seite 35). Mansoori et al. konnten keinen starken Einfluss des pH-Wertes auf die Ionisation von Aminosäuren beobachten¹³⁹ und erzielten vergleichbare Signalintensitäten bei Verwendung saurer und basischer pH-Werte. Aufgrund der unerwartet guten Ionisation dieser Aminosäuren im basischen Milieu, bezeichneten sie die Ionisation im ESI(+)-Modus, bei dem bevorzugt $[M+H]^+$ -Ionen entstehen in Kombination mit basischen Fließmitteln als „Wrong-way-round ESI“.

Bei der Verwendung von MeCN als organischer Laufmittelkomponente ergab sich ein klarer Zusammenhang zwischen dem pH-Wert der wässrigen Phase und der Signalintensität sowie der Peakfläche von m/z 104/87 von GABA. Die Intensität und Fläche des Signals nahmen durch eine Erhöhung des pH-Wertes von 3,6 auf 6,3 nur leicht ab. Wurde der pH-Wert jedoch weiter erhöht, so nahm die Intensität und Fläche des Signals deutlich zu, wie in Abbildung 37a dargestellt. Dennoch ist ein pH-Wert von 6,3 welcher die geringste Signalintensität lieferte nicht uninteressant, da zwar die Signalintensität im Vergleich zu pH 3,6 deutlich geringer ist, das Hintergrundrauschen für m/z 104/87 jedoch ebenfalls derart reduziert ist, dass ein vergleichsweise gutes Signal-zu-Rausch-Verhältnis erzielt werden konnte (siehe Abbildung 37a, grüne Kurve).

Ein ähnliches wenn auch weniger stark ausgeprägtes Verhalten ließ sich bei der Verwendung von Methanol als organischer Laufmittelkomponente beobachten (siehe Abbildung 37b). Auch hier wurde bei pH 6,3 die geringste Intensität und Fläche des Signals mit dennoch bestem S/N erzielt. Die

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Intensitäten und Flächen der Signale bei basischen pH-Werten waren höher als bei neutralen oder sauren pH-Werten, jedoch waren die Intensitäten und Flächen der Signale für pH 7,8 und 9,7 annähernd gleich, sodass im Gegensatz zur Verwendung von MeCN (vergleiche Abbildung 37a) keine weitere Steigerung des Signals durch eine stark basische mobile Phase erzielt werden konnte.

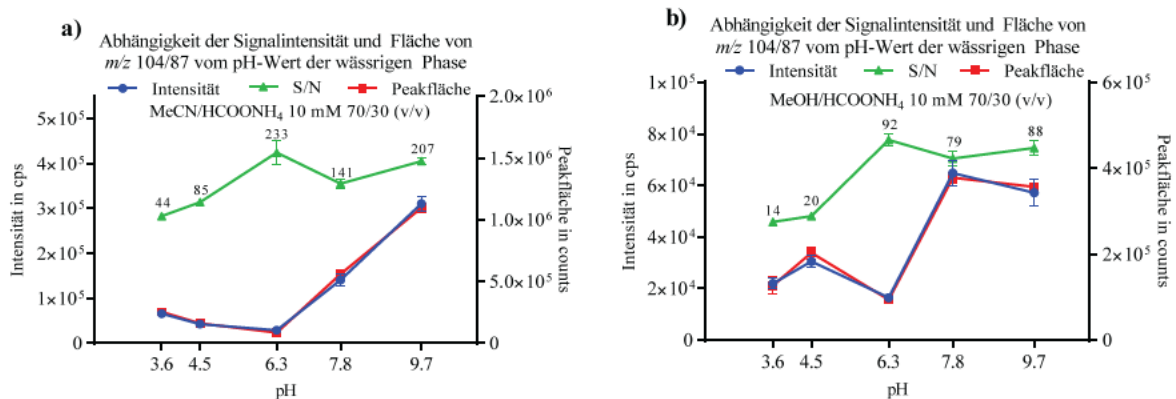


Abbildung 37: Abhängigkeit der Signalintensität und der Peakfläche vom pH-Wert der wässrigen Phase. Dargestellt sind die Mittelwerte von Duplikaten mit ihren Standardabweichungen. a) mobile Phase MeCN/HCOONH₄ 10 mM; b) MeOH/HCOONH₄ 10 mM.

Die Ionisation von GABA (1) mit der ESI-Quelle lieferte bei der Verwendung von Formiat-Puffer mit basischen pH-Werten die besten Ergebnisse. Allerdings war eine deutlich gesteigerte Signalintensität bei Verwendung von Ammoniumhydrogencarbonat-Puffer pH 7,8 zu beobachten (vergleiche Abbildung 35a auf Seite 70 (rote Kurve bei 600 µL/min, Intensität: 5x10⁵) mit Abbildung 37a (blaue Kurve bei pH 7,8, Intensität: 1,4x10⁵)). Dieser Effekt ist in Abbildung 38 anhand einer Lösemittel-Kalibrierung für (²H₆)GABA (3) *m/z* 110/73 auf der ZIC-pHILIC nochmals verdeutlicht, in der Ammoniumformiat, Ammoniumacetat und Ammoniumhydrogencarbonat als Additive der wässrigen Phase miteinander verglichen werden. Der bei dieser Untersuchung verwendete Massenübergang *m/z* 110/73 des (²H₆)GABA (3) ist derjenige, welcher für die Quantifizierung transportierten Substrates verwendet wurde.

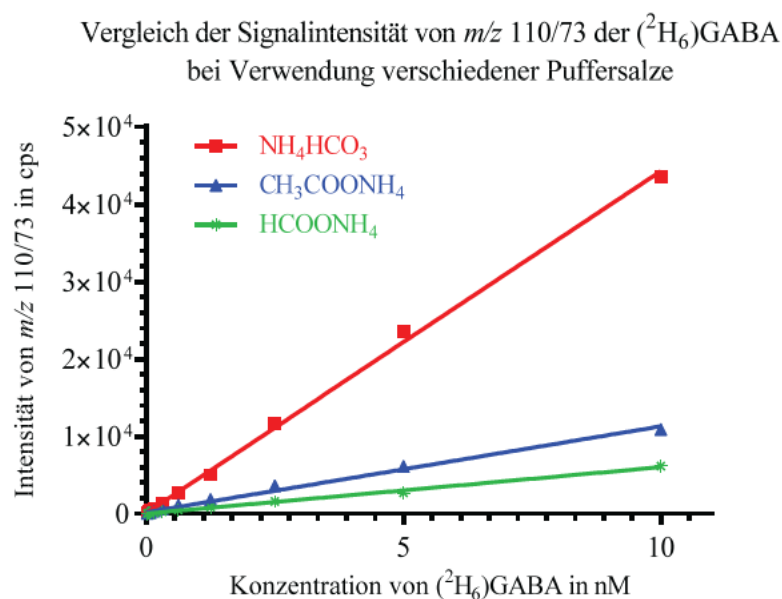


Abbildung 38: Kalibriergeraden für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in Lösemittelstandards auf der ZIC-pHILIC mit verschiedenen Puffersalzen in der mobilen Phase bei pH 7,8. Laufmittel: MeCN/5 mM Puffer 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 400 $\mu\text{L}/\text{min}$ und einem Injektionsvolumen von 30 μL bei Verwendung der ESI-Ionenquelle.

Aufgrund der besseren Signalintensität von m/z 110/73, wurde NH_4HCO_3 , 10 mM, pH 7,8 als wässrige mobile Phase verwendet. Zur Optimierung der Quellenparameter der TurboV ESI-Quelle des API 5000™ wurden 10 μL einer Lösung von 100 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in Acetonitril/Wasser (70/30, v/v) mehrfach hintereinander injiziert und die Quellenparameter in jedem Lauf im „Quantitative-Optimisation-Mode“ der Analyst Software variiert. Dabei wurde jeder Parameter im Duplikat vermessen. Die optimierten Quellenparameter für eine Laufmittelzusammensetzung von MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8, 70/30 (v/v) bei einer Flussrate von 600 $\mu\text{L}/\text{min}$ sind in Tabelle 6 angegeben.

Tabelle 6: Optimierte Quellenparameter der ESI-Quelle.

Parameter			
Schutzgas	CUR	20	psi
Kollisionsgas	CAD	5	psi
Zerstäubergas	GS1	55	psi
Trocknungsgas	GS2	50	psi
Ionisationsspannung	IS	1000	V
Temperatur	TEM	650	°C
Auflösung	res	unit	

3.1.4.4. Zusammenfassung und Vergleich der verwendeten API-Quellen

GABA ließ sich mit allen verwendeten API-Quellen ionisieren, wobei sich mit den unterschiedlichen Ionenquellen unterschiedliche Signalintensitäten erzielen ließen. Außerdem wiesen die verschiedenen Ionenquellen eine unterschiedliche Selektivität für verschiedene Substanzen auf, sodass Bestandteile aus der HEK-Zellmatrix unterschiedlich stark ionisiert wurden. Dies lässt sich in Abbildung 39 erkennen, welche die MRM-Chromatogramme einer Probe bestehend aus einer HEK-Zellmatrix mit zusätzlich 100 nM GABA (**1**), die mit Hilfe der drei API-Quellen erhalten wurden, miteinander vergleicht. Vergleicht man die MRM-Chromatogramme der APPI-Quelle und der APCI-Quelle, lässt sich die Ähnlichkeit der beiden Quellen in Bezug auf die Ionisation von Substanzen erkennen, welche sich deutlich von derjenigen der ESI-Quelle unterscheiden. So wird mit der APPI- und der APCI-Quelle bei 0.8 min ein Signal für m/z 104/86 (rot) und m/z 104/45 (grau) beobachtet, wohingegen zu dieser Retentionszeit eine Suppression aller MRM-Übergänge in der ESI-Quelle auftritt. GABA (**1**) wird von allen drei API-Quellen ionisiert (2.3 min), allerdings folgt dem GABA (**1**) Signal sowohl bei Verwendung der APPI- als auch der APCI-Quelle ein intensives Signal für m/z 104/87, 104/86 und 104/69 (3,3 min), wohingegen ein nur geringes Signal für m/z 104/86 bei der ESI-Quelle beobachtet wird. Des Weiteren liefert die ESI-Quelle ein intensives Signal für m/z 104/45 zwischen 4 und 5.5 min, welches weder mit der APCI noch mit der APPI erfasst werden kann.

Die APCI-Quelle lieferte im Vergleich zu den anderen beiden verwendeten Ionenquellen die geringsten Signalintensitäten für GABA (**1**) m/z 104/87, welche zusätzlich durch ein starkes Rauschen charakterisiert waren. Mit der DA-APPI konnte GABA (**1**) besonders bei hohen Flussraten und Fließmitteln mit hohen wässrigen Anteilen gut ionisiert werden. Allerdings birgt die Verwendung der DA-APPI-Quelle einen kleinen Nachteil, welcher den Einsatz der DA-APPI-Quelle einschränkt. Die in dieser Arbeit verwendete Dopant-Pumpe ließ sich nicht über den Computer kontrollieren, was insbesondere bei Routinemessungen und Messungen über Nacht einen Nachteil darstellt.

Die besten Ionenausbeuten für GABA (**1**) m/z 104/87 konnten mit der ESI-Quelle für einen großen Bereich an Flussraten bei basischen pH-Werten erzielt werden, wobei die Verwendung von NH_4HCO_3 in der wässrigen Phase die Ionisation von GABA (**1**) positiv beeinflusste. Da die ESI-Quelle sowohl bei einer Laufmittelzusammensetzung von MeCN/ NH_4HCO_3 10 mM, pH 7,8 70/30 als auch 80/20 (v/v), wie sie für die Chromatographie mit der YMC-Pack PVA-Sil bzw. ZIC-pHILIC verwendet werden, die besten Signalintensitäten für GABA (**1**) erzielte, wurde diese Ionenquelle für den geplanten MS-Transport-Assay verwendet.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

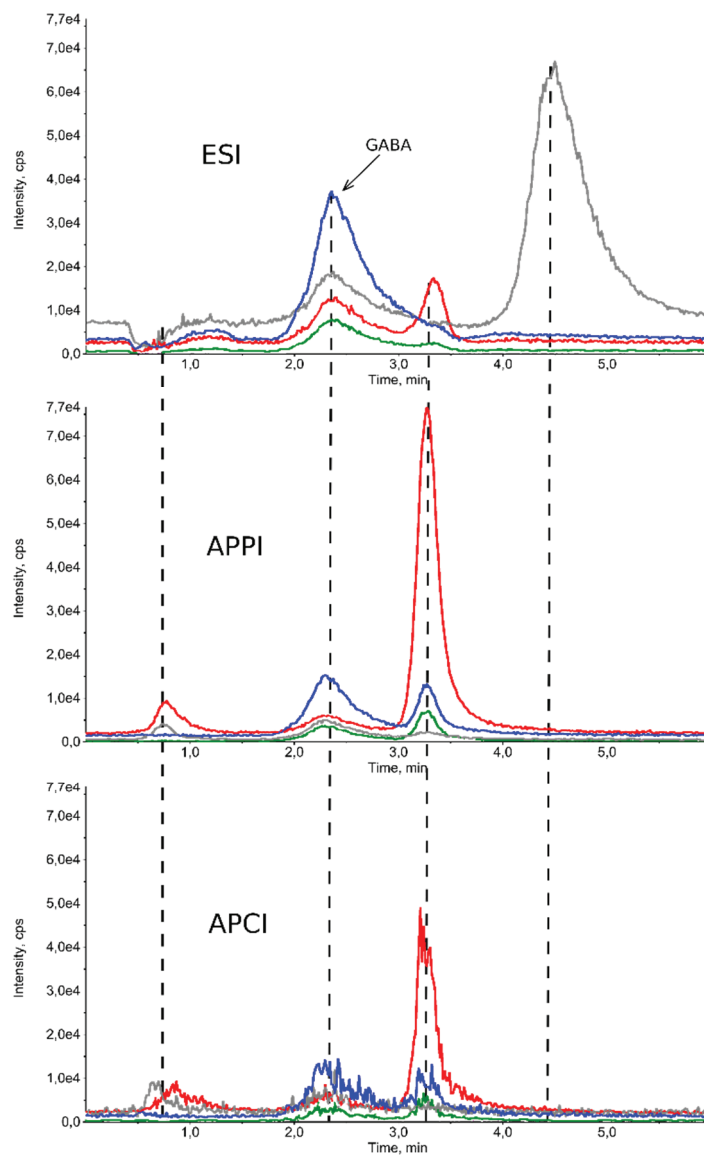


Abbildung 39: Vergleich der MRM-Chromatogramme einer HEK-Zellmatrix mit zusätzlichen 100 nM GABA (1), welche mit der ZIC-HILIC Säule unter Verwendung von MeOH/CH₃COONH₄, 5 mM, pH 4, 80/20 (v/v) bei einer Flussrate von 200 µL/min bei einem Injektionsvolumen von 15 µL mit Hilfe der drei API-Quellen ESI, APPI und APCI erhalten wurden. Blau m/z 104/87; rot m/z 104/86; grün m/z 104/69; grau m/z 104/45.

3.2. MS-Transport-Assay

Für die Entwicklung der angestrebten MS-Transport-Assays sollen im Folgenden der angedachte Ablauf und entsprechend zu berücksichtigende Randbedingungen erläutert werden. Um die GABA-Transporter zu untersuchen, sollten HEK-Zellen verwendet werden, welche das Zielprotein mGAT1 an der Zelloberfläche exprimieren. Werden diese Zellen in Gegenwart des natürlichen Substrates GABA (**1**) und von Natriumionen und Chlorid als Cosubstraten inkubiert, so findet ein Transport der GABA (**1**) in das Zellinnere statt. Sind Inhibitoren des Transporters zugegen, wird innerhalb eines gleichen Zeitintervalls weniger GABA (**1**) in das Zellinnere transportiert. Somit können aus der intrazellulären Konzentration des Substrates Eigenschaften des Transportes als auch Informationen über die Potenz von Inhibitoren gewonnen werden. Um die Menge an GABA (**1**) im Zellinneren quantifizieren zu können, müssen die Zellen in einem ersten Schritt aus ihrem Inkubationsmedium abgetrennt und gewaschen werden, um nicht aufgenommenes, extrazelluläres Substrat zu entfernen. Anschließend müssen die Zellen lysiert werden, um internalisierte GABA (**1**) freizusetzen und anschließend per LC-MS/MS quantifizieren zu können. Um verlässliche Daten zu generieren, sollten sich die Bedingungen während des Transportes nicht stark ändern, was bedeutet, dass die Konzentrationen an Substrat und Cosubstraten während des Uptakes nahezu unverändert bleiben sollten, um eine konstante Transportrate während des gesamten Versuches zu gewährleisten. Der Transport-Assay sollte unter physiologischen Bedingungen (Salzkonzentration, pH) durchgeführt werden, da intakte, vitale Zellen für die Aufrechterhaltung des Substrattransportes benötigt werden. Befindet sich bereits endogene GABA (**1**) im Zellinneren, reduziert die dadurch hervorgerufene Hintergrundkonzentration die Präzision der Quantifizierung transportierter GABA (**1**), da die Konzentration endogener GABA (**1**) natürlichen Schwankungen unterliegt. Deshalb sollte in einem ersten Versuch überprüft werden, welche Mengen an GABA (**1**) natürlich in den Zellen vorkommen, um zu ermitteln, ob diese Mengen die Präzision der Quantifizierung transportierter GABA (**1**) beeinträchtigen. Die Quantifizierung endogener GABA (**1**) in den verwendeten Zelllinien wird in Kapitel 3.2.1.1 „Bestimmung der endogenen GABA in HEK-mGAT1 Zellen“ auf Seite 77 beschrieben.

3.2.1. Uptake Assays mit HEK-mGAT1-Zellen in Suspension

Die angestrebten MS-Transport-Assays mit HEK-mGAT1-Zellen sollten ausgehend von den Bedingungen des im Arbeitskreis bereits etablierten [³H]GABA-Uptake-Assays¹⁶⁰ und in Analogie zu einem im Arbeitskreis bereits etablierten MS-Bindungs-Assay¹⁶¹ aufgebaut werden. Dies bedeutet, dass die HEK-mGAT1-Zellen in Suspension mit den Substraten inkubiert und anschließend über eine 96-Well Glasfaserfilterplatte vom Inkubationsmedium getrennt und gewaschen werden sollten. In

Anlehnung an eine von Mand et al.¹⁶² vorgestellte Methode, in der Zellen direkt auf einer Glasfaserfilterplatte lysiert wurden, sollte die Lyse der HEK-mGAT1-Zellen durch Zugabe von MeOH direkt auf den Glasfaserfiltern erfolgen und die freigesetzte GABA (**1**) in eine 96-Well Auffangplatte eluiert werden. Die einzelnen Schritte des Assays sollen im Folgenden näher beschrieben werden.

Zur Durchführung der Assays wurden HEK-mGAT1-Zellen von ihrer Kulturschale gelöst und in einen Krebs-Puffer zu 4 Mio Zellen/mL suspendiert und für 30 min bei 37 °C konditioniert. Anschließend wurden 50 µL der Zellsuspension zu verschiedenen Konzentrationen von (²H₆)GABA (**3**) in Krebs-Puffer gegeben und im Schüttelwasserbad bei 37 °C für eine definierte Zeit inkubiert, bevor 200 µL/Well auf eine 96-Well Glasfaserfilterplatte übertragen und die HEK-mGAT1-Zellen per Vakuumfiltration vom Inkubationsansatz getrennt wurden. Nach mehrmaligem Waschen der Zellen mit 0,9% NaCl-Lösung wurden die GF-Filterplatten bei 50 °C für mindestens 90 min getrocknet, bevor die Zellen durch Zugabe von MeOH/H₂O 80/20 (v/v), welches den internen Standard (²H₂)GABA (**2**) enthielt lysiert und eluiert wurden. Im gewonnenen Eluat wurde dann die Menge an (²H₆)GABA (**3**) per LC-MS/MS ermittelt.

3.2.1.1. Bestimmung der endogenen GABA in HEK-mGAT1 Zellen

3.2.1.1.1. Bestimmung des Gehaltes an endogener GABA im Bulk-Ansatz

Die Bestimmung der Konzentration an GABA (**1**) in HEK-mGAT1-Zellen konnte nicht anhand einer externen Kalibrierung erfolgen, da keine analytfreie Matrix gewonnen werden konnte. Aus diesem Grund wurde der Gehalt an GABA (**1**) in den für den Assay vorgesehenen HEK293-mGAT1-Zellen durch Standardaddition von GABA (**1**) zu einem Zelllysat aus HEK-mGAT1-Zellen an 5 Versuchstagen mit unterschiedlichen Zellpassagen bestimmt. Die Gewinnung der Zelllysate ist im Kapitel 4.3.2.2 „Gewinnung von Proben für die Bestimmung von endogener GABA (Bulk Ansatz)“ auf Seite 180 beschrieben. Kurz zusammengefasst wurden 800.000 HEK-mGAT1-Zellen/mL in MeOH/H₂O 80/20 (v/v) lysiert und mit einem Spritzenvorsatzfilter bei 0,45 µm filtriert. Anschließend wurde die Zellmatrix mit 100 nM internem Standard (²H₆)GABA (**3**) und variierenden Konzentrationen von 0 bis 100 nM GABA (**1**) versetzt und dadurch entsprechend verdünnt, sodass die hergestellten Proben endogene GABA (**1**) aus 400.000 HEK-mGAT1-Zellen/mL enthielten und einen MeOH-Gehalt von 95% aufwiesen. Das Flächenverhältnis von GABA (**1**) zu (²H₆)GABA (**3**) wurde mit der ZIC-HILIC-Säule mit MeCN/CH₃COONH₄ 5mM pH 5, 75/25 (v/v) bei einer Flussrate von 400 µL/min bestimmt und gegen die zuaddierte Konzentration an GABA (**1**) aufgetragen (siehe Abbildung 40). Es zeigte sich zum einen, dass eine erhebliche Menge endogener GABA (**1**) in HEK-mGAT1-Zellen vorhanden ist, welche in einer zu quantifizierenden GABA-Konzentration von 20 nM bis 143 nM resultierte, zum anderen, dass die Konzentration an GABA (**1**) in den HEK-mGAT1-Zellen starken Schwankungen unterlag. Die Stoffmenge

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

an GABA (**1**) in einer Zelle liegt demnach zwischen $n = \frac{20 \text{ nM}}{400.000 \text{ Zellen/ml}} = 0,05 \frac{\text{fmol}}{\text{Zelle}}$ (Batch 5) und $n = \frac{143 \text{ nM}}{400.000 \text{ Zellen/ml}} = 0,375 \frac{\text{fmol}}{\text{Zelle}}$ (Batch 4). Nimmt man ein Zellvolumen für HEK-Zellen von etwa 1,25 pL an,¹⁶³ so ergibt sich eine intrazelluläre GABA-Konzentration zwischen 40 µM und 300 µM. Die schwankenden Resultate können entweder durch natürliche Schwankungen der endogenen GABA-Konzentration in den HEK-mGAT1-Zellen oder durch unvollständige und ineffiziente Lyse und Probenvorbereitung erklärt werden.

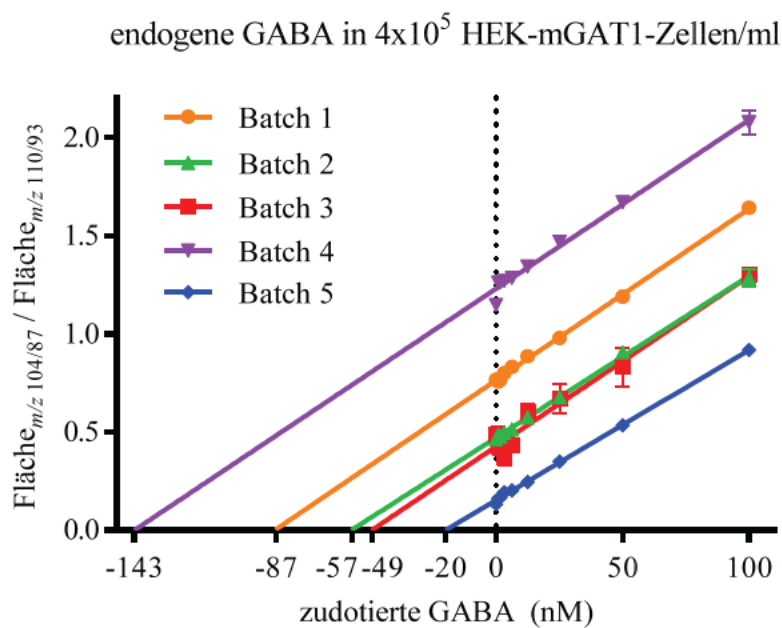


Abbildung 40: Standardaddition von GABA (**1**) zu HEK-mGAT1-Zelllysaten. Messpunkte repräsentieren Mittelwerte \pm SD, $n=3$.

Da sich große Mengen an endogener GABA (**1**) in HEK-mGAT1-Zellen befinden, wurde (²H₆)GABA (**3**) als Substrat für die geplanten MS-Transport-Assays verwendet, welches mit Hilfe von (²H₂)GABA (**2**) als internem Standard quantifiziert werden sollte. Aufgrund der hohen Konzentration an endogener GABA (**1**) ist insbesondere bei der Verwendung von (²H₂)GABA (**2**) auf mögliche Interferenzen mit natürlichen Isotopologen der endogenen GABA (**1**) zu achten.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

3.2.1.1.2. Interferenzen der natürlichen Isotopologe der endogenen GABA mit dem internen Standard ($^2\text{H}_2$)GABA

Endogene GABA (**1**), welche sich in Konzentrationen im mittleren nanomolaren Bereich in den zu messenden Proben befindet, kann die Quantifizierung des transportierten Substrates ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) beeinflussen, indem es mit dem Massenübergang m/z 106/89, welche für die Quantifizierung des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) genutzt wird, interferiert. Die natürliche Verteilung der Isotope führt dazu, dass etwa 4,6% der endogenen GABA (**1**) als (M+1)-Isotopolog und 0,48% der endogenen GABA (**1**) als (M+2)-Isotopolog vorliegen (vergleiche auch Tabelle 7).

Tabelle 7: Wahrscheinlichkeitsverteilung der Isotopologe von natürlicher GABA

	Isotopolog	Anzahl der Isotopomere	Wahrscheinlichkeit des Isotopologs
M+0	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	1	94,8742%
M+1	$^{13}\text{C}^{12}\text{C}_3^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	4	4,1045%
	$^{12}\text{C}_4^2\text{H}^1\text{H}_8^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	9	0,0982%
	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2$	1	0,3504%
	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$	2	0,0723%
	Total (M+1)		4,6254%
M+2	$^{13}\text{C}_2^{12}\text{C}_2^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	6	0,0666%
	$^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_3^2\text{H}_1^1\text{H}_8^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	36	0,0042%
	$^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_3^1\text{H}_9^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2$	4	0,0152%
	$^{13}\text{C}_1^{12}\text{C}_3^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$	8	0,0031%
	$^{12}\text{C}_4^2\text{H}_2^1\text{H}_7^{14}\text{N}^{16}\text{O}_2$	36	<0,0001%
	$^{12}\text{C}_4^2\text{H}_1^1\text{H}_8^{15}\text{N}^{16}\text{O}_2$	9	0,0004%
	$^{12}\text{C}_4^2\text{H}_1^1\text{H}_8^{14}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$	18	0,0001%
	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{15}\text{N}^{17}\text{O}^{16}\text{O}$	2	0,0003%
	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{17}\text{O}_2$	1	<0,0001%
	$^{12}\text{C}_4^1\text{H}_9^{14}\text{N}^{18}\text{O}^{16}\text{O}$	2	0,3899%
	Total (M+2)		0,4798%
Häufigkeitsverteilung der Isotope ¹⁶⁴ : ^{12}C : 98,93%; ^{13}C : 1,07%; ^1H : 99,9885%; ^2H : 0,0115%; ^{14}N : 99,632%; ^{15}N : 0,368%; ^{16}O : 99,757%; ^{17}O : 0,038%; ^{18}O : 0,205%			

Diese 0,48% der (M+2)-Isotopologe können mit dem Massenübergang des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) m/z 106/89 interferieren.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Dies wurde anhand eines Lösemittelstandards von 50 nM GABA (**1**) untersucht, welcher in Abbildung 41 dargestellt ist. Das MRM-Chromatogramm von GABA (**1**) m/z 104/87 (blau) ist etwa 75 Mal intensiver als das MRM-Chromatogramm von m/z 106/89 (rot), welches auch zur Quantifizierung des internen Standards genutzt wird, in dieser Probe allerdings ein Resultat einiger (M+2)-Isotopologe der GABA (**1**) ist. Die Menge der (M+2)-Isotopologe der GABA (**1**) ist mit $\sim 0,48\%$ so gering, dass das resultierende MRM-Chromatogramm von m/z 106/89 ein sehr schwaches Signal lieferte, welches aufgrund des geringen Signal-zu-Rausch-Verhältnisses nicht akkurat bestimmt werden konnte. Aus diesem Grund ist wahrscheinlich auch die Intensität von m/z 104/87 nicht wie theoretisch zu erwarten 195 Mal, sondern nur ~ 75 Mal größer.

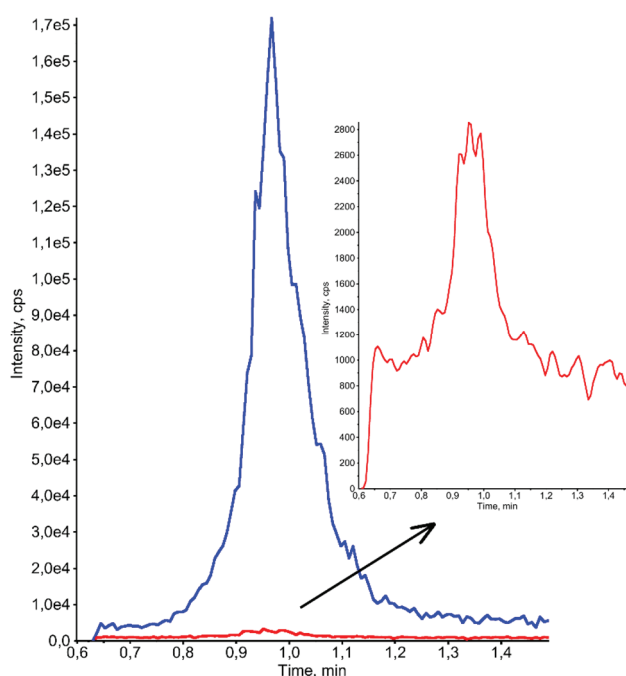


Abbildung 41: Interferenz von 50 nM GABA (m/z 104/87, blau) mit dem Massenübergang m/z 106/89 des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (rot). Gemessen auf der YMC-Pack PVA-Sil, mit MeCN/ NH_4HCO_3 , 10 mM pH 7,8 70/30 (v/v).

Eine Interferenz mit dem Massenübergang m/z 110/73 des verwendeten Substrates ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) konnte nicht beobachtet werden. Um die Interferenz des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) mit den (M+2)-Isotopologen der natürlichen GABA (**1**) zu minimieren, wurde in den MS-Transport-Assays der interne Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in einer Konzentration von 10 nM für die Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) eingesetzt, was für den Massenübergang m/z 106/89 ein im Durchschnitt etwa 60-fach stärkeres Signal als das von den (M+2)-Isotopologen der natürlichen GABA (**1**) aus 60.000 COS-Zellen resultierende lieferte.

3.2.1.1. Filtrieren und Waschen

Um die HEK-mGAT1-Zellen nach der Substrataufnahme aus dem Inkubationsansatz zu separieren, wurden 96-Well Glasfaserfilterplatten der Firma PALL eingesetzt, wie sie auch für MS-Bindungsassay¹⁶¹ eingesetzt werden. Vor der Verwendung der Filterplatten wurden diese für eine Stunde in TRIS-Uptake-Puffer eingeweicht. Die nach dem Uptake auf dem Filter verbleibenden Zellen wurden anschließend mit einer 0,9%igen NaCl-Lösung gewaschen. Zur Bestimmung der Filterbindung und um ein geeignetes Waschprotokoll zu entwickeln, wurden je 200 μL /Well verschieden konzentrierte GABA-Lösungen in Krebs-Puffer in Triplikaten auf die 96-Well GF-Filterplatte gegeben, 10 min inkubiert und anschließend filtriert. Dann wurden die einzelnen Wells entweder mit 100 μL /Well oder 300 μL /Well einer 0,9%igen NaCl-Lösung zwischen drei- und achtmal gewaschen und anschließend mit 200 μL ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) 10 nM in MeCN/H₂O 80/20 (v/v) eluiert. In den gewonnenen Eluaten wurde anschließend GABA (**1**) per LC-MS/MS mit der YMC-Pack PVA-Sil-Säule quantifiziert.

In Abbildung 42 ist die ermittelte Konzentration von GABA (**1**) in den Eluaten für die eingesetzten Lösemittelproben von 50 μM (Quadrate), 12,5 μM (leere Kreise) und 3,13 μM GABA (Dreiecke) nach unterschiedlich häufiger Anzahl an Waschschrritten dargestellt. Nach Angaben des Herstellers haben die verwendeten Acroprep-Advanced-GF-Filterplatten ein Rückhaltevolumen von 19 μL .¹⁶⁵ Auf Grundlage dieses Rückhaltevolumens wurde eine theoretische Verdünnung der eingesetzten GABA-Konzentrationen für jeden Waschschrtritt unter der Annahme einer gleichmäßigen Verdünnung des Restvolumens der Filterplatte (19 μL) mit dem eingesetzten Spülvolumen (100 μL bzw. 300 μL ; grüne bzw. rote Kurve in Abbildung 42) berechnet. Daraus ergibt sich, dass die Lösung mit jedem Waschschrtritt um 84% (100 μL Waschvolumen) bzw. 95% (300 μL Waschvolumen) abgereichert werden sollte. Praktisch sollte die Verdünnung bei der Filtration allerdings deutlich größer als die hier theoretisch angenommene sein, da bei einer kontinuierlichen Filtration der Analyt nicht gleichmäßig in der Waschlösung verteilt wird.

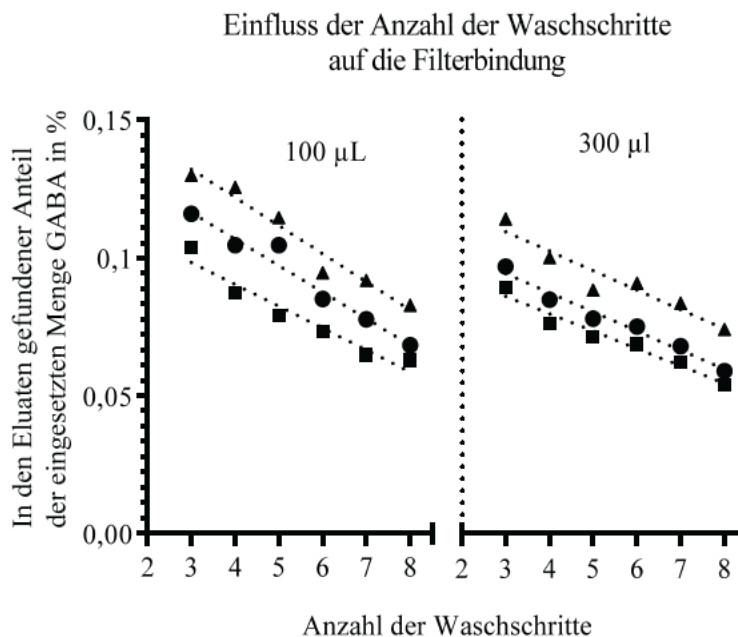


Abbildung 42: Bestimmung der Wascheffizienz und der Filterbindung von GABA. Die Konzentration an GABA (1) in den Eluaten wurde anhand eines Kalibrierfaktors mit ($^2\text{H}_2$)GABA (2) ermittelt. Der nach dem Waschen in den Eluaten gefundene Anteil der eingesetzten Menge GABA (1) ist gegen die Anzahl der Waschschrirte aufgetragen. Es wurden GABA-Konzentrationen von 50 µM (Quadrate), 12,5 µM (leere Kreise) und 3,13 µM (Dreiecke) eingesetzt und mit 100 µL (grün), bzw. 300 µL (rot) 0,9%iger NaCl gewaschen. Die Menge GABA (1) in den Eluaten wurde mit der YMC-Pack PVA-Sil-Methode quantifiziert. In diesem Versuch wurden weniger als 3 Waschschrirte nicht untersucht, da bei diesen Probeneine hohe Konzentrationen an GABA (1) erwartet wurde.

Überraschenderweise wurden selbst nach intensivem Waschen sehr hohe Konzentrationen an GABA (1) in den Eluaten gefunden, was dafür spricht, dass GABA (1) sich kaum mit 0,9%iger NaCl-Lösung aus den Glasfaserfiltern auswaschen ließ. Weder ein erhöhtes Waschvolumen (300 µL vs. 100 µL) noch ein wiederholtes Waschen konnten den verwendeten Glasfaserfilter effektiv von GABA (1) freiwaschen, sodass selbst nach achtmaligem Waschen der Filter mit jeweils mehr als dem 15-fachen seines Rückhaltevolumens (300 µL vs. 19 µL), noch immer 0,05% der der ursprünglich aufgegebenen GABA (1) im Eluat zu finden waren. Diese hohe Filterbindung erschwert die akkurate Bestimmung von GABA (1) besonders in Sättigungsexperimenten, in denen hohe Konzentrationen an Substrat eingesetzt werden (siehe Kapitel 3.4.2 „Sättigungsexperimente an hGAT1, hGAT2, hGAT3 und BGT1“ auf Seite 123).

Des Weiteren wurde bei Proben, die über die 96-Well GF-Filterplatten filtriert und mit 0,9% NaCl gewaschen wurden, eine starke Suppression der Messsignale beobachtet, die in Abbildung 43 für die Verwendung der ZIC-pHILIC-Säule veranschaulicht ist. Darin ist das MRM-Chromatogramm von m/z 104/87 einer HEK-Zellmatrix-blank-Probe dargestellt, welche nach 5-maligem Waschen mit 0,9% NaCl auf einem 96-Well GF-Filter mit MeCN/H₂O 80/20 (v/v) lysiert und eluiert wurde. Die bereits

früher beobachtete Suppression, die vermutlich durch die HEK-Zellmatrix verursacht wird (siehe 3.1.3.3.1 „Art und Zusammensetzung der mobilen Phase“ auf Seite 37), konnte ebenfalls bei der hier verwendeten Laufmittelzusammensetzung von MeCN/NH₄HCO₃ 5 mM pH 7,8, 75/25 (v/v) sowohl anhand der reduzierten Basislinie für m/z 104/87 (siehe Abbildung 43b), als auch anhand eines intensiven Signals für m/z 104/45 von 2×10^5 cps bei 2.3 min (nicht dargestellt), welches mit der Matrixsuppression assoziiert wird, beobachtet werden. Zusätzlich wurde diese Suppression ab etwa 3 min von einer weiteren Suppression überlagert, was durch einen weiteren Abfall der Basislinie von m/z 104/87 zu erkennen ist. Beide Suppressionen traten nach der Elution von GABA (1,1 min) auf und waren allen Matrixproben die mit dem 96-Well GF-Filter bearbeitet wurden gemein. Die zweite Suppression war derartig ausgeprägt, dass sie teilweise aufgrund ihrer langen Elutionsdauer (3 - 7,5 min) die nachfolgende Messung beeinträchtigte. Um die Ursache der zweiten Suppression zu identifizieren wurde ein Q1-Scan der Probe im Bereich von 50-550 Th aufgenommen (siehe Abbildung 43, TIC). Während die spätere Suppression auftrat (3 - 4 min), wurde ein charakteristisches Massenspektrum, welches ebenfalls in Abbildung 43 dargestellt ist, beobachtet. Darin ist ein Muster von Signalen mit regelmäßigem Abstand zu erkennen, wie es für eine gleichmäßige Abspaltung von Clustern charakteristisch ist. Der Abstand der intensivsten Signale entsprach Masseneinheiten von $\Delta 82$ amu, was einer Abspaltung von 2 Molekülen MeCN entspricht. Es handelt sich demnach um Lösemittelcluster von Na-Ionen mit MeCN und H₂O. Es scheint also nach etwa 3 min eine hohe Salzfracht von der Säule zu eluieren, deren Natrium-Ionen mit den Lösemittelmolekülen Ionencluster bilden. Die im Massenspektrum identifizierten Cluster sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

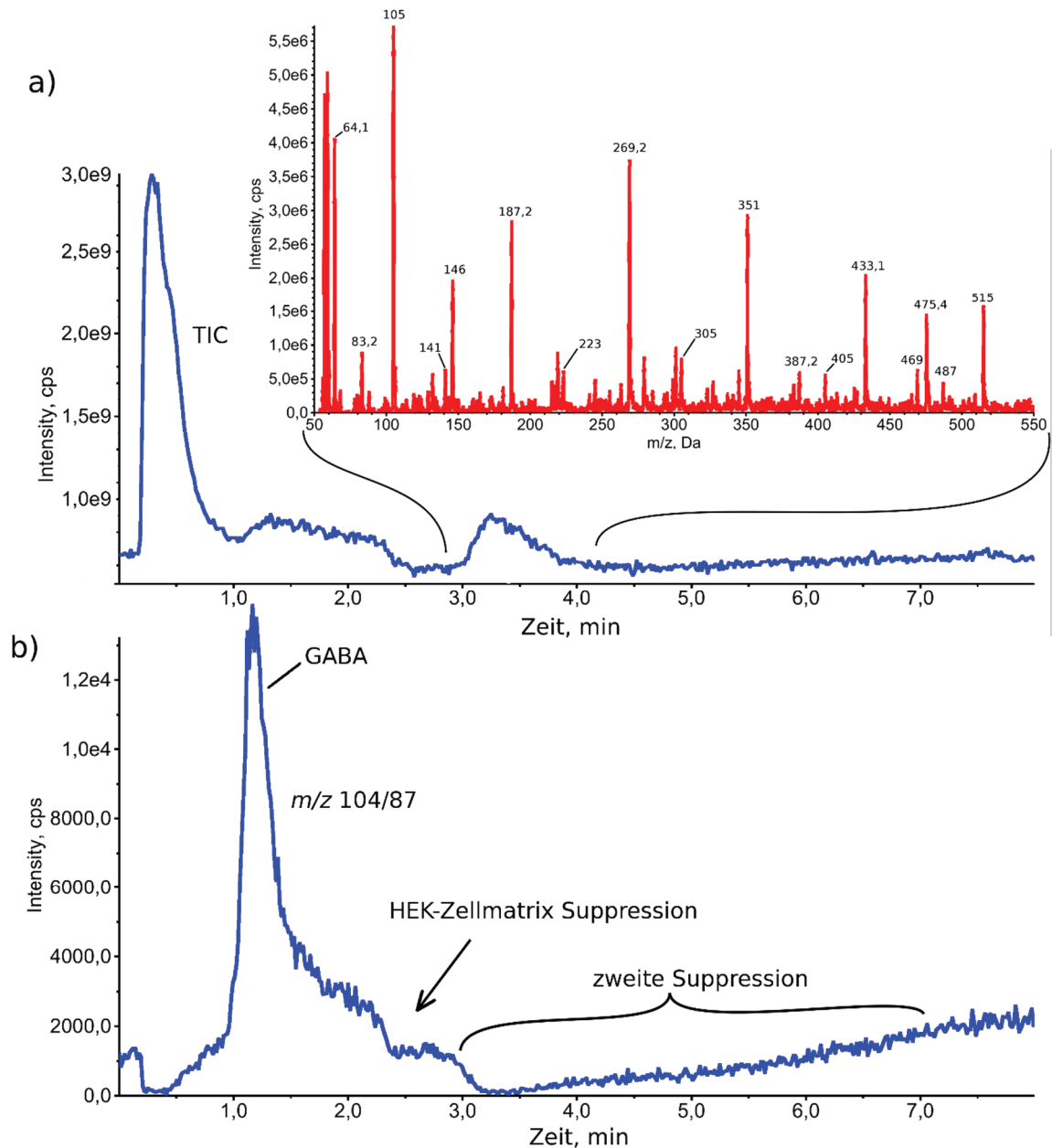


Abbildung 43: Chromatogramme einer HEK-Zellmatrix-blank-Probe, welche auf einer 96-Well GF-Filterplatte mit 0,9% NaCl gewaschen und mit MeCN/H₂O 80/20 (v/v) eluiert wurde. a) Totalionenstrom (TIC) eines Q1-Scans im Bereich von 50-550 Th (blau), sowie das gemessene Massenspektrum zwischen 2,9 und 4,1 min (rot). b) MRM-Chromatogramm von m/z 104/87 derselben Probe, in der sich nach der bereits bekannten Matrix-Suppression (2,4 - 3 min) die zweite Suppression (3 - 7,5 min) anhand des reduzierten Hintergrundsignals erkennen lässt.

Die hohe Salzfracht der Probe resultiert aus der Verwendung von NaCl im Waschpuffer. Eine Substitution des Waschpuffers durch leichtflüchtige Waschpuffer, wie NH₄HCO₃ oder CH₃COONH₄ wurde dennoch nicht vorgenommen, da diese bei der Verwendung einer Vakuumfiltration eventuell keine stabile Tonizität gewährleisten können.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Verwendung von Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) im TRIS-Uptake-Puffer zu Interferenzen mit der Detektion von GABA (**1**) m/z 104/87 und 104/86 führte, was im folgenden Abschnitt näher erläutert werden soll.

Tabelle 8: Aufstellung der Lösemittelcluster der Na-ionen, welche anhand des in Abbildung 43a dargestellten Massenspektrums identifiziert wurden.

m/z	MeCN	H ₂ O
64,1	1	0
83,2	1	1
105	2	0
141	2	2
146	3	0
187,2	4	0
223	4	2
269,2	6	0
305	6	2
351	8	0
387,2	8	2
405	8	3
433,1	10	0
469	10	2
487	10	3
515,2	12	0

3.2.1.2. Uptake-Puffer

In ersten Experimenten zeigte sich durchgehend ein Signal für die Massenübergänge m/z 104/87 und m/z 104/86, welche für die Quantifizierung von GABA (**1**) genutzt werden, was jedoch auf die Verwendung von TRIS im TRIS-Uptake-Puffer zurückzuführen ist. TRIS ist eine weit verbreitete Puffersubstanz mit der Summenformel C₄H₁₁NO₃, welche häufig in der Molekularbiologie eingesetzt wird. Ihre Struktur ist in Abbildung 44 dargestellt. Obwohl TRIS eine von GABA (**1**) verschiedene Molekülmasse (121 g/mol vs. 104 g/mol) hat, kann es theoretisch durch eine Wasserabspaltung in ein Konstitutionsisomer von GABA (**1**) übergehen, welches ebenfalls die Massenübergänge m/z 104/87 und 104/86 aufweist, wie in Abbildung 44 dargestellt. Überdies hat TRIS bei der verwendeten Chromatographie mit der YMC-Pack PVA-Sil einen vergleichbaren Kapazitätsfaktor wie GABA (t_R : 0,9 min), wodurch es zu einer Überlagerung der Signale kommt, weshalb GABA (**1**) nicht sicher detektiert werden kann.

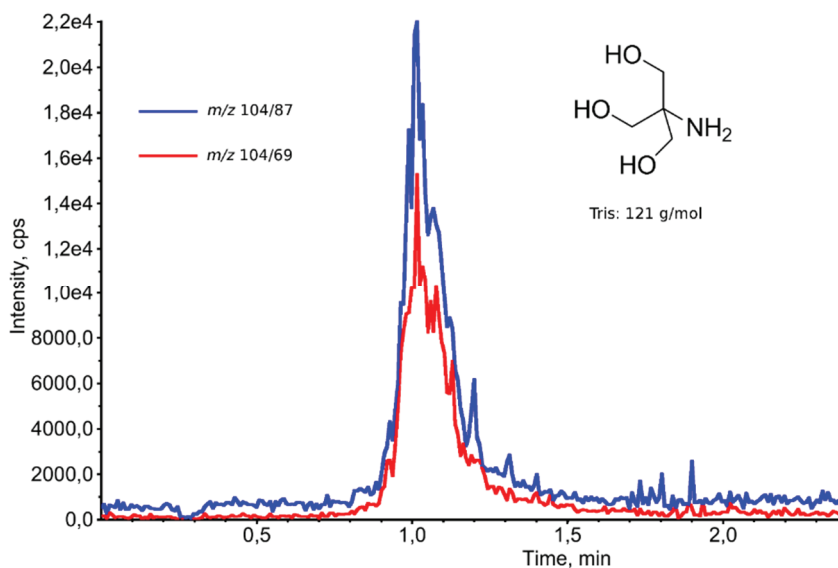


Abbildung 44: MRM-Chromatogramm von m/z 104/87 und 104/69 einer Lösung von 1 mM TRIS.

Aus diesem Grund wurde TRIS im TRIS-Uptake-Puffer durch eine äquimolare Menge HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) ersetzt.

3.2.1.3. Wiederfindung der erwarteten Menge endogener GABA

Während weiterer Untersuchungen zeigte sich, dass die Menge an endogener GABA (**1**), welche mit den Filtrationsansätzen quantifiziert wurde, geringer war, als dies nach den Bulk-Versuchen zur Bestimmung des Gehaltes endogener GABA (siehe Kapitel 3.2.1.1 „Bestimmung der endogenen GABA in HEK-mGAT1 Zellen“ auf Seite 77) zu erwarten war. Dieser Sachverhalt wird im nächsten Abschnitt näher behandelt.

Für den im Folgenden beschriebenen Versuch wurden etwa 186.000 HEK-mGAT1-Zellen je Well auf eine 96-Well GF-Filterplatte aufgetragen und nach Zugabe von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für 4 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit 100 μL 0,9% NaCl gewaschen und die Filterplatte für 2 h bei 50 °C im Trockenschrank getrocknet. Dann wurden die Filter viermal mit je 100 μL /Well MeOH/ H_2O 80/20 (v/v) mit 10 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) lysiert und eluiert, die Eluate über Nacht bei 50 °C eingetrocknet und mit 200 μL /Well MeCN/ H_2O 80/20 (v/v) rekonstituiert.

Aus der gleichen Zellsuspension wurde der Gehalt an endogener GABA (**1**) bestimmt, indem $1,86 \times 10^6$ Zellen in einem 15 mL Probenröhrchen für 2 min bei 200 g zentrifugiert und das entstandene Pellet nach Abdekantieren des Überstandes in 3 mL MeOH/ H_2O 80/20 für 2 min lysiert und anschließend über einen 0,45 μm Spritzenvorsatzfilter filtriert wurde. Zur Quantifizierung der endogenen GABA (**1**)

wurden 200 μL des Filtrates mit 150 μL MeCN und 50 μL 80 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in H_2O versetzt und mit der ZIC-pHILIC-Methode vermessen. In den Proben, welche über die 96-Well Filterplatte filtriert wurden, sollte demnach theoretisch eine dreifach höhere Konzentration endogener Substanzen (310.000 Zellen/mL im Bulk-Ansatz vs. 930.000 Zellen/mL im 96-Well-Ansatz) enthalten sein. Allerdings wurde in diesen Proben nur die Hälfte der Konzentration an GABA (**1**) quantifiziert, was einer um 83% reduzierten Menge endogener GABA (**1**) im Vergleich zu den Proben, welche durch Zentrifugation und anschließende Lyse gewonnen wurden, entspricht (siehe Abbildung 45). Es liegt also der Schluss nahe, dass entweder die Lyse der Zellen auf der 96-Well GF-Filterplatte nicht vollständig ist, oder aber Zellen bereits während des Waschprozesses zerplatzen, in Folge dessen endogene Substanzen zum Teil verloren gehen. Die große Diskrepanz der Menge an quantifizierter endogener GABA (**1**) ließ sich auch bei Verwendung der Acroprep-Supor 1,2 μm Filterplatten beobachten (Daten nicht dargestellt).

Wiederfindung endogener GABA

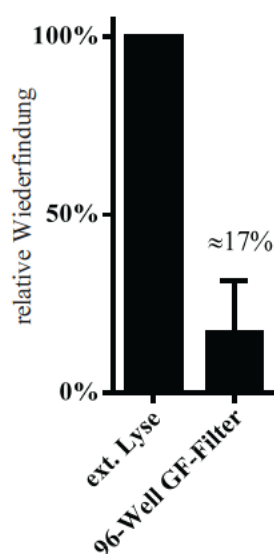


Abbildung 45: Wiederfindung der endogenen GABA (**1**), normiert auf dem Anteil endogener GABA (**1**), welche durch Lyse im Bulk-Ansatz gewonnen wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD, blau $n = 2$, rot $n = 96$

Die Wiederfindung der endogenen GABA (**1**) lag in anderen Versuchen meist bei weniger als 10%, teilweise konnten sogar nur 1% der theoretisch zu erwartenden Menge endogener GABA (**1**) in den Filtraten quantifiziert werden. Diese geringe Wiederfindung war innerhalb eines Versuches auch von starken Schwankungen der quantifizierten Menge an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) einer Messplatte begleitet, was zu großen Standardabweichungen gemessener Replikate führte.

Jedoch kann die Präsenz von endogener GABA (**1**) als nativer interner Standard dienen und so eventuell ungleichmäßige Wiederfindungen während des Assays – sei es aufgrund von Zellverlusten oder aufgrund einer ineffizienten Lyse – kompensieren.

3.2.1.4. Endogene GABA als nativer interner Standard zur Korrektur von Zellverlusten während der Probenaufbereitung

Die Verluste an Zellen während der Probenaufbereitung führen zu einem zum Verlust an Sensitivität des MS-Transport-Assays und zum anderen zur unpräzisen Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**). Dies liegt daran, dass der während der Lyse zugegebene interne Standard (²H₂)GABA (**2**) in allen Proben in gleicher Konzentration vorliegt, die Menge an eluierter (²H₆)GABA (**3**) jedoch mit der Wiederfindung variiert. Da allerdings die Menge an freigesetztem Substrat in einer Probe in gleichem Maße wie auch die Menge endogener GABA (**1**) variiert, kann diese als endogener interner Standard dienen. Somit können anhand der Menge quantifizierter endogener GABA Zellverluste oder eine unvollständige Lyse der Zellen abgeschätzt werden. Besonders deutlich ließ sich dies an einem Sättigungsversuch beobachten, welcher in 1,5 mL Eppendorf-caps durchgeführt wurde. Hierbei war die Wiederfindung besonders inhomogen, da die Proben sowohl mittels Zentrifugation als auch mit Filtration behandelt wurden. Des Weiteren wurden die Proben vor der Quantifizierung bei 50 °C eingetrocknet und anschließend in einem geeigneten Injektionsmedium rekonstituiert, was weitere Verluste von Analyt verursachen kann. Für diesen Versuch wurden 400.000 HEK-mGAT1-Zellen in Duplikaten in 500 µL Uptake-Puffer in Gegenwart von variierenden Konzentrationen (²H₆)GABA (**3**) für 6 min inkubiert, anschließend bei 6500 g für 1 min pelletiert und zweimal mit 500 µL 0,9% NaCl gewaschen (6500 g, 1 min). Dann wurde das resultierende Zellpellet durch Zugabe von 500 µL MeOH für 90 min bei 50 °C lysiert und 400 µL dieser Lösung über eine 96-Well GF-Filterplatte filtriert. Die Filter wurden anschließend mit 200 µL 200 nM (²H₂)GABA (**2**) in H₂O eluiert und das gesamte Eluat bei 50 °C über Nacht eingetrocknet. Am nächsten Tag wurden die Proben mit 400 µL MeCN/H₂O 80/20 (v/v) rekonstituiert. Die so gewonnenen Proben wurden dann mit der YMC-Pack PVA-Sil (5 µm, 50 x 3 mm,) mit einem Fließmittel bestehend aus MeCN/MeOH/CH₃COONH₄ 10 mM pH 6,8, 50/33/17 (v/v/v) bei einer Flussrate von 600 µL/min am API 5000™ vermessen. Abbildung 46 zeigt die Sättigungsisotherme, welche anhand des internen Standards (²H₂)GABA (**2**) (blau) und des endogenen internen Standards GABA (**1**) (grün) erhalten wurde. Dazu wurde die Peakfläche von (²H₆)GABA (**3**) durch die Peakfläche des internen Standards ((²H₂)GABA (**2**) bzw. GABA (**1**)) dividiert.

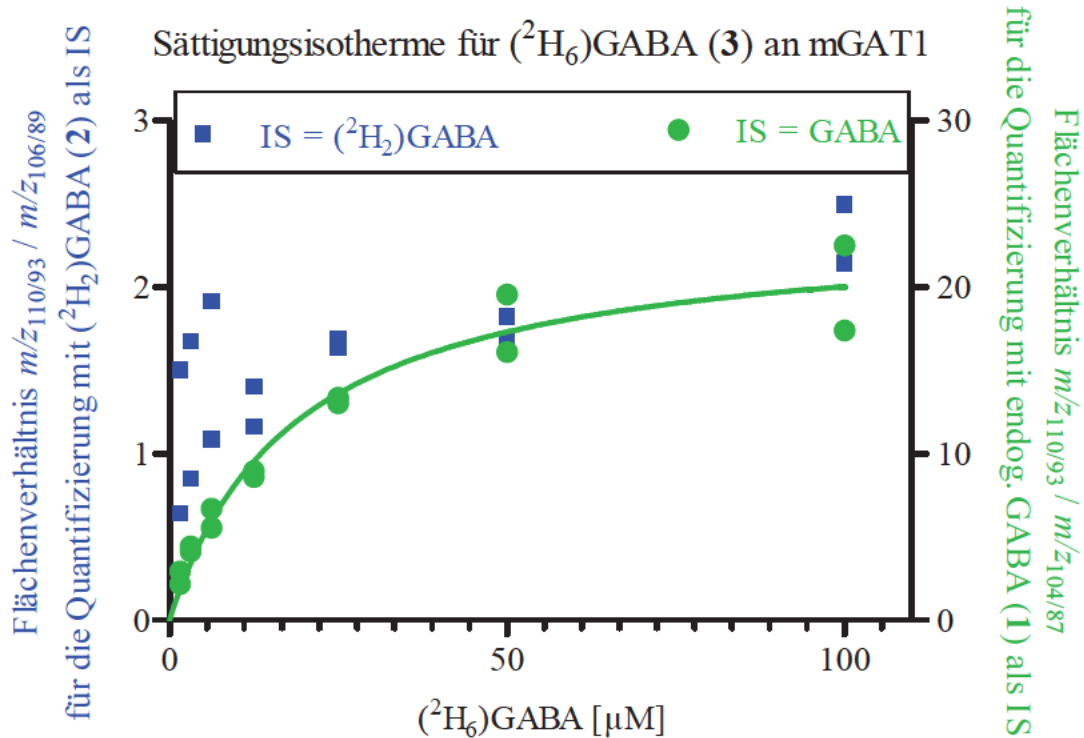


Abbildung 46: Sättigungsisotherme von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) an mGAT1, mit Verwendung von 100 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) als internem Standard (blau), bzw. mit endogener GABA (**1**) als internem Standard.

Es lässt sich erkennen, dass die Daten, welche über den internen Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) gewonnen wurden keinem Muster folgen (blaue Quadrate) und in keiner sinnvollen Sättigungsisotherme führen. Korrigiert man hingegen die erhaltenen Peakflächen für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) mit der Konzentration (Peakflächen) von nativer endogener GABA (**1**), so resultiert eine Sättigungsisotherme mit einem K_m -Wert von etwa 18 μM (grüne Punkte).

3.2.1.5. Eintrocknen der Elutionsplatten zur Aufkonzentrierung von ($^2\text{H}_6$)GABA und Rekonstituierung in geeignetem Injektionsmedium

Um die Proben nach der Elution von den Filterplatten in einem geeigneten Injektionsmedium (vergleiche 3.1.3.4.3 „Injektionsmedium“ auf Seite 53) für die Chromatographie rekonstituieren und konzentrieren zu können, wurde bei den bisherigen Versuchen das nach dem Waschen der Zellen auf der 96-Well-GF-Filterplatte durch Filtration von Methanol gewonnene Eluat bei 50 °C im Trockenschrank für mindestens 12 h über Nacht eingetrocknet und anschließend in 200 μL MeCN/ H_2O 80/20 (v/v) gelöst. Dabei kam es jedoch zu bedeutenden Schwankungen des Messsignals innerhalb einer Messplatte. Diese werden zwar durch den verwendeten internen Standard (endogene GABA (**1**) oder ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**)) kompensiert, jedoch kommt es dadurch zu schwankenden Nachweisgrenzen, was

die Robustheit der Methode reduziert. In Abbildung 47 sind die Signalintensitäten des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in einer 96-Well Messplatte abgebildet, dessen Proben zuvor bei 50 °C für 16 h eingetrocknet und anschließend in 200 μL MeCN/ H_2O 80/20 (v/v) rekonstituiert wurden. Da der interne Standard in allen Proben in gleicher Konzentration zugegeben wurde, sollten alle Signalintensitäten unter der Voraussetzung eines stabilen Messsignals annähernd gleich sein. In Spalte 3 (A-H) wurde der interne Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) erst nach dem Rekonstituieren der Proben zugegeben, sodass dieser nicht mit eingetrocknet worden war und somit die zu erwartende Signalintensität widerspiegeln sollte. Es fällt auf, dass insbesondere die Proben, welche sich am Rand der 96-Well Platte befinden (Reihe A 1-12, H 1-12 und Spalte A-H 1,2 und 12) ein deutlich schwächeres Messsignal lieferten, als Proben die sich in der Mitte der Platte befanden. Dies kann zum einen durch ein inhomogenes Eluieren der Filterplatte in die Auffangplatte verursacht werden, was jedoch auszuschließen ist, da der Füllstand der Auffangplatte nach der Elution optisch überprüft wurde und alle Wells ein vergleichbares Niveau aufwiesen. Zum anderen kann es während dem Eintrocknen der Auffangplatte zu Verlusten an Analyt kommen, was die schwankenden Signalintensitäten erklären würde. Was für dieses Ergebnis verantwortlich war, konnte nicht mit Sicherheit ermittelt werden. Um diese Probleme zu vermeiden, wurden die Eluate künftig nicht mehr eingetrocknet und rekonstituiert, sondern die Lyse der Zellen und die Elution von GABA (**1**) mit einer mit der Chromatographie kompatiblen Lösung bestehend aus MeCN/ H_2O 80/20 (v/v) mit 10 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) durchgeführt.

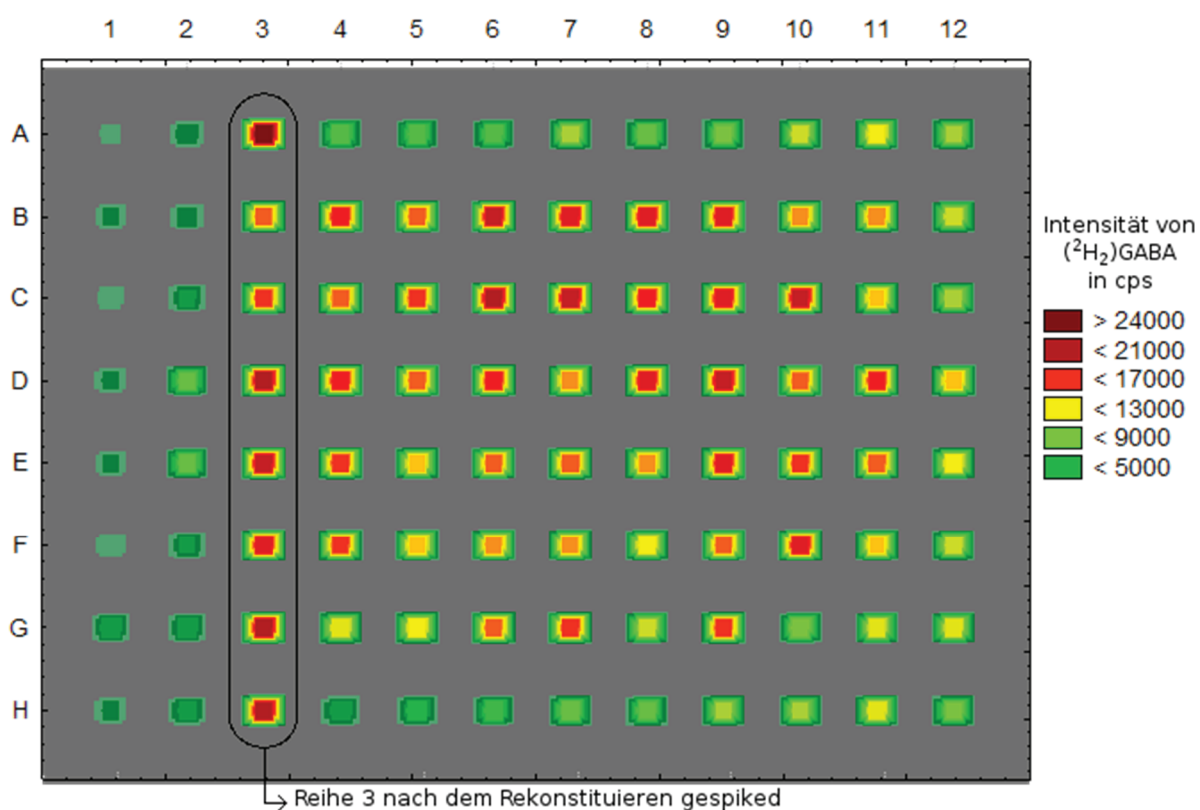


Abbildung 47: Signalintensitäten des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) innerhalb einer Messplatte. Die Proben wurden gewonnen, indem 110.000 HEK-mGAT1-Zellen/Well für 7 min in Gegenwart verschiedener Konzentrationen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) inkubiert, abgesaugt und mit $3 \times 100 \mu\text{L}$ 0,9% NaCl gewaschen wurden. Anschließend wurden die Filterplatten bei 50°C für 2 h getrocknet und dann mit $4 \times 100 \mu\text{L}$ MeOH/ H_2O 80/20 (v/v), welches den internen Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) enthielt, eluiert. Abschließend wurde das Eluat bei 50°C für 16 h eingetrocknet und anschließend mit $200 \mu\text{L}$ MeCN/ H_2O 80/20 (v/v) rekonstituiert.

Aufgrund der dargestellten Probleme mit großen Schwankungsbreiten gleicher Proben, hohen Filterbindungen und vor allem den extrem geringen Wiederfindungen und der bis dahin mit vielen Probenvorbereitungsschritten arbeitsaufwendigen Prozedur, wurde ein neuer Ansatz zur Entwicklung eines MS-Transport-Assays gewählt, welcher auf adhärente Zellen zurückgreifen sollte, um so die Verluste und Probleme, welche mit dem Filtrationsansatz verbunden waren, zu vermeiden.

3.2.2. Transport-Assays mit adhärenenten COS-hGAT1-Zellen

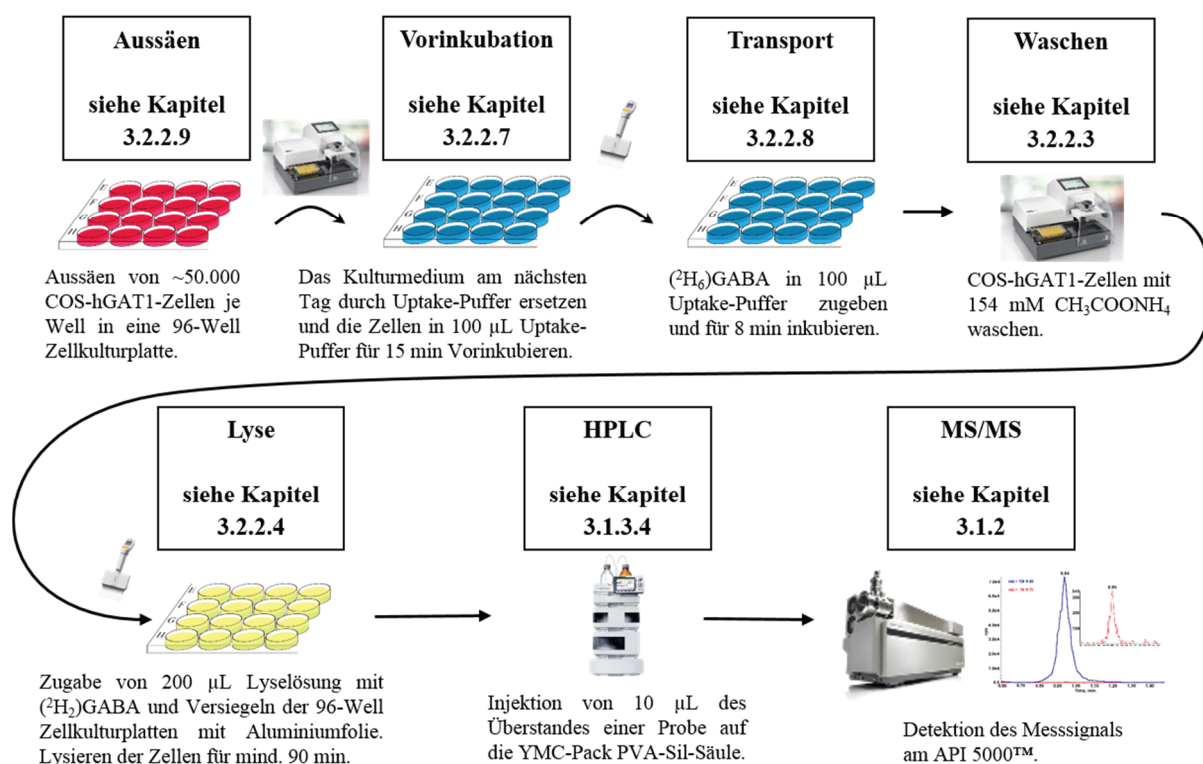
Zur weiteren Entwicklung der MS-Transport-Assays sollten Zellen verwendet werden, welche sich durch eine starke Adhärenz auszeichnen und somit ein Waschen der Zellen in den 96-Well-Zellkulturplatten erlauben sollten. Da die Adhärenz der bisher verwendeten HEK-mGAT1-Zellen nicht ausreichend war – diese ließen sich bereits durch sanftes Abspülen vom Kulturgefäßboden ablösen –

sollte eine neue Zelllinie, welche das Zielprotein stabil exprimiert, kloniert werden. In diesem Zuge sollte zudem das im Arbeitskreis bisher auf murinen GABA-Transportern beruhende Testsystem schrittweise auf die humanen GABA-Transporter umgestellt werden.

Die Firma lifetechnologies (Invitrogen™) bietet eine HEK293-Zelllinie an (GripTite™ 293 MSR), welche den humanen Macrophage-Scavenger-Receptor (MSR) exprimiert und somit eine im Vergleich zu den Standard HEK293-Zellen gesteigerte Adhärenz aufweist.¹⁶⁶ Um die Expression des MSR-Proteins in den GripTite™ 293 MSR-Zellen zu gewährleisten, müssen diese in Gegenwart eines Selektionsantibiotikums (Geneticin) kultiviert werden. Somit ist die Verwendung des im Arbeitskreis bereits vorhandenen pcDNA3.1-hGAT1-Vektors für die Transformation dieser Zellen ungeeignet, da dieser Vektor ebenfalls mit Geneticin selektioniert wird. Es muss also die kodierende Sequenz des hGAT1-Gens in einen Transfektionsvektor, welcher über einen orthogonalen Selektionsmarker verfügt, kloniert werden, bevor eine Transformation der GripTite™ 293 MSR-Zellen erfolgen kann. Ein großer Nachteil bei der Verwendung der GripTite™ 293 MSR-Zellen für die Expression von hGAT1 ist die Notwendigkeit der doppelten Selektion (zum Erhalt der Adhärenz und der Expression des Zielgens) bei der Generierung stabiler Zelllinien. Eine Alternative zu den GripTite™ 293 MSR-Zellen stellen Zelllinien dar, die sich über eine natürliche hohe Adhärenz auszeichnen, wie dies bei COS- oder CHO-Zellen der Fall ist. Durch die exzellente Adhärenz der COS-Zellen lässt sich ein zeitaufwendiges und teures „pre-coaten“ der Zellkulturplatten, wie dies für bisher beschriebene [³H]GABA-Assays in 96-Well Platten notwendig ist,⁷¹⁻⁷³ vermeiden. Da im Arbeitskreis bereits COS-7-Zellen¹⁶⁷ für die Expression von hGAT1 erfolgreich verwendet worden waren^{86,87} und weitere Testsysteme für GABA-Transporter basierend auf transient-transfizierten COS-Zellen beschrieben sind,¹⁶⁸ wurden COS-7-Zellen zur Expression von hGAT1 gewählt.

Für die Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) in MS-Transport-Assays basierend auf COS-hGAT1-Zellen, wurde ausschließlich die YMC-Pack PVA-Sil-Methode (siehe Tabelle 4 auf Seite 59) verwendet. Der prinzipielle Ablauf der MS-Transport-Assays mit den für die Optimierung des Assays verwendeten Anfangsbedingungen ist in Schema 1 dargestellt.

Ablauf der geplanten MS-Transport-Assays



Schema 1: Ablauf der geplanten MS-Transport-Assays mit den für die Optimierung gewählten Anfangsbedingungen. Für die MS-Transport-Assays wurden 50.000 COS-hGAT1-Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium mit Hilfe eines Platemashers gegen HEPES-Uptake-Puffer getauscht, die Zellen für 15 min vorinkubiert und der Substrattransport anschließend durch Zugabe von (²H₆)GABA (**3**) gestartet. Nach 8 min wurde der Transport durch Waschen mit 154 mM CH₃COONH₄ am Platemasher beendet und die Zellen durch Zugabe von 200 µL/Well Lyselösung für mind. 90 min lysiert. Anschließend wurde die Menge (²H₆)GABA (**3**) direkt in den Lysaten quantifiziert. Zur Ermittlung des nicht-spezifischen Transportes wurde die Menge transportierter (²H₆)GABA (**3**) in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipicotinsäure (*rac*-**5**) bestimmt.

Für die Entwicklung der MS-Transport-Assays wurden einige Parameter optimiert, welche die Assay-Bedingungen und die Robustheit des Assays beeinflussen. Diese werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben. Zur Ermittlung des spezifischen Transportes wurde der nicht-spezifische Transport in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipicotinsäure (*rac*-**5**) ermittelt und vom gemessenen Gesamttransport abgezogen.

3.2.2.1. Endogene GABA in COS-7-Zellen

In ersten Vorversuchen wurde der Gehalt an endogener GABA (**1**) in COS-7-Zellen ermittelt, indem 50.000 COS-7-Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte gesät und am nächsten Tag nach mehrmaligem manuellem Waschen mit 0,9% NaCl mit einer Eppendorf 12-Kanal-Pipette durch Zugabe von 200 µL/Well MeCN/H₂O 80/20 (v/v) mit 10 nM (²H₂)GABA (**2**) lysiert wurden. Wie in Abbildung 48 dargestellt, lassen sich ebenso wie in HEK-Zellen große Mengen endogen vorhandener GABA (**1**) in

COS-7-Zellen detektieren. Nimmt man ein durchschnittliches Zellvolumen von ~ 4 pL/Zelle für COS-7-Zellen an,¹⁶⁹ so resultiert eine durchschnittliche intrazelluläre GABA-Konzentration von etwa 50 μM . Außerdem lassen sich große Abweichungen, besonders zwischen mehreren unabhängigen Versuchsreihen (vergleiche Abbildung 48, Batch 2 bis 5 mit 6 und 10) erkennen. Deshalb wurde – wie auch bei den Versuchen mit HEK-mGAT1-Zellen – für die Entwicklung der MS-Transport-Assays mit COS-7-Zellen, ($^2\text{H}_6$)GABA (3) als Substrat verwendet, um dieses von endogener GABA (1) unterscheiden zu können.

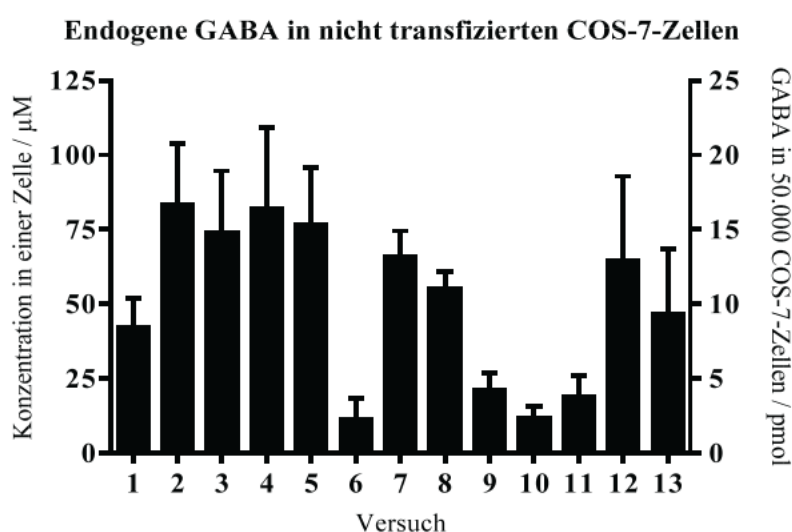


Abbildung 48: Gehalt an endogener GABA (1) in COS-7-Zellen

3.2.2.2. Generierung der COS-hGAT1 Zelllinie

Zur Herstellung einer stabilen COS-hGAT1-Zelllinie wurde das Zielgen hGAT1 in einen für die Transfektion von Säugerzellen geeigneten Vektor kloniert, welcher eine Blasticidinresistenz trägt und somit ebenfalls für eine eventuelle spätere Transfektion von Griptite™ 293 MSR-Zellen verwendet werden kann. Diese Blasticidinresistenz ist mit einem Cycle-3-GFP fusioniert, sodass die Expression des Resistenzgens fluorimetrisch verfolgt werden kann. Dies bietet den Vorteil, dass transfizierte Klone schneller identifiziert werden können. Überdies könnte die Fluoreszenz später für eine Abschätzung der Zellzahl genutzt werden, wodurch sich eventuelle Zellverluste während des Assays erfassen ließen.

3.2.2.2.1. Klonierung eines pTracer-hGAT1-Vektors

Das Zielgen hGAT1 sollte in den pTracer™-CMV/Bsd-Vektor (6048 bp) der Firma lifetechnologies (Invitrogen™) kloniert werden. Dazu wurde die für hGAT1-kodierende Sequenz durch einen Restriktionsverdau aus dem pcDNA3.1-hGAT1-Vektor (7601 bp, A. Kragler) mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen EcoR1-HF und Xba1 erhalten. Diese wurde anschließend in den in der „multiple cloning site“ (MCS) mit EcoR1-HF und Xba1 geöffneten pTracer™-CMV/Bsd-Vektor (6008 bp) ligiert. Die Vektorkarte des verwendeten Zielvektors pTracer™-CMV/Bsd ist in Abbildung 49 dargestellt. Dieser Vektor trägt neben einer Ampicillin-Resistenz für die Vervielfältigung in E. coli ein GFP-Blasticidin-Resistenzgen, welches eine Selektion in Säugerzellen erlaubt. Die Expression des in die MCS klonierten Zielgens hGAT1 wird durch einen CMV-Promoter vermittelt.

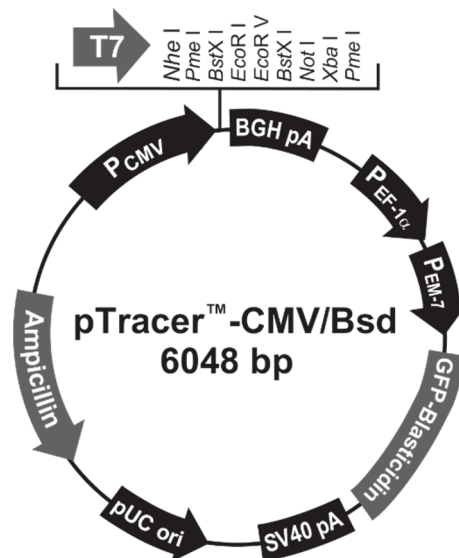


Abbildung 49: Vektorkarte des pTracer™-CMV/Bsd

Zur Klonierung wurden etwa 10 µg pcDNA3.1-hGAT1 mit jeweils 20 units EcoR1-HF und Xba1 für 2 h bei 37 °C verdaut und die resultierenden DNA-Fragmente anschließend über ein präparatives Agarosegel (1%ig) getrennt. Das mit EcoR1-HF und Xba1 aus dem pcDNA3.1-Vektor geschnittene DNA-Fragment für das hGAT1-Gen hat eine Größe von 2131 bp, weshalb die bei ~2kb laufende Bande aus dem Gel extrahiert wurde.

Für die Linearisierung des pTracer™-CMV/Bsd-Vektors wurde dieser mit 20 u EcoR1-HF und 20 u Xba1 über Nacht bei 37 °C inkubiert und anschließend nach Zugabe von 5 u Phosphatase für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert, um die 5'-Phosphatgruppe zu entfernen und somit ein Rezyklisieren des geöffneten

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

pTracer™-CMV/Bsd-Vektors zu verhindern. Dies reduziert folglich die Anzahl transformierter E. coli-Klone welche einen leeren Vektor aufgenommen haben. Der Restriktionsverdau wurde über ein präparatives Agarosegel (1%ig) getrennt und die DNA-Bande bei ~6 kb aus dem Gel extrahiert.

Zur Überprüfung der erfolgreichen Rückgewinnung beider DNA-Fragmente aus dem präparativen Agarosegel wurden beide Extrakte auf einem analytischen Agarosegel untersucht (siehe Abbildung 50). Für das hGAT1-Gen (Spalte 3 und 4) wurde eine einzelne Bande bei etwa 2,1 kb, für den pTracer™-CMV/Bsd (Spalte 1 und 2) eine einzelne Bande bei etwa 6 kb identifiziert.

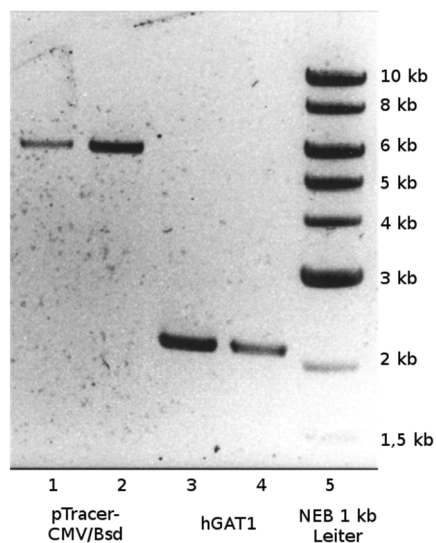


Abbildung 50: Agarosegel mit hGAT1 und geöffnetem pTracer™-CMV/Bsd

Zur Ligation beider DNA-Fragmente wurden diese zusammen mit 400 u T4-DNA-Ligase im Verhältnis Vektor/Insert 1/2 und 1/4 (m/m) bei 18 °C für 18 h inkubiert.

Die Amplifizierung des pTracer-hGAT1-Vektors erfolgte durch TSS-kompetente E. coli-Zellen, welche mit dem Ligationsansatz transformiert und anschließend für 24 h bei 37 °C auf einer Ampicillin-Agar-Platte bebrütet wurden. Sechs einzelne Kolonien wurden in einer Übernacht-Kultur vermehrt, deren DNA mittels einer Plasmidpräparation (Miniprep von Promega) extrahiert und auf einem analytischen Agarosegel charakterisiert (siehe Abbildung 51). Für alle Klone ergab sich ein identisches Bandenmuster, welches von einer intensiven Bande bei ~6kb dominiert wird. Des Weiteren ließen sich eine deutlich schwerere Bande (>10 kb) und eine sehr schwache Bande bei ~8 kb erkennen.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

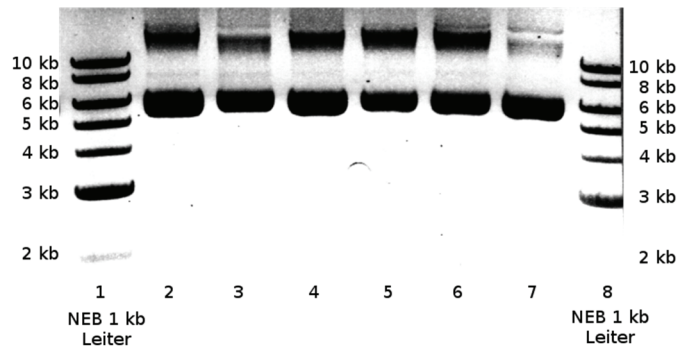


Abbildung 51: Agarosegel der Plasmidpräparation der sechs mit pTracer-hGAT1 transformierten *E. coli*-Klone

Bei der schwachen Bande bei ~8 kb handelt es sich vermutlich um den Zielvektor pTracer-hGAT1. Die Bande bei 6 kb kann ebenfalls den Zielvektor pTracer-hGAT1 darstellen, welcher durch eine „supercoiled-Struktur“ eine geringere Größe vortäuscht. Um zu überprüfen, ob es sich bei der gewonnenen DNA tatsächlich um das gewünschte Plasmid handelt, wurde die Plasmidpräparation von Klon 4 (Spalte 5 in Abbildung 51) jeweils mit EcoR1-HF, Xho1 und BamH1 verdaut und die resultierenden DNA-Fragmente auf einem analytischen Agarosegel untersucht (siehe Abbildung 52). Die erwarteten Fragmente der Restriktionsverdau des pTracer-hGAT1 und des pTracer™-CMV/Bsd sind in Tabelle 9 gegenübergestellt. Für den unverdauten Ansatz (Abbildung 52, Spalte 2 und 3) ist wieder eine starke, breite Bande zwischen 5-6 kb zu beobachten, die die „supercoiled-Struktur“ des Plasmides darstellt. Für den durch einen Restriktionsverdau mit EcoR1-HF linearisierten pTracer-hGAT1 (Spalte 8 und 9) ist eine deutliche DNA-Bande bei 8 kb zu beobachten, wohingegen keine Bande bei 6 kb auftritt. Dies bestätigt, dass es sich bei der beobachteten Bande der Plasmidpräparation von Klon 4 (Spalte 2 und 3) bei ~6 kb um die „supercoiled-Struktur“ des pTracer-hGAT1-Vektors und nicht um den pTracer™-CMV/Bsd-Vektor handelt. Auch der Verdau mit Xho1 liefert eine Bande bei ~6 kb (Spalte 6 und 7) welche für pTracer-hGAT1, nicht jedoch für pTracer™-CMV/Bsd spricht, welcher eine Bande bei ~4 kb liefern müsste (vergleiche auch Tabelle 9). Der Verdau mit BamH1 (Spalte 4 und 5) lieferte 2 Banden, eine bei ~4 kb und eine bei ~2,6 kb. Beide Vektoren liefern ein Fragment bei ~4 kb, jedoch ergibt nur der Zielvektor pTracer-hGAT1 ein Fragment bei 2.6 kb, wohingegen der Ursprungsvektor ein Fragment mit 2,1 kb liefern müsste. Die leichteren DNA-Fragmente (<2 kb) konnten auf diesem Gel nicht erfasst werden. Das aus den Restriktionsverdauen resultierende Bandenmuster spricht dafür, dass in dem vorliegenden Vektor das hGAT1-Insert eingebaut wurde und es sich somit um pTracer-hGAT1 handelt.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

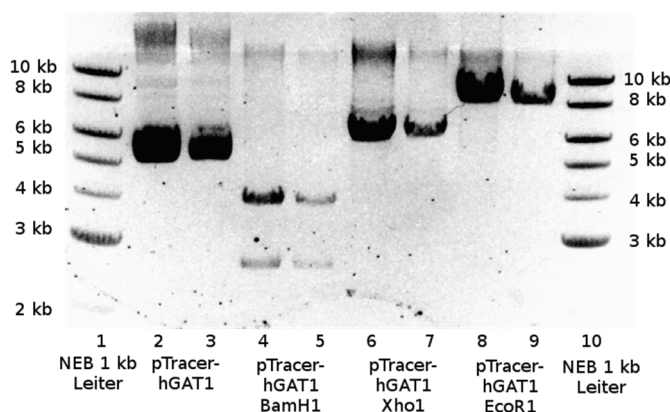


Abbildung 52: DNA-Bandenmuster von pTracer-hGAT1 aus E. coli Klon 4 mit EcoR1-HF, Xho1 und BamH1.

Tabelle 9: Größe der erwarteten DNA-Fragmente eines Restriktionsverdau des verwendeten Vektors mit und ohne Insert.

Restriktions- enzym	pTracer™-CMV/Bsd				pTracer-hGAT1			
	Anzahl der Schnittstellen	DNA Fragmente (kb)			Anzahl der Schnittstellen	DNA Fragmente (kb)		
EcoR1-HF	1	6048			1	8143		
Xho1	3	4034	1287	727	3	6129	1287	727
BamH1	2	3879	2169		4	3879	2549	915 800

3.2.2.2.2. Transiente Transfektion und Vorversuche

Mit dem erhaltenen pTracer-hGAT1-Vektor wurden COS-7-Zellen transient transfiziert, um die Funktionsfähigkeit des Vektors in COS-7-Zellen zu überprüfen und erste Transportversuche durchzuführen. Dafür wurden 250.000 COS-7-Zellen in einer 6 cm Zellkulturschale ausgesät und am nächsten Tag mit dem Vektor pTracer-hGAT1 unter Zuhilfenahme von FuGene6 nach Angaben des Herstellers im Verhältnis 1/3 DNA/FuGene6 (m/v) transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin vom Kulturboden gelöst und je 50.000 Zellen in ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte gegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium mit einer Eppendorf 12-Kanal-Pipette aus der 96-Well Platte entfernt und die Zellen wurden zwei Mal mit 200 µL HEPES-Uptake-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Gegenwart verschiedener Konzentrationen (²H₆)GABA (**3**) in HEPES-Uptake-Puffer für 10 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie 5 Mal mit 250 µL 0,9% NaCl mit einer 300 µL-12-Kanal-Pipette gewaschen wurden. Zum Lysieren der Zellen wurden 250 µL MeCN/H₂O 80/20 (v/v) mit 10 nM (²H₂)GABA (**2**) vorsichtig zugegeben und die Zellen für mindestens 90 min bei Raumtemperatur lysiert. Die COS-hGAT1-Zellen blieben auch nach der Zugabe von MeCN/H₂O 80/20 (v/v) adhärent und lösen sich nicht vom Boden der 96-Well-Zellkulturplatte ab. Dies ist eine wichtige Eigenschaft, da so eine Probe zur Quantifizierung per LC-MS/MS direkt aus dem

Überstand der Zellkulturplatte entnommen werden kann, ohne einen weiteren Probenvorbereitungsschritt, wie eine Filtration zum Abtrennen der Zelltrümmer durchzuführen. Die quantifizierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in den Lysaten ist in Abbildung 53 gegen die eingesetzte Substratkonzentration aufgetragen.

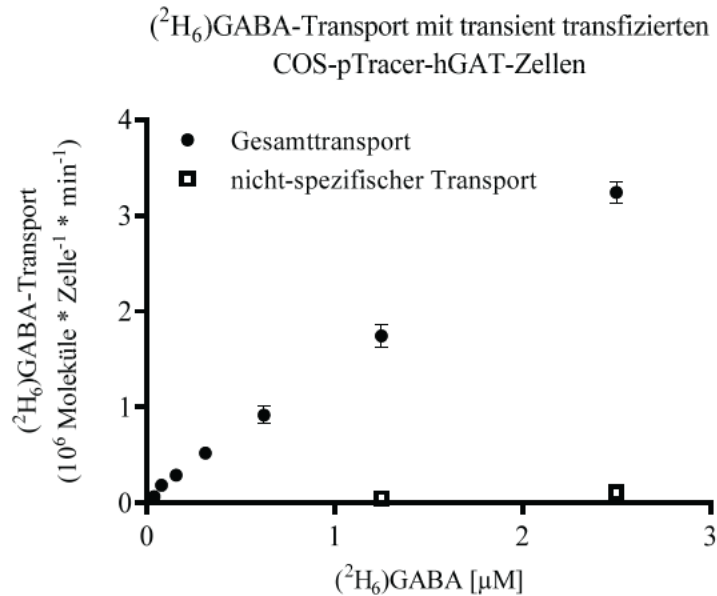


Abbildung 53: Transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in transient transfizierten COS-7-Zellen. Der nicht-spezifische Transport (Quadrate) wurde in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) ermittelt.

Die in Abbildung 53 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die mit pTracer-hGAT1 transient transfizierten COS-7-Zellen eine von der eingesetzten Konzentration abhängige Menge an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) transportierten (Kreise). Dieser Transport ließ sich effektiv durch 5 mM *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) unterdrücken (Quadrate), was zeigt, dass die quantifizierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) vermutlich aus einem hGAT1-vermittelten Transport hervorgeht. Somit scheint der Vektor pTracer-hGAT1 für die Expression von hGAT1 in COS-Zellen geeignet, weshalb mit diesem eine stabile Zelllinie generiert wurde.

3.2.2.2.3. Stabile Transfektion

Mit dem pTracer-hGAT1-Vektor wurde eine stabile COS-7-hGAT1-Zelllinie hergestellt, indem der pTracer-hGAT1-Vektor mit dem Restriktionsenzym Sca1 linearisiert wurde, welches den pTracer-hGAT1-Vektor nach dem Basenpaar 7700 – in einer Sequenz, welche auf dem Komplementärstrang für die Ampicillin-Resistenz kodiert – glatt schneidet. Eine Transfektion von Zellen mit bereits linearisierter

DNA erhöht die Wahrscheinlichkeit eines funktionsfähigen Einbaus des Vektors in das Erbgut der Zelle, indem nicht-funktionsfähige DNA-Brüche – beispielsweise Brüche in der das Zielgen kodierenden Sequenz – des zirkulären Vektors vermieden werden. Der linearisierte Vektor wurde über ein präparatives Agarosegel gereinigt. Um einen stabil transfizierten COS-hGAT1-Klon zu selektieren trägt der pTracer-hGAT1-Vektor eine Blasticidin-Resistenz (siehe Abbildung 49 auf Seite 95). Die zur Selektion potenter COS-hGAT1-Klone notwendige Konzentration an Blasticidin wurde anhand einer Tötungskurve für nicht-transfizierte COS-7-Zellen ermittelt. Dabei waren 2 mg/L Blasticidin im Kulturmedium ausreichend, um alle COS-7-Zellen innerhalb von 7 Tagen abzutöten. Um einen leicht höheren Selektionsdruck auf die Zellen auszuüben, wurde eine Konzentration von 3 mg/L Kulturmedium für die Selektion der COS-hGAT1-Klone verwendet. COS-7-Zellen wurden mit dem linearisierten pTracer-hGAT1-Vektor unter Verwendung von FuGene6® transfiziert und nach drei Tagen mit 3 mg/L Blasticidin selektioniert. Nach 14 Tagen Selektionsdruck wurden die Zellen abgelöst und in 96-Well-Zellkulturplatten verdünnt, um eine Einzelzellkolonie zu erhalten. Insgesamt wurden 94 COS-hGAT1-Klone erhalten, die in der biologischen Prüfung des Arbeitskreises mit einem radiometrischen Uptake-Assay⁸⁶ auf ihre Aktivität hin untersucht wurden (siehe Abbildung 54).

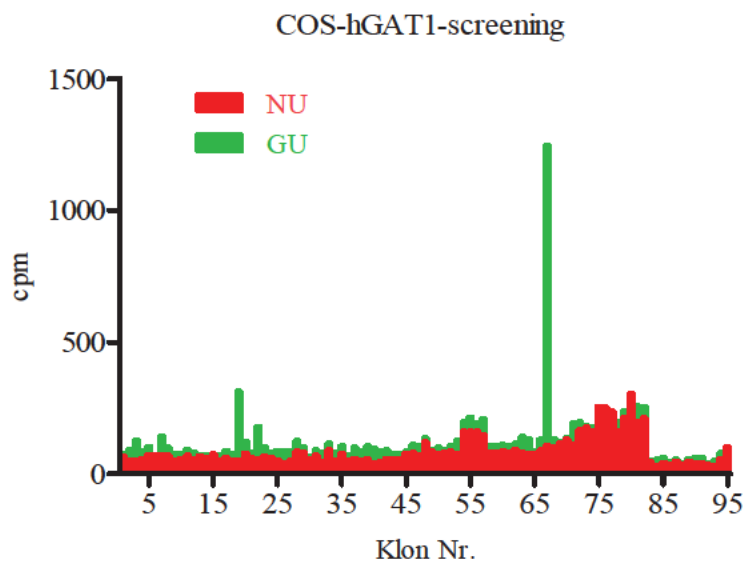


Abbildung 54: Screening der COS-hGAT1-Klone mittels [³H]GABA Uptake. Aufgenommene Radioaktivität bei 40 nM Substratkonzentration (grün). Der nicht-spezifische Uptake wurde in Gegenwart eines Überschusses GABA (10 mM) ermittelt (rot).

Nur Klon Nr. 67 hatte im [³H]GABA-Uptake-Assay einen ausreichend hohen spezifischen Uptake (spezifischer Uptake / nicht-spezifischer Uptake > 10). Allerdings zeigte sich während des Klon-screening-Prozesses, dass in allen erhaltenen Klonen keinerlei Fluoreszenz detektiert werden konnte.

Um zu überprüfen, ob der Ursprungsvektor pTracer™-CMV/Bsd eine messbare Fluoreszenz in COS-7-Zellen hervorruft, wurden COS-7-Zellen sowohl mit pTracer™-CMV/Bsd als auch mit einem Kontrollvektor, welcher für GFP kodiert, transient transfiziert und ihre Fluoreszenz nach 72 h am Platerader (Molecular Devices SpectraMax M2e, Ex: 395 nm, Em: 509 nm) gemessen. Die Zellen, welche mit pTracer™-CMV/Bsd transfiziert worden waren, zeigten im Gegensatz zu den mit dem Kontrollvektor transfizierten Zellen keine Fluoreszenz, was den Schluss nahe legt, dass entweder die Expression des Blastocidin-Cycle-3-GFP-Fusionsgens in pTracer™-CMV/Bsd für eine Detektion zu gering ist, obwohl sie für ein Wachstum der Zellen in Gegenwart von Blastocidin ausreichend scheint, oder, dass das GFP-Fusionsprotein nicht korrekt funktioniert, ohne die Funktion der Resistenz zu beeinträchtigen. Der Klon Nr. 67 wurde dennoch für die Entwicklung des MS-Transport-Assays verwendet.

3.2.2.3. Waschen der Zellen am Platewasher

Die auf COS-7-Zellen basierenden MS-Transport-Assays sollten die bei der Verwendung von HEK-Zellen beschriebenen Probleme vermeiden, indem zum Waschen der Zellen keine Filtration, sondern ein Platewasher eingesetzt wurde. Die adhärenen COS-hGAT1-Zellen ermöglichen es, den Inkubationsansatz in den 96-Well-Zellkulturplatten ohne die Verwendung von Filterplatten direkt von den Zellen zu trennen, indem das Inkubationsmedium in den 96-Well-Zellkulturplatten mit Hilfe eines Platewashers abgesaugt wird und die Zellen mit frischem Waschpuffer gewaschen werden. Der Platewasher sollte auch dazu genutzt werden, die mit den Zellen bewachsenen 96-Well-Zellkulturplatten für den Assay vorzubereiten, also das Kulturmedium zu entfernen und durch HEPES-Uptake-Puffer zu ersetzen. Wie in Kapitel 3.2.1.1 „Filtrieren und Waschen“ auf Seite 81 beschrieben, führt die Verwendung von NaCl im Waschpuffer zu unerwünschten Interferenzen mit der Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**). Aus diesem Grund wurde zum Waschen der COS-Zellen eine Lösung von 154 mM CH₃COONH₄, pH 7,4 verwendet. In Vorversuchen war bereits gefunden worden, dass die 96-Well-Zellkulturplatten mit Hilfe einer Eppendorf-Mehrkanalpipette effizient gewaschen werden konnten. Um den Waschprozess gleichmäßiger, reproduzierbarer, schneller und somit effizienter zu machen, sollten die 96-Well-Zellkulturplatten mit Hilfe eines Platewashers (Tecan Hydrospeed) gewaschen werden. Da der Platewasher das Absaugen des Mediums aus der Platte durch eine Vakuumaspiration erreicht, welche im Vergleich zur Aspiration des Mediums mit Eppendorf-Mehrkanalpipetten einen deutlich größeren Unterdruck verwendet, kann das Medium in den mit Zellen bewachsenen Platten nicht wie mit einer manuellen Pipette annähernd vollständig aspiriert werden, da es ansonsten zu Schäden am Zellrasen und somit zu Zellverlusten kommen würde. Aus diesem Grund muss bei der Verwendung des Platewashers zum Waschen von adhärenen Zellen ein gewisser Abstand zum Plattenboden eingehalten werden, um die Zellen nicht vom Boden abzulösen

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

und zu aspirieren. Dieser Abstand wurde für die verwendeten Zellkulturplatten für die verschiedenen Waschschriffe optimiert, sodass sich auch nach häufigem Waschen (>50 Waschzyklen) keine unter dem Mikroskop erkennbaren Zellverluste ergaben. Die gewählten Parameter für den Platewasher sind in Tabelle 10 sowohl für den ersten Waschschriff zur Vorbereitung der Platten für den Uptake, als auch für den zweiten Waschschriff zur Terminierung des Transportes angegeben.

Tabelle 10: Verwendete Parameter des Platewashers Tecan Hydrospeed

		Waschen zur Vorbereitung des Transportes	Waschen zum Terminieren des Transportes
Zyklen		4	10
	Aspirieren		
	z-Position	6,5 mm	6,5 mm
	x-Position	2,2 mm	2,2 mm
	y-Position	0 mm	0 mm
	Dauer	1 s	1 s
	Absenkgeschwindigkeit	4 mm/s	5 mm/s
	Absaugrate	-200 mbar	-200 mbar
	Restvolumen je Well	75 µL	75 µL
	Dispensieren		
	z-Position	5 mm	5 mm
	x-Position	2,2 mm	2,2 mm
	y-Position	0 mm	0 mm
	Kopf Bewegen	Ja	Ja
	Dispensierrate	90 µL/s	90 µL/s
	Volumen	300 µL	300 µL
Endabsaugen	Aspirieren		
	z-Position	7,5 mm	5,5 mm
	x-Position	2,2 mm	2,2 mm
	y-Position	0 mm	0 mm
	Dauer	2 s	2 s
	Absenkgeschwindigkeit	3 mm/s	4 mm/s
	Absaugrate	-200 mbar	-200 mbar
	Restvolumen je Well	100 µL	50 µL
	Gesamtzeit	70 s	140 s

Die z-Position beschreibt den Abstand zwischen dem Plattenboden und der Aspirationsnadel, die x-Position bzw. y-Position deren jeweilige Lageverschiebung vom Zentrum eines Wells. Die Dauer beschreibt die Zeit, welche die Aspirationsnadel in ihrer Endposition verweilt, bevor sie in die Ausgangslage zurückkehrt. Die Absenkgeschwindigkeit beschreibt die Geschwindigkeit, mit der die Aspirationsnadel aus ihrer Ausgangsstellung in ihre Endposition abgesenkt wird. Die Absaugrate beschreibt die Druckdifferenz zwischen dem Umgebungsdruck und den in den Aspirationsnadeln des Platewashers befindlichen Druck. Die Dispensierrate beschreibt die Geschwindigkeit, mit der die entsprechende Lösung durch die Dispensiernadeln in ein Well abgegeben wird. Während des Dispensiervorganges wird der Waschkopf des Platewashers angehoben, sodass die Dispensiernadeln nicht in die Lösung eintauchen. Dies wird durch die Funktion „Kopf bewegen“ beschrieben. Die in Tabelle 10 angegebenen Restvolumina in einem Well einer 96-Well-Zellkulturplatte wurden sowohl durch Auswiegen einer leeren Zellkulturplatte jeweils vor und nach einem Waschvorgang, als auch volumetrisch mit Hilfe einer Eppendorf-Pipette bestimmt.

Durch das in Tabelle 10 beschriebene Waschprotokoll zur Terminierung des Transportes ergibt sich eine theoretische Verdünnung des Inkubationsansatzes mit jedem Waschzyklus von 1:5 (75 µL:375 µL). Um die Proben effektiv zu waschen wurde der in Tabelle 10 beschriebene Waschzyklus zum Terminieren des Transportes 10 Mal wiederholt, wodurch sich eine Verdünnung des Inkubationsansatzes von $1:5^{10} \approx 1:10.000.000 = 1:10^7$ ergibt. Durch die Zugabe der Lyselösung zu den nach der Endabsaugung verbleibenden 50 µL Waschpuffer (siehe Tabelle 10) wird der Ansatz ein weiteres Mal 1:5 verdünnt, woraus eine Gesamtverdünnung von $2:10^8$ resultiert. Somit können in den angestrebten MS-Transport-Assays Substratkonzentrationen von bis zu 10 mM eingesetzt werden, die mit diesem Waschprotokoll theoretisch auf eine Konzentration von 200 pM verdünnt werden, was dem LLOQ der Quantifizierungsmethode (siehe Tabelle 4 auf Seite 59) entspricht.

3.2.2.4. Lyse der Zellen

Nachdem die Zellen von ihrem Inkubationsansatz getrennt und gewaschen waren, sollten sie lysiert werden, um internalisiertes Substrat freizusetzen und für die Quantifizierung zugänglich zu machen. Die Lyse mit Detergenzien ist aufgrund der LC-MS/MS-Quantifizierung nicht geeignet, weshalb die Lyse durch Zugabe eines organischen Lösemittels erfolgen sollte. Hierbei ist wichtig zu beachten, dass das nach der Lyse resultierende Probenmilieu der mobilen Phase der LC-Methode entspricht, oder eine geringere Elutionskraft als diese besitzt (siehe Kapitel 3.1.3.4.3 „Injektionsmedium“ auf Seite 53). Daher wurden zur Lyse der Zellen 200 µL einer Lösung aus MeCN/H₂O 87,5/12,5 (v/v) verwendet, welche nach der Zugabe zu den 50 µL Waschpuffer (154 mM CH₃COONH₄), die nach dem Waschen am Platewasher in einem Well verblieben (siehe Kapitel 3.2.2.3 „Waschen der Zellen am Platewasher“ auf Seite 101, sowie Tabelle 10) zu einem Probenmilieu von MeCN/CH₃COONH₄ 103 mM, 70/30 (v/v) führt, was dem Verhältnis organischer- zu wässriger Phase der mobilen Phase der LC-MS/MS-Methode entspricht.

Des Weiteren enthielt die Lyselösung 12,5 nM (²H₂)GABA (**2**), was einer Konzentration an internem Standard von 10 nM in den lysierten Proben entspricht. Somit kompensiert der interne Standard alle Unsicherheiten, welche nach der Lyse der Zellen auftreten können, wie zum Beispiel ein schwankendes Messsignal während der Quantifizierung oder das Verdunsten von Probenlösemittel.

Die Lyse der COS-Zellen durch MeCN/H₂O 70/30 (v/v) zeigte einen weiteren entscheidenden Vorteil gegenüber anderen Lysemethoden. Die COS-Zellen blieben auch nach der Zugabe des Lysemediums am Boden der Zellkulturplatte haften, sodass keine Zelltrümmer in der Probe suspendiert waren und der Überstand ohne weitere Probenvorbereitungsschritte direkt per LC-MS/MS gemessen werden konnte.

Um eine vollständige Lyse der Zellen und somit eine vollständige Freisetzung internalisierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) sicherzustellen, wurde der Gehalt an freigesetzter GABA (**1**) von nicht-transfizierten COS-7-Zellen nach unterschiedlichen Zeiten nach der Zugabe der Lyselösung ermittelt (siehe Abbildung 55).

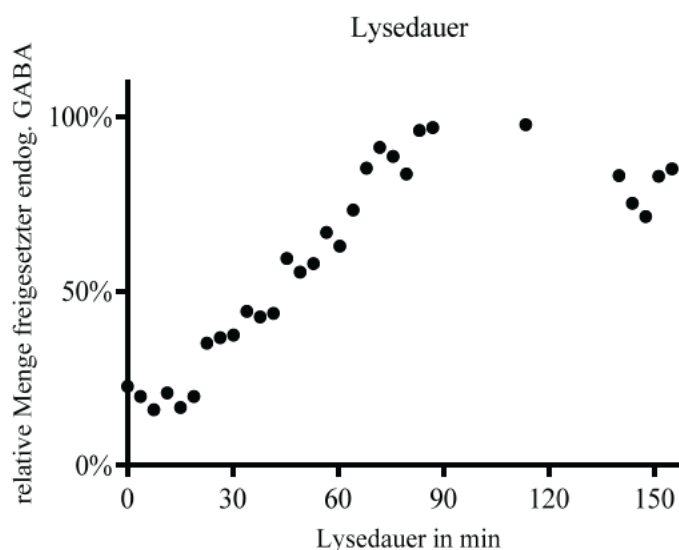


Abbildung 55: Freigesetzte Menge endogener GABA (**1**) in Abhängigkeit der Lysedauer.

Die Menge an GABA (**1**) in den Zelllysaten nimmt linear mit der Lysedauer zu und erreicht nach etwa 90 min ein Plateau. Deshalb wurden die COS-Zellen vor der Quantifizierung des ($^2\text{H}_6$)GABA-Transportes stets mindestens 90 min lang lysiert.

3.2.2.5. Temperaturabhängigkeit

Die Temperatur bei welcher der GABA-Transport erfolgt, hat einen großen Einfluss auf die Transportrate und somit auf die aufgenommene Menge GABA.¹⁷⁰

Um diesen Einfluss der Temperatur auf den ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport zu untersuchen, wurden 50.000 Zellen/Well in verschiedene 96-Well-Zellkulturplatten gesät, am nächsten Tag viermal mit HEPES-Uptake-Puffer bei 4 °C, 21 °C und 37 °C am Platewasher gewaschen und anschließend für 15 min bei 4 °C, 21 °C oder 37 °C vorinkubiert. Dann wurden 100 µL entsprechend temperierter HEPES-Uptake-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zugegeben und die Platten weitere 8 min bei ihrer entsprechenden Temperatur inkubiert. Dann wurden die Zellen am Platewasher gewaschen, lysiert und die Menge an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in den Lysaten quantifiziert. Die aus dem entsprechenden spezifischen Transport resultierenden Sättigungsisothermen sind in Abbildung 56 dargestellt.

Die Menge an transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) bei 4 °C war vernachlässigbar gering (Kreise), wohingegen bei 37 °C (Dreiecke) signifikante Mengen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch die COS-hGAT1-Zellen aufgenommen worden waren. Dieser Transport hatte im Vergleich zum Transport bei einer Temperatur von 21 °C (Quadrate) eine etwa doppelt so große maximale Transportrate (V_{\max}). In beiden Fällen erwies sich der Transport als sättigbar.

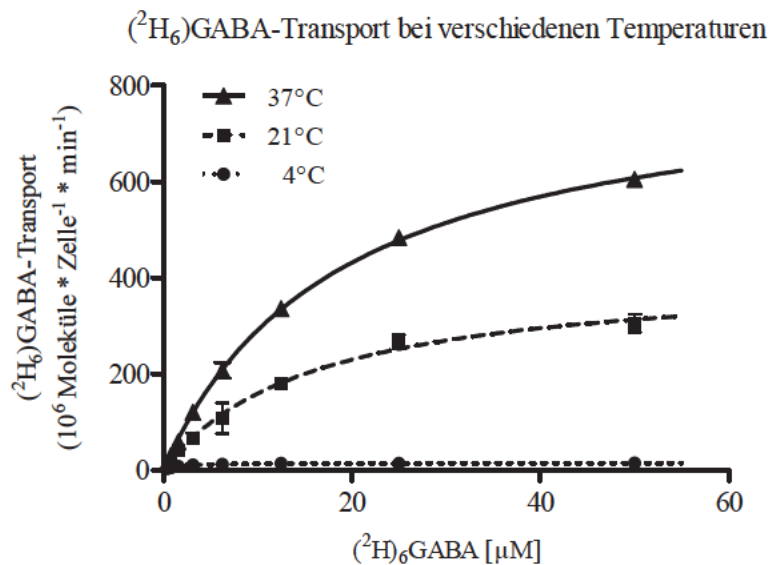


Abbildung 56: ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport bei verschiedenen Temperaturen (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). Der nicht-spezifische Transport wurde in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipecotinsäure (*rac*-**5**) bestimmt und von dem gemessenen Gesamttransport abgezogen.

Da die von den COS-hGAT1-Zellen aufgenommene Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) bei 37 °C im Vergleich zu der bei 21 °C aufgenommenen Menge deutlich höher war, wurde für die MS-Transport-Assays eine Temperatur von 37 °C gewählt. Diese wurde während des gesamten Assays bis zum Waschen der Zellen mit 154 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ konstant gehalten. Die physiologische Temperatur von 37 °C reduziert zum einen den Zellstress während des Assays, zum anderen haben die Ergebnisse der MS-Transport-Assays bei 37 °C eine höhere Relevanz, da sie physiologische Bedingungen besser widerspiegeln.

3.2.2.6. Natriumabhängigkeit

GABA-Transporter sind, wie in Kapitel 1.3 „GABA-Transporter“ auf Seite 5 behandelt, natriumabhängige Symporter. Deswegen wurde die Abhängigkeit des ($^2\text{H}_6$)GABA-Transportes von den Natriumionen im HEPES-Uptake-Puffer untersucht. Dazu wurden Transportassays sowohl mit nicht-transfizierten COS-7-Zellen als auch mit COS-hGAT1-Zellen in Na^+ -freiem HEPES-Uptake-Puffer

durchgeführt, in dem NaCl durch eine äquimolare Konzentration Cholinchlorid ersetzt und der pH-Wert mit NH₄OH auf pH 7,1 eingestellt worden war. Für den Versuch wurden 50.000 Zellen/Well in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät und am nächsten Tag viermal mit Na⁺-freiem HEPES-Uptake-Puffer gewaschen (siehe Tabelle 10 auf Seite 102). Nach der anschließenden Vorinkubation der Zellen für 15 min bei 37 °C wurden 100 µL Na⁺-freier HEPES-Uptake-Puffer mit variierenden Konzentrationen (²H₆)GABA (3) zu den nach dem Waschen verbleibenden 100 µL Puffer (siehe Tabelle 10 auf Seite 102) gegeben. Anschließend wurden die Zellen für 8 min bei 37 °C inkubiert und dann wie bereits beschrieben mit 154 mM CH₃COONH₄ am Platwasher gewaschen (siehe Tabelle 10 auf Seite 102) und anschließend lysiert. War NaCl im HEPES-Uptake-Puffer durch Cholinchlorid ersetzt worden, konnten nach dem Uptake von (²H₆)GABA (3) nur extrem geringe Konzentrationen an (²H₆)GABA (3) (5×10^5 Moleküle \times Zelle⁻¹ \times min⁻¹ in Abwesenheit von Na⁺ vs. $4,5 \times 10^7$ Moleküle \times Zelle⁻¹ \times min⁻¹ in Gegenwart von Na⁺, siehe Abbildung 58) in den COS-hGAT1-Zellen quantifiziert werden, welche den Konzentrationen an (²H₆)GABA (3) in nicht-transfizierten COS-7-Zellen nach dem Uptake von (²H₆)GABA (3) in Na⁺-freiem HEPES-Uptake-Puffer entsprachen (Siehe Abbildung 57).

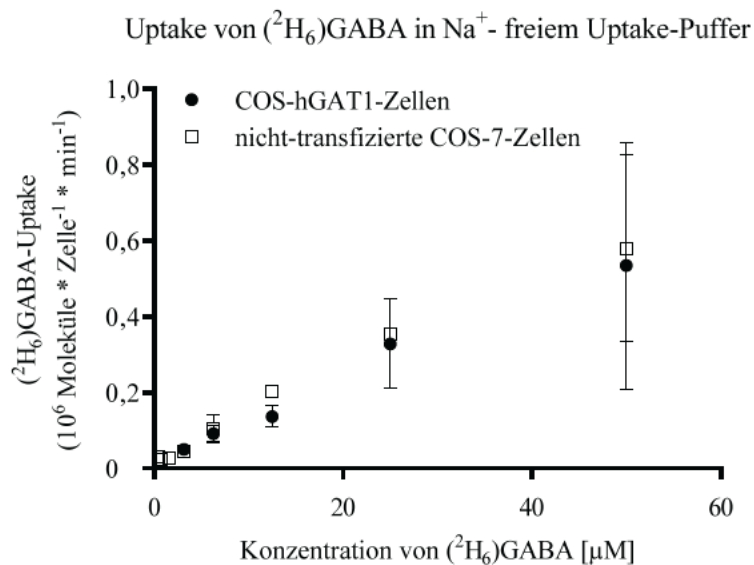


Abbildung 57: (²H₆)GABA-Transport (Mittelwert \pm SD, n=3) in Na⁺-freiem HEPES-Uptake-Puffer. Vergleich der transportierten Menge an (²H₆)GABA (3) von COS-hGAT1-Zellen (schwarze Kreise) und nicht-transfizierten COS-7-Zellen (leere Quadrate).

Dies zeigt, dass die quantifizierte Menge (²H₆)GABA (3) in COS-hGAT1-Zellen in Na⁺-haltigem Inkubationsmedium im Wesentlichen aufgrund eines Na⁺-abhängigen Transportes in die Zelle gelangt und nicht aufgrund unspezifischer Diffusion.

3.2.2.7. Vorinkubation der Zellen

Die Vitalität der Zellen während des Assays wurde anhand ihres ($^2\text{H}_6$)GABA-Transportes nach verschiedenen Vorinkubationszeiten untersucht. Dazu wurden 50.000 COS-hGAT1 Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte gesät und am nächsten Tag viermal mit HEPES-Uptake-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in den nach dem Waschen verbleibenden 100 μL HEPES-Uptake-Puffer für verschieden lange Zeiten von 5 min bis 3 h bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurden 100 μL HEPES-Uptake-Puffer mit verschiedenen Konzentrationen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zugegeben und die Zellen für 8 min bei 37 °C inkubiert, bevor sie mit 154 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ gewaschen wurden, um den Transport zu beenden. Nach der Lyse der Zellen wurde transportierte ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) quantifiziert. Die nach den verschiedenen Vorinkubationszeiten resultierenden Sättigungsisothermen von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) sind in Abbildung 58 dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass Vorinkubationszeiten von bis zu 3 h nicht zu auffälligen Veränderungen der Sättigungsisothermen führen und somit die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) nahezu unabhängig von der Vorinkubationszeit ist.

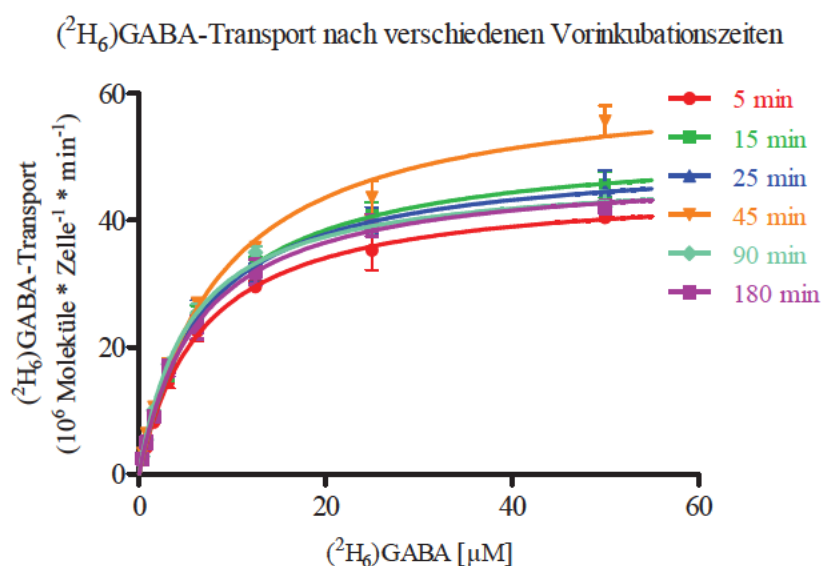


Abbildung 58: ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport nach verschiedenen Vorinkubationszeiten in HEPES-Uptake-Puffer (Mittelwert \pm SD, $n = 3$). Um den dargestellten spezifischen Transport zu erhalten, wurde der nicht-spezifische Transport in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipicotinsäure (*rac*-**5**) bestimmt und von dem gemessenen Gesamttransport abgezogen.

Nach 3 h Vorinkubation (violette Kurve in Abbildung 58) in HEPES-Uptake-Puffer nehmen die COS-hGAT1-Zellen eine vergleichbare Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) auf, wie COS-hGAT1-Zellen, die nur 5 min vorinkubiert wurden (rote Kurve). Dies zeigt außerdem, dass die Zellen nach 3 h in HEPES-Uptake-Puffer noch vital sind und keinen Einbruch in ihrem Vermögen zum ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport haben, sodass

auch Langzeituntersuchungen möglich sind, wie dies beispielsweise bei Effluxexperimenten der Fall ist (siehe Kapitel 3.4.5 „Efflux-Experimente an hGAT1“ auf Seite 152).

Für die weiteren Versuche wurde eine Vorinkubationsdauer von 25 min gewählt, da dies einen guten Kompromiss aus einer ausreichend langen Vorinkubationsdauer zum Erreichen eines Bindungsgleichgewichtes eines Inhibitors in späteren Konkurrenzexperimenten (siehe Kapitel 3.4.4 „Kompetitive MS-Transport-Assays“ auf Seite 129), sowie einer schnellen Durchführung des Assays darstellt.

3.2.2.8. Transportdauer

Einer der Parameter bei der Entwicklung der MS-Transport-Assays, der erheblichen Einfluss auf die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) hat, ist die Dauer des Transportes. Um den Einfluss der Transportdauer auf die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu untersuchen, wurden 50.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät, am nächsten Tag mit HEPES-Uptake-Puffer gewaschen und anschließend bei 37 °C vorinkubiert. Die Vorinkubation erfolgte noch für 15 min anstelle von 25 min, die für die weiteren Versuche gewählt wurden, da die Versuche zur Optimierung der Transportdauer parallel zu den Versuchen zur Optimierung der Vorinkubationszeit durchgeführt wurden. Dann wurden 100 μL HEPES-Uptake-Puffer mit 1,56 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu den auf den COS-hGAT1-Zellen verbleibenden 100 μL HEPES-Uptake-Puffer gegeben (siehe Tabelle 10 auf Seite 102), der Transport nach 4 min, 8 min, 15 min, 30 min, 60 min und 120 min durch Waschen mit 154 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ beendet und die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) nach der Lyse der Zellen quantifiziert. Für die Transportzeiten von 15 min bis 120 min wurden die Proben vor der Quantifizierung 1:10 (v/v) mit MeCN/ H_2O 70/30 (v/v) mit 10 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) verdünnt, um die zu erwartenden hohen Konzentrationen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu verdünnen. Der Verlauf der transportierten Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) während verschiedener Transportzeiten ist für eine Substratkonzentration von 780 nM in Abbildung 59 dargestellt.

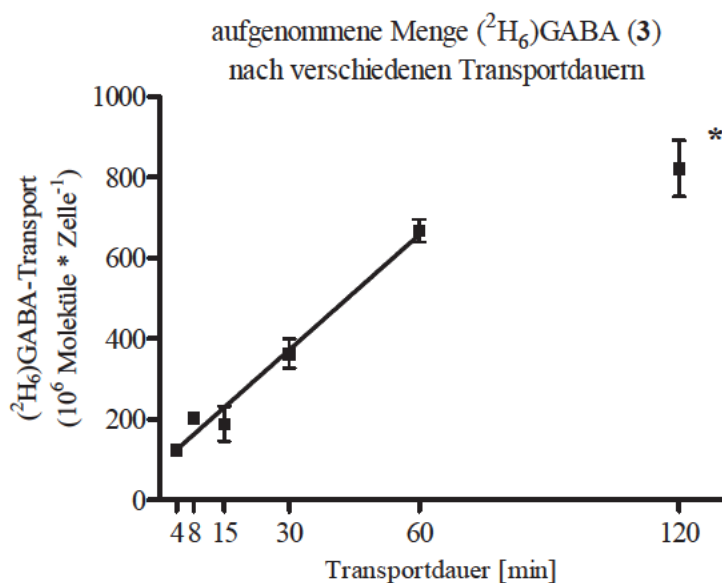


Abbildung 59: Spezifischer Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) innerhalb verschiedener Transportzeiten von 5 min bis 2 h bei einer Substratkonzentration von 780 nM. Der nicht-spezifische Transport wurde in Gegenwart von 5 mM *rac*-Nipecotinsäure (*rac*-**5**) ermittelt und vom Gesamttransport abgezogen. (Mittelwerte \pm SD, $n=3$; * $n=2$)

Die innerhalb eines Zeitintervalls von den COS-hGAT1-Zellen aufgenommene Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) steigt mindestens bis zu einer Transportdauer von 1 h linear an, was bedeutet, dass die COS-hGAT1-Zellen während dieser Zeit eine konstante Transportrate haben. Werden die COS-hGAT1-Zellen noch länger mit Substrat inkubiert (120 min) so nimmt zwar auch die transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu, jedoch nicht mehr proportional zur Inkubationsdauer (die Mengen transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für die Transportdauer 120 min war im Vergleich zu den Mengen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**), welche während 60 Minuten aufgenommen wurden nicht doppelt so groß, siehe Abbildung 59).

Für die weiteren Versuche der MS-Transport-Assays wurde eine Transportdauer von 6 min gewählt, in der die COS-hGAT1-Zellen mit Substrat inkubiert wurden und die sich an die Vorinkubationsdauer anschloss. Diese Transportdauer stellt einen guten Kompromiss aus der erzielten Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) – um ein ausreichend sensitives Signal für die LC-MS/MS-Quantifizierung zu erhalten – und um eine ausreichend konstante Transportrate während des gesamten MS-Transport-Assays zu garantieren. Überdies lässt sich durch eine Transportdauer von 6 min gewährleisten, dass die Substratkonzentration während des Transportes nahezu unverändert bleibt. Eine Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat wird in Kapitel 3.4.4.2 „Abschätzung der Konzentrationsänderung“ auf Seite 133 behandelt. Es ist wichtig, diese Transportdauer möglichst reproduzierbar einzuhalten, um vergleichbare Resultate für verschiedene Probenserien zu erhalten.

3.2.2.9. Optimierung der Zellzahl

Die Zellzahl, welche für eine einzelne Probe eingesetzt wird, bestimmt die Gesamtmenge an Substrat, welche innerhalb dieser Probe aufgenommen wird. Deswegen ist es notwendig, dass die Zellzahl pro Well innerhalb einer Probenserie nahezu konstant ist, um einzelne Proben miteinander vergleichen zu können. Die Untersuchungen zum Einfluss der Zellzahl erfolgten parallel zu den Untersuchungen der Transportdauer, weshalb für die Versuche zur einzusetzenden Zellzahl noch eine Vorinkubationszeit von 15 min und eine Transportdauer von 8 min verwendet wurden.

Zur Optimierung der Zellzahl, welche in einem Well einer 96-Well-Zellkulturplatte eingesetzt werden sollte, wurden die COS-hGAT1-Zellen trypsinisiert und in einer Neubauer-Kammer gezählt. Anschließend wurden verschiedene Zelldichten zwischen 4000 und 100.000 Zellen pro Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Kulturmedium durch Waschen der Platten im Platewasher entfernt und durch HEPES-Uptake-Puffer ersetzt. Dann wurden die Zellen für 15 min bei 37 °C vorinkubiert und anschließend in Gegenwart von 1 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für 8 min inkubiert. Der Substrattransport wurde durch Waschen mit Waschpuffer am Platewasher beendet und die transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) nach der Lyse der Zellen quantifiziert. Wie in Abbildung 60 zu erkennen ist, war die Menge transportierten Substrates bis zu einer Zellzahl von etwa 40.000 Zellen/Well annähernd proportional zur Zellzahl. Oberhalb dieser Zellzahl war die aufgenommene Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) mindestens bis zu 100.000 Zellen pro Well nahezu konstant. Dies deckt sich auch mit der Beobachtung, dass der Boden der Zellkulturplatte ab etwa 50.000 Zellen pro Well durch eine Monolage an Zellen vollständig bewachsen ist.

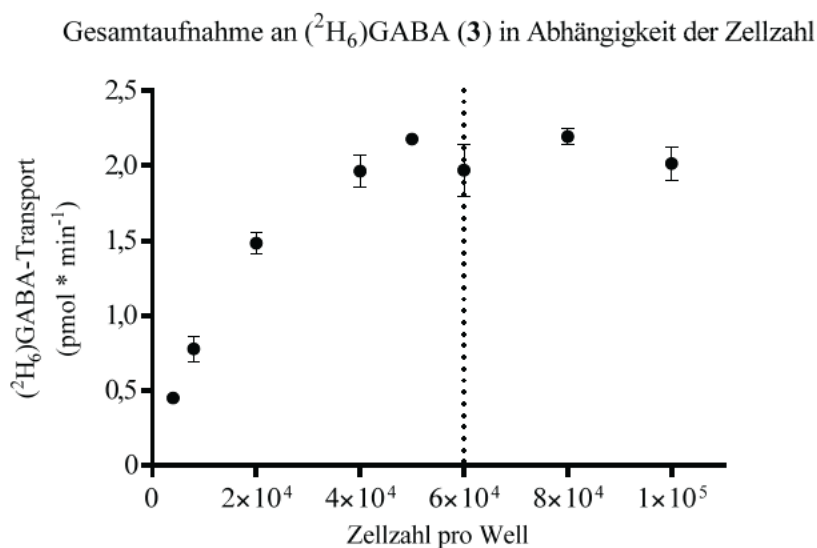


Abbildung 60: Substrattransport von 1 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in Abhängigkeit der Zellzahl

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Aus diesem Grund wurden für alle weiteren Versuche 60.000 COS-hGAT1-Zellen pro Well verwendet, da so die aufgenommene Substratmenge pro Well in Bezug auf die Zellzahl ihren Maximalwert erreicht und kleine aber unvermeidbare Schwankungen in der Zellzahl innerhalb einer Probenserie keinen großen Einfluss auf die Menge transportierten Substrates haben.

Um abzuschätzen, wie groß die Schwankungen der ($^2\text{H}_6$)GABA-Aufnahme innerhalb einer Probenserie sind, wurden COS-hGAT1-Zellen in jeweils 24 identischen Proben mit $1\ \mu\text{M}$ Substrat für 8 min inkubiert und die Menge transportierten Substrates quantifiziert. Die Abweichungen der erhaltenen Messwerte für GABA ($m/z\ 104/87$), ($^2\text{H}_2$)GABA ($m/z\ 106/89$) und ($^2\text{H}_6$)GABA ($m/z\ 110/73$), sowie die Schwankungen der Flächenverhältnisse $\frac{m/z_{110/73}}{m/z_{104/87}}$ und $\frac{m/z_{110/73}}{m/z_{106/89}}$ für die Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) mit endogenem internen Standard GABA (**1**), bzw. mit dem internen Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) sind in Abbildung 61 relativ zu ihrem Mittelwert dargestellt.

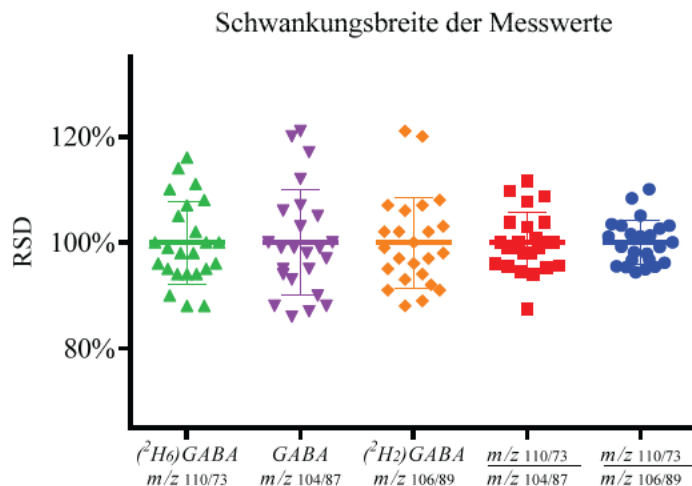


Abbildung 61: Streuung der einzelnen Messwerte, welche anhand von 24 identischen Proben eines Substrattransportes bei $1\ \mu\text{M}$ ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) mit 60.000 Zellen/Well erhalten wurden. Dargestellt sind die Abweichungen der einzelnen Messergebnisse von ihrem Mittelwert (Punkte), sowie deren relative Standardabweichung (Balken).

Die Schwankungsbreite für die Messwerte des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) $m/z\ 106/89$ (orange) sind relativ gering (<20%), was bedeutet, dass das MS-Messsignal stabil, und damit die Analytik robust ist. Ebenfalls sind die Schwankungsbreiten von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) $m/z\ 110/73$ (grün) und GABA (**1**) $m/z\ 104/87$ (violett) gering, was für einen reproduzierbaren Assay spricht. Wurde die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) anhand des endogenen internen Standards GABA (**1**) quantifiziert (rot), wurden ähnliche Schwankungsbreiten (5,5% RSD) wie für eine Quantifizierung mit ($^2\text{H}_2$)GABA

m/z 106/89 (blau, 4,2% RSD) als internem Standard erhalten. Des Weiteren sind bei den MS-Transport-Assays mit adhärennten COS-7-Zellen im Gegensatz zu den Transport-Assays mit HEK-mGAT1-Zellen in Suspension (siehe Kapitel 3.2.1.4 „Endogene GABA als nativer interner Standard zur Korrektur von Zellverlusten während der Probenaufbereitung“ auf Seite 88), keine messbaren Zellverluste während des gesamten Assays zu beobachten, weshalb die Proben relativ homogen sind und mit dem internen Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) sicher quantifiziert werden können.

Ein weiterer Vorteil bei der Nutzung von ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) als internem Standard ist, dass durch die Verwendung definierter Mengen ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) variierende Messergebnisse zwischen verschiedenen Versuchstagen, welche durch die natürlich schwankende endogene GABA-Konzentrationen von Versuchstag zu Versuchstag hervorgerufen würde (siehe Kapitel 3.2.2.1 „Endogene GABA in COS-7-Zellen“ auf Seite 93), vermieden werden.

Nichtsdestoweniger kann und sollte die Menge endogener GABA (**1**) bei der Bewertung von Messergebnissen beachtet werden, da eine innerhalb eines Versuches stark abweichende Menge endogener GABA (**1**) einen Hinweis auf etwaige Probleme liefern kann. So können zum Beispiel Substanzen in Konkurrenzexperimenten (siehe Kapitel 3.4.4 „Kompetitive MS-Transport-Assays“ auf Seite 129), welche eine Reduktion der quantifizierten Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) aufgrund einer Zelllyse und nicht aufgrund einer Inhibition der GABA-Transporter verursachen, anhand der ebenfalls reduzierten Menge endogener GABA (**1**) erkannt werden.

3.2.2.10. pH-Wert des HEPES-Uptake-Puffers

Der Transport von Substraten durch Membrantransporter kann durch den die Transporter umgebenden pH-Wert beeinflusst werden.¹⁷¹ Dies bedeutet für die MS-Transport-Assays, dass der pH-Wert des HEPES-Uptake-Puffers einen Einfluss auf die Menge transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) haben kann. Um dies zu untersuchen wurden MS-Transport-Assays mit HEPES-Uptake-Puffern mit pH-Werten von 6,9, 7,1, 7,2 und 7,4 durchgeführt. Dabei wurde für alle folgenden Versuche auch das Probenvolumen der MS-Transport-Assays von 200 μL /Well auf 250 μL /Well erhöht. Dadurch sind bei gleicher Substratkonzentration 25% mehr ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) im Inkubationsmedium vorhanden, wodurch die Änderung der extrazellulären Substratkonzentration während des Assays weiter reduziert wird. Eine Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat während des MS-Transport-Assays ist für ein Assayvolumen von 250 μL in Kapitel 3.4.4.2 „Abschätzung der Konzentrationsänderung“ auf Seite 133 zu finden. Es wurden 60.000 COS-hGAT1-Zellen/Well für 25 min bei 37 °C vorinkubiert und der ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport für 6 min ermöglicht. In Abbildung 62 ist der spezifische Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) von COS-hGAT1-Zellen bei verschiedenen pH-Werten dargestellt.

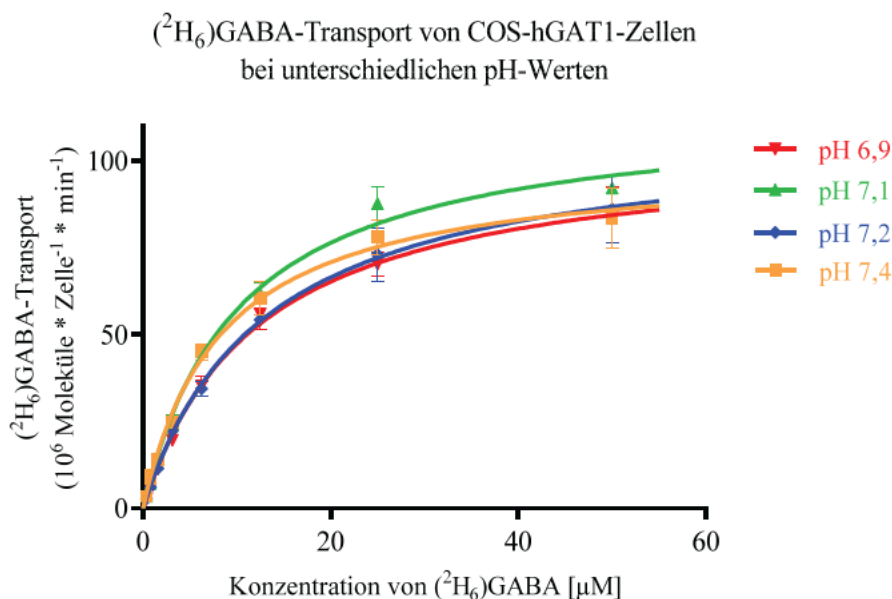


Abbildung 62: Abhängigkeit des Substrattransportes vom pH-Wert des HEPES-Uptake-Puffers

In Abbildung 62 lässt sich kein signifikanter Unterschied in den für verschiedene pH-Werte des HEPES-Uptake-Puffers erhaltenen Sättigungsisothermen erkennen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass die Transportrate von $(^2\text{H}_6)$ GABA (**3**) nicht signifikant von dem pH-Wert des HEPES-Uptake-Puffers im untersuchten Bereich abhängt. Es wurde daher weiterhin ein pH-Wert von 7,1 für den HEPES-Uptake-Puffer gewählt, da so geringe Schwankungen des pH-Wertes keinen merklichen Einfluss auf die transportierte Menge $(^2\text{H}_6)$ GABA (**3**) haben werden.

3.2.2.11. Ermittlung des nicht-spezifischen Transportes

Die quantifizierte Menge $(^2\text{H}_6)$ GABA (**3**) in COS-hGAT1-Zellen stellt die Gesamtmenge $(^2\text{H}_6)$ GABA (**3**) dar, die sich aus der Summe des spezifischen – also des zu untersuchenden hGAT1 vermittelten – und des nicht-spezifischen Transportes zusammensetzt.

Da sich der spezifische Transport nicht direkt messen lässt, kann der nicht-spezifische Transport gemessen und vom Gesamttransport abgezogen werden, um den spezifischen Transport zu ermitteln. Ein weit verbreiteter Ansatz zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes ist das Absättigen des spezifischen Transportes. In $[^3\text{H}]$ GABA-Uptake-Assays werden dafür häufig GABA^{70,72,73,87} oder *rac*-Nipecotinsäure (*rac*-5)^{74,172} verwendet. Deshalb wurde für die soweit beschriebenen MS-Transport-Assays ebenfalls *rac*-Nipecotinsäure (*rac*-5) zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes eingesetzt. Allerdings zeigte sich, dass sich durch die Verwendung von *rac*-Nipecotinsäure (*rac*-5) nur ein extrem geringer nicht-spezifischer Transport ermitteln ließ. Außerdem verwendeten Gerile et al.

zusätzlich zu einem Überschuss GABA (1), nicht-transfizierte COS-7-Zellen sowie β -Alanin (6) zur Bestimmung des nicht-spezifischen Uptakes in [^3H]GABA-Uptake-Assays, um den Uptake über in den Zellen endogen vorhandene GABA-Transporter auszuschließen.¹⁷³ Aus diesen Gründen wurde der nicht-spezifische Transport in den MS-Transport-Assays auch anhand nicht-transfizierter COS-7-Zellen, die analog den COS-hGAT1-Zellen behandelt wurden, ermittelt. Es zeigte sich, dass die transportierte Menge an ($^2\text{H}_6$)GABA (3) in nicht-transfizierten COS-7-Zellen im Vergleich zu COS-hGAT1-Zellen sehr gering ist. Allerdings zeigte sich auch, dass der Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (3) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen nicht linear mit der eingesetzten ($^2\text{H}_6$)GABA-Konzentration zunimmt – wie dies für typische nicht-spezifische Bindungen der Fall ist¹⁷⁴ – sondern vielmehr das Ergebnis eines sättigbaren Transportes ist (siehe Abbildung 63, blaue Kreise). Dieser ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport konnte nicht effektiv durch die Verwendung von 10 μM NO 711 (4), eines potenten GAT1-Inhibitors mit einem IC_{50} -Wert von etwa 100 nM⁷² blockiert werden (cyane Quadrate). Jedoch ließ sich dieser Transport durch 25 mM *rac*-Nipicotinsäure (*rac*-5) ($\text{IC}_{50} \sim 3.8 \mu\text{M}$), welche im Gegensatz zu NO 711 (4) durch eine geringe GAT-Subtypenselektivität gekennzeichnet ist,⁷² effektiv unterdrücken (rote Dreiecke). Dieser Transport war Na^+ -abhängig (siehe Abbildung 63 schwarze Dreiecke und Kapitel 3.2.2.6 „Natriumabhängigkeit“ auf Seite 105) und könnte durch eine geringe endogene Expression Na^+ -abhängiger Transporter hervorgerufen werden. Der überwiegende Teil dieser Transporter kann jedoch nicht GAT1 sein, da sich der beobachtete Transport nicht effektiv durch NO 711 (4) unterdrücken ließ (siehe Abbildung 63).

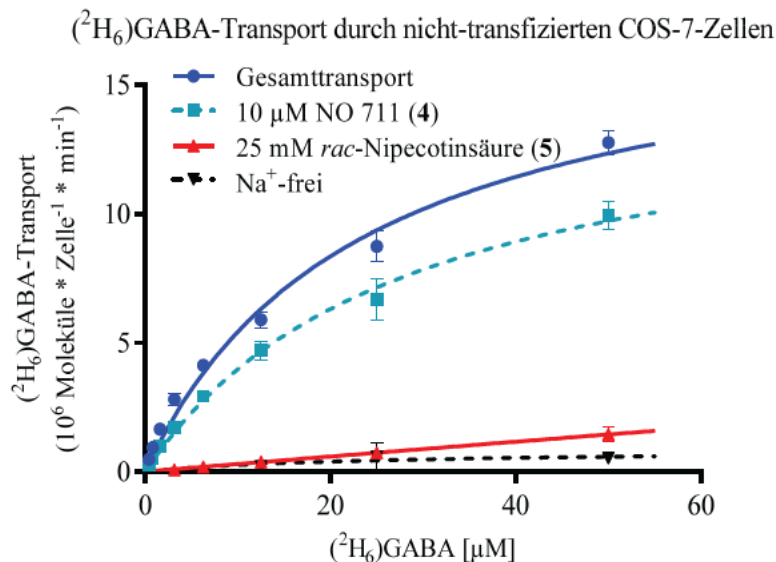


Abbildung 63: ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen.

Daraus ergibt sich, dass *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) nicht zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes geeignet ist. Zwar lässt sich durch *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) der Transport von (²H₆)GABA (**3**) durch die GABA-Transporter unterdrücken, jedoch weist *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) eine geringe Spezifität auf, sodass neben dem GAT-vermittelten Transport – der in den MS-Transport-Assays zu untersuchende spezifische Transport – auch der nicht-spezifische-Transport – welcher eigentlich in den Proben zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transporter erfasst werden soll – blockiert wird. Somit würde durch Verwendung von *rac*-Nipecotinsäure (*rac-5*) die Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes und folglich auch diejenige des spezifischen Transportes verfälscht. Aus diesen Gründen wurden nicht-transfizierte COS-7-Zellen zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes in allen weiteren MS-Transport-Assays verwendet, welche – wie weiter oben beschrieben – vermutlich eine geringe endogene Expression von Transportern aufweisen, welche (²H₆)GABA (**3**) transportieren. Diese ermöglichen es, den Anteil an (²H₆)GABA (**3**) zu ermitteln, welcher durch die endogen vorhandenen Transporter der COS-7-Zellen aufgenommen wird.

3.2.3. Zusammenfassung der MS-Transport-Assays

In Schema 2 ist der schrittweise Ablauf der MS-Transport-Assays mit den finalen Bedingungen zusammengefasst. Zur Durchführung der MS-Transport-Assays wurden alle Lösungen, mit Ausnahme des Waschpuffers und der Lyselösung auf 37 °C temperiert. Nach der Zugabe der Lyselösung blieben die Zelltrümmer am Plattenboden haften und lösten sich nicht vom Boden ab. Dies ist besonders im Hinblick auf die LC-MS/MS-Analytik von entscheidendem Vorteil, da keine weitere Probenvorbereitung, wie eine Filtration, nötig ist.

MS-Transport-Assays

1:	Aussäen von 60.000 COS-hGAT1-Zellen/Well in eine 96-Well Zellkulturplatte und kultivieren bei 37 °C über Nacht
2:	Waschen der Zellen mit Uptake-Puffer (37 °C) am Platewasher → Restvolumen 100 µL/Well
3:	Zugabe von 100 µL/Well Uptake-Puffer oder Kompetitor in Uptake-Puffer (für Konkurrenzexperimente)
4:	Vorinkubieren der Zellen bei 37 °C für 25 min
5:	Zugabe von 50 µL (² H ₆)GABA (3) in Uptake-Puffer
6:	Inkubation der Zellen für 6 min bei 37 °C
7:	Waschen der Zellen mit 154 mM CH ₃ COONH ₄ → Restvolumen 50 µL
8:	Zugabe von 200 µL/Well MeCN/H ₂ O 87,5/12,5 (v/v) mit 12,5 nM (² H ₂)GABA (2)
9:	Quantifizierung von (² H ₆)GABA (3) im Überstand der Zellkulturplatte mittels LC-MS/MS

Schema 2: Durchführung der MS-Transport-Assays. COS-hGAT1-Zellen wurden in Monolagen in 96-Well-Zellkulturplatten über Nacht bei 37 °C kultiviert (1). Am nächsten Tag wurden die Zellen am Platewasher mit HEPES-Uptake-Puffer bei 37 °C gewaschen, sodass nach dem Waschen 100 µL/Well HEPES-Uptake-Puffer in der Zellkulturplatte verblieben (2). Nach der Zugabe von 100 µL/Well HEPES-Uptake-Puffer, welcher für Konkurrenzexperimente den Inhibitor enthielt (3), wurden die Zellen für 25 min bei 37 °C vorinkubiert (4). Anschließend wurde der Transport durch die Zugabe von 50 µL HEPES-Uptake-Puffer, welcher das Substrat (²H₆)GABA (3) enthielt, gestartet (5). Dann wurden die Zellen für 6 min bei 37 °C inkubiert (6) und der Transport durch Waschen mit 154 mM CH₃COONH₄ beendet, wobei nach dem Waschen 50 µL/Well Waschpuffer in der Zellkulturplatte verblieben (7). Durch Zugabe von 200 µL/Well Lyselösung mit internem Standard (²H₂)GABA (2) wurden die Zellen für mindestens 90 min lysiert (8) bevor 10 µL des Überstandes per LC-MS/MS quantifiziert wurden (9).

3.3. Validierung der Methode zur Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA in MS-Transport-Assays

Die Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in den entwickelten MS-Transport-Assays sollte nach der „Center for Drug Evaluation and Research“ (CDER) Guideline für „Bioanalytical Method Validation“ der „Food and Drug Administration“ (FDA) validiert werden.¹⁰⁶ Für die Validierung der MS-Transport-Assays wurden Matrixproben aus COS-hGAT1-Zellen verwendet, die als Matrix-blank-Proben hergestellt wurden. Dies bedeutet, dass während des eigentlichen Transportes (vergleiche Schema 2 Schritt 5) kein ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zugegeben wurde. Kalibrierstandards und QC-Proben wurden durch Zugabe von Lyselösung (MeCN/H₂O 87,5/12,5 (v/v)), welche verschiedene Konzentrationen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) und 12,5 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) enthielt, zu den nach dem Waschen der COS-hGAT1-Zellen verbleibenden 50 μL Waschpuffer (vergleiche Schema 2 Schritt 7 auf Seite 116) erhalten.

In Anlehnung an die CDER-Guideline¹⁰⁶ wurden Kalibrier- und QC-Proben in sechs unabhängigen Versuchen gemessen. Die CDER-Guideline¹⁰⁶ empfiehlt zur Überprüfung der Selektivität eines Assays, blank-Proben von mindestens sechs Quellen zu untersuchen und auf Interferenzen zu untersuchen, sowie die Selektivität am unteren Quantifizierungslimit (LLOQ) sicherzustellen. Im Falle der MS-Transport-Assays konnten in COS-hGAT1-blank-Proben keine Interferenzen wie zusätzliche Signale detektiert werden. Überdies war die Selektivität auch am LLOQ von 200 pM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) gegeben, wie dies in Abbildung 64 anhand der MRM-Chromatogramme von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) m/z 110/73 einer Matrix-blank-Probe (rot), sowie einer QC-Probe von 200 pM (schwarz) zu erkennen ist.

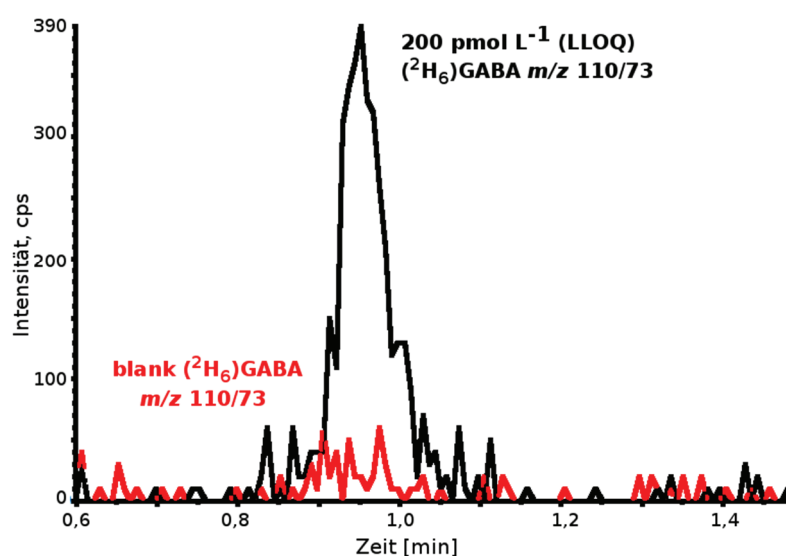


Abbildung 64: MRM-Chromatogramm von 200 pM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) (LLOQ) in einer Matrixprobe (schwarz) und eines Matrix-blanks (rot)

Anhand einer Regressionsanalyse der kleinsten Abweichungsquadrate von den Kalibrierstandards aller sechs Versuche, welche jeweils aus 14 verschiedenen Konzentrationen in Triplikaten im Bereich von 200 pM bis 400 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) bestanden, wurde eine mit $1/x$ gewichtete Kalibrierfunktion erhalten. Diese lineare Kalibrierfunktion (siehe Gleichung 9) war durch einen Regressionskoeffizienten von $R^2 = 0,996$ charakterisiert. Die Abweichungen der Kalibrierstandards von der Kalibriergeraden sind für jeden Versuch in Tabelle 11 angegeben. Diese waren in allen Fällen immer kleiner als die von der CDER-Guideline vorgeschlagenen maximalen Abweichungen von 15% der Nominalkonzentration (20% am LLOQ) und erfüllten somit deren Anforderungen.

$$y = 1.865 \times 10^{-2} \times x + 9.4 \times 10^{-4}$$

Gleichung 9: Lineare Kalibrierfunktion mit x als Konzentration an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) und y als Peakflächenverhältnis $A_{m/z\ 110/73}/A_{m/z\ 106/89}$.

Die in der CDER-Guideline¹⁰⁶ vorgeschlagene Vorgehensweise zur Bewertung der Richtigkeit (accuracy) und Präzision (precision) umfasst die wiederholte Analyse von Proben, welche eine bekannte Konzentration an Analyt enthalten. Die Richtigkeit der Methode wird durch die Genauigkeit der erhaltenen mittleren Messergebnisse im Vergleich zum „wahren Wert“, also der eingesetzten Konzentration bestimmt. Dabei sollte die Bestimmung der Richtigkeit mit mindestens fünf Proben je Konzentration bei mindestens drei Konzentrationen im zu erwartenden Konzentrationsbereich erfolgen. Der Mittelwert der Messergebnisse sollte nicht mehr als 15% vom wahren Wert abweichen, mit Ausnahme des LLOQ, wo die Richtigkeit nicht mehr als 20% abweichen sollte.

Die Präzision einer Methode wird in der CDER-Guideline¹⁰⁶ durch die Steuerung einzelner Messungen eines Analyten bei wiederholter Durchführung der Methode mit verschiedenen Aliquots einer homogenen Matrix bestimmt. Dabei sollten mindestens fünf Bestimmungen je Konzentration bei mindestens drei Konzentrationen im zu erwartenden Konzentrationsbereich erfolgen. Die bestimmte Präzision bei jeder Konzentration sollte nicht größer als 15% des Variationskoeffizienten (RSD) sein, mit Ausnahme des LLOQ, wo diese nicht größer als 20% (RSD) sein sollte. Zur Bestimmung der Richtigkeit (Accuracy) als auch der inter- und intra-Batch-Präzision (Precision) der entwickelten MS-Transport-Assays wurden QC-Proben mit 500 pM, 2 nM, 10 nM, 50 nM und 200 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in jeweils sieben Replikaten in sechs Versuchsreihen untersucht.

Zur Berechnung der Richtigkeit wurden die anhand der globalen Kalibrierfunktion (siehe Gleichung 9 auf Seite 118) erhaltenen Konzentrationen der sieben QC-Proben je Konzentration jeder Versuchsreihe ins Verhältnis zur eingesetzten Konzentration gesetzt und der Mittelwert der erhaltenen Richtigkeit je

Konzentration gebildet. Die erhaltenen Werte für die Richtigkeit sind in Tabelle 11 zusammengefasst. Die größte Abweichung der Richtigkeit betrug in einer Versuchsreihe 7,9% vom Nominalwert (nach CDER-Guideline max. 15%), außer am unteren Quantifizierungslimit (LLOQ), wo es 13,2% betrug (nach CDER-Guideline max. 20%). Die Präzision der MS-Transport-Assays wurde für jede Probenserie ermittelt, indem die erhaltenen Konzentrationen der QC-Proben – welche auch zur Bestimmung der Richtigkeit verwendet wurden – für jede Konzentration jeder Probenserie durch ihren jeweiligen Mittelwert geteilt wurden. Innerhalb einer Probenserie wurde eine Präzision von $\leq 9,1\%$ (RSD) ermittelt (Intra-Batch-Präzision). Die Präzision während aller Versuchstage zusammen (Inter-Batch-Präzision) lag bei $\leq 10,2\%$ (RSD). Die während der Validierung der MS-Transport-Assays erhaltenen Werte der Präzision sind ebenfalls in Tabelle 11 zusammengefasst.

Das untere Quantifizierungslimit (LLOQ) sollte nach der CDER-Guideline¹⁰⁶ ein Signal-zu-Rausch-Verhältnis von mindestens $S/N > 5$ haben. Außerdem sollte der Analyt-Peak identifizierbar, diskret und reproduzierbar mit einer Präzision von 20% und einer Richtigkeit von 80% bis 120% sein. Die MS-Transport Assays haben ein unteres Quantifizierungslimit (LLOQ) von 200 pM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in COS-Zellmatrix bei einem Signal/Rausch-Verhältnis von $S/N > 10$. Ein noch niedrigeres LLOQ konnte aufgrund der in der CDER-Guideline¹⁰⁶ geforderten Bedingungen zur Richtigkeit und Präzision nicht erreicht werden. Die LC-MS/MS-Quantifizierung war sehr robust und reproduzierbar, sodass während der Routineanwendung die während der Validierung erhaltene Kalibrierfunktion (siehe Gleichung 9) zur Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) verwendet werden konnte. Um die Verlässlichkeit der Quantifizierung in Routineexperimenten zu gewährleisten, wurden QC-Proben bei drei Konzentrationsniveaus von ($^2\text{H}_6$)GABA (500 pM, 5 nM und 50 nM) für jeden MS-Transport-Assay analysiert. Die etablierte LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in COS-Zellmatrixproben hat eine ausreichend hohe Sensitivität, welche es erlaubt, den nicht-spezifischen Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen – sogar für Substratkonzentrationen von nur 228 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) – im validierten Bereich zu charakterisieren.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 11: Richtigkeit und Präzision der 6 Versuchsreihen zur Validierung der entwickelten LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von (²H₆)GABA

QC-Proben	Intra-batch											Inter-batch	
	Serie 1			Serie 2			Serie 3						
	Erm. Konz.	Acc.	Prec.	Erm. Konz.	Acc.	Prec.	Erm. Konz.	Acc.	Prec.				
500 pM	476 pM	95,2%	5,1%	566 pM	113,2%	4,3%	437 pM	87,4%	5,1%				
2 nM	2,07 nM	103,4%	3,7%	2,10 nM	104,8%	3,8%	1,93 nM	96,6%	3,5%				
10 nM	10,4 nM	104,3%	2,3%	10,3 nM	102,7%	3,8%	10,2 nM	102,1%	2,5%				
50 nM	51,9 nM	103,8%	1,9%	51,7 nM	103,4%	2,4%	49,2 nM	98,4%	1,5%				
200 nM	213,4 nM	106,7%	2,3%	209,2 nM	104,6%	2,7%	206,6 nM	103,3%	2,0%				
Kalibrierproben													
195 pM	198 pM	101,3%	7,9%	208 pM	106,4%	4,7%	205 pM	105,2%	4,8%				
391 pM	374 pM	95,7%	1,3%	411 pM	105,2%	2,6%	418 pM	107,0%	9,8%				
781 pM	665 pM	85,1%	2,1%	785 pM	100,4%	5,3%	746 pM	95,5%	4,0%				
1,56 nM	1,36 nM	87,1%	2,0%	1,58 nM	101,0%	0,5%	1,54 nM	98,6%	6,2%				
3,13 nM	3,19 nM	102,1%	6,3%	2,96 nM	94,8%	3,1%	2,85 nM	91,3%	0,9%				
6,25 nM	5,43 nM	86,9%	1,7%	6,08 nM	97,3%	3,3%	5,63 nM	90,1%	2,5%				
12,5 nM	11,4 nM	91,4%	1,5%	12,3 nM	98,6%	1,6%	11,0 nM	88,3%	1,5%				
25 nM	24,7 nM	98,8%	3,3%	25,4 nM	101,7%	2,9%	22,3 nM	89,3%	2,2%				
50 nM	44,3 nM	88,7%	2,8%	49,0 nM	98,1%	2,4%	48,1 nM	96,1%	2,3%				
100 nM	94,3 nM	94,3%	2,2%	98,2 nM	98,2%	1,6%	94,2 nM	94,2%	2,0%				
200 nM	203,7 nM	101,8%	1,9%	191,2 nM	95,6%	1,3%	192,5 nM	96,2%	4,0%				
400 nM	409,8 nM	102,5%	2,3%	411,7 nM	102,9%	1,0%	420,4 nM	105,1%	1,6%				
QC-Proben													
QC-Proben	Intra-batch									Inter-batch			
	Serie 4			Serie 5			Serie 6						
	Erm. Konz.	Acc.	Prec.	Erm. Konz.	Acc.	Prec.	Erm. Konz.	Acc.	Prec.			Acc.	Prec.
500 pM	483 pM	96,6%	9,1%	469 pM	93,8%	8,0%	504 pM	100,7%	5,4%	97,9%	10,2%		
2 nM	2,04 nM	101,8%	4,0%	2,02 nM	101,0%	3,7%	2,05 nM	102,7%	1,9%	101,7%	4,2%		
10 nM	10,5 nM	104,7%	4,0%	10,7 nM	107,4%	1,5%	10,26 nM	102,6%	1,7%	104,0%	3,1%		
50 nM	50,5 nM	100,9%	4,0%	53,6 nM	107,1%	2,9%	49,95 nM	99,9%	3,8%	102,3%	3,9%		
200 nM	197,6 nM	98,8%	2,6%	215,8 nM	107,9%	4,2%	198,0 nM	99,0%	4,2%	103,4%	4,5%		
Kalibrierproben													
195 pM	196 pM	100,4%	8,0%	183 pM	93,5%	5,4%	215 pM	110,2%	12,1%	108,5%	15,3%		
391 pM	416 pM	106,6%	7,5%	349 pM	89,3%	4,3%	378 pM	96,9%	1,0%	100,1%	8,3%		
781 pM	855 pM	109,4%	0,4%	827 pM	105,9%	6,6%	795 pM	101,7%	2,9%	99,7%	8,8%		
1,56 nM	1,61 nM	103,0%	5,5%	1,7 nM	108,5%	2,3%	1,52 nM	97,5%	5,1%	99,3%	7,1%		
3,13 nM	3,12 nM	99,9%	1,8%	3,31 nM	106,0%	0,8%	3,14 nM	100,6%	0,2%	99,1%	5,6%		
6,25 nM	6,17 nM	98,7%	3,6%	6,13 nM	98,1%	5,2%	6,08 nM	97,3%	0,7%	94,7%	5,6%		
12,5 nM	12,0 nM	96,0%	3,1%	12,3 nM	98,1%	2,0%	12,1 nM	97,0%	2,7%	94,9%	4,5%		
25 nM	24,2 nM	96,6%	4,0%	24,7 nM	98,9%	1,2%	25,1 nM	100,5%	0,7%	97,6%	4,8%		
50 nM	48,0 nM	96,0%	0,5%	49,4 nM	98,7%	0,4%	48,8 nM	97,7%	1,9%	95,9%	3,9%		
100 nM	93,1 nM	93,1%	6,3%	102,9 nM	102,9%	2,4%	99,8 nM	99,8%	1,3%	97,1%	4,5%		
200 nM	190,9 nM	95,5%	1,7%	202,4 nM	101,2%	1,8%	201,7 nM	100,9%	1,0%	98,5%	3,4%		
400 nM	419,3 nM	104,8%	0,4%	395,6 nM	98,9%	0,6%	400,1 nM	100,0%	3,0%	102,4%	2,7%		

Erm. Konz.: anhand der globalen Kalibrierfunktion erhaltene Konzentrationen. Acc: Richtigkeit (Verhältnis der aufgrund der erhaltenen Kalibrierung bestimmten (²H₆)GABA-Konzentration und der nominalen Konzentration an (²H₆)GABA; Prec.: Präzision (% Reststandardabweichung). Die Kalibrierfunktionen, welche an jedem einzelnen Versuchstag erhalten wurden, waren wie folgt. Serie 1: $y=0,01931x-0,00095$; Serie 2: $y=0,01913x-0,00020$; Serie 3: $y=0,01926x-0,00229$; Serie 4: $y=0,0189x-0,00001$; Serie 5: $y=0,01861x-0,00025$; Serie 6: $y=0,01895x-0,00013$.

Der Matrixeffekt, also der Einfluss der Zellmatrix auf die Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) wurde anhand des Verhältnisses der Peakflächen von *m/z* 110/73 der QC-Matrix-Proben (7 Replikate) und der von Lösemittelstandards identischer Konzentration (3 Replikate) bei 5 verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Im Mittel lag der Matrixeffekt bei der Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) in den MS-Transport-Assays bei ~91%, was bedeutet, dass das Messsignal einer Matrixprobe 91% der Größe eines entsprechenden Lösemittelstandards hatte. Linearität, Präzision und Richtigkeit der entwickelten LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) erfüllten allesamt die empfohlenen Kriterien der CDER-Guideline.¹⁰⁶

3.4. Anwendung der entwickelten MS-Transport-Assays

Nachdem die MS-Transport-Assays entwickelt, optimiert und mit den gewählten Bedingungen validiert waren, sollten deren Leistungsfähigkeiten anhand von Experimenten mit hGAT1 gezeigt werden. Außerdem sollten die MS-Transport-Assays auch auf die anderen GAT-Subtypen hGAT2, hGAT3 und hBGT1 übertragen werden. Für diese drei Subtypen stellen Transport-Assays das wichtigste Werkzeug zur Charakterisierung dieser Transporter und der Suche nach potenten Inhibitoren dar, da, wie in der Einleitung beschrieben, geeignete, selektive Binder zur Etablierung von Bindungsassays bisher nicht zur Verfügung stehen. Alle vier GABA-Transporter-Subtypen wurden anhand von Sättigungsexperimenten charakterisiert, um geeignete Bedingungen für spätere kompetitive MS-Transport-Assays wählen zu können. Um die Leistungsfähigkeit der entwickelten MS-Transport-Assays zu demonstrieren, wurden kompetitive MS-Transport-Assays entwickelt, die zum Screening von GAT-Inhibitoren geeignet sind. Dies wurde für alle vier GAT-Subtypen anhand eines Sets bestehend aus 21 GAT-Inhibitoren unterschiedlicher Potenz und Selektivität realisiert. Die Anwendungsbreite der MS-Transport-Assays wurde exemplarisch für hGAT1 gezeigt, indem diese zur Durchführung von Efflux-Experimenten genutzt wurden. Außerdem sind die MS-Transport-Assays auch in der Lage – wenn die Anzahl an eingesetzten Transportern bestimmt werden kann, wie dies für hGAT1 der Fall ist – Transportraten der GABA-Transporter zu ermitteln. Abschließend wurde die immense Stärke der LC-MS/MS-Detektion genutzt, um Inhibitoren, welche selber Substrat der GABA-Transporter sind, direkt innerhalb eines kompetitiven MS-Transport-Assays zu erfassen und so Inhibitoren der GABA-Transporter, welche als Substrate dienen, zu verifizieren und zu charakterisieren.

3.4.1. Generierung der COS-Zelllinien zur Expression von hGAT2, hGAT3 und hBGT1

Um die MS-Transport-Assays auch auf die anderen GABA-Transporter-Subtypen übertragen zu können, wurden aufgrund der erforderlichen hohen Adhärenz der Zellen zur Durchführung der MS-Transport-Assays in Analogie zu den COS-hGAT1-Zellen, COS-hBGT1-, COS-hGAT2- und COS-hGAT3-Zellen erzeugt. Zur Generierung der stabilen COS-hBGT1-Zelllinie wurde ein für die Transfektion von Säugerzellen geeigneter Vektor (pCMVentry-hBGT1 von Origene (SC318954)-SLC6A12, transcript variant 2) bezogen und COS-7-Zellen nach Linearisierung des Vektors mit dem Restriktionsenzym Spe1-HF mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGene®HD im Verhältnis 3:1 FuGene®HD:DNA transfiziert. Nach 72 h wurden die transfizierten Zellen durch Zugabe von 1 mg/mL G418 im Kulturmedium für 14 Tage selektioniert. Anschließend wurden die verbleibenden Zellen in diesem Selektionsmedium verdünnt und 20 Zellen je Well in eine 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Nach weiteren 14 Tagen wurde die Konzentration des Selektionsantibiotikums im Kulturmedium auf

500 mg/L reduziert und die entstandenen einzelnen Zellkolonien mit den MS-Transport-Assays bei einer Substratkonzentration von 10 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) auf ihre Fähigkeit zum ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport hin untersucht. Insgesamt wurden 75 Zellklone getestet, von denen der potenteste einen im Vergleich zu nicht-transfizierten COS-7-Zellen im Durchschnitt mehr als 17-fach höheren Substrattransport aufwies (Klon 25). Weitere COS-hBGT1-Klone wurden ebenfalls vermehrt und in flüssigem Stickstoff gelagert (Klon 16 und Klon 37). Die Generierung der stabilen COS-hGAT2- und der COS-hGAT3-Zelllinien wurde von der Abteilung für biologische Prüfung des Arbeitskreises Wanner übernommen.

3.4.2. Sättigungsexperimente an hGAT1, hGAT2, hGAT3 und BGT1

Zu den wichtigsten Charakteristika eines Enzymes gehört die Umsatzgeschwindigkeit des entsprechenden Substrates. Bei Transportproteinen, wie den GABA-Transportern ist dies die Transportgeschwindigkeit, welche von der Substratkonzentration abhängig ist.¹⁷⁵ Dieser Zusammenhang wird von der Michaelis-Menten-Gleichung¹⁷⁶ (siehe Gleichung 10) beschrieben.

$$V = V_{max} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung 10: Michaelis-Menten-Gleichung¹⁷⁶

Wie aus dieser Gleichung für $[S]=K_m$ hervorgeht, ist die Michaelis-Konstante K_m diejenige Substratkonzentration, bei der die Transportgeschwindigkeit halbmaximal ist ($V = V_{max} \times \frac{1}{2}$). Die Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 10) beschreibt eine Hyperbel mit der Asymptote V_{max} (siehe Abbildung 65). Die Geschwindigkeit des Substrattransportes steigt bei Konzentrationen unterhalb von K_m annähernd linear mit der Substratkonzentration an und nähert sich bei Konzentrationen oberhalb von K_m asymptotisch der Maximalgeschwindigkeit V_{max} an, bei der sich die Transportgeschwindigkeit nicht mehr ändert und der Transporter mit Substrat gesättigt ist.

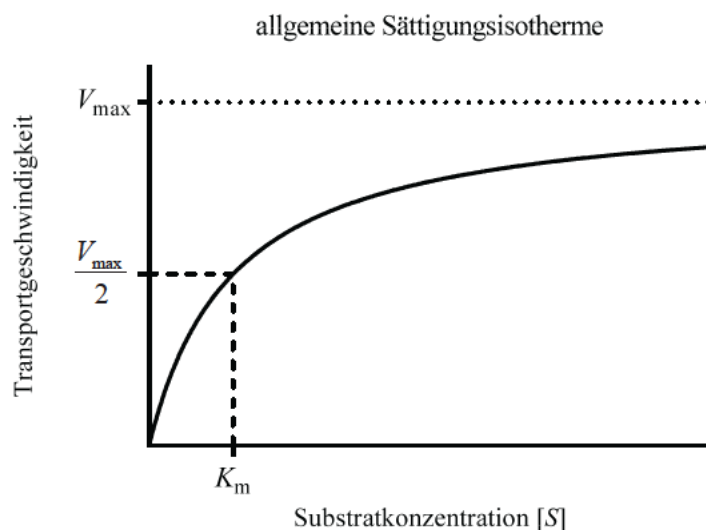


Abbildung 65: theoretischer Verlauf einer Sättigungsisotherme

Durch die Quantifizierung des Substrattransportes bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen lässt sich eine charakteristische Sättigungsisotherme für den Substrattransport ermitteln. Dies wurde für alle vier GAT-Subtypen (hGAT1, hGAT2, hGAT3 und hBGT1) in MS-Transport-Assays mit ($^2\text{H}_6$)GABA (3) durchgeführt. Die resultierenden Sättigungsisothermen sind in Abbildung 66 dargestellt und die den Transport beschreibenden Kenngrößen (K_m und V_{\max}) in Tabelle 12 zusammengefasst.

Da die in den Sättigungsexperimenten erhaltenen Konzentrationen von ($^2\text{H}_6$)GABA (3) für hohe Substratkonzentrationen außerhalb des bisher validierten Quantifizierungsbereiches lagen, wurden für diese Sättigungsversuche separate Kalibriergeraden aufgenommen, welche eine Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (3) bis 2 μM erlaubten.

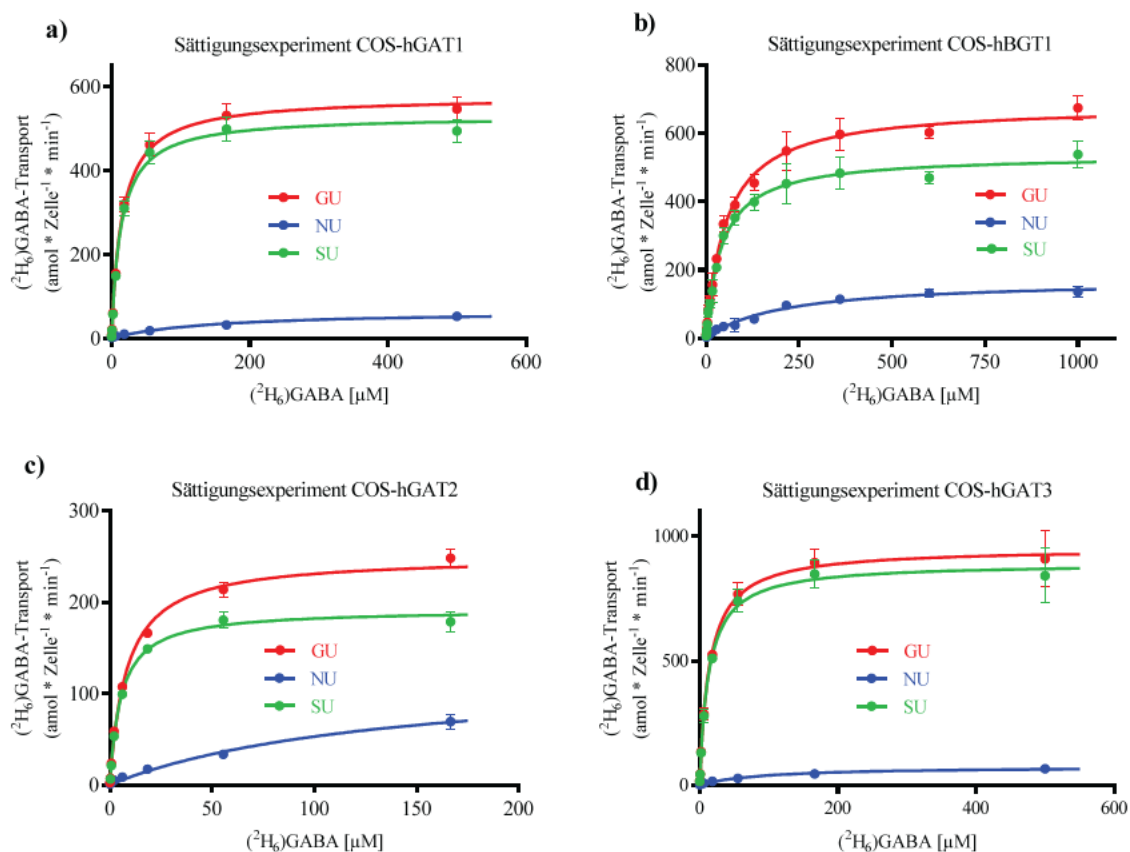


Abbildung 66: Repräsentative Sättigungsisothermen von $(^2\text{H}_6)\text{GABA}$ (**3**) an a) hGAT1, b) hBGT1, c) hGAT2 und d) hGAT3. Der nicht-spezifische Transport (blau) wurde mit Hilfe von nicht-transfizierten COS-7-Zellen ermittelt. GU: Gesamtuptake, NU: nicht-spezifischer Uptake, SU: spezifischer Uptake.

Die Sättigung des Transportes von $(^2\text{H}_6)\text{GABA}$ (**3**) durch hGAT1 war von einem K_m -Wert von $13 \pm 1 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 15$, siehe Abbildung 66a und Tabelle 12) charakterisiert, was ideal mit den K_m -Werten für den GABA-Uptake durch hGAT1 in elektrophysiologischen Assays ($11 \mu\text{M}^{55}$ und $12 \mu\text{M}^{76}$), als auch mit denen aus entsprechenden $[^3\text{H}]\text{GABA}$ -Uptake-Assays ($11 \pm 1,2 \mu\text{M}^{72}$) übereinstimmt. Sättigungsisothermen für hBGT1 (siehe Abbildung 66b) wurden in einem Konzentrationsbereich von 470 nM bis 1 mM $(^2\text{H}_6)\text{GABA}$ (**3**) erfasst und ergaben einen K_m -Wert von $42 \pm 8 \mu\text{M}$, der damit deutlich oberhalb der K_m -Werte für die anderen drei GABA-Transporter liegt (siehe Tabelle 12). In der Literatur lassen sich für hBGT1 unterschiedliche K_m -Werte von $18 \pm 2,2 \mu\text{M}$,⁷³ $20,4 \pm 1,6 \mu\text{M}^{177}$ und $36 \mu\text{M}^{13,168}$ finden.

Der für COS-hGAT2 erhaltene Klon hatte eine geringere Target-Expression, als dies für die Klone von COS-hGAT1, COS-hBGT1 und COS-hGAT3 der Fall war. Nichtsdestotrotz war diese ausreichend, um sowohl Sättigungs- als auch Konkurrenzexperimente durchführen zu können. Der Transport von $(^2\text{H}_6)\text{GABA}$ (**3**) durch hGAT2 war durch einen K_m -Wert von $6,5 \pm 1,1 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 4$, siehe Abbildung 66c und Tabelle 12) gekennzeichnet, welcher ebenfalls in sehr guter Übereinstimmung mit

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

den in der Literatur zu findenden K_m -Werten für hGAT2 ($8,2 \pm 0,38 \mu\text{M}^{70}$) und für mGAT3 – dem entsprechenden murinen Homolog des hGAT2 – aus elektrophysiologischen Messungen ($7,3 \pm 1,1 \mu\text{M}^{178}$) ist. Die für hGAT3 erhaltene stabile Zelllinie zeigte in ersten Transportversuchen eine vergleichsweise hohe Gesamtaufnahme an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**). Die im Sättigungsbereich von hGAT3 transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) resultierte in Konzentrationen von etwa $1,4 \mu\text{M}$ (entsprechend $1000 \text{ amol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ bei 60.000 Zellen je Well und 6 min Uptake). Deshalb wurden die hGAT3-Sättigungen auch mit einer reduzierten Zellzahl von 5000 Zellen je Well durchgeführt. Die dabei erhaltenen Sättigungsisothermen lieferten entsprechende K_m - und V_{max} -Werte, wie dies für 60.000 COS-hGAT3-Zellen der Fall war. Obwohl die Menge an transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch 60.000 COS-hGAT3-Zellen leicht über 10% der Gesamtmenge an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) war (vergleiche Kapitel 3.4.4.2 „Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat und Inhibitor in Konkurrenzexperimenten“ auf Seite 133), wurden dennoch für alle weiteren Versuche 60.000 COS-hGAT3-Zellen verwendet, da sich keine signifikante Änderung in den Sättigungsisothermen zwischen 5000 und 60.000 COS-hGAT3-Zellen ergab. Dies zeigt, dass die Änderung der Substratkonzentration während der Transport-Assays mit 60.000 COS-hGAT3-Zellen nicht zu einer messbaren Änderung der Transportgeschwindigkeit führt und somit die Substratkonzentration immer noch als konstant angenommen werden kann. Außerdem nimmt die Variation der Zellzahl von Well zu Well deutlich zu, sobald eine reduzierte Zellzahl verwendet wird, bei der die Zellen nicht mehr in einer kompakten Monolage wachsen (siehe Kapitel 3.2.2.9 „Optimierung der Zellzahl“ auf Seite 110). Die Sättigungsisothermen, welche anhand von 60.000 COS-hGAT3-Zellen erhalten wurden hatten einen K_m -Wert von $13 \pm 2 \mu\text{M}$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 5$, siehe Abbildung 66d und Tabelle 12), der im Bereich der in der Literatur beschriebenen K_m -Werte für hGAT3 ($8,1 \pm 0,56 \mu\text{M}^{72}$) und mGAT4 ($8,1 \pm 1 \mu\text{M}^{179}$), dem murinen Homolog des hGAT3 liegt. Die in Abbildung 66 erkennbaren unterschiedlich hohen nicht-spezifischen Transportraten können verschiedene Ursachen haben, wobei der größte Einfluss auf diese Variation sicherlich durch die für die Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes eingesetzte Zellzahl (nominell 60.000 Zellen je Well), sowie die Expressionsrate der in den nicht-transfizierten COS-7-Zellen endogen vorkommenden natriumabhängigen Transportern, sowie der Passagennummer der verwendeten COS-7-Zellen hervorgerufen wird.

Tabelle 12: Charakteristika der Sättigungsisothermen für hGAT1, hBGT1, hGAT2 und hGAT3.

	hGAT1	hBGT1	hGAT2	hGAT3
	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM	MW \pm SEM
K_m (μM)	13 ± 1	42 ± 8	$6,5 \pm 1,1$	13 ± 2
V_{max} ($\text{amol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{min}^{-1}$)	656 ± 63	581 ± 58	306 ± 45	1200 ± 140
Konz.-Bereich	228 nM – 500 μM	470 nM – 1 mM	76 nM – 166 μM	228 nM – 500 μM
Anzahl an Experimenten	15	5	4	5

MW: Mittelwert, SEM: Standardfehler („Standard Error of the Mean“)

Die in den Sättigungsexperimenten bestimmte maximale Transportrate (V_{\max}) ist eine Größe, welche eine makroskopische ($^2\text{H}_6$)GABA-Transportrate einer COS-hGAT1-Zelle beschreibt. Diese Substrataufnahme ist jedoch in hohem Maße von der Expressionsrate – also der Targetdichte – der Zelle abhängig, sodass diese Größe keinen Vergleich der Geschwindigkeiten der Transportproteine zulässt. Die mikroskopische Transportrate allerdings, welche den Substrattransport eines einzelnen Transporters beschreibt, ist für einen Vergleich der Transportgeschwindigkeiten, sowie zum Abschätzen der Effizienz des Transportes *in-vivo* geeignet.⁷⁹ Diese wurde mit Hilfe der MS-Transport-Assays für hGAT1 bestimmt, wie im folgenden Abschnitt beschrieben wird.

3.4.3. Bestimmung der Transportrate von hGAT1

Die Transportrate von GAT1 wurde bisher fast ausschließlich durch elektrophysiologische Messungen bestimmt, meistens bei Raumtemperatur und unter nicht-physiologischen Salzkonzentrationen.⁷⁷ Die MS-Transport-Assays sind in Kombination mit den MS-Bindungs-Assays⁸⁴ in der Lage, eine Abschätzung der Transportrate von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für GAT1 vorzunehmen und stellen somit eine Alternative zu den elektrophysiologischen Messungen dar. So ist eine Messung der Transportrate von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) unter annähernd physiologischen Bedingungen möglich. Um eine Transportrate von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) an hGAT1 abschätzen zu können, muss zum einen die vorhandene Transporterzahl, zum anderen die transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) innerhalb eines bestimmten Zeitintervalls bekannt sein. Zur Bestimmung der Transporterzahl von hGAT1 in COS-hGAT1-Zellen wurden COS-hGAT1-Zellhomogenate hergestellt und deren Transporterdichte in einem MS-Bindungs-Assay mit NO 711 (**4**) bestimmt. Dazu wurden COS-hGAT1-Zellen in 152 cm² Zellkulturplatten kultiviert, bei einer Konfluenz von etwa 85% mit PBS-Puffer gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS-Puffer (Zentrifugation für 5 min bei 500 g in einem 50 mL Falcon-Tube), wurden die COS-hGAT1 Zellen mit einer Neubauer Zählkammer gezählt, ein weiteres Mal zentrifugiert (5 min bei 500 g in einem 50 mL Falcon-Tube), anschließend in 0,32 M Saccharose suspendiert und mit einem Polytron PT A7 homogenisiert. Mehrere Aliquots der COS-hGAT1-Zellhomogenate mit einem Gesamtproteingehalt von ~3 mg/mL (bestimmt nach Bradford¹⁸⁰) wurden bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Am Versuchstag wurde die COS-hGAT1-Membranpreparation mit TRIS-Bindungs-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 20 min bei 50.000 g) und das resultierende Pellet in TRIS-Bindungs-Puffer resuspendiert, sodass die in den MS-Bindungs-Assays eingesetzte Menge an Membranpräparation von etwa 500.000 COS-hGAT1-Zellen stammte. Anschließend wurden die MS-Bindungs-Assays wie bereits beschrieben durchgeführt,^{84,181} wobei folgende Änderungen vorgenommen wurden. Anstatt die Filterplatten wie in den publizierten Methoden nach der Filtration des Inkubationsansatzes und der daran anschließenden Waschschr

für 30 bis 60 min zu trocknen, wurde der auf dem Filter verbliebene Rückstand direkt mit $3 \times 100 \mu\text{L}$ einer Lösung von $1,4 \text{ nM } (^2\text{H}_{10})\text{NO 711}$ in MeOH (bisher 1 nM) eluiert und das erhaltene Eluat mit $130 \mu\text{L/Well HCOONH}_4$, $10 \text{ mM pH } 7,0$ (bisher $100 \mu\text{L}$) ergänzt. Die vorgenommenen Änderungen wurden durchgeführt, um das Eintrocknen der Eluate zu vermeiden, da sich gezeigt hatte, dass durch die direkte Messung der Eluate die Schwankungsbreite der Messwerte deutlich reduziert werden konnte.

Die gebundene Menge NO 711 (**4**) wurde nach einer Injektion von $30 \mu\text{L}$ Probe per LC-ESI-MS/MS wie bereits beschrieben quantifiziert.¹⁸¹ Eine repräsentative Sättigungsisotherme für die NO 711 (**4**) Bindung an COS-hGAT1-Membranpräparationen ist in Abbildung 67 dargestellt. Wie bereits oben erwähnt, wurden 500.000 COS-hGAT1-Zellen je Probe eingesetzt, sodass anhand der ermittelten Konzentration an NO 711 (**4**) in den Proben auf die gebundene Menge NO 711 (**4**) je Zelle bezogen werden konnte.

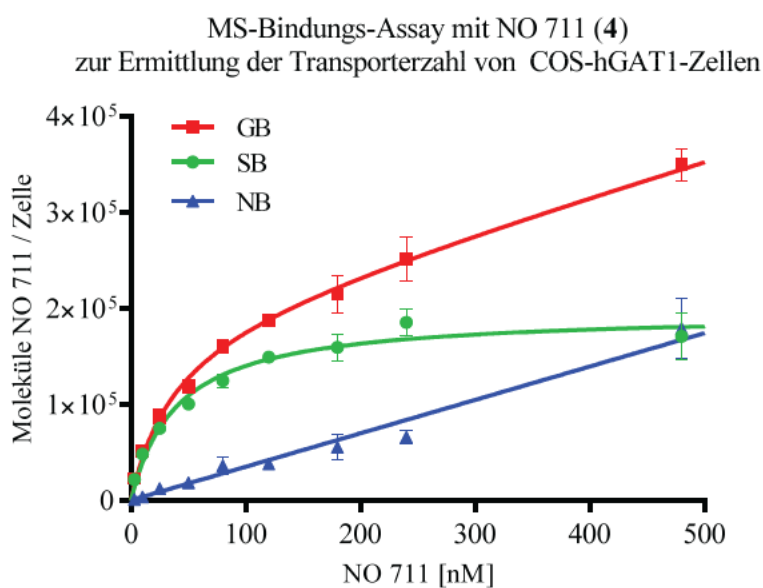


Abbildung 67: NO 711 (**4**) Bindung an COS-hGAT1-Membranpräparationen. GB: Gesamtbindung, SB: spezifische Bindung, NB: nicht-spezifische Bindung (Bindung in Gegenwart von $10 \text{ mM GABA } (\mathbf{1})$). GB: Gesamtbindung, SB: spezifische Bindung, NB: nicht-spezifische Bindung.

Insgesamt wurden an zwei unabhängigen Versuchstagen mit 7 verschiedenen Membranpräparationen 11 Sättigungen der NO 711 (**4**)-Bindung an COS-hGAT1-Membranpräparationen durchgeführt. Aus den erhaltenen B_{max} -Werten der NO 711 (**4**)-Bindung wurde eine mittlere Transporterzahl von $1,92 \times 10^5 \pm 3,21 \times 10^4$ (Mittelwert \pm SEM, $n = 11$) je COS-hGAT1-Zelle ermittelt. Anhand dieser Transporterzahl je Zelle und des mit den MS-Transport-Assays bestimmten V_{max} -Wertes von $656 \pm 63 \text{ amol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ für den Transport von $(^2\text{H}_6)\text{GABA } (\mathbf{3})$ durch hGAT1 (siehe Tabelle 12 auf

Seite 126), wurde eine maximale Transportrate von 34 Molekülen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) je Sekunde für hGAT1 errechnet. Diese Transportrate liegt im Bereich der für GAT1 bereits publizierten Transportraten (1,2 - 93 Moleküle je Sekunde), welche über elektrophysiologische Messungen bestimmt wurden.^{76,77,79,80}

3.4.4. Kompetitive MS-Transport-Assays

Kompetitive Assays sind eines der wichtigsten Werkzeuge in der Wirkstoffentwicklung, da sie eine Identifizierung von Inhibitoren ermöglichen, ohne diese selbst quantifizieren zu müssen.⁸² Die entwickelten MS-Transport-Assays sind ideal dazu geeignet, die inhibitorische Potenz von Testverbindungen auf den ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport in kompetitiven MS-Transport-Assays zu bestimmen. Im Folgenden soll der konzeptionelle Ansatz der entwickelten kompetitiven MS-Transport-Assays für das Screening von GAT-Inhibitoren erläutert werden.

3.4.4.1. Design der kompetitiven MS-Transport-Assays

Kompetitive Transport-Assays können zur Charakterisierung von Inhibitoren eingesetzt werden. Ein Ansatz kompetitiver Transport-Assays besteht darin, den Substrattransport in Sättigungsexperimenten in Gegenwart eines Inhibitors durchzuführen. Die Transportgeschwindigkeit in Anwesenheit eines kompetitiven Inhibitors wird dann durch Gleichung 11 beschrieben.¹⁸²

$$V = V_{max} \times \frac{[S]}{\left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m + [S]}$$

Gleichung 11: Transportgeschwindigkeit in Gegenwart eines kompetitiven Inhibitors. Mit K_i = Affinitätskonstante des Inhibitors; $[I]$ = Konzentration des Inhibitors, $[S]$ = Konzentration an Substrat; K_m = Michaelis-Menten-Konstante; V_{max} = maximale Transportrate. Nach Cornish-Bowden¹⁸²

Ist kein Inhibitor zugegen ($[I] = 0$), vereinfacht sich die Gleichung zur bereits bekannten Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 10, Seite 123). Wie in Abbildung 68 dargestellt, wirkt ein kompetitiver Inhibitor derartig, dass er die beobachteten K_m^* -Werte ($K_m^* = \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) K_m$) des Substrates verschiebt, V_{max} hingegen unverändert bleibt (vergleiche Abbildung 68 grüne und schwarze Kurve). Dabei ist das Ausmaß der Verschiebung des K_m^* -Wertes sowohl von der Konzentration $[I]$, als auch von der Affinität des Inhibitors abhängig (siehe Gleichung 11). Allosterische Inhibitoren, genauer nicht-kompetitive Inhibitoren, verursachen hingegen eine Verringerung der maximalen

Transportgeschwindigkeit ohne eine Veränderung von K_m (vergleiche Abbildung 68 grüne und rote Kurve), was durch Gleichung 12 beschrieben wird.¹⁸²

$$V' = \frac{V'_{max}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} \times \frac{[S]}{K_m + [S]}$$

Gleichung 12: Transportgeschwindigkeit in Anwesenheit eines nicht-kompetitiven Inhibitors. Mit K_i = Affinitätskonstante des Inhibitors; $[I]$ = Konzentration des Inhibitors, $[S]$ = Konzentration an Substrat; K_m = Michaelis-Menten-Konstante; V'_{max} = maximale Transportrate. Nach Cornish-Bowden¹⁸²

Anhand von Gleichung 12 lässt sich erkennen, dass mit steigender Konzentration des nicht-kompetitiven Inhibitors $[I]$ die virtuelle Enzymkonzentration reduziert und folglich der V'_{max} -Wert erniedrigt wird.

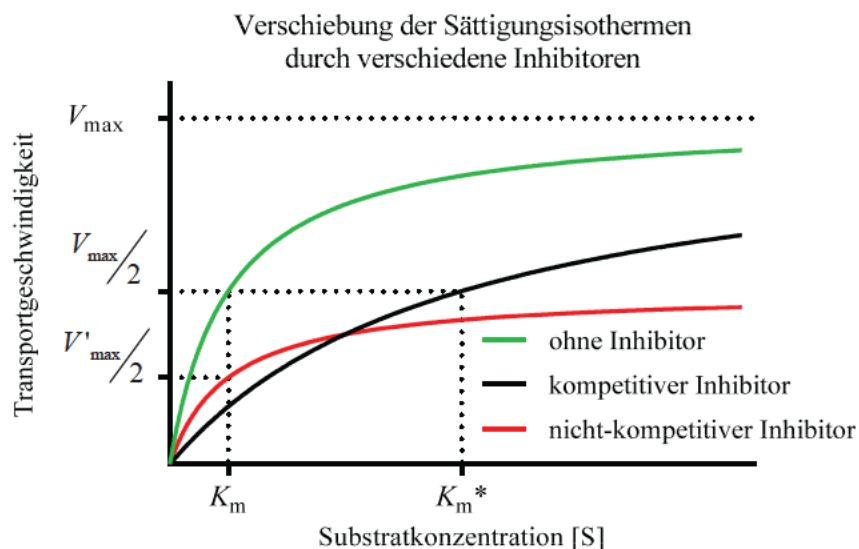


Abbildung 68: Verschiebung der Sättigungsisothermen durch verschiedene Inhibitoren

Kompetitive Transport-Assays in denen ganze Sättigungsisothermen in Gegenwart eines Inhibitors gemessen werden erlauben es, die Wirkungsweise des Inhibitors – ob kompetitiv, allosterisch oder gemischt-kompetitiv – zu charakterisieren. Dieser Ansatz erfordert jedoch eine Vielzahl an Proben, da jeweils für die verschiedenen Inhibitorkonzentrationen vollständige Sättigungsisothermen

aufgenommen werden müssen. Somit ist dieser Ansatz für ein Screening von Inhibitoren, bzw. eine Bestimmung der inhibitorischen Potenzen (pIC_{50} -Werte) zu aufwendig und nur bedingt geeignet.

Ein Weiterer Ansatz bei der Charakterisierung von Inhibitoren in Konkurrenzexperimenten besteht darin, den Einfluss des Inhibitors auf den Substrattransport bei nur einer bestimmten Substratkonzentration zu untersuchen, also das Target mit einer konstanten Konzentration Substrat in Gegenwart steigender Konzentrationen Inhibitor zu inkubieren. Daraus resultiert eine Inhibitionskurve, bei der mit zunehmender Inhibitorkonzentration die Menge transportierten Substrates abnimmt. Anhand der sich ergebenden Dosis-Wirkungs-Kurven lassen sich die inhibitorischen Potenzen von Inhibitoren ableiten. Dabei hat sich die Verwendung des IC_{50} -Wertes zum Vergleich von Potenzen verschiedener Inhibitoren etabliert. Der IC_{50} -Wert beschreibt diejenige Inhibitorkonzentration, bei der die Aktivität des Transporters um 50% reduziert ist. Allgemein werden Inhibitionskurven durch Gleichung 13 beschrieben, welche den in Abbildung 69 dargestellten Verlauf haben.

$$y = Min + \frac{Max - Min}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}}$$

Gleichung 13: Allgemeine Gleichung einer 3-parametrischen Dosis-Wirkungs-Kurve.

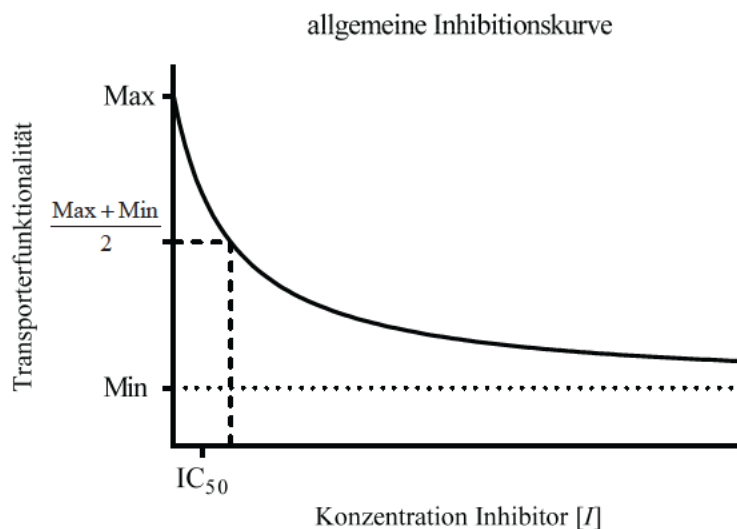


Abbildung 69: Allgemeine Dosis-Wirkungs-Kurve.

Der IC_{50} -Wert ist kein absolutes Maß für die Affinität eines Inhibitors, da er von der verwendeten Substratkonzentration abhängig ist. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_i des Inhibitors, die den

Gleichgewichtszustand des Systems gemäß dem Massenwirkungsgesetz beschreibt, hat dagegen einen festen Wert und ist nur von den äußeren Bedingungen, wie zum Beispiel der Temperatur abhängig. Zumindest für kompetitive Inhibitoren lässt sich K_i über die Cheng-Prusoff-Gleichung⁸³ (siehe Gleichung 1 auf Seite 13) aus dem IC_{50} -Wert berechnen. Wird für kompetitive Transportexperimente eine Substratkonzentration gewählt, die deutlich kleiner als K_m ist, so ist der Einfluss der gewählten Substratkonzentration auf die Größe des IC_{50} -Wertes allerdings sehr gering und die gemessenen IC_{50} -Werte entsprechen nahezu den K_i -Werten, sodass verschiedene Experimente direkt miteinander verglichen werden können. Trägt man die eingesetzten Inhibitorkonzentrationen in logarithmierter Form auf, so ergibt sich aus Gleichung 13:

$$y = Min + \frac{Max - Min}{1 + 10^{\log[I] + pIC_{50}}}$$

Gleichung 14: Logarithmierte 3-parametrische Dosis-Wirkungs-Kurve.

Die resultierende logarithmische Dosis-Wirkungs-Kurve (siehe Abbildung 70) hat einen sigmoiden Verlauf, sodass sich der pIC_{50} -Wert leichter bestimmen lässt.

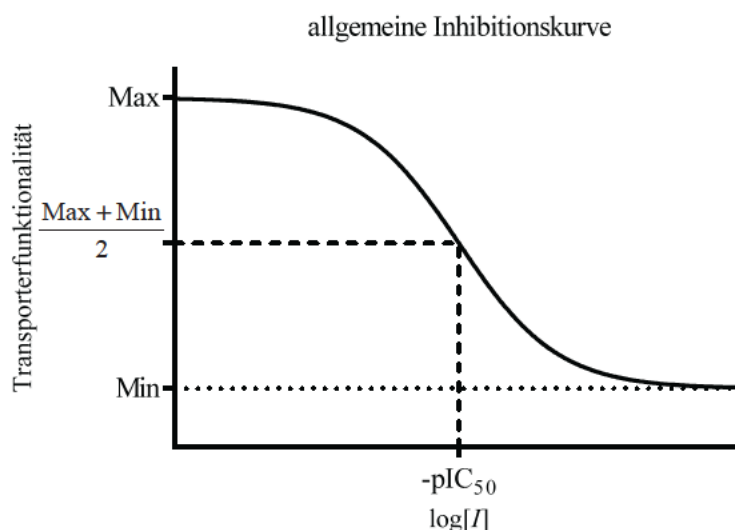


Abbildung 70: Logarithmische 3-parametrische Dosis-Wirkungs-Kurve

Für die in dieser Arbeit durchgeführten kompetitiven MS-Transport-Assays wurden die Inhibitoren für 25 min mit den Zellen vorinkubiert (siehe Schema 2 Schritt 3). Damit sollte gewährleistet werden, dass sich schon ein Gleichgewicht für die Bindung der Inhibitoren an das Target einstellen kann. Außerdem

wurde eine Substratkonzentration von 500 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für kompetitive MS-Transport-Assays an hGAT1, hGAT2 und hGAT3 verwendet. Diese Substratkonzentration ist deutlich unterhalb der K_m -Werte für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) an diesen Transportern ($\sim 1/20 K_m$). Dadurch ist eine annähernd konstante Substratkonzentration und somit eine konstante Transportrate während des gesamten Assays gewährleistet, wie dies in Kapitel 3.4.4.2 „Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat und Inhibitor in Konkurrenzexperimenten“ auf Seite 133 abgeschätzt wird. Für hBGT1 wurde eine Substratkonzentration von 3 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) verwendet, da dieser Transporter eine deutlich geringere Affinität zum Substrat ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) hat und somit die transportierte Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) bei Verwendung einer ($^2\text{H}_6$)GABA-Konzentration von 500 nM während der Konkurrenzexperimente für eine verlässliche Quantifizierung in Gegenwart von Inhibitor zu gering wäre. Um diese zu steigern könnte alternativ auch die Inkubationszeit für den Transport verlängert werden (siehe Kapitel 3.2.2.8 „Transportdauer“ auf Seite 108).

3.4.4.2. Abschätzung der Konzentrationsänderung an Substrat und Inhibitor in Konkurrenzexperimenten

Um eine verlässliche Bestimmung von pIC_{50} -Werten zu erhalten, müssen verschiedene Randbedingungen eingehalten werden. Zu diesen zählt unter anderem, dass die Konzentration an Substrat deutlich unterhalb seines K_m -wertes eingesetzt werden sollte, sodass, wie bereits auf Seite 132 erwähnt, die erhaltenen IC_{50} -Werte annähernd mit den K_i -Werten übereinstimmen. Überdies lässt sich mit einer geringeren Substratkonzentration ein sensitiverer Assay erhalten. Außerdem sollte die Substratkonzentration während des gesamten Assays nahezu konstant sein, da eine starke Änderung der Substratkonzentration $[S]$ eine Änderung der Transportgeschwindigkeit (vergleiche Gleichung 10 auf Seite 123) zur Folge hat. Die Menge an ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**), welche von den COS-hGAT1-Zellen während eines kompetitiven MS-Transport-Assays transportiert wird, wurde anhand der Sättigungsexperimente von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) an COS-hGAT1 ermittelt, indem die Transportrate von hGAT1 bei einer Substratkonzentration von 500 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) mit der Michaelis-Menten-Gleichung (Gleichung 10 auf Seite 123) für ein V_{max} von 656 amol und einem K_m von 13 μM (siehe Tabelle 12 auf Seite 126) errechnet wurde. Bei einer Substratkonzentration von 500 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) werden demnach $\sim 25 \text{ amol} \times \text{Zelle}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ von den COS-hGAT1-Zellen transportiert. Die in den kompetitiven MS-Transport-Assays eingesetzte Substratkonzentration von 500 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in 250 μL HEPES-Uptake-Puffer entspricht einer eingesetzten Stoffmenge von 125 pmol. Somit transportieren die in kompetitiven MS-Transport-Assays eingesetzten 60.000 COS-hGAT1-Zellen während der 6 minütigen Inkubation mit Substrat etwa 9 pmol ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**), was 7% der eingesetzten Stoffmenge (125 pmol) entspricht. Demnach ist die Änderung der Substratkonzentration während des Assays nur gering und eine annähernd konstante Transportgeschwindigkeit während der kompetitiven MS-Transport-Assays

kann angenommen werden. Analog wurde für hBGT1, hGAT2 und hGAT3 anhand der in Tabelle 12 angegebenen K_m - und V_{max} -Werte eine Änderung der Substratkonzentration von 2% für hBGT1 (bei 3 μ M Substratkonzentration), 6% für hGAT2 und 12,8% für hGAT3 ermittelt. Wie bereits erwähnt, ist die Änderung der Substratkonzentration im Fall von hGAT3 > 10%, jedoch zeigte sich in den Sättigungsexperimenten mit einer reduzierten Zellzahl von 5000 COS-hGAT3-Zellen (im Vergleich zu 60.000 COS-hGAT3-Zellen) kein erkennbarer Unterschied in der Transportkinetik (siehe Kapitel 3.4.2 „Sättigungsexperimente an hGAT1, hGAT2, hGAT3 und BGT1“ auf Seite 123).

3.4.4.3. Evaluierung der pIC₅₀-Werte von Inhibitoren an hGAT1-3 und hBGT1

Wie bereits erwähnt sollten die kompetitiven MS-Transport-Assays dazu genutzt werden, die inhibitorischen Potenzen von 21 Verbindungen an allen vier GABA-Transporter-Subtypen zu untersuchen. Die für die Untersuchung ausgewählten Inhibitoren decken einen großen Bereich an Potenzen und Subtypenselektivitäten ab. Die Strukturen der verwendeten Inhibitoren sind in Abbildung 71 dargestellt. Neben dem natürlichen Substrat der GABA-Transporter, GABA (**1**), wurden Verbindungen mit GABA-analoger Struktur untersucht, die in frühen Struktur-Aktivitäts-Beziehungen als GAT-Inhibitoren identifiziert wurden. Dazu zählen die in der Betelnuss vorkommenden Nipicotinsäuren (**5**) und Guvacin (**7**).¹⁸³ Durch *N*-Alkylierung des Amin-Stickstoffes von Nipicotinsäure (**5**) wurden bereits 1985 Verbindungen wie SK&F-89976 (**8**) mit einer deutlich gesteigerten inhibitorischen Potenz erhalten.¹⁸⁴ Seither sind eine Vielzahl an Verbindungen mit Nipicotinsäure (**5**) als Grundstruktur und lipophiler Seitenkette wie (*S*)-SNAP-5114 (**9**), DDPM-859 (**10**), DDPM-1457 (**11**), DDPM-2349 (**12**) und Tiagabin (**13**) – ein zur Behandlung von Epilepsien in der Klinik eingesetztes Antiepileptikum¹⁸⁵ – synthetisiert worden und stellen Beispiele für von Nipicotinsäure (**5**) abgeleitete potente GAT1-Inhibitoren dar.^{72,186} Ein in der GAT-Forschung ebenfalls weit verbreiteter GAT1-Inhibitor ist NO 711 (**4**),^{72,86,186,187} welcher auch als Markersubstanz in kompetitiven Bindungsassays eingesetzt wird⁸⁴ und auf Guvacin (**7**) als Grundstruktur beruht. Weitere GABA-Analoga Verbindungen mit inhibitorischem Effekt auf den GABA-Transport stellen 2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure (**14**) dar,¹⁸⁸ von denen ebenfalls Derivate mit hydrophober Seitenkette synthetisiert wurden.¹⁸⁹ β -Alanin (**6**), sowie L-DABA (**15**) wurden ebenfalls als Inhibitoren der GABA-Transporter identifiziert.¹⁸⁸ Neben GABA (**1**) und β -Alanin (**6**) sind DL-DAPA (**16**),⁷⁰ Hypotaurin (**17**)²⁹ und Taurin (**18**)²⁷ potente Inhibitoren von GAT2. Im Organismus ist Betain (**19**) neben GABA (**1**) das Hauptsubstrat des Betain/GABA-Transporters BGT1, welcher sich auch durch Chinidin (**20**) inhibieren lässt.²⁹ NNC 05-2090 (**21**) ist ein potenter und – mit einer 10-fach höheren Affinität zu mGAT2 im Vergleich zu mGAT1, mGAT3 und mGAT4 – selektiver Inhibitor von BGT1.¹⁹⁰

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

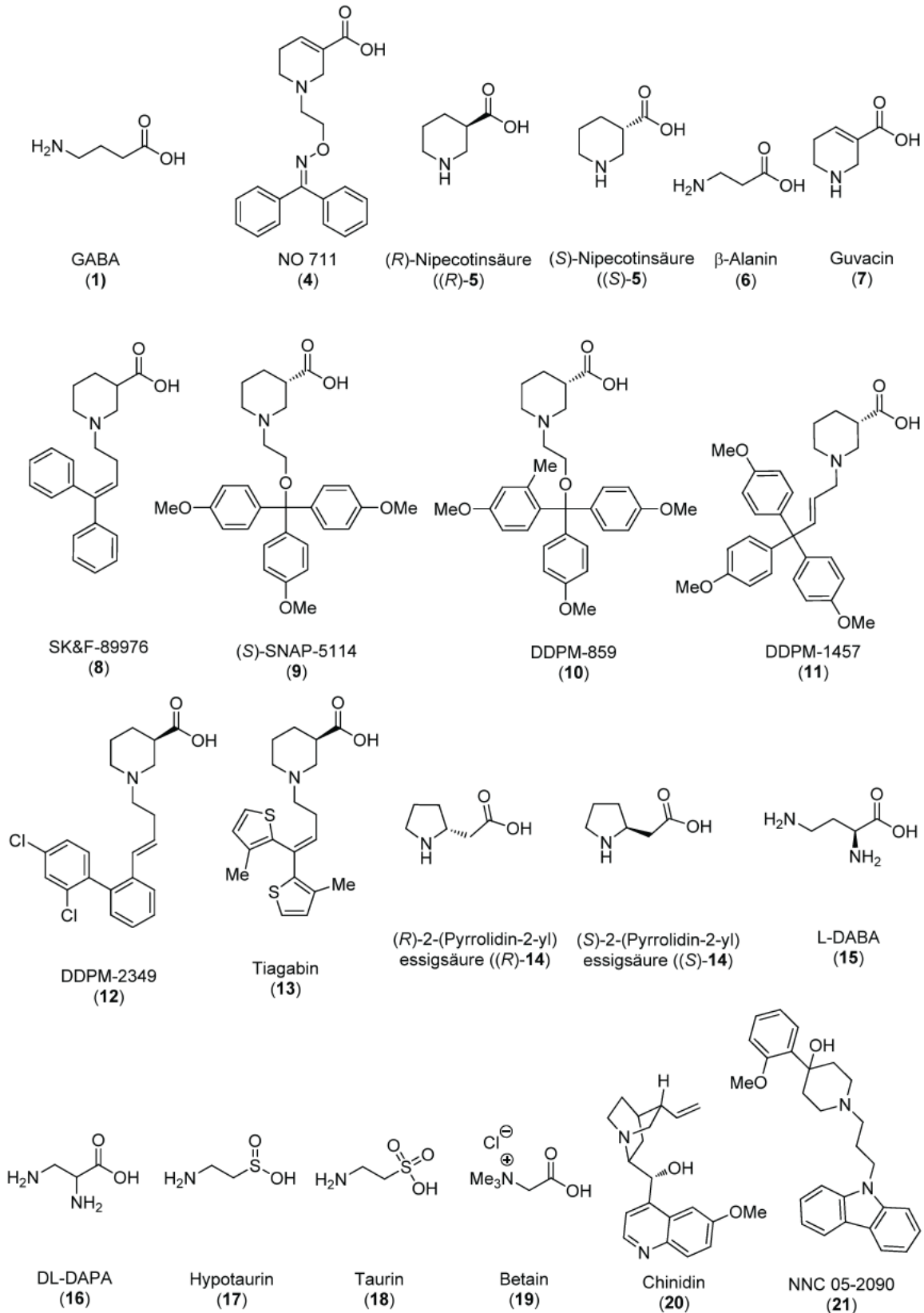


Abbildung 71: Strukturen der 21 Inhibitoren, welche mit den kompetitiven MS-Transport-Assays untersucht wurden.

Die in Abbildung 71 dargestellten Substanzen wurden mit den MS-Transport-Assays an allen vier GAT-Subtypen auf ihre Potenz zur Reduktion des (²H₆)GABA-Transportes hin untersucht. Durch Vergleich der so erhaltenen Daten und den aus anderen Testsystemen sollte die Validität des von mir entwickelten Verfahrens überprüft werden. Eine repräsentative Dosis-Wirkungs-Kurve für (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-5) ist in Abbildung 72 wiedergegeben. Darin lässt sich erkennen, dass die MS-Transport-Assays eine geringe Streuung einzelner Messergebnisse (zu erkennen an den Standardabweichungen der einzelnen Messpunkte) haben. Das Verhältnis der Streubreite von Messwerten zum dynamischen Bereich eines Assays ist ein Qualitätsmerkmal zur Charakterisierung von Screening-Assays – besonders für solche mit einem hohen Durchsatz – welcher durch den von Zhang et al. vorgeschlagenen „Z-Faktor“¹⁹¹ beschrieben wird (siehe Gleichung 15).

$$Z = 1 - \frac{3 \times SD_{neg} + 3 \times SD_{pos}}{\mu_{pos} - \mu_{neg}}$$

Gleichung 15: Z-Faktor nach Zhang et al.¹⁹¹, μ_{pos} = Mittelwert der Positivkontrollen; μ_{neg} = Mittelwert der Negativkontrollen; SD_{pos} = Standardabweichung der Positivkontrollen; SD_{neg} = Standardabweichung der Negativkontrollen.

Aus den Positiv- und Negativkontrollen der kompetitiven MS-Transport-Assays zur Bestimmung der pIC₅₀-Werte für hGAT1 (n = 126) wurde für die entwickelten kompetitiven MS-Transport-Assays nach Gleichung 15 ein Z-Faktor von 0,7 berechnet, was nach Zhang et al. einer exzellenten Screening-Assay-Güte entspricht.¹⁹¹

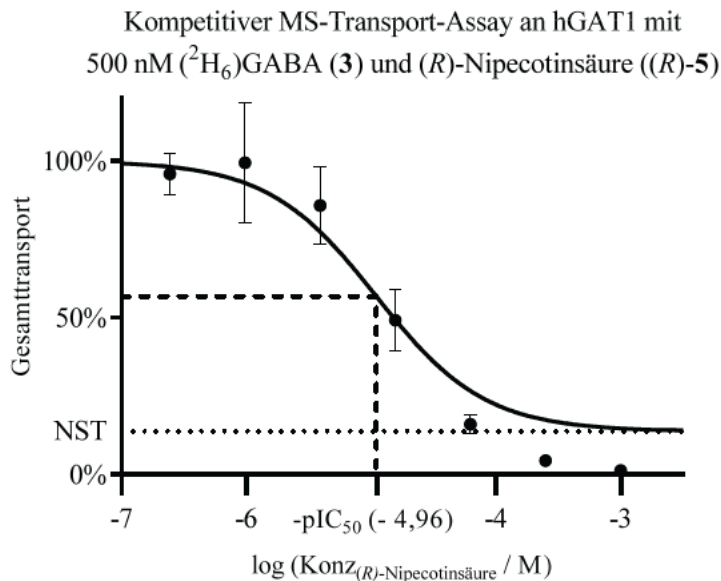


Abbildung 72: Dosis-Wirkungs-Kurve von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) an hGAT1. Mittelwerte \pm SD, $n=3$). Die untere gestrichelte Linie (NST) gibt die Negativkontrollen, also den nicht-spezifischen Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen in Abwesenheit von Inhibitor wieder. Die Kompetitionskurve von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) ist auf 100% (Positivkontrolle) und den ungehinderten nicht-spezifischen Transport (NST=13,8%) fixiert (als oberes und unteres Maximalniveau).

Außerdem fällt in Abbildung 72 auf, dass der relative spezifische ($^2\text{H}_6$)GABA-Transport bei hohen Konzentrationen von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) negativ wird. Dieser negative spezifische Transport wird durch die Subtraktion des nicht-spezifischen Transportes – bestimmt als Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen – vom Gesamttransport durch COS-hGAT1-Zellen hervorgerufen. Wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 3.2.2.11 „Ermittlung des nicht-spezifischen Transportes“ auf Seite 113) blockiert (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) neben dem GAT1-vermittelten Transport auch den Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in nicht-transfizierten COS-7-Zellen. Dies führt dazu, dass bei hohen Konzentrationen von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) sowohl der spezifische, als auch der nicht-spezifische Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in COS-hGAT1-Zellen blockiert wird. Da der nicht-spezifische Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) allerdings durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen in Abwesenheit von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) erfasst wurde, wird zur Bestimmung des spezifischen Transportes in diesem Fall der nicht-spezifische Transport vom gemessenen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Transport in COS-hGAT1-Zellen abgezogen, obwohl der nicht-spezifische Transport in den COS-hGAT1-Zellen durch (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) blockiert wurde. Dieses Phänomen des negativen spezifischen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Transportes konnte außer bei (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) noch bei GABA (**1**), β -Alanin (**6**), Betain (**19**), DL-DAPA (**16**), Guvacin (**7**), Hypotaurin (**17**), L-DABA (**15**) und Taurin (**18**) beobachtet werden. Allerdings war dieser Effekt nur dann erkennbar, wenn eine vollständige Dosis-Wirkungs-Kurve erhalten wurde. Der Effekt des negativen spezifischen Transportes führt zu einer Überschätzung

der Menge an (²H₆)GABA (**3**), welche durch den untersuchten GABA-Transporter transportiert wurde. In den kompetitiven MS-Transport Assays war der nicht-spezifische Transport von (²H₆)GABA (**3**) maximal 13% des Gesamttransportes, weshalb dieser Fall im folgenden Kapitel beschrieben werden soll.

3.4.4.3.1. Fitting von Kompetitionskurven

In Abbildung 72 ist die Dosis-Wirkungs-Kurve von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) an hGAT1 mit dem oben beschriebenen negativen spezifischen Transport (bei log(c_{Inhibitor}) 3,6 und 3) dargestellt. Das Vorgehen beim Auswerten der erhaltenen Dosis-Wirkungs-Kurven aus Konkurrenzexperimenten soll anhand von Abbildung 73 und Abbildung 74 verdeutlicht werden. In Abbildung 73 ist der theoretische Verlauf des relativen Transportes von (²H₆)GABA (**3**) in Konkurrenz mit einem Inhibitor dargestellt, welcher sowohl den spezifischen, also den GAT-vermittelten, als auch den nicht-spezifischen Transport von (²H₆)GABA (**3**) inhibiert. Hat der Inhibitor eine deutlich geringere Affinität zum nicht-spezifischen als zum GAT-vermittelten Transport, so sollte die theoretisch erhaltene Konkurrenzkurve zweistufig verlaufen, wie in Abbildung 73 anhand der grünen Kurve exemplarisch dargestellt. Eine solche biphasische Inhibitionskurve lässt sich als Summe aus zwei unabhängigen Transportprozessen und somit als Summe der einzelnen Inhibitionskurven beschreiben.¹⁹² Eine einphasige Inhibitionskurve wird durch Gleichung 14 auf Seite 132 beschrieben. Summiert man nun zwei derartige Kurven, wobei man jede einzelne mit ihrem jeweiligen Effektanteil normiert, so erhält man Gleichung 16

$$y = \frac{Max^1 - Min^1}{1 + 10^{\log[I] + pIC_{50}^1}} + \frac{Max^2 - Min^2}{1 + 10^{\log[I] + pIC_{50}^2}}$$

Gleichung 16: Gleichung zum Beschreiben einer biphasischen Inhibitionskurve.

welche zur Beschreibung der in Abbildung 73 und Abbildung 74 dargestellten theoretischen Kurvenverläufe mit Hilfe der Software Prism[®]6 verwendet wurde. Die in Abbildung 73 dargestellten Verläufe der biphasischen Inhibitionskurven umfassen drei Fälle, bei denen der Anteil des spezifischen Transportes, wie im Fall der (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) (siehe Abbildung 72 auf Seite 137) jeweils 87% und der Anteil des nicht-spezifischen Transportes 13% des Gesamttransportes ausmachen. Im ersten Fall (siehe Abbildung 73 grüne Kurve) liegen die pIC₅₀-Werte der Inhibition des nicht-spezifischen Transportes (NST) und des spezifischen Transportes (ST) vier Zehnerpotenzen auseinander (ΔpIC₅₀ = pIC₅₀(ST) - pIC₅₀(NST) = 4). Der Abfall des (²H₆)GABA-Transportes bei geringeren Inhibitorkonzentrationen wird durch die GAT-Inhibition und diejenige bei höheren Konzentrationen

durch die Inhibition des nicht-spezifischen Transportes hervorgerufen. Beide Affinitätsstufen sind so weit voneinander entfernt, dass sie sich nicht gegenseitig beeinflussen. In diesem Fall ließe sich der pIC_{50} -Wert für die GAT-Inhibition anhand der ersten Affinitätsstufe bestimmen. Liegen die Affinitäten des Inhibitors für den spezifischen und den nicht-spezifischen Transport näher zusammen, so beginnen sich die beiden Inhibitionskurven zu überlagern und es kommt zu einer Streckung der Inhibitionskurve (siehe Abbildung 73 rote Kurve, $\Delta pIC_{50} = 2$). Ist die Affinität des Inhibitors für beide Transportmechanismen (spezifisch und nicht-spezifisch) gleich groß (Abbildung 73, blaue Kurve, $\Delta pIC_{50} = 0$), so geht die biphasische Inhibitionskurve in eine monophasische über.

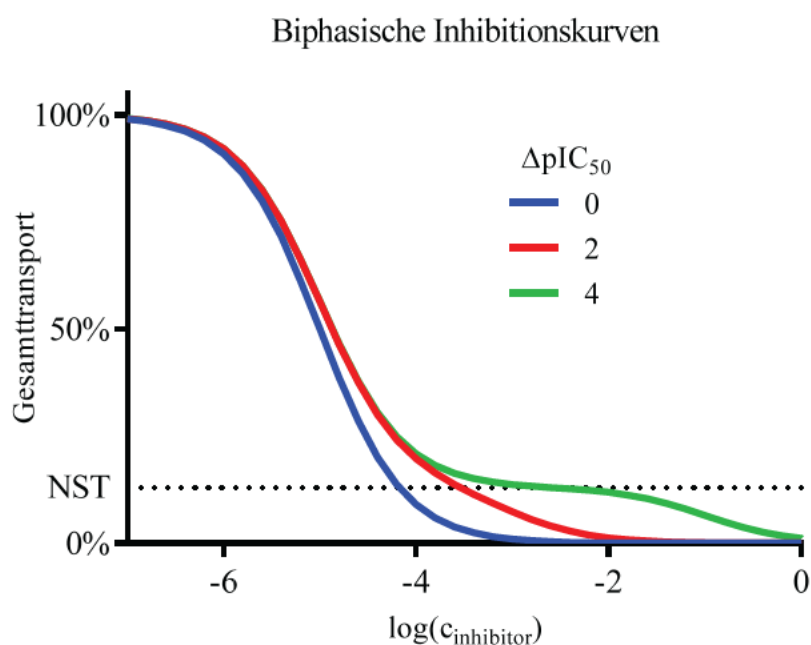


Abbildung 73: Biphasische Dosis-Wirkungs-Kurven. Die angegebenen Kurven wurden anhand der Prism®6-Software für einen pIC_{50} -Wert von 5 für die erste Affinitätsstufe und einem pIC_{50} -Wert von 5 (blau), 3 (rot), bzw. 1 (grün) für die zweite Affinitätsstufe berechnet. Für die erste Stufe wurde ein Anteil von 87% und für die zweite Stufe von 13% vom Gesamttransport gewählt.

Gleiches gilt in umgekehrter Weise für den Fall, dass die Affinität des Inhibitors für den nicht-spezifischen Transport deutlich höher als für den spezifischen Transport ist (siehe Abbildung 74 grüne Kurve, $\Delta pIC_{50} = -4$). Ein solches Verhalten eines Inhibitors ließe sich anhand der Abweichung der Messwerte bei geringen Konzentrationen an Inhibitor (linker Bereich der Inhibitionskurve) unterhalb der Positivkontrolle erkennen (siehe Abbildung 74 grüne Kurve). Dies war allerdings bei keinem der untersuchten Inhibitoren der Fall.

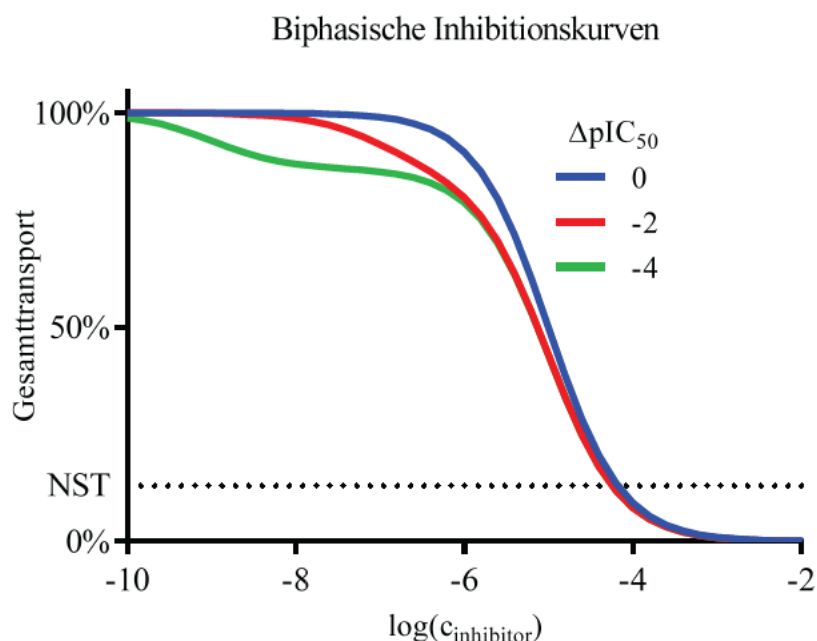


Abbildung 74: Biphasische Dosis-Wirkungs-Kurven. Die angegebenen Kurven wurden anhand der Prism[®]6-Software für einen pIC_{50} -Wert von 5 für die erste Affinitätsstufe und einem pIC_{50} -Wert von 5 (blau), 7 (rot), bzw. 9 (grün) für die zweite Affinitätsstufe berechnet. Für die erste Stufe wurde ein Anteil von 87% und für die zweite Stufe von 13% vom Gesamttransport gewählt.

Meist werden bei der Bestimmung der Potenzen von Inhibitoren nicht derartig hohe Konzentrationen eingesetzt, dass eine Inhibition des nicht-spezifischen Transportes erfasst werden kann. Betrachtet man den Extremfall, bei dem $pIC_{50}(ST) \gg pIC_{50}(NST)$, also den Fall, bei dem der Inhibitor den nicht-spezifischen Transport faktisch nicht blockiert, so lässt sich der pIC_{50} -Wert des spezifischen Transportes korrekt erfassen, wenn die monophasische Inhibitionskurve auf das Niveau des nicht-spezifischen Transportes der in Abwesenheit von Inhibitor gemessen wurde fixiert wird. Aus diesem Grund ist es weit verbreitet, den nicht-spezifischen Transport nur in Abwesenheit von Inhibitor zu erfassen^{68,72,73,186,189} und bei der Auswertung der Daten die Inhibitionskurve auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes zu fixieren. Wird jedoch ein Gesamttransport gemessen, welcher aus einem spezifischen und einem nicht-spezifischen Transport besteht (siehe Abbildung 73 rote Kurve), fällt der Gesamttransport unter das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes, wie für die (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-5) in Abbildung 72 auf Seite 137 dargestellt. Dadurch, dass für die Auswertung die Inhibitionskurve auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes fixiert wird, kommt es zu einem Stauchen der Inhibitionskurve und somit zu einer Verschiebung des ermittelten pIC_{50} -Wertes zu höheren Werten hin. Vernachlässigt man hingegen den nicht-spezifischen Transport, also wertet man den Gesamttransport mit einer monophasischen Inhibitionskurve (siehe Gleichung 14 auf Seite 132) aus, ohne diese auf das Niveau des nicht-

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

spezifischen Transportes zu fixieren, so würde der ermittelte pIC_{50} -Wert den spezifischen und den nicht-spezifischen Transport nur dann richtig beschreiben, wenn beide Transportmechanismen gleich stark inhibiert werden ($\Delta pIC_{50} = 0$). Werden hingegen die biphasischen Inhibitionskurven bei $\Delta pIC_{50} = 2$ und $\Delta pIC_{50} = 4$ (siehe Abbildung 73 rote und grüne Kurve) derartig gefittet, so ergeben sich pIC_{50} -Werte, die zu niedrigeren Werten hin verschoben sind. Wie stark sich die einzelnen Verschiebungen bei beiden Arten der Auswertung – anhand des Gesamttransportes oder anhand des Fixierens auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes – auf die ermittelten pIC_{50} -Werte auswirkt, wurde mit Hilfe der Software Prism®6 für verschiedene Fälle simuliert. In Tabelle 13 sind die pIC_{50} -Werte angegeben, welche anhand der Auswertung einer biphasischen Inhibitionskurve mit einem monophasischen Modell erhalten werden. Dabei wurde die Auswertung sowohl anhand des Gesamttransportes (Tabelle 13, A) als auch anhand eines Modells, bei dem die Inhibitionskurve auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes fixiert wurde (Tabelle 13, B), vorgenommen.

Tabelle 13: Verschiebung der pIC_{50} -Werte vom wahren pIC_{50} -Wert des spezifischen Transportes in Abhängigkeit des gewählten Modells zur Auswertung der Daten.

		ΔpIC_{50}	5	4	3	2	1	0	-1	-2	-3	-4	-5
		NST											
A)	13%		4,95	4,91	4,87	4,85	4,89	5,00	5,11	5,15	5,13	5,09	5,05
	10%		4,97	4,94	4,91	4,89	4,92	5,00	5,09	5,11	5,09	5,06	5,03
	5%		4,98	4,97	4,96	4,95	4,96	5,00	5,04	5,05	5,04	5,03	5,02
B)	13%		5,00	5,00	5,00	5,01	5,06	5,17	5,30	5,37	5,40	5,40	5,40
	10%		5,00	5,00	5,00	5,01	5,05	5,13	5,23	5,28	5,29	5,29	5,29
	5%		5,00	5,00	5,00	5,01	5,02	5,07	5,11	5,13	5,14	5,14	5,14

Zur Ermittlung der in dieser Tabelle angegebenen pIC_{50} -Werte wurde mit der Prism®6-Software ein Satz von biphasischen Inhibitionskurven erstellt, welche die folgenden Parameter hatten. Top: 100, Bottom: 0, Frac: 0,87 (13% NST), 0,9 (10% NST) bzw. 0,95 (5% NST), $\log EC_{501}$: -5; $nH1$: -1 (Hill Koeffizient); $\log EC_{502}$: ($\log EC_{501} + \Delta pIC_{50}$); $nH2$: -1 (Hill Koeffizient). Diese Funktionenschar stellt einen Fall dar, bei dem der spezifische Transport mit einem pIC_{50} -Wert von 5 inhibiert wird. A): Auswertung der Daten anhand des Gesamttransportes. Dazu wurde die Funktionenschar anhand der 3-parametrischen Inhibitions Gleichung ohne Einschränkungen gefittet (siehe Gleichung 14). B): Auswertung der Daten anhand des Gesamttransportes. Dazu wurde die Funktionenschar anhand der 3-parametrischen Inhibitions Gleichung mit der Einschränkungen gefittet, dass das untere Niveau dem ungehinderten nicht spezifischen Transport entspricht ($min = NST$). NST: nicht-spezifischer Transport. $\Delta pIC_{50} = pIC_{50}(ST) - pIC_{50}(NST)$.

Anhand der Daten in Tabelle 13 lässt sich gut erkennen, dass die pIC_{50} -Werte, welche durch das Fixieren der Inhibitionskurve auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes (Tabelle 13, Methode B) für alle Fälle, bei denen $\Delta pIC_{50} \geq 1$ ist, näher am „wahren“ pIC_{50} -Wert (5,00) liegen, als diejenigen, welche ohne Einschränkungen der Inhibitionskurve gewonnen wurden (Tabelle 13, Methode A).

Besonders ausgeprägt ist der Unterschied, wenn der Inhibitor den spezifischen Transport nur etwa 100-fach stärker inhibiert als den nicht-spezifischen Transport (Tabelle 13, $\Delta pIC_{50} = 2$). Wird in diesem Fall, wenn der nicht-spezifische Transport 13% des Gesamttransportes ausmacht (NST = 13%), die Inhibitionskurve ohne Einschränkungen ausgewertet (Methode A), liegt der ermittelte pIC_{50} -Wert 0,15 Einheiten unterhalb des „wahren“ pIC_{50} -Wertes, wohingegen durch die Einschränkung der Inhibitionskurve auf das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes der erhaltene pIC_{50} -Wert nur 0,01 Einheiten größer ist (Tabelle 13, Methode B). Hat hingegen der Inhibitor eine ähnliche oder gar höhere Potenz zur Inhibition des nicht-spezifischen Transportes als des spezifischen Transportes (siehe Abbildung 74, grüne Kurve auf Seite 140), so werden durch das Fixieren der Inhibitionskurve auf den nicht-spezifischen Transport die ermittelten pIC_{50} -Werte deutlich verschoben (siehe Tabelle 13, Methode B, $\Delta pIC_{50} \leq 0$). Da Inhibitoren, die ein derartiges Verhalten zeigen, nicht von Interesse sind und, wie bereits erwähnt, auch nicht beobachtet wurden, stellt die Art der Auswertung durch Fixieren der Inhibitionskurven meines Erachtens nach einen guten Kompromiss zur Bestimmung der pIC_{50} -Werte an GAT dar. Dieses Verfahren gibt die pIC_{50} -Werte für die reine GAT-Inhibition in den Fällen besser wieder, bei denen die Potenz des Inhibitors an GAT größer ist als für den nicht-spezifischen Transport. Da die MS-Transport-Assays zum Screening potenter GAT-Inhibitoren verwendet werden sollen, ist es für die meisten Inhibitoren wahrscheinlicher, dass die Potenz des Inhibitors am spezifischen Transport größer ist, als am nicht-spezifischen Transport ($\Delta pIC_{50} \geq 0$). Außerdem sollte hier nochmals erwähnt werden, dass die in diesem Kapitel behandelte Problematik nur für Inhibitoren relevant ist, die sowohl den spezifischen, als auch den nicht-spezifischen Transport inhibieren. Für spezifische GAT-Inhibitoren hat die Art der Auswertung keinen Einfluss auf die erhaltenen pIC_{50} -Werte, da für diese Inhibitoren der Verlauf der Inhibitionskurve theoretisch wie in Abbildung 73 auf Seite 139 (grüne Kurve) ist, wobei die Konzentrationen, welche den nicht-spezifischen Transport blockieren, nicht erreicht werden. Überdies ist der Einfluss des nicht-spezifischen Transportes sehr gering und beeinflusst die ermittelte inhibitorische Potenz, wie gezeigt, nur in geringem Maße. Ist eine exaktere Bestimmung von pIC_{50} -Werten nötig, so kann die Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes an nicht-transfizierten COS-7-Zellen ebenfalls für alle Konzentrationen an Inhibitor erfolgen und nicht ausschließlich in Abwesenheit von Inhibitor. Allerdings würde ein solches Vorgehen nicht nur den Verbrauch an Inhibitor, sondern vielmehr auch die Anzahl der zu messenden Proben verdoppeln. Daher wurde für die MS-Transport-Assays, welche auch als Screening-Methoden mit hohem Durchsatz eingesetzt werden sollen, der nicht-spezifische Transport von (2H_6)GABA (**3**) an nicht-transfizierten COS-7-Zellen weiterhin nur in Abwesenheit von Inhibitor bestimmt.

Exemplarisch für (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) wurde jedoch ein Konkurrenzexperiment an nicht-transfizierten COS-7-Zellen durchgeführt, um den nicht-spezifischen Transport in diesem Fall vollständig zu erfassen (siehe Abbildung 75, rote Kurve). Die aufgenommene Menge (²H₆)GABA (**3**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen ist bei einer Substratkonzentration von 500 nM – wie diese für Konkurrenzexperimente an hGAT1 verwendet wird – zwar zu quantifizieren, aber dennoch so gering, dass keine Konkurrenz gemessen werden kann. Deshalb wurde zur Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes eine Substratkonzentration von 3 μM (²H₆)GABA (**3**) verwendet. Die Konkurrenz von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) mit (²H₆)GABA (**3**) an nicht-transfizierten COS-7-Zellen war durch einen pIC₅₀-Wert von 3,97 charakterisiert. Dieser pIC₅₀-Wert ist leicht niedriger als für die Inhibition des hGAT1-vermittelten Transportes durch (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) in diesem Versuch (pIC₅₀ 4,96). Da der ermittelte nicht-spezifische Transport aufgrund der verwendeten höheren Substratkonzentration nicht direkt vom Gesamttransport subtrahiert werden kann, wurde angenommen, dass die durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen aufgenommene Menge (²H₆)GABA (**3**) bei einer Substratkonzentration von 500 nM (²H₆)GABA (**3**) ein sechstel derjenigen ist, welche bei 3 μM (²H₆)GABA (**3**) aufgenommen wurde. Diese Annahme kann deshalb getroffen werden, da die Substratkonzentration deutlich unterhalb des K_m-Wertes des nicht-spezifischen Transportes lag und somit eine annähernd lineare Zunahme der Transportgeschwindigkeit angenommen werden kann. Anhand dieser berechneten Menge an nicht-spezifisch aufgenommener (²H₆)GABA (**3**) wurde nach Gleichung 14 eine Inhibitionskurve ermittelt (siehe Abbildung 75, rote Kurve) und diese dann von dem Gesamttransport der COS-hGAT1-Zellen abgezogen, um einen spezifischen Transport zu erhalten (blaue Kreise und blaue Kurve in Abbildung 75). Wie in Abbildung 75 anhand der blauen Punkte bei log[*I*] = 3,6 und 3 zu erkennen ist, liegt dieser spezifische Transport immer noch leicht unterhalb von 0%. Dies kann unter anderem mit Messungenauigkeiten bei geringen Konzentrationen an (²H₆)GABA (**3**) – sowohl bei der Bestimmung des nicht-spezifischen Transportes, als auch bei der Bestimmung des Gesamttransportes – als auch mit variierenden Zellzahlen und Expressionsraten erklärt werden. Der pIC₅₀-Wert, welcher sich anhand des spezifischen Transportes (blaue Kurve in Abbildung 75) ergab, beträgt 4,85 und ist in Übereinstimmung mit demjenigen pIC₅₀-Wert, welcher auf die in den MS-Transport-Assays übliche Weise ermittelt wurde (pIC₅₀ 4,96, grüne Ringe und grüne Kurve in Abbildung 75 und Abbildung 66 auf Seite 125).

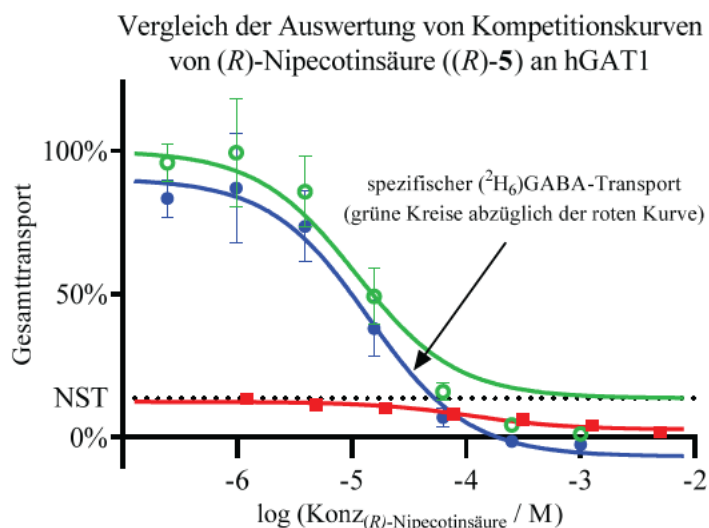


Abbildung 75: Vergleich der Auswertung von Kompetitionskurven von (R)-Nipecotinsäure ((R)-5) an COS-hGAT1-Zellen. In rot ist der ermittelte nicht-spezifische Transport von (²H₆)GABA (**3**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen in Gegenwart der angegebenen Konzentration (R)-Nipecotinsäure ((R)-5) dargestellt. In blau ist der aus der Differenz des Gesamttransportes von (²H₆)GABA (**3**) durch COS-hGAT1-Zellen und des nicht-spezifischen Transportes (rot) resultierende spezifische Transport dargestellt. In grün ist der Gesamttransport von (²H₆)GABA (**3**) durch COS-hGAT1-Zellen dargestellt. Die grüne Inhibitionskurve wurde aus das Niveau des ungehinderten nicht-spezifischen Transportes (NST) fixiert. Dargestellt sind Mittelwerte ± SD, n = 3.

Dies zeigt, dass die Art der Auswertung der Kompetitionskurven durch Fixieren der Kurve auf die Positivkontrollen (Gesamttransport abzüglich des nicht-spezifischen Transportes in Abwesenheit von Inhibitor) bzw. der Negativkontrollen (nicht-spezifischer Transport in Abwesenheit von Inhibitor) – zumindest für Kompetitoren, welche eine geringere Potenz zur Inhibition des nicht-spezifischen Transportes im Vergleich zum spezifischen Transport haben – zu verlässlichen Resultaten führt.

3.4.4.3.2. Resultate der kompetitiven MS-Transport-Assays

Da IC₅₀-Werte von der Konzentration des eingesetzten Substrates abhängen, lassen sich IC₅₀-Werte aus verschiedenen Quellen nicht direkt vergleichen. Dies ist nur dann möglich, wenn die eingesetzte Substratkonzentration – wie in der hier vorliegenden Arbeit – deutlich unterhalb des K_m-Wertes für das Substrat liegen, da dann, wie aus der Cheng-Prusoff-Gleichung (siehe Gleichung 1 auf Seite 13) hervorgeht, die IC₅₀-Werte den K_i-Werten nahezu identisch sind.

Meistens wird zusätzlich eine Referenzsubstanz in die Untersuchungen eingeschlossen, um eine weitere Vergleichsmöglichkeit verschiedener Datensätze aus unterschiedlichen Laboratorien und verschiedener Assays zu haben.⁶⁹

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 14: pIC_{50} -Werte der in Abbildung 71 dargestellten Inhibitoren an den vier GAT-Subtypen bestimmt mit den kompetitiven MS-Transport-Assays im Vergleich zu pIC_{50} -Werten aus $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays und der Literatur.

	Substanz	Nr.		$(^2H_6)$ GABA-Transport mit COS-hGAT	$[^3H]$ GABA-Uptake mit HEK-mGAT	Ref	Literatur	Ref
1	GABA	(1)	GAT1	5,23 ± 0,03	5,14 ± 0,09	⁸⁶	5,0 ± 0,003	⁷²
			BGT1	4,91 ± 0,05	4,56 ± 0,06	-	4,6 ± 0,04	⁷²
			GAT2	5,10 ± 0,05	4,94 ± 0,09	-	5,0 ± 0,07	⁷²
			GAT3	5,31 ± 0,07	5,18 ± 0,13	-	5,0 ± 0,10	⁷²
2	β-Alanin	(6)	GAT1	1,68 ± 0,07	2,59 ± 0,03	¹⁹³	2,3 ± 0,07	⁷²
			BGT1	3,12 ± 0,12	3,48 ± 0,11	-	3,2 ± 0,04	⁷²
			GAT2	4,47 ± 0,15	4,66 ± 0,06	-	4,4 ± 0,10	⁷²
			GAT3	3,48 ± 0,09	4,46 ± 0,13	-	4,5 ± 0,1	⁷²
3	L-DABA	(15)	GAT1	3,20 ± 0,10	3,85 ± 0,12	-	4,0 ± 0,06	⁷²
			BGT1	3,06 ± 0,13	2,77 ± 0,11	-	3,6 ± 0,06	⁷²
			GAT2	3,84 ± 0,02	3,58 ± 0,06	-	3,2 ± 0,05	⁷²
			GAT3	2,46 ± 0,08	3,52 ± 0,02	-	3,0 ± 0,1	⁷²
4	DL-DAPA	(16)	GAT1	1,94 ± 0,13	3,11 ± 0,02	-	< 3	⁷²
			BGT1	3,48 ± 0,05	3,50 ± 0,12	-	3,9 ± 0,05	⁷²
			GAT2	4,90 ± 0,06	4,66 ± 0,08	-	4,6 ± 0,1	⁷²
			GAT3	4,19 ± 0,10	5,05 ± 0,02	-	4,8 ± 0,09	⁷²
5	(R)-Nipicotinsäure	(R-5)	GAT1	4,70 ± 0,15	5,19 ± 0,03	-	5,2 ± 0,06	¹⁸⁶
			BGT1	2,89 ± 0,10	3,39 ± 0,05	-	2,6 ± 0,02	¹⁸⁶
			GAT2	4,06 ± 0,10	4,76 ± 0,05	-	4,7 ± 0,04	¹⁸⁶ a)
			GAT3	3,90 ± 0,01	4,95 ± 0,05	-	4,3 ± 0,05	¹⁸⁶
6	(S)-Nipicotinsäure	(S-5)	GAT1	3,48 ± 0,10	4,24 ± 0,05	-	3,9 ± 0,03	¹⁸⁶
			BGT1	2,51 ± 0,12	3,13 ± 0,14	-	2,2 ± 0,01	¹⁸⁶
			GAT2	2,64 ± 0,04	3,83 ± 0,04	-	3,1 ± 0,03	¹⁸⁶ a)
			GAT3	2,54 ± 0,14	3,63 ± 0,06	-	2,6 ± 0,02	¹⁸⁶
7	(R)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure	(R-14)	GAT1	2,53 ± 0,13	3,62 ^{g)}	¹⁹³		
			BGT1	(68%) 2,5 mM	(81%) 1 mM	-		
			GAT2	2,62 ± 0,14	3,47 ± 0,08	-		
			GAT3	(75%) 2,5 mM	2,95 ± 0,12	-		
8	(S)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure	(S-14)	GAT1	2,24 ^{g)}	3,39 ± 0,17	¹⁹³		
			BGT1	(81%) 1 mM	(77%) 1 mM	-		
			GAT2	3,31 ± 0,13	3,85 ± 0,02	-		
			GAT3	2,71 ± 0,11	3,76 ± 0,07	-		
9	Guvacin	(7)	GAT1	4,35 ± 0,09	4,87 ± 0,06	⁸⁶	4,8 ± 0,05	⁷²
			BGT1	2,61 ± 0,04	3,31 ± 0,03	-	2,7 ± 0,09	⁷²
			GAT2	3,33 ± 0,03	4,59 ± 0,05	-	3,0 ± 0,08	⁷²
			GAT3	3,11 ± 0,06	4,59 ± 0,05	-	3,9 ± 0,05	⁷²
10	Taurin	(18)	GAT1	(72%) 50 mM	(69%) 10 mM	¹⁹³	< 2	⁷²
			BGT1	1,80 ± 0,08	(73%) 1 mM	-	2,1 ± 0,03	⁷²
			GAT2	2,71 ± 0,12	3,46 ± 0,1	-	< 2,5	⁷²
			GAT3	1,96 ± 0,06	3,51 ± 0,01	-	2,4 ± 0,09	⁷²

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

11	Hypotaurin	(17)	GAT1	2,08 ± 0,06	3,43 ± 0,1	-	3,0 ± 0,05	194	b)
			BGT1	(61%) 1 mM	3,54 ± 0,09	-	3,4 ± 0,01	168	
			GAT2	4,29 ± 0,15	4,32 ± 0,08	-	4,3 ± 0,05	194	a)
			GAT3	3,30 ± 0,05	4,84 ± 0,13	-	4,1 ± 0,04	194	a)
12	Betain	(19)	GAT1	0,89 ± 0,01	(66%) 10 mM	-	< 2	72	
			BGT1	4,11 ± 0,14	3,93 ± 0,08	-	3,2 ± 0,03	72	
			GAT2	1,47 ± 0,09	2,12 g)	-	< 2,5	72	
			GAT3	1,16 ± 0,01	(58%) 10 mM	-	< 2	72	
13	Chinidin	(20)	GAT1	3,36 ± 0,20	3,24 ± 0,04	-	3,0 ± 0,07	72	
			BGT1	4,33 ± 0,18	4,07 ± 0,09	-	3,8 ± 0,05	72	
			GAT2	4,03 ± 0,09	3,40 ± 0,09	-	3,2 ± 0,05	72	
			GAT3	3,47 ± 0,10	3,61 ± 0,08	-	3,5 ± 0,05	72	
14	(S)-SNAP 5114	(9)	GAT1	3,78 ± 0,08	4,07 ± 0,09	87	< 3,3	72	
			BGT1	4,40 ± 0,20	(56%) 100 µM	195	3,6 ± 0,08	72	
			GAT2	4,76 ± 0,05	5,29 ± 0,04	195	3,9 ± 0,06	72	
			GAT3	5,48 ± 0,10	5,71 ± 0,2	195	4,3 ± 0,09	72	
15	DDPM-859	(10)	GAT1	4,09 ± 0,09	4,19 ± 0,07	195	-	-	
			BGT1	4,47 ± 0,17	4,12 ± 0,08	195	-	-	
			GAT2	4,99 ± 0,06	4,85 ± 0,04	195	-	-	
			GAT3	5,51 ± 0,02	5,78 ± 0,03	195	-	-	
16	DDPM-1457	(11)	GAT1	4,56 ± 0,17	4,40 ± 0,05	195	-	-	
			BGT1	5,15 ± 0,10	4,42 ± 0,11	195	-	-	
			GAT2	5,55 ± 0,06	5,47 ± 0,02	195	-	-	
			GAT3	5,87 ± 0,02	5,87 ± 0,08	195	-	-	
17	Tiagabin	(13)	GAT1	6,81 ± 0,15	6,88 ± 0,12	87	5,6 ± 0,06	186	
			BGT1	3,74 ± 0,07	(50%) 100 µM	-	< 3,5	186	
			GAT2	3,67 ± 0,06	(64%) 100 µM	-	< 3,5	186	
			GAT3	(76%) 250 µM	(73%) 100 µM	-	< 3,5	186	
18	SK&F-89976	(8)	GAT1	5,91 ± 0,06	6,16 ± 0,05	87	6,9 ± 0,03	186	
			BGT1	3,26 ± 0,05	3,43 ± 0,07	-	2,1 ± 0,18	186	
			GAT2	3,56 ± 0,12	3,71 ± 0,04	-	3,3 ± 0,15	186	a)
			GAT3	3,02 ± 0,07	3,56 ± 0,06	-	3,0 ± 0,11	186	
19	NO 711	(4)	GAT1	6,72 ± 0,18	6,83 ± 0,06	87	5,9 ± 0,03	72	
			BGT1	(77%) 250 µM	3,20 ± 0,09	-	2,8 ± 0,04	72	
			GAT2	3,50 ± 0,05	3,62 ± 0,04	-	2,9 ± 0,07	72	
			GAT3	(99%) 300 µM	3,07 ± 0,05	-	< 2,8	72	
20	DDPM-2349	(12)	GAT1	7,60 ± 0,18	7,43 ± 0,1	-	-	-	
			BGT1	(73%) 25 µM	(73%) 100 µM	-	-	-	
			GAT2	3,88 ± 0,12	(91%) 100 µM	-	-	-	
			GAT3	(78%) 25 µM	4,20 g)	-	-	-	
21	NNC 05-2090	(21)	GAT1	4,81 ± 0,04	4,99 ± 0,06	-	4,7 ± 0,02	190	c)
			BGT1	5,79 ± 0,16	5,09 ± 0,06	-	5,8 ± 0,07	190	d)
			GAT2	5,57 ± 0,03	4,93 ± 0,03	-	4,4 ± 0,08	190	e)
			GAT3	4,92 ± 0,05	4,78 ± 0,1	-	4,8 ± 0,08	190	f)

Bei Inhibitoren, für die kein pIC_{50} -Wert bestimmt werden konnte, ist der verbleibende Resttransport bei der höchsten eingesetzten Konzentration angegeben. a) rGAT2; b) rGAT1; c) mGAT1; d) mGAT2; e) mGAT3; f) mGAT4; g) n=1

Die mit den MS-Transport-Assays ermittelten pIC_{50} -Werte der in Abbildung 71 dargestellten Inhibitoren sind in Tabelle 14 zusammengefasst und dort den pIC_{50} -Werten, die in der biologischen Prüfung des Arbeitskreises Wanner mit einem [3H]GABA-Uptake-Assay mit HEK-Zellen – welche die murinen GABA-Transporter exprimieren – ermittelt wurden,⁸⁷ sowie den in der Literatur verfügbaren pIC_{50} -Werten gegenübergestellt. Für Inhibitoren, die den Substrattransport im untersuchten Konzentrationsbereich nicht um mehr als 50% reduzieren konnten, wurde kein pIC_{50} -Wert bestimmt. Stattdessen ist in Tabelle 14 der verbleibende Resttransport in % angegeben, welcher bei der höchsten im Assay getesteten Konzentration erreicht wurde. Wie sich in Tabelle 14 erkennen lässt, stimmen diejenigen pIC_{50} -Werte, die mit den MS-Transport-Assays ermittelt wurden gut mit denjenigen aus den [3H]GABA-Uptake-Assays überein. Auch in der graphischen Darstellung der Korrelation zwischen den pIC_{50} -Werten, die mit den MS-Transport-Assays und denjenigen, die mit den [3H]GABA-Uptake-Assays bestimmt wurden, wird ersichtlich, dass die mit den MS-Transport-Assays erhaltenen inhibitorischen Potenzen der Testsubstanzen sehr gut mit denjenigen aus den [3H]GABA-Uptake-Assays übereinstimmen und die generelle Reihenfolge der Potenzen der Inhibitoren in beiden Fällen gleich war (siehe Abbildung 76).

Für GAT1 (Abbildung 76a) ergab sich aus dem Vergleich der pIC_{50} -Werte der entwickelten MS-Transport-Assays mit denjenigen des im Arbeitskreis bereits verwendeten [3H]GABA-Uptake-Assays eine Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von $R^2 = 94,0\%$, wobei Inhibitoren, für die kein pIC_{50} -Wert bestimmt werden konnte, nicht dargestellt und berücksichtigt wurden. Auch für die anderen GAT-Subtypen ergaben sich gute Korrelationen (BGT1: $R^2 = 86,9\%$ (Abbildung 76b), GAT2: $R^2 = 73,7\%$ (Abbildung 76c), GAT3: $R^2 = 81,2\%$ (Abbildung 76d)), die allerdings auch aufgrund der geringeren Datenlage – für viele Inhibitoren konnte aufgrund der geringen Potenz kein IC_{50} -Wert an diesen Transportern ermittelt werden – geringfügig niedriger ausfiel.

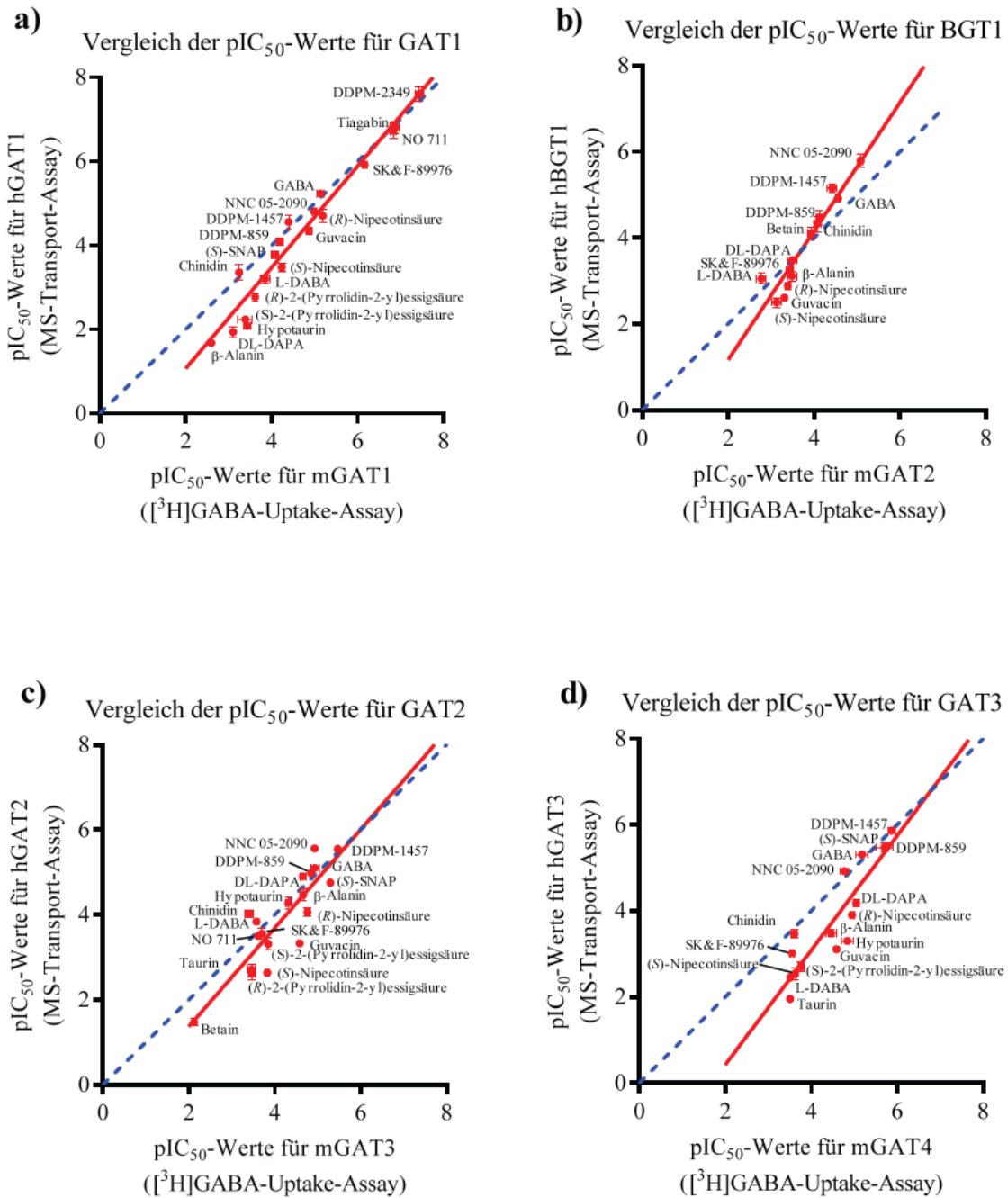


Abbildung 76: Korrelation der pIC_{50} -Werte aus den auf humanen GAT beruhenden MS-Transport-Assays und den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays mit murinen GAT.

Auffällig ist, dass die erhaltenen Geraden der Korrelationen der pIC_{50} -Werte der GAT-Inhibitoren, welche mit den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays erhalten wurden und denjenigen aus den MS-Transport-Assays eine Steigung >1 haben (vergleiche dazu in Abbildung 76a-d die blau-gestrichelte Gerade) und die y-Achse (pIC_{50} -Werte aus den MS-Transport-Assays) im Negativen schneidet (siehe rote Gerade in Abbildung 76a-d). Dies zeigt einen Trend an, wonach die pIC_{50} -Werte von schwachen Inhibitoren in den MS-Transport-Assays geringer ausfallen, als in den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays. So betreffen die

Abweichungen der pIC_{50} -Werte, die stets sehr klein sind, Substanzen mit geringer Potenz (vergleiche Tabelle 14 Einträge 2, 4 und 6 bis 11, sowie Abbildung 76a-d), für die es allgemein wegen der erforderlichen hohen Konzentration für die Erstellung der kompetitionskurven sehr schwierig ist, präzise Werte zu erhalten. Dies könnte die Abweichungen erklären, aber auch die unterschiedlichen Expressionssysteme (COS-7-Zellen in MS-Transport-Assays vs. HEK293-Zellen in $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays) oder der unterschiedliche Ursprung der GABA-Transporter (humane GAT in MS-Transport-Assays vs. murine GAT in $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays). Ein weiterer substantieller Unterschied zwischen den MS-Transport-Assays und den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays, der die leichten Unterschiede erklären könnte ist, dass bei den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays im Gegensatz zu den MS-Transport-Assays die verwendeten Säugerzellen in Suspension eingesetzt werden.

Wie in Tabelle 14, Eintrag 1 zusammengefasst, wurden in homo-Kompetitionsexperimenten mit GABA (**1**) pIC_{50} -Werte von ~ 5 für alle vier GABA-Transporter-Subtypen ermittelt, wobei die stärkste Inhibition des $(^2H_6)$ GABA-Uptakes für hGAT3 (pIC_{50} 5,31) und eine etwas geringere für hBGT1 (pIC_{50} 4,91) gemessen wurde (siehe Tabelle 14, Eintrag 1). Dies bestätigt nochmals die hohe Affinität des natürlichen Substrates GABA (**1**) an allen vier GABA-Transporter-Subtypen (charakterisiert durch K_m -Werte von $6 \mu M$ (hGAT2) bis $42 \mu M$ $(^2H_6)$ GABA (**3**) (hBGT1); siehe Tabelle 12 auf Seite 126). Überdies sind die gefundenen pIC_{50} -Werte in guter Übereinstimmung mit den pIC_{50} -Werten aus den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays basierend auf murinen GABA-Transportern des Arbeitskreises Wanner, sowie mit den in der Literatur beschriebenen.⁷²

Bei den inhibitorischen Potenzen von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**), (*S*)-Nipecotinsäure ((*S*)-**5**) und Guvacin (**7**) lässt sich besonders für die „nicht-GAT1“-Transporter eine Abweichung der pIC_{50} -Werte erkennen (siehe Tabelle 14, Eintrag 5, 6 und 9), welche bereits den oben beschriebenen Trend für schwächere Inhibitoren erkennen lassen (vergleiche dazu die roten Trendlinien in Abbildung 76a-d). Vergleicht man jedoch die pIC_{50} -Werte dieser Verbindungen mit denjenigen in der Literatur für hGAT,^{72,186} so ist zum Teil eine bessere Übereinstimmung der Potenzen erkennbar.

Für L-DABA (**15**), (*R*)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure ((*R*)-**14**), (*S*)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure ((*S*)-**14**) und Taurin (**18**), schwache und nahezu unselektive GABA-Transporter-Inhibitoren, konnten in den MS-Transport-Assays zum überwiegenden Teil etwas geringere pIC_{50} -Werte als in den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays bestimmt werden (siehe Tabelle 14, Eintrag 3, 7, 8 und 10).

Ebenso waren β -Alanin (**6**), DL-DAPA (**16**) und Hypotaurin (**17**) in den MS-Transport-Assays in den meisten Fällen geringfügig weniger potent als in den $[^3H]$ GABA-Uptake-Assays (siehe Tabelle 14, Eintrag 2, 4 und 11), jedoch blieb auch hier der Trend (rote Trendlinien in Abbildung 76) und somit die allgemeine Reihenfolge der Potenzen der Inhibitoren erhalten.

Im Fall von GAT1 konnten bei den höhermolekularen GAT1-Inhibitoren Tiagabin (**13**), SK&F-89976 (**8**) bzw. NO 711 (**4**) (siehe Tabelle 14, Eintrag 17, 18 und 19) sehr gute Übereinstimmungen der pIC_{50} -Werte mit den MS-Transport-Assays und den [3H]GABA-Uptake-Assays erhalten werden. DDPM-2349 (**12**), eine im Arbeitskreis Wanner von M. Petrera entwickelte Substanz, erreichte mit einem pIC_{50} -Wert von 7,6 in den MS-Transport-Assays die höchste inhibitorische Potenz an hGAT1, wobei sie gleichzeitig eine um mehr als 1000-fach höhere Selektivität gegenüber den anderen GABA-Transporter-Subtypen hatte (siehe Tabelle 14, Eintrag 20).

Für (S)-SNAP 5114 (**9**), das von (S)-SNAP 5114 (**9**) abgeleitete Derivat DDPM-859 (**10**) und DDPM-1457 (**11**) konnten im Fall von GAT3 mit den MS-Transport-Assays gut übereinstimmende Resultate zu den [3H]GABA-Uptake-Assays erhalten werden (Tabelle 14, Einträge 14-16). Allerdings war DDPM-859 (**10**) mit einem pIC_{50} -Wert von 5,51 ebenso potent an hGAT3 wie (S)-SNAP 5114 (**9**), sodass die gesteigerte Selektivität von DDPM-859 (**10**) bezüglich der anderen GABA-Transporter-Subtypen¹⁹⁵ im Vergleich zu (S)-SNAP 5114 (**9**) nicht gefunden werden konnte (vergleiche Tabelle 14, Eintrag 15 mit Eintrag 14).

Betain (**19**) – ein weiteres Substrat des BGT1-Transporters¹⁹⁶ – hatte einen pIC_{50} -Wert von 4,11 an hBGT1 und damit einen um mehr als 500-fach höhere Selektivität für hBGT1 als für die anderen GABA-Transporter Subtypen (pIC_{50} -Werte von 1,47 für hGAT2, 1,16 für hGAT3 und 0,89 für hGAT1, siehe Tabelle 14, Eintrag 12). Auch für die BGT1-Inhibitoren Chinidin (**20**), sowie das in der Literatur¹⁹⁰ als selektiver BGT1-Inhibitor beschriebene NNC 05-2090 (**21**) wurden vergleichbare Potenzen in beiden Assays bestimmt, wobei in beiden Fällen die Potenz an hBGT1 und hGAT2 in den MS-Transport Assays sogar leicht höher war als in den [3H]GABA-Uptake-Assays (siehe Tabelle 14, Eintrag 13 und 21).

Zusammenfassend bestätigen die in Tabelle 14 aufgelisteten und in Abbildung 76 auf Seite 149 dargestellten Korrelationen der pIC_{50} -Werte die Richtigkeit und Robustheit der entwickelten MS-Transport-Assays und der pIC_{50} -Werte, welche anhand dieser ermittelt wurden. Die entwickelten MS-Transport-Assays sind in der Lage in kompetitiven MS-Transport-Assays die funktionale Potenz von Inhibitoren so präzise, schnell und sensitiv zu erfassen, wie dies mit radiometrischen Transport-Assays möglich ist, bieten gleichzeitig aber den Vorteil durch die Quantifizierung per LC-MS/MS auf radioaktiv-markierte Substanzen zu verzichten. Überdies eröffnet sich mit den MS-Transport-Assays – im Gegensatz zu radiometrischen Transport-Assays – die Möglichkeit, native, also unmarkierte Substrate, sowie Inhibitoren oder weitere Substrate direkt zu quantifizieren, solange sich diese durch eine ausreichend sensitive MS/MS-Methode quantifizieren lassen. Diese Möglichkeiten werden im folgenden Abschnitt näher behandelt.

3.4.5. Verifizierung von GAT-Substraten

Eine weitere und sehr exklusive Eigenschaft der MS-Transport-Assays ist die Möglichkeit, im gleichen Konkurrenzexperiment neben dem eigentlichen Substrat ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zudem auch direkt den eingesetzten Inhibitor mit zu erfassen, welcher von den Zellen aufgenommen wurde. Dies ist möglich, indem bei der LC-MS/MS-Quantifizierung zusätzlich ein Massenübergang, welcher spezifisch für den eingesetzten Inhibitor ist, aufgezeichnet wird. Auf diese Weise lassen sich Inhibitoren, welche ebenfalls Substrate der GABA-Transporter sind, identifizieren.

Dies sei hier zunächst beispielhaft an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) als Inhibitor des hGAT1 erläutert. In kompetitiven MS-Transport-Assays an hGAT1 wurde neben dem Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) auch die Menge der aufgenommenen (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) erfasst, die als Inhibitor eingesetzt wurde. Die Detektion der (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) wurde mittels der Massenübergänge m/z 130/112 und m/z 130/84 vorgenommen. Zur absoluten Quantifizierung der Nipecotinsäure (**5**) wurde eine externe Kalibrierung mit (*rac*)-Nipecotinsäure (*rac*-**5**) über das Flächenverhältnis von m/z 130/112 zu m/z 106/89 des internen Standards ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) erstellt. In Abbildung 77 ist die Inhibitionskurve für die durch (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) verminderte ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Aufnahme (rot), sowie die Kurve für die Menge an aufgenommener Nipecotinsäure (**5**) (grün), die aus den erhaltenen Daten konstruiert wurde, dargestellt.

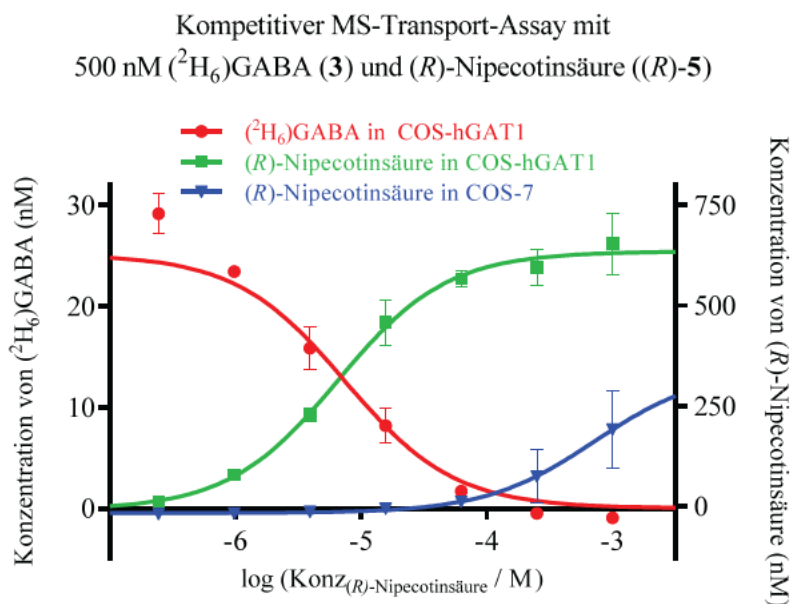


Abbildung 77: Kompetitive MS-Transport-Assays von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) mit gleichzeitiger Detektion des in die Zelle aufgenommenen Inhibitors.

In Abbildung 77 ist zu erkennen, dass mit zunehmender Konzentration von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) im Assay die Menge transportierter (²H₆)GABA (**3**) sinkt, wohingegen gleichzeitig die durch GAT1 aufgenommene Menge (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) zunimmt. Bei hohen Konzentrationen an Inhibitor ist die Aufnahme von (²H₆)GABA (**3**) vollständig unterdrückt und der Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) erreicht ein Plateau.

Aus Sicht der (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) handelt es sich bei den kompetitiven MS-Transport-Assays um eine Art eines Sättigungsexperimentes, wobei berücksichtigt werden sollte, dass die Bedingungen für den Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) in den kompetitiven MS-Transport-Assays, in denen hier neben der Inhibition des (²H₆)GABA (**3**) Transportes parallel die Aufnahme von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) verfolgt wird, zwar nur gering, aber dennoch eindeutig unterschiedlich zu den Bedingungen sind, wie sie in klassischen Sättigungsexperimenten verwendet werden. So können die eingesetzten Inhibitoren bereits während der 25 minütigen Vorinkubation, sowie der anschließenden sechsminütigen Inkubation mit (²H₆)GABA (**3**) von den Zellen aufgenommen werden. Da die Vorinkubation der Zellen in Gegenwart des Inhibitors für 25 min in einem Volumen von 200 µL/Well erfolgt, ist die Konzentration des eingesetzten Inhibitors während der Vorinkubation 125% der Nominalkonzentration, welche erst durch Zugabe von 50 µL des eigentlichen Substrates (²H₆)GABA (**3**) erreicht wird.

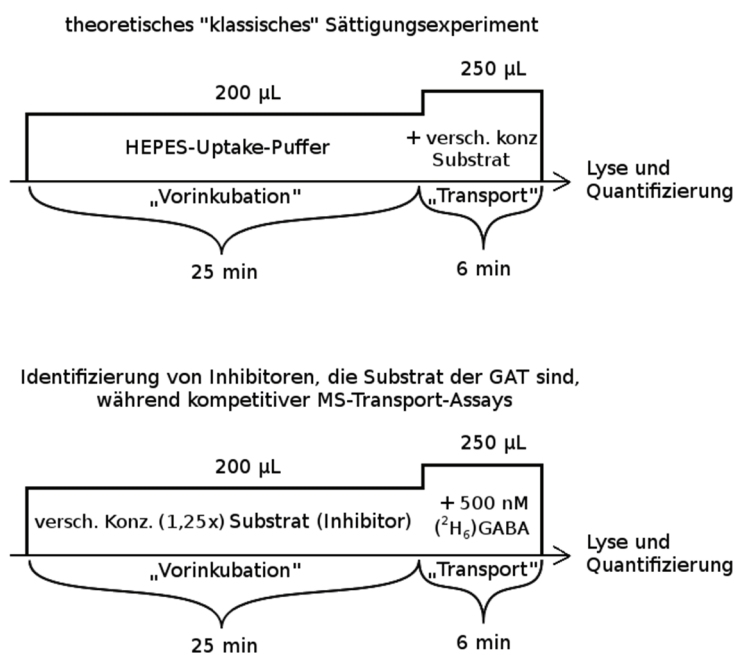


Abbildung 78: Kompetitiver MS-Transport-Assay aus der Sicht eines Inhibitors, der auch Substrat der GABA-Transporter ist. Das theoretische „klassische“ Sättigungsexperiment (oben) soll die Unterschiede verdeutlichen, welche aufgrund der Versuchsbedingungen entstehen.

Überdies stellt ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) während des 6 minütigen Transportes von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) (siehe Abbildung 78) für den Transport des Inhibitors einen Kompetitor dar. Transformiert man die in Abbildung 77 dargestellte Konzentrationen von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) auf eine lineare Achse, so erhält man die gewohnte Darstellung einer Sättigungsisotherme (siehe Abbildung 79). Der EC_{50} -Wert, welcher hier und im Folgenden die Konzentration an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) beschreiben soll, bei der die Aufnahme von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) halbmaximal wird, ist aufgrund der Versuchsbedingungen und der Anwesenheit von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) als Kompetitor von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) während der Transportdauer von sechs Minuten (siehe Abbildung 78) nach Gleichung 11 auf Seite 129 und Abbildung 68 auf Seite 130 nach rechts verschoben. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Konzentration von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**), die für einen halbmaximalen Transport notwendig ist (EC_{50}), nicht den exakten K_m -Wert für den Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) an hGAT1 widerspiegeln, sondern vielmehr eine Näherung dessen darstellen.

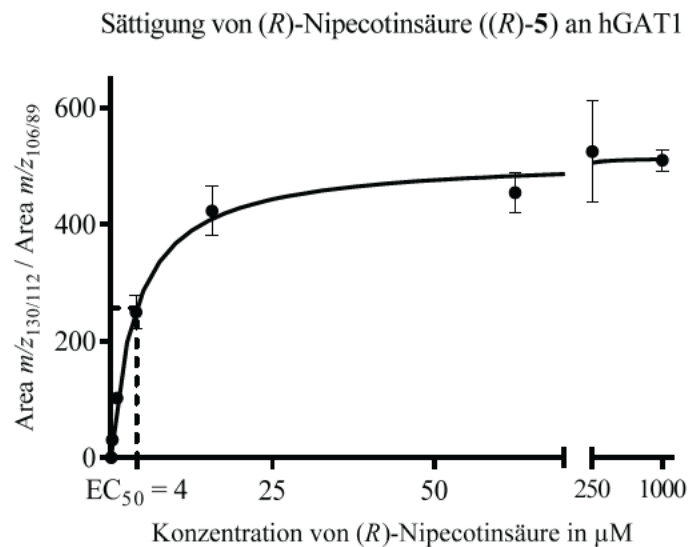


Abbildung 79: Sättigungsisotherme für (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) an hGAT1.

Bemerkenswert ist der hier beobachtete sehr geringe EC_{50} -Wert von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) an hGAT1, welcher geringer ist, als der K_m -Wert für ($^2\text{H}_6$)GABA ($4 \mu\text{M}$ für (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) vs. $13 \mu\text{M}$ für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**), siehe Tabelle 12 auf Seite 126).

Auch der nicht-spezifische Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) wurde anhand des Transportes durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen untersucht (siehe Abbildung 77, blaue Kurve auf Seite 152). Für Konzentrationen an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) bis etwa $60 \mu\text{M}$ wurden nur vergleichsweise geringe

Mengen an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) in nicht-transfizierten COS-7-Zellen gefunden (~2% der Mengen, die in COS-hGAT1-Zellen aufgenommen wurden). Erst bei höheren Konzentrationen an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) von 1 mM erreichte die Menge an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) in COS-7-Zellen etwa 30% der Menge, welche in COS-hGAT1-Zellen gefunden wurde (Siehe Abbildung 77, blaue und grüne Kurve). Der geringe Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen im Vergleich zu COS-hGAT1-Zellen lieferte einen weiteren Hinweis dafür, dass die in COS-hGAT1-Zellen gefundene Menge (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) zum überwiegenden Teil durch hGAT1 und nicht durch einen anderen Mechanismus in die Zellen gelangt ist.

Außerdem nimmt die Menge transportierter (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) mit zunehmender Inkubationsdauer sowohl in den COS-hGAT1-Zellen, als auch in den nicht-transfizierten COS-7-Zellen zu, sodass von einem Transport und nicht von einer Art nicht-spezifischen Bindung ausgegangen werden kann. Dies wurde anhand von Konkurrenzexperimenten mit (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) und (²H₆)GABA (**3**) untersucht, bei denen die Vorinkubationszeit von 25 min in Gegenwart des Inhibitors zwar konstant, die Inkubationszeit mit dem eigentlichen Substrat (²H₆)GABA (**3**) jedoch von 6 min auf 10 min erhöht wurde (siehe Abbildung 78). Dabei nahm die aufgenommene Menge an (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) während der Inkubation für 35 min (25 min + 10 min) im Vergleich zur Inkubationsdauer von 31 min (25 min + 6 min) um ~18% zu. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) zu einem überwiegenden Teil durch einen GAT1-vermittelten Transport in die COS-hGAT1-Zellen gelangt sind und nicht über einen anderen aktiven oder passiven Transport.

Wird der Inhibitor (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) tatsächlich über hGAT1 transportiert, so sollte der EC₅₀-Wert des Inhibitors unter den gewählten Bedingungen aus den oben genannten Gründen zwar nicht exakt, aber immerhin annähernd gleich dem IC₅₀-Wert sein. Tatsächlich ist der in den kompetitiven MS-Transport-Assays mit (²H₆)GABA (**3**) ermittelte IC₅₀-Wert für (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) annähernd identisch zu den Konzentrationen von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**), die einen halbmaximalen Transport von (*R*)-Nipecotinsäure ((*R*)-**5**) hervorrufen (siehe Tabelle 15).

Sowohl für hGAT1, als auch für hGAT2, hGAT3 und hBGT1 wurden weitere Inhibitoren untersucht, welche zu einem großen Teil in die Zelle transportiert werden. Diese sind in Tabelle 15 zusammengefasst, wobei der pEC₅₀-Wert diejenige Konzentration an Inhibitor beschreibt, bei der der Inhibitor-Transport in diesem Versuchsaufbau halbmaximal ist.

3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 15: Weitere Substrate von hGAT1, hGAT2, hGAT3 und hBGT1 und deren pEC₅₀-Werte im Vergleich zu den in den kompetitiven MS-Transport-Assays ermittelten pIC₅₀-Werten.

	hGAT1			hBGT1			hGAT2			hGAT3		
	pEC ₅₀	± SEM	pIC ₅₀	pEC ₅₀	± SEM	pIC ₅₀	pEC ₅₀	± SEM	pIC ₅₀	pEC ₅₀	± SEM	pIC ₅₀
(R)-Nipecotinsäure	5,45	± 0,10	4,70	3,03	± 0,19	2,89	4,52	± 0,11	4,06	4,29	± 0,07	3,90
(S)-Nipecotinsäure	4,37	± 0,01	3,48	2,54	± 0,22	2,51	3,33	± 0,10	2,64	3,26	± 0,07	2,54
Guvacin	4,69	± 0,12	4,35	2,98	± 0,04	2,61	3,69	± 0,15	3,33	3,78	± 0,28	3,11
Taurin	1,61	± 0,18	< 1,3	1,64	± 0,13	1,80	2,44	± 0,24	2,71	2,71	± 0,16	1,96
β-Alanin	1,50	± 0,07	1,68	1,68	± 0,02	3,12	4,51	± 0,14	4,47	3,79	± 0,07	3,48
GABA	5,50	± 0,02	5,23	4,80	± 0,05	4,91	5,26	± - ¹⁾	5,1	5,58	± 0,04	5,31

Angegeben sind pEC₅₀-Werte als Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Versuchen (n=3) mit ihren Standardfehlern (SEM), welche durch die Detektion des Messsignals des jeweiligen Inhibitors während der kompetitiven MS-Transport-Assays ermittelt wurden. Zum Vergleich sind die in diesen kompetitiven MS-Transport-Assays ermittelten pIC₅₀-Werte aus Tabelle 14 angeführt. ¹⁾ n=1.

3.4.6. Efflux-Experimente an hGAT1

Die physiologische Funktion der GABA-Transporter besteht im Allgemeinen darin, den Neurotransmitter GABA (**1**) durch Wiederaufnahme in die Neuronen bzw. Gliazellen aus dem synaptischen Spalt zu entfernen.¹⁸⁸ Allerdings sind die GABA-Transporter auch in der Lage einen Rücktransport von GABA (**1**) aus den Zellen zu vollziehen und somit GABA (**1**) in den synaptischen Spalt freizusetzen. Die physiologische Bedeutung dieses Rücktransportes ist bis heute nicht vollständig verstanden.¹⁹⁷ *In-vitro* lässt sich dieser Rücktransport nach einer Umkehr des Na⁺-Gradienten beobachten.¹⁹⁷ Die in dieser Dissertation entwickelten MS-Transport-Assays sind auch in der Lage, Fragen bezüglich des Rücktransportes von (²H₆)GABA (**3**) aus den Zellen einer Zellkultur in das Kulturmedium zu bearbeiten. Dazu waren nur geringe Anpassungen der bisher vorgestellten MS-Transport-Assays notwendig. Nach diesen konnten sie auch für die Untersuchung in Efflux-Experimenten eingesetzt werden. Dazu wurden COS-hGAT1-Zellen zuerst in Gegenwart von 50 μM (²H₆)GABA (**3**) für 6 min inkubiert, analog dem Vorgehen wie dies auch für Sättigungsexperimente beschrieben ist. Anschließend wurden die auf diese Weise mit (²H₆)GABA (**3**) beladenen COS-hGAT1-Zellen mit Efflux-Puffer – einem HEPES-Uptake-Puffer in dem NaCl durch eine äquimolare Menge Cholin-Chlorid ersetzt wurde – gewaschen, um den Na⁺-Gradienten umzukehren und somit den Efflux zu starten. Um eine Wiederaufnahme von (²H₆)GABA (**3**) in die Zelle zu minimieren, wurden die COS-hGAT1-Zellen zudem bis zum Ende der Efflux-Periode alle 2 min am Platewasher mit Efflux-Puffer (37 °C, 300 μL) gewaschen. Am Ende der Effluxexperimente wurden die COS-hGAT1-Zellen mit kaltem CH₃COONH₄ (154 mM, pH 7,4, 5x300 μL) gewaschen, anschließend durch Zugabe von Lyselösung

(MeCN/H₂O 87,5/12,5 (v/v) mit 12,5 nM (²H₆)GABA) lysiert und die nach dem Efflux in den Zellen verbliebene Menge (²H₆)GABA (**3**) per LC-MS/MS quantifiziert. In Abbildung 80 ist die zeitabhängige Reduktion der in den COS-hGAT1-Zellen verbleibenden Menge an (²H₆)GABA (**3**) nach Inkubation in Efflux-Puffer dargestellt.

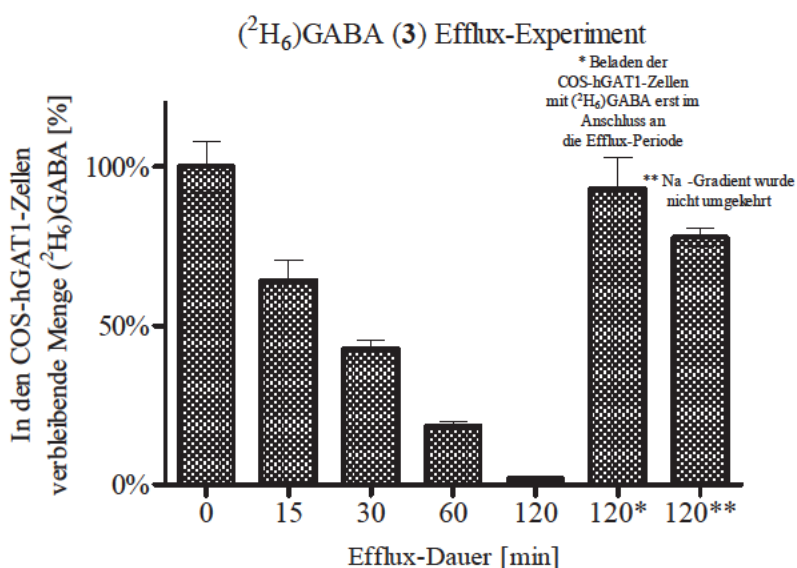


Abbildung 80: Zeitabhängige Reduktion der in COS-hGAT1-Zellen verbliebenen Menge an (²H₆)GABA (**3**) nach Uptake von 50 μM (²H₆)GABA (**3**) für 6 min durch die Umkehr des Na⁺-Gradienten für 0 min bis 120 min (Mittelwerte ± SD, n=3). „120*min“ beschreibt einen Versuch, in dem im Gegensatz zu den Efflux-Experimenten 0-120 min, die COS-hGAT1-Zellen nicht zu Beginn mit (²H₆)GABA (**3**) beladen, wohl aber für 120 min in Efflux-Puffer inkubiert wurden. Erst im Anschluss an die Efflux-Periode wurden die COS-hGAT1-Zellen mit (²H₆)GABA (**3**) in HEPES-Uptake-Puffer beladen. „120** min“ beschreibt einen Versuch, in dem COS-hGAT1-Zellen zu Beginn mit (²H₆)GABA (**3**) beladen wurden, anschließend jedoch für 120 min mit HEPES-Uptake-Puffer anstelle von Efflux-Puffer gewaschen wurden, sodass der Na⁺-Gradient nicht umgekehrt wurde, sondern erhalten blieb.

Wie in Abbildung 80 durch die Balken für 0 min bis 120 min dargestellt, reduziert sich die in den COS-hGAT1-Zellen verbleibende Menge an (²H₆)GABA (**3**) zeitabhängig innerhalb einer Efflux-Periode von 120 min auf ~2%. In einem Kontrollexperiment wurden COS-hGAT1-Zellen wie für ein Efflux-Experiment behandelt, außer, dass diese zu Beginn nicht in Gegenwart von 50 μM (²H₆)GABA (**3**) für 6 min inkubiert und somit nicht mit (²H₆)GABA (**3**) beladen wurden (120* min). Stattdessen wurde, nachdem die Efflux-Periode von 120 min beendet war, der Efflux-Puffer durch HEPES-Uptake-Puffer, welcher 50 μM (²H₆)GABA (**3**) enthielt, ersetzt. Innerhalb der sich anschließenden Uptake-Periode von 6 min erreichten diese COS-hGAT1-Zellen eine vergleichbare intrazelluläre Konzentration an (²H₆)GABA (**3**) wie COS-hGAT1-Zellen, die zu Beginn des Efflux-Experimentes mit (²H₆)GABA (**3**) beladen wurden (vergleiche hierzu Abbildung 80 Balken 120* min mit 0 min). Dieser Versuch zeigt, dass die

COS-hGAT1-Zellen nach 2 h immer noch vital sind und keinen bedeutenden Verlust der Transportaktivität zeigen, wenn sie für 2 h mit Efflux-Puffer gewaschen werden. In einem weiteren Kontrollexperiment wurden COS-hGAT1-Zellen wie für ein Efflux-Experiment mit ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) beladen, im Anschluss allerdings mit HEPES-Uptake-Puffer anstelle von Efflux-Puffer für 2 h gewaschen, sodass der Na^+ -Gradient nicht umgekehrt wurde, sondern erhalten blieb. In diesen Versuchen sind die Mengen an verbleibender ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in COS-hGAT1-Zellen im Vergleich zu den ursprünglich aufgenommenen Mengen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) nur minimal reduziert (vergleiche Abbildung 80 Balken 120** min mit 0 min). Dies zeigt, dass die beobachtete Reduktion der Menge ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in zuvor beladenen COS-hGAT1-Zellen während eines Efflux-Experimentes – also bei Umkehr des Na^+ -Gradienten – kaum aufgrund eines unspezifischen Verlustes, sondern vielmehr aufgrund eines Na^+ -abhängigen Rücktransportes erfolgt sein muss.

Die Untersuchungen des Effluxes von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) aus COS-hGAT1-Zellen demonstrieren die Möglichkeiten, welche die entwickelte MS-Transport-Assays bieten. So können die MS-Transport-Assays dazu eingesetzt werden, um Inhibitoren zu identifizieren, welche auch einen Efflux von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) inhibieren.

3.5. Zusammenfassung

γ -Aminobuttersäure (GABA) ist der wichtigste inhibitorische Neurotransmitter im zentralen Nervensystem (ZNS). Für die Entwicklung potenter Inhibitoren der GABA-Transporter – welche als Target für die Behandlung von Epilepsie, Alzheimer, Schizophrenie oder Parkinson genutzt werden können – sind Werkzeuge zur Untersuchung des GAT-vermittelten GABA-Transportes von großer Bedeutung. In dieser Dissertation wurde eine auf LC-MS/MS basierende Alternative zu den bisher weit verbreiteten radiometrischen GABA-Uptake-Assays, welche den Einsatz radioaktiv-markierter Substrate erfordern, entwickelt. Die entwickelten MS-Transport-Assays zur Charakterisierung des GABA-Transportes nutzen ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) als Substrat, welches mit hoher Sensitivität und Selektivität mit Hilfe einer robusten HILIC-ESI-MS/MS-Methode unter Verwendung von ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) als internem Standard quantifiziert werden kann. Während der Entwicklung der LC-MS/MS-Methode wurden verschiedene stationäre HILIC-Phasen und unterschiedliche mobile Phasen untersucht, wobei sich die YMC-Pack PVA-Sil-Säule in Kombination mit einer mobilen Phase bestehend aus Acetonitril / NH_4HCO_3 , 10 mM, pH 7,8, 70/30 (v/v) als für die Quantifizierung von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) aus Zellmatrixproben am geeignetsten erwies. Die Detektion der Analyten erfolgte mit einem Triple-Quadrupol-MS (API™ 5000), welches die für diese Zwecke notwendige Sensitivität und Selektivität durch Verwendung des „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM)-Modes erreichte. Um die Sensitivität der Detektion von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu optimieren, wurden des Weiteren verschiedene Ionenquellen (APCI, DA-APPI und ESI) untersucht, von denen die ESI-Ionenquelle für die LC-MS/MS-Methode gewählt wurde, da sich mit der ESI-Quelle die Analyten am besten ionisieren ließen. Die entwickelte HILIC-ESI-MS/MS-Methode wurde validiert und erfüllte alle in der CDER-Guideline für „Bioanalytische Methoden“ empfohlenen Parameter. Bei einer Laufzeit von nur 3 min je Probe konnte eine Quantifizierung von bis zu 200 pM ($^2\text{H}_6$)GABA (LLOQ) in Zellmatrix-Proben erreicht werden. Die entwickelte Quantifizierungsmethode für ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) wurde dazu genutzt, um MS-Transport-Assays für die vier verschiedenen GABA-Transporter-Subtypen zu entwickeln. Diese sind durch die folgenden Eigenschaften charakterisiert. Sie nutzen COS-7-Zellen zur Expression der Targetproteine. Da die Zellen über eine ausgeprägte Oberflächenadhärenz verfügen, können die MS-Transport-Assays in einer einzigen 96-Well-Zellkulturplatte – von der Inkubation bis zur LC-MS/MS-Quantifizierung – durchgeführt werden. Dadurch sind neben dem Waschen der Zellen zur Terminierung des Transportes keine weiteren Probenvorbereitungsschritte für die LC-MS/MS-Analytik notwendig. Für die MS-Transport-Assays mit allen vier Subtypen der GABA-Transporter, wurden die verschiedenen Assay-Bedingungen stellvertretend anhand der COS-hGAT1-Zelllinie optimiert. Dabei wurden der Einfluss der eingesetzten Zellzahl, die Temperatur bei der der Transport-Assay durchgeführt wurde, die Abhängigkeit des Transportes von Na^+ -Ionen, der pH-Wert des Uptake-Puffers, sowie verschieden lange Vorinkubations- und Transportdauern untersucht. Die optimierten MS-Transport-Assays wurden mit 60.000 COS-Zellen je Well in einer 96-Well-Zellkulturplatte bei 37 °C

für 6 min durchgeführt, nachdem die Zellen zuvor für 25 min bei 37 °C – gegebenenfalls in Gegenwart eines Inhibitors – vorinkubiert worden waren. Es wurden vier COS-Zelllinien generiert, welche jeweils einen der vier GAT-Subtypen stabil exprimieren und deren Eigenschaften hinsichtlich des Substrattransportes anhand von Sättigungsexperimenten charakterisiert. Die im Weiteren entwickelten MS-Transport-Assays wurden dazu genutzt, in Konkurrenzexperimenten die inhibitorischen Potenzen von 21 Modellverbindungen an allen vier GAT-Subtypen zu charakterisieren. Die anhand der MS-Transport-Assays bestimmten inhibitorischen Potenzen waren in guter Übereinstimmung mit Ergebnissen, die anhand eines radiometrischen Uptake-Assays ermittelt wurden. Die entwickelte LC-MS/MS-Methode ist in der Lage, neben der in den MS-Transport-Assays als Substrat eingesetzten (²H₆)GABA, die in Säugerzellen endogen vorhandene Menge GABA zu quantifizieren. Überdies erlaubt die Quantifizierung mittels LC-MS/MS die zeitgleiche Detektion weiterer Verbindungen, sodass zu untersuchende Inhibitoren direkt erfasst werden können. So können Inhibitoren, die ebenfalls Substrate der GABA-Transporter sind, wie das beispielsweise bei Nipicotinsäure oder Guvacin der Fall ist, als solche verifiziert werden. Des Weiteren wurden exemplarisch für hGAT1 auch Efflux-Experimente durchgeführt. Diese zeigten, dass die MS-Transport-Assays auch dazu geeignet sind, Fragen bezüglich eines Rücktransportes von GABA zu untersuchen. Außerdem konnten die MS-Transport-Assays in Kombination mit den MS-Bindungs-Assays dazu genutzt werden, um eine molekulare Transportrate für hGAT1 zu ermitteln. Somit bieten die entwickelten MS-Transport-Assays alle Möglichkeiten, wie bisherige [³H]GABA-Uptake-Assays – wie zum Beispiel die Charakterisierung der Transportkinetik, der Bestimmung inhibitorischer Potenzen von Verbindungen und des Rücktransportes von Substrat – erzielen dabei Ergebnisse, die mit denen aus [³H]GABA-Uptake-Assays korrelieren, wobei sie aber die Nachteile, welche mit der Verwendung radioaktiv-markierter Substanzen verbunden sind, vermeiden. Aufgrund der Qualität der kompetitiven MS-Transport-Assays – charakterisiert durch einen Z-Faktor von 0,7 – ihres hohen Probendurchsatzes, den geringen Kosten für Verbrauchsmaterial, sowie deren Möglichkeit der weiteren Prozessautomation, sind die MS-Transport-Assays ideal für den Einsatz in Wirkstoff-Screening-Kampagnen geeignet. Die entwickelten MS-Transport-Assays stellen die ersten derartigen MS-basierten Verfahren mit einer Effizienz dar, wie sie bisher nur von radiometrischen Transport-Assays erzielt wurden. Die hier am Beispiel der GABA-Transporter entwickelten MS-Transport-Assays könnten eine vielversprechende Option zur Untersuchung anderer membranständiger Transporter sein, sofern sich bei dem jeweiligen Fall eine ausreichend sensitive LC-MS/MS-Methode zur Quantifizierung der entsprechenden Substrate entwickeln lässt.

Die im Rahmen dieser Dissertation entwickelten MS-Transport-Assays haben aufgrund der beschriebenen Eigenschaften das Potential, einen wichtigen Beitrag in der Grundlagenforschung von Transportproteinen sowie in Wirkstoff-Screening-Prozessen zu leisten.

4. Experimenteller Teil

4.1. HPLC-MS/MS4.1.1. Geräte und Material

HPLC		
Am API 5000™		
Agilent 1200 – HPLC-Pumpe	G1312B – Bin Pump SL	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Agilent 1200 – Degasser	G1379B – Degasser	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Agilent 1200 - Säulenofen	G1316B – TCC SL	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Am API 3200™		
Agilent 1200 – HPLC-Pumpe	G1312A – Bin Pump	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Agilent 1200 – Degasser	G1322A – Degasser	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Agilent 1200 - Säulenofen	G1316A – TCC	Agilent, Waldbronn, Deutschland
Dopant-HPLC für APPI		
Merck Hitachi	655A-12 Liquid Chromatograph	
Spritzenpumpe	Model 11 Plus single syringe pump MA1 70-2208	Harvard Apparatus, Massachusetts, USA
Massenspektrometer		
API 5000™	Triple Quadrupole MS	ABSciex, Darmstadt, Deutschland
10-Port Schaltventil		Vici Valco Instruments Co. Inc., Waterbury, USA
API 3200™	Triple Quadrupole MS	ABSciex, Darmstadt, Deutschland
Ionenquellen		
TurboV-ESI	Quellenposition Horizontal: 5 mm Vertikal: 5 mm Überstand der ESI-Kapillare ~1,5 mm	ABSciex, Darmstadt, Deutschland
TurboV-APCI	Quellenposition Horizontal: 5 mm Vertikal: 5 mm	ABSciex, Darmstadt, Deutschland
Photospray	Quellenposition Horizontal: 5 mm Vertikal: 5 mm Position der UV-Lampe: 5 mm	ABSciex, Darmstadt, Deutschland

Autosampler		
PAL System HTS-PAL	(am API 5000™) mit 50 µL Spritze	CTC-Analytics, Zwingen, Schweiz
SIL-HAT(A)	(am API 3200™)	Shimadzu, Duisburg, Deutschland
HPLC-Säulen und Fritten		
ZIC-HILIC	20x2,1 mm i.d., 3,5 µm, 100 Å	Merck, SeQuandt, Darmstadt, Deutschland
ZIC-pHILIC	20x2,1 mm i.d., 5 µm (guard column)	Merck, SeQuandt, Darmstadt, Deutschland
ZIC-cHILIC	50x2,1 mm i.d., 3 µm, 100 Å	Merck, SeQuandt, Darmstadt, Deutschland
YMC-Pack Diol	50x3mm i.d. 5 µm, 6 nm	YMC-Europe, Dinslaken, Deutschland
YMC-Pack Polyamin II	50x3mm i.d. 5 µm, 12 nm	YMC-Europe, Dinslaken, Deutschland
YMC-Pack PVA-Sil	50x3mm i.d. 5 µm, 12 nm	YMC-Europe, Dinslaken, Deutschland
YMC-Pack PVA-Sil	50x2,1mm i.d. 5 µm, 12 nm	YMC-Europe, Dinslaken, Deutschland
0,5 µm Fritte	Stainless Steel Frit, A-102x	IDEX, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
0,2 µm Fritte	Titan, A-501	IDEX, Wertheim-Mondfeld, Deutschland
0,2 µm Fritte	Part No. 5067-1555	Agilent Technologies, Waldbronn, Deutschland
HPLC-Laufmittel und Puffer		
MeCN	LC-MS-grade	Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
MeOH	LC-MS-grade	Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O	LC-MS-grade	Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
NH ₄ HCO ₃	LC-MS-grade	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4 EXPERIMENTELLER TEIL

CH ₃ COONH ₄	HPLC-grade	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HCOONH ₄	LC-MS-grade	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
HCOOH	LC-MS-grade	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NH ₄ OH	LC-MS-grade	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aceton	HPLC-grade	Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
Toluol	HPLC-grade	Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
Analyten		
GABA (1)	(>98%)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(² H ₂)GABA (2)	(>98%)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(² H ₆)GABA (3)	(>97%)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4.1.2. Vorgehen während der LC-MS/MS Methodenentwicklung

Für die LC-MS/MS-Methodenentwicklung wurden sowohl das API 5000™ in Kombination mit einem Agilent 1200 HPLC System als auch das API 3200™ mit einem Agilent 1200 HPLC System verwendet. Für Arbeiten am API 5000™ wurden ausschließlich Lösemittel in LC-MS-Qualität, für Arbeiten am API 3200™ Lösemittel in HPLC-Qualität, sowie frisch destilliertes und filtriertes Wasser verwendet. Zur Herstellung der wässrigen Laufmittelpuffer wurde das entsprechende Puffersalz in Wasser gelöst und der pH-Wert mit NH₄OH oder Ameisensäure entsprechend eingestellt. Der pH-Wert des 10 mM NH₄HCO₃-Puffers wurde mit einer Glaselektrode überprüft und betrug nach dem Lösen von 78 mg / 100 mL Wasser bereits den erwünschten pH-Wert von pH 7,8 und musste nicht weiter eingestellt werden.

Das organische Laufmittel (Acetonitril bzw. Methanol) wurde an Kanal B, die entsprechenden wässrigen Phasen an Kanal A der binären HPLC-Pumpe (Agilent 1200) angeschlossen und jeder Kanal separat mit mindestens 15 mL (25 mL für Agilent 1200 am API 3200™) gepurged. Anschließend wurde die Flussrate innerhalb von 7 min auf 600 µL/min gesteigert und die Säule anschließend für mindestens 30 min bei der entsprechenden Flussrate equilibriert. Dabei wurde der Fließmittelstrom auf die Quelle

des Massenspektrometers geleitet und die Quelle entsprechend der Methodenparameter betrieben, um diese ebenfalls zu equilibrieren.

Zur Durchführung von Infusionsexperimenten wurde mit Hilfe einer externen Spritzenpumpe die zu infundierende Lösung durch ein T-Kopplungsstück unmittelbar vor der Ionenquelle in den Eluentenstrom der HPLC geleitet.

4.1.3. Anwendung der validierten HPLC-MS/MS-Methode mit der YMC-Pack PVA-Sil

Das API 5000™ wurde mit einem HTS-PAL (CTC-Analytics) Autosampler bestückt, der mit einer 50 µL Hamilton Spritze und einer 100 µL Probenschleife ausgestattet war. Die Proben wurden direkt aus der 96-Well-Zellkulturplatte injiziert. Dazu wurde die Injektionsspritze in der Mitte des entsprechenden Wells soweit abgesenkt, dass sie in die Mitte der Lösung ragte, etwa 3 mm oberhalb des Plattenbodens (siehe Tabelle 16).

Tabelle 16: Einstellungen des HTS-PAL-Autosamplers für die Aufnahme der 96-Well-Zellkulturplatten

Tray MT96	
Needle Penetration	10,5 mm
Offset X	-64,4 mm
Offset Y	-46,0 mm
Offset Z	63,3 mm
Injector	
Needle Penetration	46,5 mm

10 µL Probe wurden mit einer Geschwindigkeit von 3 µL/s aufgezogen und mit 5 µL/s in die Probenschleife geladen. Die Spritze des Autosamplers wurde nach jeder Injektion zweimal mit Methanol und einmal mit MeCN/H₂O 50/50 (v/v) gewaschen. Die Probenschleife wurde anschließend ebenfalls jeweils einmal mit beiden Waschflüssigkeiten gespült. Hinter den Autosampler war ein Agilent Säulenofen mit Säulenauswahlventil, sowie ein Valco 2-Positionen-Schaltventil verbaut, welches den Eluentenstrom entweder in den Abfall, oder auf die Ionenquelle des Massenspektrometers dirigierte.

Die Messung einer Probe erfolgte wie im Folgenden beschrieben. Die Proben, welche mit den MS-Transport-Assays generiert wurden, hatten nach der Lyse eine Lösemittelzusammensetzung von 30% CH₃COONH₄, 103 mM und 70% MeCN. Von diesen Proben wurden 10 µL auf die YMC-Pack PVA-Sil (50

4 EXPERIMENTELLER TEIL

x 2,1 mm i.d., 5 μ M) injiziert und diese isokratisch mit MeCN/NH₄HCO₃, 10 mM, pH 7,8, 70/30 (v/v) bei einer Flussrate von 600 μ L/min und einer Säulentemperatur von 25 °C eluiert. Vor der verwendeten Säule YMC-Pack PVA-Sil waren eine 0,5 μ m und eine 0,2 μ m Fritte installiert, um ein Verstopfen der Säule durch größere Partikel zu verhindern.

Der Eluentenstrom wurde von 0 bis 0,6 min und von 1,5 bis 3 min in den Abfall und von 0,6 bis 1,5 min auf die TurboV-Quelle des Massenspektrometers geleitet. Das Massenspektrometer zeichnete zwischen 0,6 und 1,5 min die in Tabelle 17 angegebenen Massenübergänge mit „unit-resolution“ auf. Die in der validierten Methode zur Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) verwendeten Quellenparameter sind in Tabelle 6 auf Seite 73 zusammengefasst.

Tabelle 17: Compound-dependent Parameter der GABA-Isotopologe

	Q1	Q3	DP (V)	CE (V)	EP (V)	CXP (V)	Dwelltime (ms)
GABA	104	87	40	15	10	12	80
	104	69	40	21	10	12	50
(² H ₆)GABA	110	93	40	30	10	12	50
	110	73	40	21	10	12	100
(² H ₂)GABA	106	89	40	15	10	12	100
	106	71	40	21	10	12	50

Die entstandenen MRM-Chromatogramme wurden mit der Analyst Software im „quantitation-mode“ integriert, wobei nur die Massenübergänge m/z 104/87, m/z 106/89 und m/z 110/73 für GABA (**1**), (²H₂)GABA (**2**) und (²H₆)GABA (**3**) zur Quantifizierung verwendet wurden. Die anderen Massenübergänge dienten als Qualifier, welche die Selektivität sicherstellen sollten.

Nach einer Messung wurde die YMC-Pack PVA-Sil-Säule mit MeCN/H₂O 70/30 (v/v) für 30 min bei 600 μ L/min gespült und in diesem Medium bis zur nächsten Verwendung gelagert

4.2. Molekularbiologie und Zellkultur

Alle molekularbiologischen Arbeiten mit E. coli wurden unter halbsterilen Bedingungen neben der offenen Flamme eines Bunsenbrenners durchgeführt. Für Arbeiten mit Säugerzellen (HEK, COS, CHO) wurden eine Sicherheitswerkbank, sowie ausschließlich sterile Lösemittel verwendet.

4.2.1. Geräte und Material

Zentrifuge	Sorvall Evolution RC, Rotor: SS34	Thermo Electron, Hanau, Deutschland
	Biofuge Stratos, Rotor: #3047, #3331	Heraeus, Hanau, Deutschland
Sicherheitswerkbank	Herasafe Klasse 2, Typ H	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Autoklav	VacuLab PL	MMM Medcenter München, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	HFU86	Heraeus, Hanau, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	HeraFreeze TOP	Thermo Fischer
Gefrierschrank -20°C	Liebherr Premium	Liebherr, Biberach, Deutschland
Cryoanlagen (LN ₂)	Cryosystem RS Series	Taylor Wharton, Theodore, USA
	Cryosystem ARPEGE Gas 140	Air Liquide, München, Deutschland
Elektrophorese	Horizontal Elektrophoresesystem EasyCast B1A mit Consort E385	Owl Separation Systems, Portsmouth, UK)
Geldokumentationsgerät	Gel Doc 2000	Bio-rad, München, Deutschland
Mikroskop	Olympus CK30	Olympus, Hamburg, Deutschland
UV/VIS Spektrometer	Ultraspec plus	Pharmacia LKB, Freiburg, Deutschland
Brutschrank für HEK-293 und COS-7:	Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Brutschrank E. coli:	Ecocell	MMM Medcenter, München, Deutschland
Schüttelinkubator	Certomat® IS	B. Braun Biotech International, Tuttlingen, Deutschland
Mikrowelle	Moulinex SymbioGrill	Krups GmbH, Offenbach/main, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter	0,45 µm, regenerierte Cellulose	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Zelllinien		
HEK 293 T	Human Embryonic Kidney cells, transformiert mit Adenovirus Typ 5 (Ad5)	Prof. Biel, LMU München, Deutschland
COS-7	African Green Monkey Kidney cells (ACC 60)	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
COS-hGAT1	COS-7 Zellen, transformiert mit pTracer™-hGAT1, zur stabilen Expression von hGAT1	
COS-hBGT1	COS-7 Zellen, transformiert mit pCMVentry-hBGT1 von Origene (SC318954)-SLC6A12, transcript variant 2, zur stabilen Expression von hBGT1	
COS-hGAT2	COS-7 Zellen, transformiert mit pcDNA3.1-hGAT2, zur stabilen Expression von hGAT2	Biologische Prüfung des AK Wanner
COS-hGAT3	COS-7 Zellen, transformiert mit pcDNA3.1-hGAT3, zur stabilen Expression von hGAT3	Biologische Prüfung des AK Wanner
E. coli	XL1-blue MRF'	Stratagene, La Jolla, USA
Plasmide		
pcDNA3.1(+)-hGAT1		A. Kragler, LMU München, Deutschland
pTracer™-CMV/Bsd		life technologies, Darmstadt, Deutschland
pMD-MSR1	Human SR-A/MSR1 full length cDNA gene clone / ORF gene clone	Hölzel Diagnostika, Köln, Deutschland

4 EXPERIMENTELLER TEIL

pTracer™-hGAT1		
pCMVentry-hBGT1	pCMVentry-hBGT1 (SC318954)-SLC6A12, transcript variant 2	Origene, Beijing, China
Restriktionsenzyme	ScaI, EcoRI, EcoRI-HF, XbaI, XhoI, BamHI, KsaI, PciI, PvuII	New England BioLabs (NEB), Ipswich, USA
T4 DNA Ligase		New England BioLabs (NEB), Ipswich, USA
Antarctic Phosphatase		New England BioLabs (NEB), Ipswich, USA
1 kb Quick load™ DNA Ladder		New England BioLabs (NEB), Ipswich, USA
Kits		
Kulturmedien für e. coli		
Ampicillin-Natrium	50 mg/mL	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LB (+)-Medium		
Peptone	1% (w/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hefeextrakt	0,5% (w/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
NaCl	0,5% (w/v)	p. A., Roth, Karlsruhe, Deutschland
D-(+)-Glucose	0,1% (w/v)	Microbiology, Merck, Darmstadt, Deutschland
Agar	1,5% (w/v)	(Zugabe nur zur Herstellung von Agarplatten)
Nach dem Autoklavieren Zugabe von Antibiotikum		
Ampicillin-Natrium	0,01% (w/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Elektrophoresepuffer		
TBE-Elektrophoresepuffer		
TRIS	89 mM	Ultra, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	89 mM	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA	2 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

TAE-Elektrophoresepuffer		
TRIS	89 mM	Ultra, Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	89 mM	
EDTA	2 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Elektrophorese Probenladelösung		
Bromphenolblau	0,25%	
Glycerin	30%	
Agarose	Low EEO	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid		Merck, Darmstadt, Deutschland
Transfektionsreagenz		
FuGENE® 6		Promega, Mannheim, Deutschland
FuGENE® HD		Promega, Mannheim, Deutschland
X-tremeGENE HP		Roche, Indianapolis, USA
Selektionsantibiotika		
G418	G418-Sulfat	PAA, Pasching, Österreich
Blasticidin		PAA, Pasching, Österreich
Penicillin-Streptomycin	100 x Penicillin-Streptomycin Lösung	PAA, Pasching, Österreich
Zellkulturmedium		
Normalmedium (COS-7-Zellen)		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose und L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS (Fötales Kälberserum Gold)	10%	PAA, Pasching, Österreich / Lonza, Basel, Schweiz
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL (100 µg/mL)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Selektionsmedium (COS-hGAT1-Zellen)		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose und L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

4 EXPERIMENTELLER TEIL

FCS (Fötales Kälberserum Gold)	10%	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL (100 µg/mL)	Biowest, Nuaille, Frankreich
Blasticidin	3 µg/mL	PAA, Pasching, Österreich
Selektionsmedium (COS-hGAT3, COS-hGAT2, COS-hBGT1 und HEK-mGAT1)		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose und L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS (Fötales Kälberserum Gold)	10%	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	100 U/mL (100 µg/mL)	Biowest, Nuaille, Frankreich
G418	500 µg/mL	PAA, Pasching, Österreich
Einfriermedium		
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium mit 4,5 g/L Glucose und L-Glutamin	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
FCS (Fötales Kälberserum Gold)	10%	PAA, Pasching, Österreich / Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DMSO	10%	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PBS-Puffer		
NaCl	137 mM	p. A., Roth, Karlsruhe, Deutschland
KCl	2,7 mM	p. A., Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	8 mM	Applichem, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	1,75 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
pH	7,4 (mit HCl)	
Trypsin-EDTA-Lösung	10x (0,5% / 0,2% in PBS)	PAA, Pasching, Österreich / Biowest, Nuaille, Frankreich
TRIS-NaCl-Puffer		
TRIS	50 mM	Ultra, Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	1 M	p. A., Roth, Karlsruhe, Deutschland

pH	7,1 (mit Zitronensäure)	
Kulturgefäße		
Kulturschalen	152 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Kulturplatten	6-Well Nunclon™ Δ Surface	Nalge® Nunc™ International, Roskilde, Dänemark
	24-Well Nunclon™ Δ Surface	Nalge® Nunc™ International, Roskilde, Dänemark
	96-Well Cell+	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

4.2.2. Analytische DNA-Gelelektrophorese

Um ein analytisches Elektrophorese-Gel zu gießen, wurde die entsprechende Menge Agarose (0,5% - 1,5%) in einen Erlenmeyerkolben eingewogen und mit 40 mL TBE-Laufpuffer in der Mikrowelle bei 800 W für ca. 2 min bis zum Sieden erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung auf ca. 45 °C wurden 4 µL Ethidiumbromid zugegeben und in den Gelträger gegossen. Der analytische Probenkamm mit 10 Taschen wurde eingesetzt und das Gel für mind. 2 h ausgehärtet. Anschließend wurde der Kamm entfernt, das Gel in der Elektrophoresekammer positioniert und die Laufmittelreservoirs mit TBE-Laufpuffer befüllt, sodass das Gel ca. 1 mm mit Puffer bedeckt war. Nach dem Versetzen der Proben mit Probenladepuffer (8:2) wurden maximal 10 µL dieser Proben in eine Probentasche übertragen. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 120 V bis 150 V bei einer maximalen Stromstärke von 80 mA bis 120 mA für ca. 60 min bis 80 min angelegt.

4.2.3. Präparative DNA-Gelelektrophorese

Für eine präparative Gelelektrophorese wurde ein 1%iges Agarosegel durch Lösen von 400 mg Agarose in 40 mL TAE-Laufpuffer unter Erwärmen in der Mikrowelle (800 W, 2 min) hergestellt. Nach Abkühlen der Lösung auf ca. 45 °C wurden 4 µL Ethidiumbromid zugegeben und das Gel mit einem präparativen Probenkamm mit 6 Taschen gegossen. Nach Versetzen der Proben mit 4 µL Probenladepuffer (8:2) wurden 20 µL Probe je Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte mit TAE-Puffer, welches das Gel ca. 1 mm bedeckte, bei 120 V bis 150 V und einer maximalen Stromstärke von 80 mA für 60 min bis 150 min.

4.2.4. Gelextraktion mittels Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System von Promega

Die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde mit dem „Wizard® SV Gel and PCR Clean Up“ System von Promega nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dazu wurde die entsprechende DNA Bande mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, in ein 1,5 mL e-cap gegeben und mit 1 µL/mg Membrane Binding Solution bei 60 °C gelöst. Die Lösung wurde auf die Minicolumn überführt und bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säule mit 700 µL Membrane Wash Solution und 500 µL Membrane Wash Solution (Zentrifugation bei 16.000 g) wurde die Säule mit 50 µL DNase-freiem Wasser für 2 min bei RT inkubiert und anschließend in ein 1,5 mL e-cap eluiert.

4.2.5. Restriktionsverdau und Linearisierung von Plasmiden

Für einen Restriktionsverdau wurden 10 – 20 units Restriktionsenzym, 3 µL entsprechender 10x Enzympuffer nach Angaben des Herstellers und ca. 500 ng bis 10 µg DNA auf 30 µL mit sterilem Wasser in ein 0,5 mL Eppendorf Reagiergefäß ergänzt. Der Restriktionsverdau wurde 2,5 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme durch Erwärmen des Ansatzes auf 54 °C für 10 min inaktiviert.

Für Linearisierungen wurde anschließend 10 units CIP-Enzym (Calf-Intestinal-Phosphatase) zugegeben und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Vor der gelelektrophoretischen Aufarbeitung wurde der Ansatz erneut für 10 min bei 54 °C inkubiert.

4.2.6. Ligation von DNA

Bei Ligationsansätzen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente im Verhältnis 1:1 bis 1:4 (Vektor / Insert), 2 µL 10x Ligationspuffer und 400 units T4-DNA-Ligase mit sterilem Wasser auf 20 µL ergänzt und für mindestens 2 h bei RT inkubiert.

4.2.7. Transformation TSS kompetenter E. coli

TSS kompetente E. coli Zellen wurden von -80 °C langsam im Eisbad aufgetaut, 400 µL auf einen Ligationsansatz gegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 2 min auf 42 °C erwärmt und weitere 5 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden 2,6 mL LB(+)Medium ohne Antibiotika zugegeben und für 90 min bei 37 °C und 145 rpm im Schüttelinkubator bebrütet. 150 µL der Zellsuspension wurden auf eine Ampicillin-Agar-Platte ausplattiert. Die übrige Zellsuspension wurde bei 5000 g abzentrifugiert, der Überstand verworfen, das erhaltene Zellpellet in 200 µL

LB(+)Medium resuspendiert und ebenfalls auf Ampicillin-Agar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden für mindestens 12 h bei 37 °C bebrütet.

4.2.8. Glycerol Stocks transformierter Bakterienkolonien

Zur Lagerung transformierter E. coli Zellen wurden 500 µL Zellsuspension mit 500 µL autoklaviertem Glycerol gemischt und bei -80 °C gelagert.

4.2.9. DNA Extraktion mit PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega

Für die Extraktion von plasmidischer DNA aus E. coli wurde das PureYield™ Plasmid Miniprep System von Promega nach den Angaben des Herstellers verwendet. Kurz zusammengefasst wurde wie folgt vorgegangen. Für eine Miniprep wurde eine Bakterienkolonie in 7 mL LB(+)Medium mit 0,1 mg/mL Ampicillin geimpft und über Nacht bei 37 °C und 145 rpm kultiviert. Anschließend wurden 2 x 1,5 mL Bakteriensuspension nacheinander in ein 1,5 mL Eppendorf cap bei 5000 g für 10 min pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 600 µL H₂O resuspendiert. Nach Zugabe von 100 µL „Cell Lysis Buffer“ wurde das e-cap 6 mal invertiert und anschließend 350 µL Neutralisations-Lösung zugegeben. Der entstandene Niederschlag wurde pelletiert (11.000 g, 3 min) und der Überstand auf eine „PureYield™ Minicolumn“ überführt. Nach kurzem Zentrifugieren der Säule (11.000 g, 15 s) wurde diese nacheinander mit 200 µL „Endotoxin Removal Wash“ (ERM) und 400 µL „Column Wash Solution“ (CWC) gewaschen. Zum Eluieren der DNA wurden 30 µL DNase-freies Wasser zugegeben und die Säule für 2 min bei RT inkubiert, bevor sie in ein 1,5 mL e-cap zentrifugiert wurde.

4.2.10. DNA Extraktion mit PureYield™ Plasmid Midiprep System von Promega

Zur präparativen Extraktion von plasmidischer DNA aus E. coli Zellkulturen wurde das „PureYield™ Plasmid Midiprep System“ von Promega nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Kurz zusammengefasst wurde wie folgt vorgegangen.

Für eine Midiprep wurde ein Bakterienstock in 7 mL LB(+)Medium mit 0,1 mg/mL Ampicillin geimpft und für 6 h bei 37 °C und 145 rpm kultiviert. Anschließend wurden 2 x 100 mL LB(+)Medium mit 0,1 mg/mL Ampicillin geimpft und über Nacht bei 37 °C und 145 rpm kultiviert. Die Kultur wurde so lange bebrütet, bis sie eine Zelldichte von OD₆₀₀ > 1.6 hatte. Die Übernachtskultur wurde dann in vier 50 mL PP Röhrchen (Greiner) überführt und die Zellen bei 5000 g pelletiert. Das Zellpellet wurde in jeweils 3 mL „Resuspension Buffer“ aufgenommen und durch Zugabe von 3 mL „Cell Lysis Buffer“ unter

sanftem Schwenken für 1 min lysiert. Nach Zugabe von 5 mL „Neutralisation Solution“ wurde bei 15.000 g für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine blaue „Clearing Column“ überführt und unter Vakuum in eine „Binding Column“ überführt. Die „Binding Column“ wurde anschließend mit 5 mL „Endotoxin Removal Wash“ und 20 mL „Column Wash Solution“ gewaschen. Zur Elution wurde 800 µL DNase-freies Wasser zugegeben, die Säule bei RT für 2 min inkubiert und anschließend in ein 1,5 mL e-cap eluiert.

4.2.11. Reinheit und Gehaltsbestimmung der Plasmid-DNA Präparation

Die Reinheit der gewonnenen Plasmid DNA wurde spektroskopisch durch das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm bestimmt. Dieser Wert sollte möglichst groß sein ($>1,7$), zumindest jedoch innerhalb von 1,4 und 1,8 liegen. Der Gehalt an DNA bestimmt sich nach der Absorption bei 260 nm. Hierbei entspricht eine Absorption von 1 einem DNA-Gehalt von etwa 50 µg/mL.¹⁹⁸

4.2.12. Zellkulturtechniken

Das Arbeiten mit eukaryotischen Zellkulturen erfolgte unter der sterilen Sicherheitswerkbank im Labor der Sicherheitsstufe S1. Alle Materialien, sowie der entstandene Abfall, wurden vor der Reinigung bzw. vor der Entsorgung im Autoklaven inaktiviert.

4.2.12.1. Auftauen von COS-Zellen und HEK-Zellen

Um eine Zelllinie in Kultur zu bringen wurde der im Gasraum einer Cryoanlage gelagerte Zell-Stock aufgetaut und in 25 mL Kulturmedium in eine 152 cm² Kulturschale gegeben. Die Zellkultur wurde im Brutschrank bei 37 °C und 8% CO₂ bebrütet, bis eine Konfluenz $>75\%$ erreicht wurde, wobei das Kulturmedium alle 2 bis 3 Tage erneuert wurde. Dazu wurde das Medium zuerst mit Hilfe einer Membranpumpe und einer Pasteurpipette am Schalenrand abgesaugt und frisches Medium langsam am Rand hinablaufen gelassen. Hatte die Kultur eine Konfluenz $>75\%$ wurde sie entweder passagiert (siehe 4.2.12.2 „Passagieren von HEK-Zellen“, bzw. 4.2.12.3 „Passagieren von COS-Zellen“) oder für den Assay in 96-Well-Zellkulturplatten umgesetzt (siehe 4.2.12.4 „Aussäen von COS-Zellen für den Assay“).

4.2.12.2. Passagieren von HEK-Zellen

War nicht mehr ausreichend Wachstumsfläche vorhanden, wurden die Zellen in eine neue Kulturschale passagiert. Dazu wurde das Medium mit Hilfe einer Membranpumpe und einer Pasteurpipette aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 10 mL PBS gewaschen. Nachdem das PBS ebenfalls

abgesaugt wurde, wurden die HEK-Zellen mit 12 mL Kulturmedium vom Boden der Kulturplatte abgespült und durch mehrmaliges auf- und abpipettieren vereinzelt, um eine homogene Zellsuspension zu erhalten. Von dieser Zellsuspension wurden, je nach Bedarf, 0,5 mL bis 4 mL in eine neue Kulturschale mit 20 mL Kulturmedium gegeben. Diese wurde nach kurzen Schwenken im Brutschrank weiter inkubiert.

4.2.12.3. Passagieren von COS-Zellen

Mussten COS-Zellen passagiert werden, wurde das Medium mit Hilfe einer Membranpumpe und einer Pasteurpipette aus der Kulturschale abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit 10 mL PBS gewaschen. Nach Absaugen des PBS, wurden die COS-Zellen nach Zugabe von 3 mL Trypsin/EDTA-Lösung für 4 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 12 mL Kulturmedium vom Boden abgespült, durch mehrmaliges Pipettieren vereinzelt und je nach Bedarf 0,5 mL bis 4 mL in eine neue Kulturschale mit 20 mL Kulturmedium gegeben. Diese wurde nach kurzen Schwenken im Brutschrank weiter inkubiert.

4.2.12.4. Aussäen von COS-Zellen für den Assay

Wurde ein Transport-Assay mit COS-Zellen durchgeführt, so wurden am Vortag die entsprechenden Zellen wie folgt in die Kavitäten einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Es wurden die COS-Zellen, wie unter 4.2.12.3 „Passagieren von COS-Zellen“ beschrieben, von der Kulturplatte abgelöst und in Suspension gebracht. Anschließend wurden 20 µL dieser Suspension in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt und das entsprechende Volumen für 60.000 Zellen je Kavität mit einer 1200 µL 12-Kanal-Pipette ausgesät, nachdem in die Kavitäten bereits Kulturmedium vorgelegt worden war, sodass sich nach der Zugabe der Zellen ein Volumen von 250 µL/Well ergab. Anschließend wurde die 96-Well-Zellkulturplatte im Brutschrank für mindestens 17 h inkubiert.

4.3. Assay mit HEK-Zellen4.3.1. Geräte und Material

96-Well Filtrationseinheit	Multi-Well Plate Vacuum Manifold	Pall, New York, USA
96-Well Glasfaserfilterplatten	AcroPrep™-Advance 96 350 µL 1 µm A/B Glass	Pall, New York, USA
96-Well Supor-Filterplatten	AcroPrep™-Advance 96 350 µL 1,2 µm Supor	Pall, New York, USA
96-Well Deepwell-Platten	PP, 1,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Puffer		
TRIS-Uptake-Puffer		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM	Applichem, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ KPO ₄	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KCl	4,7 mM	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Glucose x H ₂ O	11 mM	Microbiology, Merck, Darmstadt, Deutschland
TRIS	25 mM	Ultra, Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	119 mM	p. A., Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH	7,1 (mit HCl)	

4.3.2. Versuchsdurchführung

Zur Durchführung eines Uptake-Assays mit HEK-mGAT1-Zellen, wurden HEK-mGAT1-Zellen von ihrer Kulturschale gelöst und in einen Krebs-Puffer zu 4 mio Zellen/mL suspendiert und für 25 min bei 37 °C konditioniert. Anschließend wurden 50 µL der Zellsuspension zu verschiedenen Konzentrationen von (²H₆)GABA (**3**) in Krebs-Puffer gegeben und im Schüttelwasserbad bei 37 °C inkubiert, bevor 200 µL/Well auf eine 96-Well-Glasfaserfilterplatte übertragen und die HEK-mGAT1-Zellen per Vakuumfiltration vom Inkubationsansatz getrennt wurden. Nach mehrmaligem Waschen (3 bis 8 mal) der Zellen mit 0,9% NaCl-Lösung (100 µL bzw. 300 µL je Well) wurden die GF-Filterplatten bei 50 °C für mindestens 90 min getrocknet, bevor die Zellen durch Zugabe von MeOH/H₂O 80/20 (v/v), welches den internen Standard (²H₂)GABA (**2**) für die Quantifizierung per LC-MS/MS enthielt lysiert und eluiert wurden. Im gewonnenen Eluat wurde dann die Menge an (²H₆)GABA (**3**) per LC-MS/MS ermittelt.

4.3.2.1. Gewinnung von Matrix für die Optimierung der Chromatographie

Für die LC-MS/MS-Methodenentwicklung wurden Matrixproben generiert, indem HEK-mGAT1-Zellen in TRIS-Uptake-Puffer suspendiert und über eine 96-Well-GF-Filterplatte filtriert wurden. Dann wurden 3 x 100 µL MeOH/H₂O 80/20 (v/v) auf die Filterplatte gegeben, filtriert und das gewonnene Filtrat vereinigt.

4.3.2.2. Gewinnung von Proben für die Bestimmung von endogener GABA (Bulk Ansatz)

Die Gewinnung von Proben zur Bestimmung der endogenen GABA (**1**) in HEK-mGAT1-Zellen erfolgte, indem HEK-mGAT1-Zellen von ihrer Kulturschale gelöst, bei 500 g pelletiert und zweimal mit PBS-Puffer gespült wurden (30 mL, 500 g). Vor dem letzten Zentrifugieren wurden 20 µL der Zellsuspension entnommen und die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dann wurde das nach dem Zentrifugieren erhaltene Zellpellet mit dem entsprechenden Volumen MeOH/H₂O, 80/20 (v/v) lysiert, um eine Konzentration von 800.000 HEK-mGAT1-Zellen/mL in MeOH/H₂O 80/20 (v/v) zu erhalten. Nachdem die Zellen für mindestens 90 min lysiert worden waren, wurde das Lysat mit einem Spritzenvorsatzfilter bei 0,45 µm filtriert. Anschließend wurden 250 µL des Filtrates mit 125 µL 400 nM internem Standard (²H₂)GABA (**2**) in MeOH und 125 µL variierenden Konzentrationen von 0 bis 100 nM GABA (**1**) in MeOH versetzt und dadurch entsprechend verdünnt, sodass die hergestellten Proben endogene GABA (**1**) aus 400.000 HEK-mGAT1-Zellen/mL enthielten und einen MeOH-Gehalt von 95% aufwiesen (siehe auch Abbildung 81).

Schema der Probenherstellung zur Bestimmung der endogenen GABA in HEK293-Zellen

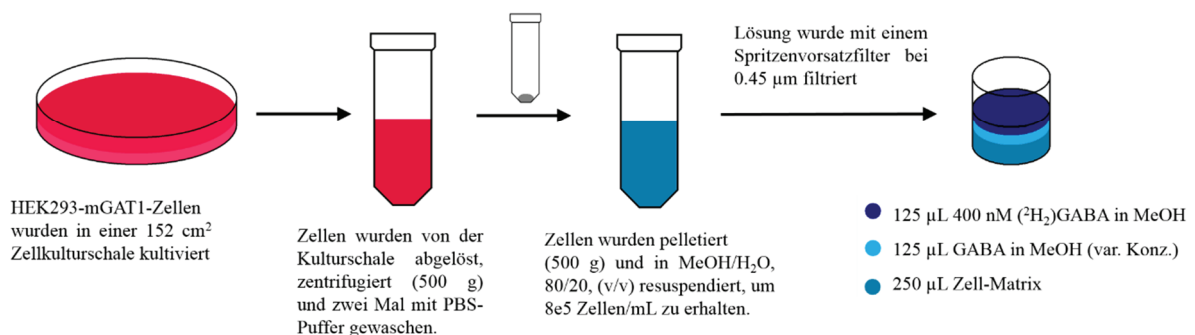


Abbildung 81: Gewinnung der Proben zur Bestimmung der endogenen GABA (**1**) im Bulk-Ansatz

4.4. MS-Transport-Assays mit COS-Zellen

4.4.1. Geräte und Material

Platwasher	Tecan-HydroSpeed™ mit 96-Well indexing Waschkopf	Tecan, Männedorf, Schweiz
96-Well-Deepwell-Platten	PP, 1,2 mL	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Zellkulturplatten	Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom Cell+ (83.1835.300)	Sarstedt, Newton, USA
300 µL 12-Kanal-Pipette	Eppendorf Xplorer®, 12-Kanal, variable 15-300 µL, orange	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
1200 µL 12-Kanal-Pipette	Eppendorf Xplorer® Plus, 12-Kanal, variable 50-1200 µL, grün	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenzspektrometer (Platereader)	SpectraMax M2 & M2e Multi-Mode Microplate Reader	Molecular Devices, Biberach an der Riss, Deutschland
Schwarze Zellkulturplatte mit transparentem Boden	lumox® multiwell, 96; REF 94.6000.024	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Puffer und Lösungen		
HEPES-Uptake-Puffer		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM	Applichem, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ KPO ₄	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KCl	4,7 mM	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Glucose x H ₂ O	11 mM	Microbiology, Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	25 mM	For biochemistry, Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
NaCl	119 mM	p. A., Roth, Karlsruhe, Deutschland
pH	7,1 (mit NaOH)	
Waschpuffer		
Ammoniumacetat	154 mM	p. A., Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland / Applichem, Darmstadt, Deutschland
pH	7,4	
Lyselösung		
MeCN	87,5% (v/v)	HPLC-grade, Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O	12,5% (v/v)	
(² H ₂)GABA (2)	12,5 nM	(>98%), Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Efflux-Puffer		
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,5 mM	Applichem, Darmstadt, Deutschland
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ KPO ₄	1,2 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
KCl	4,7 mM	Grüssing GmbH, Filsum, Deutschland
Glucose x H ₂ O	11 mM	Microbiology, Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	25 mM	For biochemistry, Prolabo, VWR, Darmstadt, Deutschland
Cholinchlorid	119 mM	Fluka, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
pH	7,1 (mit NH ₄ OH)	

4.4.2. Transientes Transfektionsprotokoll

Wurde der MS-Transport-Assay mit transient-transfizierten COS-7-Zellen durchgeführt, so wurden die COS-7-Zellen wie im Folgenden beschrieben transfiziert. Etwa 2×10^6 COS-7-Zellen wurden in 20 mL Normalmedium in eine 152 cm² Zellkulturschale ausgesät und über Nacht bei 8% CO₂ und 37 °C kultiviert. Am nächsten Tag wurden in einem sterilen 1,5 mL Eppendorf Reagiergefäß 970 µL DMEM-Medium (serumfrei), 10 µL Transfektionsreagenz (FuGene6, bzw. FuGene HD) und 10 µg DNA in dieser Reihenfolge zusammenpipettiert und das Gefäß mehrmals invertiert. Nach 30 min wurde die Lösung gleichmäßig auf der 152 cm² Kulturschale verteilt und diese anschließend bei 37 °C und 8% CO₂ kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen nach weiteren 24 h trypsiniert und jeweils 60.000 Zellen in ein Well einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Diese wurde anschließend für weitere 24 h bei 37 °C und 8% CO₂ kultiviert, bevor 72 h nach der Transfektion der MS-Transport-Assay durchgeführt wurde (siehe 4.4.4 „Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays“ auf Seite 183).

4.4.3. Messung der Fluoreszenz von COS-hGAT1-Zellen

Zur Bestimmung der Fluoreszenz von COS-hGAT1-Zellen, welche durch das Blasticidin-GFP-Fusionsprotein hervorgerufen werden sollte, wurden jeweils 350.000 COS-7-Zellen in zwei 58 cm² Zellkulturschalen ausgesät und 24 h bei 37 °C und 8% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden in 2 sterilen 1,5 mL Eppendorf Reagiergefäßen 442 µL DMEM-Medium, 7 µL FuGene6 und entweder 7 µg pTracer-hGAT1 oder pGFP (Prof. Zahler, AK Vollmer) gemischt und nach mehrmaligem Invertieren für

30 min inkubiert. Anschließend wurde je ein Ansatz auf eine 58 cm² Zellkulturschale gegeben und diese weiter kultiviert. Nach 24 h wurde das Kulturmedium erneuert und die Zellen nach weiteren 24 h abgelöst, gezählt und 50.000 Zellen je Well in eine schwarze 96-Well-Zellkulturplatte mit transparentem Boden (lumox® multiwell, 96; REF 94.6000.024) gesät. Diese wurde für weitere 24 h kultiviert und anschließend mit einer 300 µL Mehrkanalpipette zweimal mit 250 µL HEPES-Uptake-Puffer gewaschen, wobei nach dem zweiten Waschschrift der HEPES-Uptake-Puffer in der 96-Well-Zellkulturplatte mit transparentem Boden (lumox® multiwell, 96; REF 94.6000.024) verblieb. Dann wurde die Fluoreszenz am „SpectraMax M2 & M2e Multi-Mode Microplate Reader“ (Molecular Devices) bei einer Anregungswellenlänge von 395 nm und einer Emissionswellenlänge von 509 nm mit einem „cutoff“ bei 495 nm gemessen und die Ergebnisse mit der SoftMax Pro 5.4-Software ausgewertet.

4.4.4. Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays

Zur Durchführung der MS-Transport-Assays wurden am Vortag 60.000 transfizierte COS-Zellen (COS-hGAT1, COS-hBGT1, COS-hGAT2, COS-hGAT3), sowie nicht-transfizierte COS-7 Zellen für die Bestimmung des nicht spezifischen Transportes, in die Vertiefungen einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Für eine genauere Beschreibung, siehe Kapitel 4.2.12.4 „Aussäen von COS-Zellen für den Assay“ auf Seite 178. Am Versuchstag wurde die 96-Well-Zellkulturplatte am Platewasher (Tecan Hydrospeed) viermal mit 37 °C warmem HEPES-Uptake-Puffer gewaschen, wobei nach der finalen Aspiration ein Restvolumen von etwa 100 µL in den Wells zurückblieb. Die Parameter des Waschprozesses sind in Tabelle 18 aufgeführt.

Tabelle 18: Waschschriffe zur Vorbereitung der MS-Transport-Assays

Absaugrate	1	≅ -200 mbar		Rest- volumen / Well
4 Zyklen a	Asp	z-Position	6,5 mm	≅ 75 µL
		Dauer	1 s	
		Absenkgeschwindigkeit	4 mm/s	
	Disp	z-Position	5 mm	
		Kopf Bewegen	Ja	
		Dispensiertrate	90 µL/s	
		Volumen	300 µL	
Endabsaugung	Asp	z-Position	7,5 mm	≅ 100 µL
		Dauer	2 s	
		Absenkgeschwindigkeit	3 mm/s	

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Anschließend wurden mit einer 300 μL 12-Kanal-Pipette 100 μL HEPES-Uptake-Puffer (für Sättigungsexperimente) oder Inhibitor in HEPES-Uptake-Puffer (für Konkurrenzexperimente) langsam zugegeben (speed 3) und der Ansatz für 25 min bei 37 °C vorinkubiert. Danach wurde mit der 300 μL 12-Kanal-Pipette 50 μL ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in HEPES-Uptake-Puffer in die Mitte der entsprechenden Wells gegeben (speed 7). Die Zellen wurden für weitere 6 min bei 37 °C inkubiert, ehe sie am Platewasher mit 154 mM $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ (Waschpuffer) nach den in Tabelle 19 angegebenen Parametern gewaschen wurden.

Tabelle 19: Waschschritte zur Terminierung des Transportes.

Absaugrate	1 \triangleq -200 mbar			Rest- volumen / Well
10 Zyklen a	Asp	z-Position	6,5 mm	\triangleq 75 μL
		Dauer	1 s	
		Absenkgeschwindigkeit	5 mm/s	
	Disp	z-Position	5 mm	
		Kopf Bewegen	Ja	
		Dispensierrate	90 $\mu\text{L/s}$	
Volumen		300 μL		
Endabsaugung	Asp	z-Position	5,5 mm	\triangleq 50 μL
		Dauer	2 s	
		Absenkgeschwindigkeit	4 mm/s	

Nach dem Waschprozess verblieben noch 50 μL Waschpuffer je Well, weswegen die Zellen mit 200 μL einer Lyselösung bestehend aus 12,5 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in MeCN/ H_2O , 87,5/12,5 (v/v) überschichtet wurden, um eine finale Probenzusammensetzung von MeCN/ H_2O 70/30 (v/v) mit einer Konzentration von 10 nM internem Standard ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) zu erhalten. Dies wurde mit einer 1200 μL 12-Kanal-Pipette (speed 1) derartig durchgeführt, dass die Lyselösung langsam in ein Well hinabließ. Die Platten wurden mit Aluminiumfolie dicht verschlossen und für mindestens 90 min lysiert, bevor diese analysiert wurden.

4.4.5. Herstellen von Kalibrierungen und QC-Proben

Um Kalibrier- und QC-Proben zu erstellen, wurden COS-7-Zellen so behandelt, wie in Kapitel 4.4.4 „Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays“ auf Seite 183 beschrieben, wobei jedoch kein

Substrat ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zugegeben wurde. Des Weiteren wurde die Lyse nicht mit der Lyselösung, sondern mit nachfolgend beschriebenen Kalibrier und QC-Lösung durchgeführt.

4.4.5.1. Kalibrierlösungen zur Validierung nach CDER

Ausgehend von 100 μL einer 8 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Stammlösung in Wasser wurden 13 sequenzielle 1:2-Verdünnungen mit 50 μL Wasser hergestellt und alle Proben mit weiteren 50 μL einer 200 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) Lösung in Wasser und 700 μL Acetonitril ergänzt. Außerdem wurde eine Blankprobe bestehend aus 100 μL H_2O und 700 μL Acetonitril, sowie eine Nullprobe, die zusätzlich 12,5 nM ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) enthält, hergestellt. 200 μL dieser Kalibrierlösungen wurden auf die nach dem Waschen der Zellen zurückgebliebenen 50 μL Waschpuffer gegeben, um eine Matrixkalibrierung im Bereich von 400 nM bis 48 pM zu erhalten.

4.4.5.2. QC-Lösungen für Validierung nach CDER

QC-Proben wurden ausgehend von einer 10 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Stammlösung durch sequenzielle Verdünnung mit H_2O und anschließender Zugabe von ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in H_2O und Acetonitril in den Konzentrationen 250 nM, 62,5 nM, 12,5 nM, 2,5 nM und 625 pM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 87,5/12,5 (v/v) hergestellt. Diese Proben enthielten ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) in einer Konzentration von 12,5 nM. Durch Zugabe von 200 μL dieser QC-Lösungen zu den nach dem Waschen auf den Zellen verbleibenden 50 μL Waschpuffer wurden Kontrollproben von 200 nM bis 500 pM erstellt. Es wurden für die Validierung des MS-Transport-Assays jeweils sechs replikater Proben je Konzentration hergestellt.

4.4.5.3. QC-Lösungen für Konkurrenzexperimente

QC-Proben wurden ausgehend von einer 10 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Stammlösung durch sequenzielle Verdünnung mit H_2O und anschließender Zugabe von ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) und Acetonitril in den Konzentrationen 62,5 nM, 6,25 nM und 625 pM in $\text{MeCN}/\text{H}_2\text{O}$, 87,5/12,5 (v/v) hergestellt. Durch Zugabe von 200 μL dieser QC-Lösungen zu den nach dem Waschen auf den Zellen verbleibenden 50 μL Waschpuffer wurden Kontrollproben von 50 nM, 5 nM und 500 pM erhalten. Je Versuchstag wurden QC-Proben in Triplikaten erstellt.

4.4.6. MS-Bindungs-Assay zur Bestimmung der Transporterzahl

Die MS-Bindungs-Assays zur Bestimmung der Transporterzahl der COS-hGAT1-Zellen wurde von der biologischen Prüfung des AK Wanner durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurde dabei wie folgt vorgegangen.

Zur Herstellung der COS-hGAT1-Membranpräparationen wurden COS-hGAT1-Zellen bei einer Konfluenz von >85% in 152 cm² Zellkulturschalen mit PBS-Puffer gewaschen und mit Hilfe eines Zellschabers abgeerntet. Nach zwei weiteren Waschschrritten mit PBS-Buffer (Zentrifugation für 5 min bei 500 g) wurden die Zellen in PBS-Puffer resuspendiert und ein Aliquot mit einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurden die COS-hGAT1-Zellen nach einer weiteren Zentrifugation (500 g, 5 min) in 0,32 M Saccharose resuspendiert und mit einem Poytron PT A7 (Kinematica Polytron, Littau-Luzern, Schweiz) homogenisiert. Aliquots dieses Homogenates mit einem Proteingehalt von etwa 3 mg/mL (bestimmt nach Bradford et al.¹⁸⁰ mit BSA als Referenz, nach einer Inkubation in 10 mM NaOH für 1h) wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Am Versuchstag wurden Aliquots der Membranpräparationen aufgetaut, in 20 mL TRIS-NaCl-Puffer verdünnt, bei 50.000 g für 20 min zentrifugiert und das entstandene Pellet in TRIS-NaCl-Puffer resuspendiert.

Die MS-Bindungs-Assays wurden wie bereits beschrieben durchgeführt,^{84,181} wobei die folgenden Änderungen vorgenommen wurden. Nach der Filtration des Inkubationsansatzes und dem anschließenden Waschschrtritt wurde das auf den Filtern verbleibende Material dreimal mit 100 µL einer Lösung von 1,4 nM (²H₁₀)NO 711 in MeOH eluiert und das erhaltene Eluat mit 130 µL 10 mM HCOONH₄-Puffer, pH 7,0 je Well ergänzt. Gebundenes NO 711 (**4**) wurde nach einer Injektion von 30 µL je Probe mittels LC-ESI-MS/MS am API 3200™ (ABSciex) quantifiziert.¹⁸¹ Die erhaltenen B_{max} -Werte sind auf die Zellzahl, welche zur Herstellung der Membranpräparationen eingesetzt wurde bezogen.

4.4.1. Sättigungsexperimente

Zur Bestimmung von Sättigungsisothermen wurden sowohl transfizierte als auch nicht transfizierte COS-7 Zellen verwendet. Dazu wurden MS-Transport-Assays, wie in Kapitel 4.4.4 „Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays“ auf Seite 183 beschrieben, durchgeführt. Dabei wurden, nachdem die Zellen mit HEPES-Uptake-Puffer gewaschen worden waren, zu den nach dem Waschen am Platewascher verbleibenden 100 µL HEPES-Uptake-Puffer weitere 100 µL HEPES-Uptake-Puffer je Well gegeben und die Zellen für 25 min bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 50 µL je Well variierende Konzentrationen (²H₆)GABA (**3**) in HEPES-Uptake-Puffer zugegeben und für weitere 6 min bei 37 °C inkubiert, bevor diese, wie bereits beschrieben, mit 154 mM CH₃COONH₄ gewaschen und anschließend lysiert wurden. Analog wurde für jede untersuchte Konzentration an (²H₆)GABA (**3**) der nicht-spezifische Transport an nicht-transfizierten COS-7-Zellen ermittelt und von dem gemessenen Gesamttransport der transfizierten Zellen subtrahiert. Alle Proben wurden in Triplikaten getestet. Aufgrund der bei Sättigungsexperimenten hohen Konzentrationen an (²H₆)GABA (**3**) in den Proben, wurde die Quantifizierung transportierter (²H₆)GABA (**3**) anhand einer Kalibriergeraden

bestimmt. Die Kalibrierproben wurden analog den Kalibrierlösungen wie in Kapitel 4.4.5.1 „Kalibrierlösungen zur Validierung nach CDER“ auf Seite 185 beschrieben hergestellt, wobei die Kalibrierung einen Konzentrationsbereich von 914 pM bis 2 μ M ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) erlaubte.

4.4.2. Kompetitionsexperimente

Kompetitionsexperimente wurden durchgeführt, indem die zu testende Substanz in HEPES-Uptake-Puffer gelöst und verdünnt wurde. Verbindungen, welche in DMSO gelöst wurden, hatten einen maximalen Gehalt von 1% DMSO im Assay. (Die Konzentration an DMSO wurde bei der Verdünnung der Proben ebenfalls verdünnt). Sieben Konzentrationen je Substanz in einem Bereich von mehr als 3 Größenordnungen wurden vor der Vorinkubation zu den Zellen gegeben. Ungehinderter Transport als Positivkontrolle wurde in Abwesenheit von Inhibitor für jede Testsubstanz separat ermittelt. Nach 25 min Vorinkubation wurden 50 μ L 2,5 μ M – für COS-hGAT1, COS-hGAT2 und COS-hGAT3 – bzw. 15 μ M – für COS-hBGT1 – ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) Lösung in HEPES-Uptake-Puffer zu jedem Well gegeben, um eine finale Substratkonzentration von 500 nM bzw. 3 μ M ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) je Probe zu erhalten. Alle Proben wurden in Triplikaten getestet.

Die mit den MS-Transport-Assays getesteten Substanzen sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

Tabelle 20: Verwendete Inhibitoren

Substanz	Nr.	Salz	Hersteller
GABA	(1)		Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
β -Alanin	(6)		Merck, Darmstadt, Deutschland
L-DABA	(15)	Dihydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DL-DAPA	(16)	Monohydrochlorid	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
(R)-Nipecotinsäure	(R-5)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
(S)-Nipecotinsäure	(S-5)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
(R)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure	(R-14)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
(S)-2-(Pyrrolidin-2-yl)essigsäure	(S-14)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
Guvacin	(7)		Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Taurin	(18)		Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Hypotaurin	(17)		Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Betain	(19)	Hydrochlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Chinidin	(20)		Synopharm, Barsbüttel, Deutschland
(S)-SNAP 5114	(9)		Synthetisiert im AK Wanner
DDPM-859	(10)		Synthetisiert im AK Wanner
DDPM-1457	(11)		Synthetisiert im AK Wanner
Tiagabin	(13)		Synthetisiert im AK Wanner
SK&F-89976	(8)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
NO 711	(4)	Hydrochlorid	Synthetisiert im AK Wanner
DDPM-2349	(12)		Synthetisiert im AK Wanner
NNC 05-2090	(21)		Abcam, Cambridge, UK

4.4.3. Substratidentifizierung

Für die Identifizierung von GAT-Substraten wurden Konkurrenzexperimente, wie in Kapitel 4.4.2 „Konkurrenzexperimente“ auf Seite 187 beschrieben durchgeführt. Bei der Quantifizierung transportierter ($^2\text{H}_6$)GABA (3) per LC-MS/MS wurde jedoch, in Abhängigkeit des zu untersuchenden Inhibitors, zusätzlich ein weiterer Massenübergang im MRM-Mode gemessen, dessen Bedingungen in Tabelle 21 aufgelistet sind.

4 EXPERIMENTELLER TEIL

Tabelle 21: Verwendete MS-Parameter zur Detektion weiterer GAT-Substrate.

		Q1	Q3	Dwelltime (ms)	DP (V)	CE (V)	Retentionszeit auf YMC-Pack PVA-Sil
β -Alanin	(6)	90.0	72.0	50	46	11	0,76 min
Guvacin	(7)	128.0	99.0	100	61	17	0,84 min
Nipecotinsäure	(5)	130.0	112.0	50	51	17	0,83 min
Taurin	(18)	126.0	108.0	50	60	15	0,48 min

Die in Tabelle 21 aufgelisteten Bedingungen wurden für die jeweiligen Substanzen anhand eines Spritzenpumpentunings mit 200 nM Analyt in MeOH/0,1% HCOOH 50/50 (v/v) gewonnen.

4.4.4. Efflux-Experimente

Bei Efflux-Experimenten wurden die Zellen, wie bereits beschrieben (siehe Kapitel 4.4.4 „Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays“ auf Seite 183), für den Transport vorbereitet, wobei die folgenden Modifikationen vorgenommen wurden. Nach der Vorinkubation der COS-hGAT1-Zellen für 25 min in HEPES-Uptake-Puffer wurden diese in Gegenwart von 50 μ M ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für 6 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen am Platwasher zehnmal mit Efflux-Puffer wie in Tabelle 19 beschrieben gewaschen, wobei auf die Endabsaugung verzichtet wurde. Anschließend wurde der Efflux-Puffer alle 2 Minuten abgesaugt (Restvolumen 75 μ L) und durch frischen (300 μ L) ersetzt. Nach verschieden langen Zeitintervallen (von 0 bis 120 min) wurde eine Platte, wie in Kapitel „Standardvorgehensweise der MS-Transport-Assays“ auf Seite 183 beschrieben, mit Waschpuffer gewaschen (Tabelle 19), wobei die Anzahl der Waschzyklen auf 5 reduziert wurde. Anschließend wurden die Zellen wie für die MS-Transport-Assays üblich lysiert und intrazelluläre ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) quantifiziert.

4.5. Software und Datenanalyse

Zur Evaluation der gewonnenen Daten wurde das Microsoft Office Professional Plus 2013 Paket, sowie das Microsoft Office Professional Plus 2003 Paket verwendet. Des Weiteren wurde die Analyst Software 1.4.2 und 1.6 von ABSciex zur Steuerung der Massenspektrometer und der Auswertung der erhaltenen Chromatogramme, sowie Prism[®]5 und Prism[®]6 von GraphPad Software verwendet.

4.5.1. Analyst Daten

Die Chromatogramme für die Massenübergänge m/z 104/87 für GABA (**1**), m/z 106/89 für (²H₂)GABA (**2**) und m/z 110/73 für (²H₆)GABA (**3**) wurden mit der Analyst[®] Software manuell integriert und die resultierenden Peakflächen für GABA (**1**) und (²H₆)GABA (**3**) ins Verhältnis zur Peakfläche des internen Standards (²H₂)GABA (**2**) gesetzt. Anhand einer Kalibrierung wurden die erhaltenen Peakflächenverhältnisse in eine Konzentration umgerechnet.

4.5.2. Kalibrierung und QC-Proben

Zur Erstellung von Kalibrierungen wurden die Flächenverhältnisse von (²H₆)GABA (**3**) zu (²H₂)GABA (**2**) gegen die eingesetzte Konzentration von (²H₆)GABA (**3**) aufgetragen und die Messpunkte mittels linearer Regression in der Prism[®]-Software mit einer Wichtung von $1/x$ gefittet. In den Validierungsexperimenten (siehe Kapitel 3.3 „Validierung der Methode“ auf Seite 117) ergab sich die globale Kalibriergleichung $Y = 1,865e^{-2} * x + 9,4e^{-4}$ deren Gültigkeit in jedem Experiment durch das Vermessen von QC-Proben (drei Konzentrationen in Triplikaten in Konkurrenzexperimenten, siehe „QC-Lösungen für Konkurrenzexperimente“ auf Seite 185) überprüft wurde. Diese Kalibriergerade wurde in allen Experimenten, in denen keine eigene Kalibrierung aufgenommen wurde, zur absoluten Quantifizierung von (²H₆)GABA (**3**) verwendet. Wurde an einem Versuchstag eine neue Kalibrierung aufgenommen, so wurde diese an dem entsprechenden Versuchstag verwendet.

4.5.3. Sättigungsexperimente

Bei Sättigungsexperimenten wurden ausgehend von den ermittelten Flächenverhältnissen und der Kalibriergeraden die entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Proben ermittelt. Der spezifische Transport wurde als Differenz des Transportes von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen bei jeder Konzentration bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen in einen Stoffmengentransport je Zelle und Minute umgerechnet und gegen die eingesetzte

Substratkonzentration aufgetragen um eine Sättigungsisotherme zu erhalten. Diese wurde dann mit der Michaelis-Menten-Gleichung $Y = V_{max} * \frac{[S]}{K_m + [S]}$ der Prism®-Software gefittet und so der K_m und V_{max} -Wert ermittelt.

4.5.4. Kompetitionsexperimente

Zur Auswertung der Kompetitionsexperimente wurde das Flächenverhältnis von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) der Proben des Transportes von 500 nM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) – für hGAT1, hGAT2 und hGAT3, bzw. 3 μM ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) für hGAT1 – durch nicht-transfizierte COS-7-Zellen von allen Flächenverhältnissen von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) zu ($^2\text{H}_2$)GABA (**2**) der Kompetitionproben subtrahiert. Zur Normierung der Kompetitionskurven wurden die so erhaltenen Flächenverhältnisse für den spezifischen Transport ins Verhältnis zu demjenigen Flächenverhältnis gesetzt, welches für den ungehinderten Transport von ($^2\text{H}_6$)GABA (**3**) durch die transfizierten Zellen in Abwesenheit von Inhibitor erhalten wurde (Positivkontrolle), um einen relativen Transport in % zu erhalten. Dieser relative Transport wurde gegen die logarithmierte Inhibitorkonzentration aufgetragen und mit der einparametrischen Inhibitions Gleichung $Y = \frac{100\%}{1 + 10^{([I] - \text{LogIC}_{50})}}$ gefittet.

5. Literatur

- (1) Martin, D. L.; Rimvall, K. *J Neurochem* **1993**, *60*, 395-407.
- (2) Bowery, N. G.; Smart, T. G. *Br J Pharmacol* **2006**, *147 Suppl 1*, S109-19.
- (3) Zhou, Y.; Danbolt, N. C. *Frontiers in endocrinology* **2013**, *4*, 165.
- (4) Evans, J. E.; Frosthalm, A.; Rotter, A. *J Comp Neurol* **1996**, *376*, 431-46.
- (5) Lee, T. S.; Bjornsen, L. P.; Paz, C.; Kim, J. H.; Spencer, S. S.; Spencer, D. D.; Eid, T.; de Lanerolle, N. C. *Acta neuropathologica* **2006**, *111*, 351-63.
- (6) Chiu, C. S.; Brickley, S.; Jensen, K.; Southwell, A.; McKinney, S.; Cull-Candy, S.; Mody, I.; Lester, H. A. *J Neurosci* **2005**, *25*, 3234-45.
- (7) Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S. *Neurotoxicity research* **2005**, *8*, 221-5.
- (8) Bak, L. K.; Schousboe, A.; Waagepetersen, H. S. *J Neurochem* **2006**, *98*, 641-53.
- (9) Waagepetersen, H. S.; Sonnewald, U.; Schousboe, A. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **2003**, *9*, 398-403.
- (10) Foster, A. C.; Kemp, J. A. *Current opinion in pharmacology* **2006**, *6*, 7-17.
- (11) Pramod, A. B.; Foster, J.; Carvelli, L.; Henry, L. K. *Molecular aspects of medicine* **2013**, *34*, 197-219.
- (12) Kristensen, A. S.; Andersen, J.; Jorgensen, T. N.; Sorensen, L.; Eriksen, J.; Loland, C. J.; Stromgaard, K.; Gether, U. *Pharmacol Rev* **2011**, *63*, 585-640.
- (13) Broer, S.; Gether, U. *Br J Pharmacol* **2012**, *167*, 256-78.
- (14) Kleppner, S. R.; Tobin, A. J. *Emerging Ther. Targets* **2001**, *5*, 219-239.
- (15) Belebony, R. O.; Carolino, R. O.; Pizzo, A. B.; Castellan-Baldan, L.; Coutinho-Netto, J.; dos Santos, W. F.; Coimbra, N. C. *Cell Mol Neurobiol* **2004**, *24*, 707-28.
- (16) Rissman, R. A.; De Blas, A. L.; Armstrong, D. M. *J Neurochem* **2007**, *103*, 1285-92.
- (17) Sarup, A.; Larsson, O. M.; Schousboe, A. *Current drug targets. CNS and neurological disorders* **2003**, *2*, 269-77.
- (18) Meldrum, B. S.; Rogawski, M. A. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* **2007**, *4*, 18-61.
- (19) Czuczwar, S. J.; Patsalos, P. N. *CNS drugs* **2001**, *15*, 339-50.
- (20) Madsen, K. K.; Clausen, R. P.; Larsson, O. M.; Krogsgaard-Larsen, P.; Schousboe, A.; White, H. S. *J Neurochem* **2009**, *109 Suppl 1*, 139-44.
- (21) Radian, R.; Ottersen, O. P.; Storm-Mathisen, J.; Castel, M.; Kanner, B. I. *J Neurosci* **1990**, *10*, 1319-30.
- (22) Conti, F.; Melone, M.; De Biasi, S.; Minelli, A.; Brecha, N. C.; Ducati, A. *J Comp Neurol* **1998**, *396*, 51-63.
- (23) Ikegaki, N.; Saito, N.; Hashima, M.; Tanaka, C. *Brain Res Mol Brain Res* **1994**, *26*, 47-54.
- (24) Minelli, A.; Brecha, N. C.; Karschin, C.; DeBiasi, S.; Conti, F. *J Neurosci* **1995**, *15*, 7734-46.
- (25) De Biasi, S.; Vitellaro-Zuccarello, L.; Brecha, N. C. *Neuroscience* **1998**, *83*, 815-28.
- (26) Minelli, A.; DeBiasi, S.; Brecha, N. C.; Zuccarello, L. V.; Conti, F. *J Neurosci* **1996**, *16*, 6255-64.
- (27) Zhou, Y.; Holmseth, S.; Guo, C. Y.; Hassel, B.; Höfner, G.; Huitfeldt, H. S.; Wanner, K. T.; Danbolt, N. C. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 35733-35746.
- (28) Zhou, Y.; Holmseth, S.; Hua, R.; Lehre, A. C.; Olofsson, A. M.; Poblete-Naredo, I.; Kempson, S. A.; Danbolt, N. C. *Am J Physiol Renal Physiol* **2012**, *302*, F316-28.
- (29) Liu, Q. R.; Lopez-Corcuera, B.; Mandiyan, S.; Nelson, H.; Nelson, N. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 2106-12.
- (30) Guastella, J.; Nelson, N.; Nelson, H.; Czyzyk, L.; Keynan, S.; Miedel, M. C.; Davidson, N.; Lester, H. A.; Kanner, B. I. *Science* **1990**, *249*, 1303-6.
- (31) Nelson, N. *J Neurochem* **1998**, *71*, 1785-803.
- (32) Androutsellis-Theotokis, A.; Goldberg, N. R.; Ueda, K.; Beppu, T.; Beckman, M. L.; Das, S.; Javitch, J. A.; Rudnick, G. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 12703-9.
- (33) Yamashita, A.; Singh, S. K.; Kawate, T.; Jin, Y.; Gouaux, E. *Nature* **2005**, *437*, 215-23.
- (34) Singh, S. K. *Channels* **2008**, *2*, 380-9.
- (35) Krishnamurthy, H.; Piscitelli, C. L.; Gouaux, E. *Nature* **2009**, *459*, 347-55.
- (36) Bismuth, Y.; Kavanaugh, M. P.; Kanner, B. I. *J Biol Chem* **1997**, *272*, 16096-102.

- (37) Quick, M.; Shi, L.; Zehnpfennig, B.; Weinstein, H.; Javitch, J. A. *Nature structural & molecular biology* **2012**, *19*, 207-11.
- (38) Quick, M.; Winther, A. M.; Shi, L.; Nissen, P.; Weinstein, H.; Javitch, J. A. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2009**, *106*, 5563-8.
- (39) Shi, L.; Quick, M.; Zhao, Y.; Weinstein, H.; Javitch, J. A. *Mol Cell* **2008**, *30*, 667-77.
- (40) Zhao, Y.; Terry, D. S.; Shi, L.; Quick, M.; Weinstein, H.; Blanchard, S. C.; Javitch, J. A. *Nature* **2011**, *474*, 109-13.
- (41) Cheng, Mary H.; Bahar, I. *Biophysical Journal* **2013**, *105*, 630-639.
- (42) Nyola, A.; Karpowich, N. K.; Zhen, J.; Marden, J.; Reith, M. E.; Wang, D. N. *Current opinion in structural biology* **2010**, *20*, 415-22.
- (43) Krishnamurthy, H.; Gouaux, E. *Nature* **2012**, *481*, 469-74.
- (44) Wang, H.; Elferich, J.; Gouaux, E. *Nature structural & molecular biology* **2012**, *19*, 212-9.
- (45) Wang, H.; Gouaux, E. *EMBO reports* **2012**, *13*, 861-6.
- (46) Beuming, T.; Shi, L.; Javitch, J. A.; Weinstein, H. *Mol Pharmacol* **2006**, *70*, 1630-42.
- (47) Skovstrup, S.; Taboureau, O.; Brauner-Osborne, H.; Jorgensen, F. S. *ChemMedChem* **2010**, *5*, 986-1000.
- (48) Penmatsa, A.; Wang, K. H.; Gouaux, E. *Nature* **2013**.
- (49) Wang, H.; Goehring, A.; Wang, K. H.; Penmatsa, A.; Ressler, R.; Gouaux, E. *Nature* **2013**.
- (50) Radian, R.; Kanner, B. I. *Biochemistry* **1983**, *22*, 1236-41.
- (51) Keynan, S.; Kanner, B. I. *Biochemistry* **1988**, *27*, 12-7.
- (52) Eulenburg, V.; Gomeza, J. *Brain Research Reviews* **2010**, *63*, 103-112.
- (53) Matskevitch, I.; Wagner, C. A.; Stegen, C.; Broer, S.; Noll, B.; Risler, T.; Kwon, H. M.; Handler, J. S.; Waldegger, S.; Busch, A. E.; Lang, F. *J Biol Chem* **1999**, *274*, 16709-16.
- (54) Zomot, E.; Bendahan, A.; Quick, M.; Zhao, Y.; Javitch, J. A.; Kanner, B. I. *Nature* **2007**, *449*, 726-30.
- (55) Loo, D. D.; Eskandari, S.; Boorer, K. J.; Sarkar, H. K.; Wright, E. M. *J Biol Chem* **2000**, *275*, 37414-22.
- (56) Skou, J. C. *Biochim Biophys Acta* **1957**, *23*, 394-401.
- (57) Vidaver, G. A. *J Theor Biol* **1966**, *10*, 301-6.
- (58) Jardetzky, O. *Nature* **1966**, *211*, 969-70.
- (59) Mitchell, P. *Nature* **1957**, *180*, 134-6.
- (60) Mitchell, P. *Research in microbiology* **1990**, *141*, 286-9.
- (61) Lu, C. C.; Hilgemann, D. W. *J Gen Physiol* **1999**, *114*, 445-57.
- (62) Lu, C. C.; Hilgemann, D. W. *J Gen Physiol* **1999**, *114*, 429-44.
- (63) Singh, S. K.; Yamashita, A.; Gouaux, E. *Nature* **2007**, *448*, 952-6.
- (64) Singh, S. K.; Piscitelli, C. L.; Yamashita, A.; Gouaux, E. *Science* **2008**, *322*, 1655-61.
- (65) Forrest, L. R.; Rudnick, G. *Physiology* **2009**, *24*, 377-86.
- (66) Forrest, L. R.; Zhang, Y. W.; Jacobs, M. T.; Gesmonde, J.; Xie, L.; Honig, B. H.; Rudnick, G. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 10338-43.
- (67) Krogsgaard-Larsen, P. *Mol Cell Biochem* **1980**, *31*, 105-21.
- (68) Dalby, N. O.; Thomsen, C.; Fink-Jensen, A.; Lundbeck, J.; Sokilde, B.; Man, C. M.; Sorensen, P. O.; Meldrum, B. *Epilepsy Res* **1997**, *28*, 51-61.
- (69) Hog, S.; Greenwood, J. R.; Madsen, K. B.; Larsson, O. M.; Frolund, B.; Schousboe, A.; Krogsgaard-Larsen, P.; Clausen, R. P. *Curr Top Med Chem* **2006**, *6*, 1861-82.
- (70) Christiansen, B.; Meinild, A.-K.; Jensen, A. A.; Brauner-Osborne, H. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 19331-19341.
- (71) Sarup, A.; Larsson, O. M.; Bolvig, T.; Frolund, B.; Krogsgaard-Larsen, P.; Schousboe, A. *Neurochem Int* **2003**, *43*, 445-51.
- (72) Kvist, T.; Christiansen, B.; Jensen, A. A.; Brauner-Osborne, H. *Comb Chem High Throughput Screen* **2009**, *12*, 241-9.
- (73) Kragholm, B.; Kvist, T.; Madsen, K. K.; Jorgensen, L.; Vogensen, S. B.; Schousboe, A.; Clausen, R. P.; Jensen, A. A.; Brauner-Osborne, H. *Biochem Pharmacol* **2013**, *86*, 521-8.

- (74) Braestrup, C.; Nielsen, E. B.; Sonnewald, U.; Knutsen, L. J.; Andersen, K. E.; Jansen, J. A.; Frederiksen, K.; Andersen, P. H.; Mortensen, A.; Suzdak, P. D. *J Neurochem* **1990**, *54*, 639-47.
- (75) Nagga, K.; Bogdanovic, N.; Marcusson, J. *Journal of neural transmission* **1999**, *106*, 1141-9.
- (76) Bicho, A.; Grewer, C. *Biophys J* **2005**, *89*, 211-31.
- (77) Gonzales, A. L.; Lee, W.; Spencer, S. R.; Oropeza, R. A.; Chapman, J. V.; Ku, J. Y.; Eskandari, S. J. *Membr Biol* **2007**, *220*, 33-51.
- (78) Weinglass, A. B.; Garcia, M. L.; Kaczorowski, G. L. *Channels* **2008**, *2*, 312-21.
- (79) Mager, S.; Naeve, J.; Quick, M.; Labarca, C.; Davidson, N.; Lester, H. A. *Neuron* **1993**, *10*, 177-88.
- (80) Risso, S.; DeFelice, L. J.; Blakely, R. D. *J Physiol* **1996**, *490 (Pt 3)*, 691-702.
- (81) Lin, F.; Lester, H. A.; Mager, S. *Biophys J* **1996**, *71*, 3126-35.
- (82) Leysen, J.; Langlois, X.; Heylen, L.; Lammertsma, A. In *Encyclopedia of Psychopharmacology*, I., S.; L., P., Eds.; SpringerReference: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010, 2010.
- (83) Cheng, Y.-C.; Prusoff, W. H. *Biochemical Pharmacology* **1973**, *22*, 3099-3108.
- (84) Zepperitz, C.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 208-17.
- (85) Polley, M.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *Biomedical Chromatography* **2012**.
- (86) Kragler, A.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *Eur J Pharmacol* **2005**, *519*, 43-7.
- (87) Kragler, A.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *Eur J Med Chem* **2008**, *43*, 2404-11.
- (88) Katona, M.; Kiss, K.; Angyal, V.; Kucsma, N.; Sarkadi, B.; Takats, Z.; Szakacs, G. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2009**, *23*, 3372-6.
- (89) Fork, C.; Bauer, T.; Golz, S.; Geerts, A.; Weiland, J.; Del Turco, D.; Schomig, E.; Grundemann, D. *Biochem J* **2011**, *436*, 305-12.
- (90) Fujita, M.; Nakanishi, T.; Shibue, Y.; Kobayashi, D.; Moseley, R. H.; Shirasaka, Y.; Tamai, I. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **2009**, *297*, G681-6.
- (91) Grigat, S.; Fork, C.; Bach, M.; Golz, S.; Geerts, A.; Schomig, E.; Grundemann, D. *Drug Metab Dispos* **2009**, *37*, 330-7.
- (92) Harlfinger, S.; Fork, C.; Lazar, A.; Schomig, E.; Grundemann, D. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **2005**, *372*, 125-30.
- (93) Krumpochova, P.; Sapthu, S.; Brouwers, J. F.; de Haas, M.; de Vos, R.; Borst, P.; van de Wetering, K. *FASEB J* **2012**, *26*, 738-47.
- (94) Nunez, O.; Gallart-Ayala, H.; Martins, C. P.; Lucci, P.; Busquets, R. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2013**, *927*, 3-21.
- (95) van den Ouweland, J. M.; Kema, I. P. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012**, *883-884*, 18-32.
- (96) Vogeser, M.; Kirchhoff, F. *Clinical biochemistry* **2011**, *44*, 4-13.
- (97) Honour, J. W. *Annals of clinical biochemistry* **2011**, *48*, 97-111.
- (98) Hsieh, Y. *J Sep Sci* **2008**, *31*, 1481-91.
- (99) Xu, R. N.; Fan, L.; Rieser, M. J.; El-Shourbagy, T. A. *J Pharm Biomed Anal* **2007**, *44*, 342-55.
- (100) Roddy, T. P.; Horvath, C. R.; Stout, S. J.; Kenney, K. L.; Ho, P. I.; Zhang, J. H.; Vickers, C.; Kaushik, V.; Hubbard, B.; Wang, Y. K. *Anal Chem* **2007**, *79*, 8207-13.
- (101) 2013, N. M. A.
- (102) Yamashita, M.; Fenn, J. B. *The Journal of Physical Chemistry* **1984**, *88*, 4451-4459.
- (103) Bozovic, A.; Kulasingam, V. *Clinical biochemistry* **2013**, *46*, 444-55.
- (104) Novakova, L. *J Chromatogr A* **2013**, *1292*, 25-37.
- (105) Novakova, L.; Vlckova, H. *Anal Chim Acta* **2009**, *656*, 8-35.
- (106) CDER. FDA **2001**, <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>.
- (107) Tsukatani, T.; Higuchi, T.; Matsumoto, K. *Analytica Chimica Acta* **2005**, *540*, 293-297.
- (108) Monge-Acuna, A. A.; Fornaguera-Trias, J. *J Neurosci Methods* **2009**, *183*, 176-81.
- (109) Yamamoto, T.; Nanjoh, C.; Kuruma, I. *Neurochem Int* **1985**, *7*, 77-82.
- (110) Reinhoud, N. J.; Brouwer, H. J.; van Heerwaarden, L. M.; Korte-Bouws, G. A. *ACS chemical neuroscience* **2013**, *4*, 888-94.
- (111) Rea, K.; Cremers, T. I.; Westerink, B. H. *J Neurochem* **2005**, *94*, 672-9.
- (112) Sauvinet, V.; Parrot, S.; Benturquia, N.; Bravo-Moraton, E.; Renaud, B.; Denoroy, L. *Electrophoresis* **2003**, *24*, 3187-96.

- (113) Zhao, X. E.; Suo, Y. R. *Talanta* **2008**, *76*, 690-7.
- (114) Bathena, S. P.; Huang, J.; Epstein, A. A.; Gendelman, H. E.; Boska, M. D.; Alnouti, Y. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2012**, *893-894*, 15-20.
- (115) Buck, K.; Voehringer, P.; Ferger, B. *J Neurosci Methods* **2009**, *182*, 78-84.
- (116) Eckstein, J. A.; Ammerman, G. M.; Reveles, J. M.; Ackermann, B. L. *J Neurosci Methods* **2008**, *171*, 190-6.
- (117) Fonteh, A. N.; Harrington, R. J.; Harrington, M. G. *Amino Acids* **2007**, *32*, 203-12.
- (118) Cai, H. L.; Zhu, R. H.; Li, H. D. *Anal Biochem* **2010**, *396*, 103-11.
- (119) Inagaki, S.; Tano, Y.; Yamakata, Y.; Higashi, T.; Min, J. Z.; Toyo'oka, T. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2010**, *24*, 1358-64.
- (120) Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Bourdin, C.; Acquaviva-Bourdain, C.; Boyer, S.; Elfakir, C.; Bouchu, D. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 3287-97.
- (121) Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J. P.; Bouchu, D. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2005**, *19*, 1587-602.
- (122) Piraud, M.; Vianey-Saban, C.; Petritis, K.; Elfakir, C.; Steghens, J. P.; Morla, A.; Bouchu, D. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2003**, *17*, 1297-311.
- (123) Annesley, T. M. *Clin Chem* **2003**, *49*, 1041-4.
- (124) Mallet, C. R.; Lu, Z.; Mazzeo, J. R. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**, *18*, 49-58.
- (125) Alpert, A. J. *J Chromatogr* **1990**, *499*, 177-96.
- (126) Jandera, P. *Anal Chim Acta* **2011**, *692*, 1-25.
- (127) Chirita, R. I.; West, C.; Zubrzycki, S.; Finaru, A. L.; Elfakir, C. *J Chromatogr A* **2011**.
- (128) Zhang, X.; Rauch, A.; Lee, H.; Xiao, H.; Rainer, G.; Logothetis, N. K. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**, *21*, 3621-8.
- (129) ABSciex.
- (130) Bourcier, S.; Benoist, J. F.; Clerc, F.; Rigal, O.; Taghi, M.; Hoppilliard, Y. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2006**, *20*, 1405-21.
- (131) Kirchherr, H. In *Chromatogramme richtig integrieren und bewerten: Ein Praxishandbuch für die HPLC und GC*, Kromidas, S.; Kuss, H.-J., Eds.; Wiley-VCH: Weinheim, 2008, pp 267-283.
- (132) Skoog, D.; West, D.; Holler, F. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 7th ed.; Harcourt Brace College Publishers, 1996.
- (133) Dawson, R. M. C., Elliott, Daphne C, Elliott, William H; et al. *Data for Biochemical Research*, 1959.
- (134) Cohn, E. J.; Edsall, J. T. *Proteins, amino acids and peptides as ions and dipolar ions*; Hafner Pub. Co., 1965.
- (135) Greenstein, J. P., Winitz, M. *Chemistry of the Amino Acids*; John Wiley & Sons: New York, 1961; Vol. Vol. 1.
- (136) Merck, <http://www.sequant.com/default.asp?ML=11528>, 13.05.2014
- (137) Hao, Z.; Xiao, B.; Weng, N. *J Sep Sci* **2008**, *31*, 1449-64.
- (138) Rodriguez-Gonzalo, E.; Garcia-Gomez, D.; Carabias-Martinez, R. *J Chromatogr A* **2011**, *1218*, 3994-4001.
- (139) Mansoori, B. A.; Volmer, D. A.; Boyd, R. K.; John Wiley & Sons, Ltd., 1997, pp 1120-1130.
- (140) YMC Europe GmbH, http://www.ymc-europe.com/ymceurope/files/catalogue/Normal%20Phase_LQ.pdf, 13.05.2014
- (141) Choi, S. S.; Song, M. J.; Kim, O. B.; Kim, Y. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2013**, *27*, 143-51.
- (142) Desai, M. J.; Armstrong, D. W. *J Mass Spectrom* **2004**, *39*, 177-87.
- (143) Kauppila, T. J.; Nikkola, T.; Ketola, R. A.; Kostianen, R. *J Mass Spectrom* **2006**, *41*, 781-9.
- (144) Kostianen, R.; Kauppila, T. J. *J Chromatogr A* **2009**, *1216*, 685-99.
- (145) Robb, D. B.; Covey, T. R.; Bruins, A. P. *Anal Chem* **2000**, *72*, 3653-9.
- (146) Raffaelli, A.; Saba, A. *Mass Spectrom Rev* **2003**, *22*, 318-31.
- (147) Robb, D. B.; Blades, M. W. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1275-1290.
- (148) Marchi, I.; Rudaz, S.; Veuthey, J. L. *Talanta* **2009**, *78*, 1-18.

- (149) Kauppila, T. J.; Bruins, A. P.; Kostianen, R. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* **2005**, *16*, 1399-1407.
- (150) Kauppila, T. J.; Kuuranne, T.; Meurer, E. C.; Eberlin, M. N.; Kotiaho, T.; Kostianen, R. *Anal Chem* **2002**, *74*, 5470-9.
- (151) Cannington, P. H.; Ham, N. S. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena* **1983**, *32*, 139-151.
- (152) NIST, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C108883&Mask=20>, 25.10.2013
- (153) NIST, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67641&Units=SI&Mask=20>, 25.10.2013
- (154) NIST, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C67561&Mask=20>, 25.10.2013
- (155) NIST, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C75058&Mask=20>, 25.10.2013
- (156) Zeleny, J. *Physical Review, The* **1917**, *X*.
- (157) Taylor, G. *Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Mathematical and Physical Sciences* **1964**, *280*, 383-397.
- (158) Kebarle, P.; Tang, L. *Analytical Chemistry* **1993**, *65*, 972A-986A.
- (159) Konermann, L.; Ahadi, E.; Rodriguez, A. D.; Vahidi, S. *Anal Chem* **2012**, *85*, 2-9.
- (160) Höfner, G.; Wanner, K. T. *Neurosci Lett* **2004**, *364*, 53-7.
- (161) Zepperitz, C. *Entwicklung von Bindungsassays mit massenspektrometrischer Quantifizierung eines gebundenen nativen Markers*; LMU München: Verlag Dr. Hut, München, 2007.
- (162) Mand, M. R.; Wu, D.; Veach, D. R.; Kron, S. J. *J Biomol Screen* **2010**, *15*, 434-40.
- (163) Sitte, H. H.; Hiptmair, B.; Zwach, J.; Piffl, C.; Singer, E. A.; Scholze, P. *Mol Pharmacol* **2001**, *59*, 1129-37.
- (164) IUPAC; K. J. R. Rosman; P. D. P. Taylor. *Pure Appl. Chem.* **1998**, *70*, 217-235.
- (165) PALL; Science, L., http://www.pall.com/pdfs/Laboratory/AcroPrepAdvance_LAB_SS.pdf, 25.06.2014
- (166) Robbins, A. K.; Horlick, R. A. *Biotechniques* **1998**, *25*, 240-4.
- (167) Gluzman, Y. *Cell* **1981**, *23*, 175-82.
- (168) Borden, L. A.; Smith, K. E.; Gustafson, E. L.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. *J Neurochem* **1995**, *64*, 977-84.
- (169) Sagi, Y.; Bassar, P. J.; Assaf, Y. *Proc. Intl. Soc. Mag. Reson. Med.* **2009**, *17*, 1390.
- (170) Iversen, L. L.; Neal, M. J. *J Neurochem* **1968**, *15*, 1141-9.
- (171) Bidon-Chanal, A.; Krammer, E.-M.; Blot, D.; Pebay-Peyroula, E.; Chipot, C.; Ravaud, S.; Dehez, F. *The Journal of Physical Chemistry Letters* **2013**, *4*, 3787-3791.
- (172) Andersen, K. E.; Braestrup, C.; Gronwald, F. C.; Jorgensen, A. S.; Nielsen, E. B.; Sonnewald, U.; Sorensen, P. O.; Suzdak, P. D.; Knutsen, L. J. *J Med Chem* **1993**, *36*, 1716-25.
- (173) Gerile; Sogawa, C.; Ohyama, K.; Masuko, T.; Kusama, T.; Morita, K.; Sogawa, N.; Kitayama, S. *International journal of molecular sciences* **2012**, *13*, 2578-89.
- (174) Haylett, D. G. *Textbook of Receptor Pharmacology*, 3rd Edition ed.; CRC Press, Taylor & Francis Group, 6000 Broken Sound Parkway, NW, Suite 300, 2011, p 303.
- (175) Cornish-Bowden, A. *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, 4th ed.; Wiley, 2012.
- (176) Michaelis, L.; Menten, M. M. *FEBS Lett* **2013**, *587*, 2712-20.
- (177) Rasola, A.; Galletta, L. J.; Barone, V.; Romeo, G.; Bagnasco, S. *FEBS Lett* **1995**, *373*, 229-33.
- (178) Sacher, A.; Nelson, N.; Ogi, J. T.; Wright, E. M.; Loo, D. D.; Eskandari, S. *J Membr Biol* **2002**, *190*, 57-73.
- (179) Karakossian, M. H.; Spencer, S. R.; Gomez, A. Q.; Padilla, O. R.; Sacher, A.; Loo, D. D.; Nelson, N.; Eskandari, S. *J Membr Biol* **2005**, *203*, 65-82.
- (180) Bradford, M. M. *Anal Biochem* **1976**, *72*, 248-54.
- (181) Höfner, G.; Wanner, K. T. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2010**, *878*, 1356-64.
- (182) Cornish-Bowden, A.; Wiley, 2012, pp 133-168.
- (183) Johnston, G. A.; Krogsgaard-Larsen, P.; Stephanson, A. *Nature* **1975**, *258*, 627-8.
- (184) Ali, F. E.; Bondinell, W. E.; Dandridge, P. A.; Frazee, J. S.; Garvey, E.; Girard, G. R.; Kaiser, C.; Ku, T. W.; Lafferty, J. J.; Moonsammy, G. I.; et al. *J Med Chem* **1985**, *28*, 653-60.
- (185) Leppik, I. E.; Gram, L.; Deaton, R.; Sommerville, K. W. *Epilepsy Res* **1999**, *33*, 235-46.

- (186) Borden, L. A.; Murali Dhar, T. G.; Smith, K. E.; Weinshank, R. L.; Branchek, T. A.; Gluchowski, C. *Eur J Pharmacol* **1994**, *269*, 219-24.
- (187) Suzdak, P. D.; Frederiksen, K.; Andersen, K. E.; Sorensen, P. O.; Knutsen, L. J.; Nielsen, E. B. *Eur J Pharmacol* **1992**, *224*, 189-98.
- (188) Krogsgaard-Larsen, P.; Frolund, B.; Frydenvang, K. *Current pharmaceutical design* **2000**, *6*, 1193-209.
- (189) Fulep, G. H.; Hoese, C. E.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *Eur J Med Chem* **2006**, *41*, 809-24.
- (190) Thomsen, C.; Sorensen, P. O.; Egebjerg, J. *Br J Pharmacol* **1997**, *120*, 983-5.
- (191) Zhang, J. H.; Chung, T. D.; Oldenburg, K. R. *J Biomol Screen* **1999**, *4*, 67-73.
- (192) Abramson, S. N.; McGonigle, P.; Molinoff, P. B. *Mol Pharmacol* **1987**, *31*, 103-11.
- (193) Wein, T.; Wanner, K. T. *J. Mol. ModVL* **2010**, *16*, 155-161.
- (194) Borden, L. A. *Neurochem Int* **1996**, *29*, 335-56.
- (195) Pabel, J.; Faust, M.; Prehn, C.; Wörlein, B.; Allmendinger, L.; Höfner, G.; Wanner, K. T. *ChemMedChem* **2012**, *7*, 1245-1255.
- (196) Yamauchi, A.; Uchida, S.; Kwon, H. M.; Preston, A. S.; Robey, R. B.; Garcia-Perez, A.; Burg, M. B.; Handler, J. S. *J Biol Chem* **1992**, *267*, 649-52.
- (197) Richerson, G. B.; Gaspary, H. L. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* **1997**, *3*, 151-157.
- (198) Gallagher, S. R. *Detection of Nucleic Acids using Absorbance Spectroscopy*, 4th ed.; Wiley: New York, 1999; Vol. Short protocols in molecular biology.

6. Anhang

6.1. Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromolar
API	Atmospheric Pressure Ionisation
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
CAD	Collisionsgas
cDNA	komplementäre DNA
CE	Collision Energy
cm	Zentimeter
COS	African Green Monkey Kidney cells
cpm	counts per minute
cps	counts per second
CRM	Charge Residue Model
CSF	Cerebrospinalflüssigkeit
CUR	Curtain Gas
CXP	Collision Cell Exit Potential
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„Deoxyribonucleic acid“ / Desoxyribonukleinsäure
DP	Declustering Potential
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EP	Entrance Potential
ESI	Electrospray Ionisation
FCS	Fötales Kälberserum
FDA	Food and Drug Administration
FIA	Flow Injection Analysis
g	Erdbeschleunigung / Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GAT	GABA-Transporter
GS1	Nebulizer Gas
GS2	Auxiliary Gas
GU	Gesamt Uptake
HEK	Human Embryonic Kidney cells
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hGAT	humaner GAT
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HTS	High Throughput Screening
IC50	Mittlere Inhibitorische Konzentration
IEM	Ion Evaporation Model
ihe	interface Heater
IS	Ionspray Voltage
k	Kapazitätsfaktor
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LC	Liquid Chromatography
LeuT	Leucin Transporter
LLOQ	Lower Limit of Quantification

M	Molar
m	Meter
MCS	Multiple Cloning Site
mGAT	muriner GAT
min	Minute
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Massenspektrometer / Massenspektrometrie
MS/MS	Tandem MS
nM	Nanomolar
NSS	Neurotransmitter Sodium Symporter
NU	nicht-spezifischer Uptake
OD	optische Dichte
pM	Pikomolar
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
rGAT	rat GAT
RP	Reversed Phase
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SD	Standard Deviation
SEM	Standard Error of the Mean
SLC6	Solute Carrier Family 6
SRM	Single Reaction Monitoring
SU	spezifischer Uptake
TEM	Temperatur
TIC	Total ion Current
TM	Transmembranäre Helix
t _R	Retentionszeit
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	unit
ZNS	Zentrales Nervensystem