

**Einfluss der
Johanniskrautinhaltstoffe
Hyperforin, Hyperosid und Hypericin
auf die laterale Mobilität und die
Signaltransduktion von
5-HT_{1A}-Rezeptoren**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Daniel Philipp Jakobs

aus

Köln

Bonn 2014

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Hanns Häberlein

2. Gutachter: Prof. Dr. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 14.04.2014

Erscheinungsjahr: 2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Depressive Erkrankungen	2
1.2	Antidepressiva	4
1.3	Johanniskraut	6
1.4	Johanniskraut bei depressiven Erkrankungen.....	8
1.5	Wirkungsmechanismus von Johanniskrautextrakt	9
1.6	5-HT _{1A} -Rezeptor	12
1.7	Involvierung des 5-HT _{1A} -Rezeptors in depressiven Störungen	13
1.8	Untersuchung der 5-HT _{1A} -Rezeptoren	15
1.9	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie	18
1.10	Einzelmolekülverfolgung	22
1.10.1	Sprungweitenanalyse	23
1.10.2	Analyse des mittleren Verschiebungsquadrates	24
1.11	Zielsetzung	26
2	Ergebnisse	27
2.1	Etablierung der C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen.....	28
2.2	Synthese eines fluoreszierenden Liganden.....	30
2.2.1	Kopplung EL409 mit Alexa Fluor® 532	33
2.3	Charakterisierung der lateralen Mobilität des 5-HT _{1A} -ST-Rezeptors in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen.....	39
2.3.1	Einzelmolekülverfolgung von 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren	39
2.3.2	FCS Untersuchungen von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen.....	43
2.3.3	FCS Untersuchungen von EL409-Alexa532 an C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	44
2.4	Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die laterale Mobilität des 5-HT _{1A} -ST-Rezeptors in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	47
2.4.1	SPT-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf das Verhalten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren.....	47
2.4.2	FCS-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf das Verhalten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren.....	53
2.4.3	FCS-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die laterale Mobilität von EL409-Alexa532-5-HT _{1A} -ST-Rezeptor-Komplexen in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	58
2.4.4	Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die Signaltransduktion der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren	62

3	Diskussion.....	69
3.1	Diskussion	70
3.2	Schlussfolgerungen und Ausblick	97
3.3	Zusammenfassung.....	99
4	Material und Methoden	101
4.1	Material.....	102
4.1.1	Chemikalien.....	102
4.1.2	Lösungen.....	102
4.2	Methoden	104
4.2.1	Synthese von EL409-Alexa532	104
4.2.2	Generierung einer stabil transfizierten C6-5-HT _{1A} -SNAP-tag Zelllinie.....	105
4.2.3	cAMP-Assay	106
4.2.4	Fluoreszenzmikroskopie.....	106
4.2.5	Lebendzellmessungen.....	107
4.2.6	Anfärben und Fixierung der C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen.....	107
4.2.7	FCS-Messungen.....	108
4.2.8	Einzelmolekülverfolgung.....	109
4.2.9	Statistische Auswertung	110
5	Abbildungsverzeichnis	111
6	Tabellenverzeichnis	113
7	Literaturverzeichnis	114
8	Anhang.....	125
8.1	Publikationen	125
8.2	Poster	125

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ACC	Autokorrelationskurve
AGT	O-6-Alkylguaninalkyltransferase
AOM	Akustooptischer Modulator
APD	Lawinenphotodiode
B_{max}	Maximale Bindungsdichte
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
DDD	Definierte Tagesdosis
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMA	Europäische Arzneimittel-Agentur
EMCCD	electron multiplying charge-coupled device
eYFP	Enhanced yellow fluorescent protein
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Fluorescence Recovery after Photobleaching
FST	Forced Swimming Test
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK	G protein-coupled inwardly-rectifying K ⁺ channel
GFP	Green fluorescent protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat
HMPC	Committee on Herbal Medicinal Products
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
ICD-10	International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems
JD	Sprungweitenverteilung
K_D	Dissoziationskonstante
MAO	Monoaminoxidase
MAO-Hemmer	Monoaminoxidasehemmer
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure

MS	Massenspektrometrie
MSD	Mittleres Verschiebungsquadrat
NRI	Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Ph. Eur.	Europäisches Arzneibuch
RLK	Rezeptor-Ligand-Komplex
SPT	Single particle tracking
SSNRI	Selektiver Serotonin-Noradrenalin- Wiederaufnahmehemmer
SSRI	Selektiver Serotonin-Wiederaufnahmehemmer
TZA	Trizyklisches Antidepressivum
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Depressive Erkrankungen

Depressive Erkrankungen sind weit verbreitet. Ca. 17 % der Bevölkerung in den Vereinigten Staaten von Amerika sind im Laufe ihres Lebens davon betroffen [1]. Je nach untersuchtem Land variiert die Lebenszeitprävalenz jedoch [2]. Depressionen weisen eine hohe Komorbidität auf [3-6] und sind eine der Hauptursachen für Arbeitsunfähigkeit [7]. Frauen sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Männer [8].

Nach der internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (ICD-10, *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*) werden als Symptome für depressive Episoden unter anderem gedrückte Stimmung, Antriebslosigkeit, verminderte Konzentrationsfähigkeit, Agitiertheit, Schlafstörungen, vermindertes Selbstvertrauen und Selbstwertgefühl sowie Verlust von Gewicht als auch der Libido genannt. Je nach Anzahl der auftretenden Symptome wird zwischen leichten, mittelgradigen und schweren Episoden unterschieden. Treten wiederholt depressive Episoden auf, wird von einer rezidivierenden depressiven Störung gesprochen. Der Fülle der Symptome entsprechend vielfältig sind auch mögliche Ursachen und Therapiemöglichkeiten. Zum jetzigen Zeitpunkt ist noch keine endgültige, schlüssige Erklärung dafür gefunden worden, wie eine depressive Erkrankung entsteht jedoch gibt es mehrere Theorien. Ende der 1950er Jahre wurde durch Zufall das antidepressive Potential von Imipramin entdeckt und dessen Wirkungsmechanismus als eine Wiederaufnahmehemmung verschiedener Botenstoffe im zentralen Nervensystem (ZNS) entschlüsselt [9]. In der Folge entwickelte sich unter anderem daraus die Monoamin-Theorie [10]. Diese nimmt an, dass Depressionen durch Defizite der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin im Gehirn verursacht werden. Eingesetzte Medikamente, die solche Defizite in kurzer Zeit beheben, führen allerdings nicht direkt zu einer Linderung, sondern benötigen mehrere Tage bis Wochen, ehe diese ihre antidepressive Wirkung zeigen [11]. Daher ist davon auszugehen, dass erst die durch diese Medikamente angestoßenen Anpassungsmechanismen für die Wirkung der Antidepressiva verantwortlich sind [12]. Diese funktionellen und strukturellen adaptiven Veränderungen von Neuronen im ZNS werden als Neuroplastizität bezeichnet. Dabei werden präsynaptische Veränderungen wie beispielsweise eine Reduktion der Neurotransmitterausschüttung

pro Aktionspotential und postsynaptische Veränderungen wie zum Beispiel eine erhöhte Rezeptordichte unterschieden.

Auf molekularer Ebene steht das serotonerge Rezeptorsystem im Mittelpunkt der meisten antidepressiven Strategien [13]. Hier ist eine Erhöhung der mittels Serotonin übertragenen Signaltransmission erwünscht. Bedingt durch ihre enge Verschaltung beeinflussen sich serotonerge, noradrenergen und dopaminergen Neuronen im ZNS gegenseitig [13, 14]. Eine Erhöhung der serotonergen Transmission schwächt beispielsweise noradrenerge Transmissionen ab [15]. Neben Medikamenten, die die serotonerge Transmission erhöhen sollen, gibt es auch Antidepressiva, die über noradrenerge und dopaminerge Neuronen vermittelt eine antidepressive Wirkung erreichen. Daraus kann im Einzelfall geschlossen werden, dass bei bestimmten Patienten verschiedene Rezeptoren in die depressive Erkrankung involviert sind [14]. Die meisten Antidepressiva besitzen neben ihrem Hauptwirkungsmechanismus Affinitäten für weitere Rezeptoren im ZNS. Dies könnte erklären, warum bestimmte Medikamente bei bestimmten Patienten besser wirken als bei anderen [13].

Neben biologischen Ursachen können auch kognitive Verarbeitungsmuster, chronischer Stress oder psychosoziale Faktoren bei der Entstehung einer depressiven Erkrankung eine Rolle spielen [16-18]. Erkrankte Personen können psychotherapeutisch, mit physikalischen Maßnahmen oder mittels Pharmakotherapie behandelt werden. Nach der S3-Leitlinie „Unipolare Depression“ soll beim Auftreten der Symptome einer leichten Depression zunächst aktiv abgewartet werden [19]. Persistiert die Symptomatik mehr als 14 Tage, soll eine Therapie begonnen werden. Bei mittelschweren Depressionen soll entweder eine Pharmako- oder eine Psychotherapie durchgeführt werden. Bei einer schweren Depression wird eine Kombinationstherapie empfohlen.

1.2 Antidepressiva

Die S3-Leitlinie „Unipolare Depression“ teilt Antidepressiva in sechs Gruppen ein: trizyklische Antidepressiva (TZA), selektive Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI), Monoaminoxidasehemmer (MAO-Hemmer), weitere Antidepressiva, Lithium-Salze und Phytotherapeutika. SSRI verhindern die Wiederaufnahme von ausgeschüttetem Serotonin an der präsynaptischen Membran und sind relativ nebenwirkungsarm. TZA hemmen vergleichsweise unspezifisch die Aufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin im ZNS [20]. Sie weisen im Vergleich zu SSRI ein höheres Potential für Nebenwirkungen auf und sind daher nicht mehr *first-line* Therapeutika [21]. In Fällen von starken Depressionen, in denen die Therapie mit SSRI erfolglos bleibt, werden sie weiterhin angewandt. MAO-Hemmer blockieren das Enzym Monoaminoxidase (MAO), welches im ZNS die Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin und Dopamin abbaut. Eine Blockade dieses Enzyms erhöht dementsprechend die Konzentration dieser Botenstoffe im Gehirn [22]. Patienten, die ein solches Antidepressivum einnehmen, müssen allerdings eine streng tyraminarme Diät einhalten. Tyramin ist ein in vielen Nahrungsmitteln vorkommendes biogenes Amin, welches über die MAO abgebaut wird. Es wirkt indirekt sympathomimetisch und kann sich bei fehlendem Abbau aufgrund einer MAO-Hemmer-Therapie anreichern und infolgedessen zu lebensgefährlichen Blutdruckanstiegen führen [23]. Unter „Weitere Antidepressiva“ werden verschiedene Substanzgruppen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zusammengefasst. Unter anderem finden hier die selektiven Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (SSNRI), tetrazyklische Antidepressiva und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer (NRI) Erwähnung. Lithium-Salze wird vor allem in der Phasenprophylaxe rezidivierender Depressionen sowie zur Augmentation einer nicht suffizienten Therapie mit einem Antidepressivum eingesetzt.

Ebenfalls Verwendung zur Therapie von Depressionen findet das Phytopharmakon Johanniskrautextrakt. Dieses unterscheidet sich von anderen Antidepressiva vor allem durch seine Komposition. Der Extrakt aus *Hyperici herba* setzt sich aus verschiedenen Inhaltsstoffen zusammen, die potentiell unterschiedliche, sich teilweise ergänzende Wirkungsmechanismen aufweisen können [24].

In Deutschland wurden im Jahr 2011 339 Millionen definierte Tagesdosen (DDD, *defined daily doses*) des SSRI Citalopram verordnet [25]. Am zweithäufigsten wurde

das tetrazyklische Antidepressivum Mirtazapin verschrieben (150 Mio. DDD). Es folgen der SSNRI Venlafaxin (124 Mio. DDD) sowie die TZA Amitriptylin (95 Mio. DDD) und Opipramol (80 Mio. DDD). Johanniskrautpräparate wurden 2011 in einer Menge von 33 Mio. DDD verordnet. Interessanterweise spielte der Hauptvertreter der Gruppe der MAO-Hemmer Tranylcypromin mit 3 Mio. DDD in den Verordnungszahlen nur eine untergeordnete Rolle [24].

1.3 Johanniskraut

Der lateinische Name von Johanniskraut lautet *Hypericum perforatum* L.. Es gehört zur Familie der Hypericaceae. Die Monographie des Europäischen Arzneibuches (Ph. Eur.) definiert *Hyperici herba* als während der Blütezeit geerntete, ganze oder geschnittene, oberirdische Teile von *Hypericum perforatum* L.. Es wird ein Mindestgehalt von 0,08 % Gesamthypericine gefordert, berechnet als Hypericin und bezogen auf die getrocknete Droge. Zur Herstellung eines Trockenextraktes können Methanol (50 - 80 %) oder Ethanol (50 - 80 %) als Extraktionsmittel verwendet werden. Der Extrakt muss einen Mindestgehalt von 0,1 - 0,3 % Hypericine und 6 % Flavonoide (berechnet als Rutin) aufweisen und darf einen Maximalgehalt von 6 % Hyperforin nicht überschreiten.

Aufbauend auf der Johanniskrautmonographie des Ph. Eur. hat das *Committee on Herbal Medicinal Products* (HMPC) der Europäischen Arzneimittel-Agentur (EMA) eine Monographie für den *well-established medical use* von *Hypericum perforatum* L., *Herba* herausgebracht. In dieser werden die Kriterien für die Herstellung eines Johanniskrauttrockenextraktes deutlich enger definiert. Als Indikationen werden darin leichte bis mittelgradige depressive Episoden sowie die kurzzeitige Behandlung der Symptome einer leichten depressiven Störung definiert. Darüber hinaus werden Dosierung, Behandlungsdauer, Wechselwirkungen und Kontraindikationen aufgelistet. Es wird davor gewarnt sich während der Behandlung zu starker UV-Strahlung auszusetzen. Es wird festgestellt, dass verschiedene Inhaltsstoffe des Johanniskrautextraktes zur antidepressiven Wirksamkeit beitragen. Bei diesen handele es sich um Naphthodianthrone, Phloroglucinole und Flavonoide. Des Weiteren werden Bioverfügbarkeit sowie Eliminationshalbwertszeit angegeben. Es wird darauf aufmerksam gemacht, dass keine Hinweise auf Toxizität oder Mutagenität von Johanniskrautextrakt vorliegen.

Für die vorliegende Arbeit wurden die mengenmäßigen Hauptvertreter der von der EMA als wirksamkeitsmitbestimmend eingestuften Gruppen ausgewählt und ihr Einfluss auf die laterale Mobilität und die Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors untersucht. Bei den Hauptvertretern handelt es sich um das Flavonoid Hyperosid, das Phloroglucinol Hyperforin und das Naphthodianthron Hypericin (Abbildung 1.1).

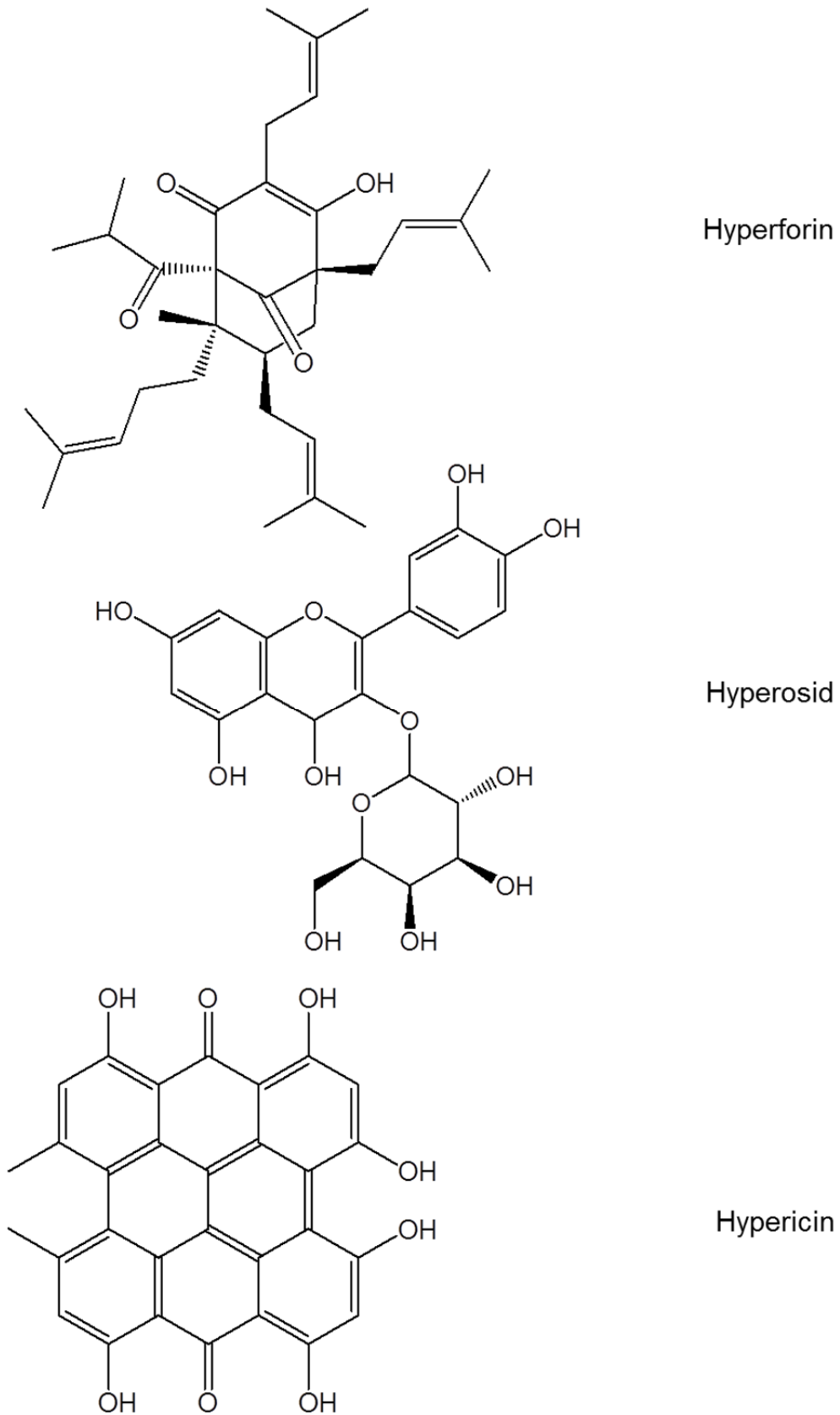


Abbildung 1.1: Strukturformeln von Hyperforin, Hyperosid und Hypericin

1.4 Johanniskraut bei depressiven Erkrankungen

Johanniskrautextrakt ist bei leichten bis mittelgradigen depressiven Episoden indiziert und für den Einsatz bei mittelgradigen Episoden verschreibungspflichtig. Darüber hinaus kann er für die kurzzeitige Behandlung der Symptome einer leichten depressiven Störung eingesetzt werden. Ein Cochrane Review aus dem Jahr 2009 [26] hat die Ergebnisse aus 29 klinischen Studien mit insgesamt 5489 Patienten, die für vier bis zwölf Wochen mit Johanniskrautextrakt behandelt wurden, analysiert. Die Autoren kommen zu dem Schluss, dass eine Behandlung mit Johanniskrautextrakt im Vergleich zu Placebo überlegen und einer Behandlung mit Standardantidepressiva ebenbürtig ist. Darüber hinaus stellen die Autoren ein geringeres Nebenwirkungspotential für Johanniskrautextrakt im Vergleich zu synthetischen Antidepressiva fest.

Sie weisen außerdem darauf hin, dass sich die Zusammensetzung der verfügbaren Johanniskrautextrakte zum Teil sehr stark unterscheidet. Daher könnten die Ergebnisse des Reviews nur auf die in den Studien getesteten Johanniskrautextrakte bezogen werden.

1.5 Wirkungsmechanismus von Johanniskrautextrakt

Johanniskrautextrakt beinhaltet verschiedene potentiell wirksame Substanzen. Es liegt bereits eine Fülle von Daten zu den Wirkungen vieler dieser Substanzen vor [24, 27]. Allerdings hat sich bisher keiner der Inhaltsstoffe als der alleinige, für die antidepressive Wirkung verantwortliche Inhaltsstoff herauskristallisiert. Hinzu kommt, dass der Extrakt Substanzen enthält, die für sich keine antidepressive Wirkung besitzen, aber für die Wirkung des Extraktes essentiell zu sein scheinen [24]. Daher ist nach jetzigem Kenntnisstand davon auszugehen, dass der Gesamtextrakt für die antidepressive Wirkung verantwortlich ist [28].

In den vergangenen Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, die für die Wirkung von Johanniskrautextrakt verantwortlichen Einzelsubstanzen zu identifizieren. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf Hypericin, Hyperosid und Hyperforin gelegt. So konnte für Hypericin eine antidepressive Wirkung im *Forced Swimming Test* (FST) nachgewiesen werden [29]. Eine achtwöchige Gabe von Hypericin führte im Hypothalamus von Ratten zu einer Erhöhung der Serotoninkonzentration und zu einer Senkung der Noradrenalkonzentration im Hippocampus [30]. Außerdem senkte Hypericin den mRNA-Spiegel des 5-HT_{1A}-Rezeptors im Hippocampus [31].

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte ein Effekt von Hyperosid und Hyperforin auf β_1 - und β_2 -Rezeptoren in C6-Zellen nachgewiesen werden. So führte eine Vorinkubation mit Hyperosid oder Hyperforin zu einer Internalisierung von β_1 -Rezeptoren am postsynaptischen C6-Zellmodell unter nicht stimulierenden Bedingungen [32]. Darüber hinaus konnte eine veränderte laterale Mobilität der auf der Zelloberfläche verbliebenen Rezeptoren beobachtet werden. Nach dreitägiger Vorinkubation von C6-Zellen mit Hyperforin und Hyperosid stieg der Anteil der weniger mobilen Rezeptorpopulation an und der Anteil der mobileren Rezeptorpopulation sank, was eine Abnahme in der Rezeptoraktivität anzeigt. Dieser Effekt setzte sich auch in der Signaltransduktion der β_1 -Rezeptoren fort und die cAMP-Spiegel der C6-Zellen waren nach Vorinkubation mit Hyperforin und Hyperosid niedriger als in Kontrollzellen [32].

Eine Internalisierung von β_2 -Rezeptoren konnte nach Vorinkubation von C6-Zellen mit Hyperforin und Hyperosid nicht beobachtet werden [33]. Allerdings zeigte sich

auch hier ein Anstieg der weniger mobilen Rezeptor-Ligand-Komplexe zu Ungunsten der mobileren Rezeptor-Ligand-Komplexe. Des Weiteren konnte die Abnahme der Bindungsaffinität eines β_2 -Rezeptor-Agonisten nach Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin und Hyperosid gezeigt werden, die sich in einer verminderten cAMP-Produktion nach Stimulation der β_2 -Rezeptoren mittels Terbutalin fortführte [33].

Für Hyperforin konnte außerdem eine Hemmung der Wiederaufnahme von Serotonin, Noradrenalin und Dopamin beobachtet werden [34]. Auf molekularer Ebene geschieht diese Hemmung allerdings nicht durch eine direkte Blockade der Neurotransmittertransporter, wie es beispielsweise SSRI bewerkstelligen, sondern indirekt durch eine Aktivierung von TRPC6-Kanälen [35, 36]. Werden diese Kanäle aktiviert, kommt es zu einer Erhöhung der intrazellulären Na^+ - und Ca^{2+} -Konzentrationen. Als Folge schwächt sich der Gradient dieser Kationen an der Zellmembran der Nervenzellen von außen nach innen ab [37]. Aber eben dieser Gradient ist für einen effektiven Rücktransport der Neurotransmitter in die Nervenzellen essentiell. Fehlt er, ist die Wiederaufnahme der Neurotransmitter gehemmt.

Hyperforin ist neben diesen erwünschten Wirkungen auch für eine unerwünschte Arzneimittelwirkung verantwortlich. Es induziert die Cytochrom P450 Enzyme CYP3A4, CYP2C9 und CYP2C19 sowie P-Glykoprotein [38], indem es den Pregnan-X-Rezeptor dosisabhängig aktiviert [38, 39]. Dieser Rezeptor ist für die Erkennung von xenobiotischen, toxischen Stoffen verantwortlich und reguliert bei Aktivierung die Expression der Cytochrom P450 Enzyme hoch [40]. Damit verbunden kommt es zu teilweise kritischen Wechselwirkungen zwischen Johanniskrautextrakt und diversen Arzneistoffen, unter anderem mit Immunsuppressiva [41], antiretroviralen Medikamenten [42], Zytostatika [43], Antibiotika [42], oralen Kontrazeptiva [44] und Antikoagulantien [45], die über besagte Cytochrom Enzyme abgebaut werden. Eine gleichzeitige Gabe von Johanniskrautextrakt und Immunsuppressiva, antiretroviralen Medikamenten und Zytostatika ist kontraindiziert.

Neben diesen erwünschten wie unerwünschten Effekten einzelner Inhaltsstoffe konnten mehrere, als pharmokinetische Synergien bezeichnete Effekte des Johanniskrautextraktes beobachtet werden [28]. Eine pharmakokinetische Synergie konnte zum Beispiel für das Flavonoid Rutin nachgewiesen werden [46]. So zeigte weder Rutin als Reinsubstanz noch ein rutinarmer Johanniskrautextrakt eine antidepressive Wirksamkeit bei Ratten im FST. Wurde dem rutinarmen Extrakt

allerdings Rutin hinzugefügt, so konnte eine antidepressive Wirkung im FST festgestellt werden. Als Ursache dafür wird eine durch Rutin vermittelte, verbesserte Bioverfügbarkeit von wirksamkeitsmitbestimmenden Bestandteilen des Extraktes diskutiert. Für Procyanidine konnte gezeigt werden, dass sie die Löslichkeit von Hypericin in Wasser um das 120-fache erhöhen [29]. Auch die Bioverfügbarkeit von Hypericin in Ratten wurde durch Procyanidine erhöht und stieg um 60 % [47].

1.6 5-HT_{1A}-Rezeptor

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) aus der Familie der Serotoninrezeptoren [48]. Er ist der am weitesten verbreitete Rezeptor dieser Familie und ist vor allem im ZNS lokalisiert [49]. Dort kommt er im Hippocampus, der Amygdala, in der Hirnrinde und in den Raphe-Kernen vor. Er ist in Lernvorgänge [50, 51], Sexualverhalten [52, 53], zentrale Blutdruckregulation [54] und Regulierung der Körpertemperatur [55-57] involviert. Darüber hinaus ist er ein Angriffspunkt für die Therapie von depressiven Erkrankungen und Angststörungen [58, 59]. Im Bereich der Raphe-Kerne kommt er hauptsächlich als somatodentritischer Autorezeptor und im Hippocampus, der Amygdala und in der Hirnrinde hauptsächlich als postsynaptischer Rezeptor vor. Die 5-HT_{1A}-Autorezeptoren vermitteln einen sehr schnell reagierenden Rückkopplungsmechanismus. Eine Ausschüttung von Serotonin verhindert durch seine Bindung an diese Autorezeptoren eine weitere Freisetzung von Serotonin [60, 61].

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist mit dem G-Protein G_i gekoppelt, welches wiederum das Enzym Adenylylcyclase (AC) hemmt [62]. Bei Aktivierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors kommt es infolgedessen zu einer verminderten Produktion des *Second Messengers* cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP). Aufgrund des niedrigeren cAMP-Spiegels wird die Proteinkinase A weniger stark aktiviert und in Nervenzellen werden rezeptorgesteuerte Kaliumkanäle GIRK (*G protein-coupled inwardly-rectifying K⁺ channel*) geöffnet [63]. Durch offene Kaliumkanäle fließt Kalium entlang des Konzentrationsgradienten aus dem Zellinneren hinaus. Es kommt zu einer Hyperpolarisation der Nervenzelle und infolgedessen zu einer verminderten Erregbarkeit der Zelle [64].

1.7 Involvierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors in depressiven Störungen

Eine Involvierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors in depressiven Störungen kann als gesichert angesehen werden [65]. So ist die Anzahl der postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Gehirn depressiver Menschen zumeist erniedrigt. Dies konnte unter anderem mittels Positronen-Emissions-Tomographie-Untersuchungen (PET-Untersuchungen) festgestellt werden [66, 67]. Die Dichte präsynaptischer Autorezeptoren ist hingegen erhöht [68, 69]. Mäuse, denen das Gen für den 5-HT_{1A}-Rezeptor fehlt, weisen angststörungsähnliche Symptome auf [70], die nicht auf eine SSRI-Therapie ansprechen [71]. Frühe postnatale Expression des Rezeptors im Vorderhirn dieser Knockout-Mäuse verhindert das Auftreten der angststörungsähnlichen Symptome [72].

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist ein Angriffspunkt vieler Antidepressiva. Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten wie beispielsweise Flesinoxan antidepressive Effekte in Ratten zeigt [73]. Auch für die Wirkung von SSRI spielt der 5-HT_{1A}-Rezeptor eine wichtige Rolle. Diese erreichen innerhalb kurzer Zeit nach Gabe das ZNS und blockieren dort unmittelbar Serotonintransporter [74]. Infolgedessen wird die Wiederaufnahme von ausgeschüttetem Serotonin zurück in die Nervenzellen verhindert, und es kommt zu einem Anstieg der zentralnervösen Serotoninkonzentration im synaptischen Spalt [75]. Die erhöhte Serotoninkonzentration aktiviert wiederum den Rückkopplungsmechanismus der 5-HT_{1A}-Autorezeptoren, welcher eine weitere Ausschüttung des Botenstoffes verhindert. Die chronische Gabe von SSRI führt dazu, dass die Autorezeptoren in Folge des anhaltend erhöhten Serotoninspiegels desensitiviert werden [76, 77]. Durch die Desensitivierung der 5-HT_{1A}-Autorezeptoren fällt deren Hemmung auf die Raphe-Neurone weg. Diese können vermehrt Aktionspotentiale weiterleiten, wodurch sich der Serotoninspiegel an den postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren langfristig erhöht [75, 76].

Die Tatsache, dass die negative Rückkopplung durch die 5-HT_{1A}-Autorezeptoren anfangs die Erhöhung der Serotoninkonzentration durch SSRI aufhebt, und es erst nach Desensitivierung der Autorezeptoren zu einem dauerhaften Anstieg der Serotoninkonzentration kommt, wird als einer der Gründe für die Verzögerung des Wirkeintritts von Antidepressiva verantwortlich gemacht [78, 79].

Interessanterweise ist selbst bei chronischer Gabe von SSRI der Rückkopplungsmechanismus der Autorezeptoren nicht vollständig unterdrückt. So können starke Anstiege des Serotoninspiegels nach massiver Stimulation entsprechender Neuronen weiterhin verhindert werden [80].

Mit Vilazodon wurde 2011 der erste Arzneistoff, der die Wirkprinzipien eines SSRI mit denen eines Partialagonisten am 5-HT_{1A}-Rezeptor kombiniert, von der amerikanischen Arzneimittelbehörde FDA zugelassen. Durch diese Kombination soll ein schnelleres Einsetzen des antidepressiven Effektes des Präparates im Vergleich zu anderen Antidepressiva erreicht werden [81, 82].

1.8 Untersuchung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor und seine Signaltransduktion sind für die Pathophysiologie und Therapie depressiver Störungen von großer Bedeutung. Die laterale Mobilität des Rezeptors auf der Zelloberfläche beeinflusst dessen Signaltransduktion und ist ihrerseits wiederum abhängig von Interaktionen des Rezeptors mit membranären oder intrazellulären Bestandteilen [83].

Mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Einzelmolekülverfolgung kann die laterale Mobilität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren bestimmt und die Dynamiken der Rezeptoren in der Membran sowie eventuell auf sie vorhandene Einflüsse von Johanniskrautinhaltstoffen charakterisiert werden [84, 85].

Voraussetzung für solche Untersuchungen ist eine Fluoreszenzmarkierung des Rezeptors oder alternativ eines Liganden. Der Rezeptor kann beispielsweise durch eine Kopplung mit einem SNAP-tag markiert werden. Bei dem SNAP-tag handelt es sich um das genetisch modifizierte DNS-Reparaturenzym O-6-Alkylguanin-alkyltransferase (AGT), welches an den Rezeptor gentechnisch angehängen werden kann [86]. Es ist in der Lage, Farbstoffe, die als Benzylguaninderivat vorliegen, kovalent zu binden (Abbildung 1.2). Dies ermöglicht, den 5-HT_{1A}-Rezeptor nach Wunsch mit einem synthetischen Farbstoff zu verknüpfen. Der SNAP-tag kann sowohl an den N-Terminus als auch an den C-Terminus des 5-HT_{1A}-Rezeptors gehängt werden. Wird er an den intrazellulären C-Terminus angehängen, so müssen Farbstoffe zum Koppeln an den SNAP-tag membrangängig sein.

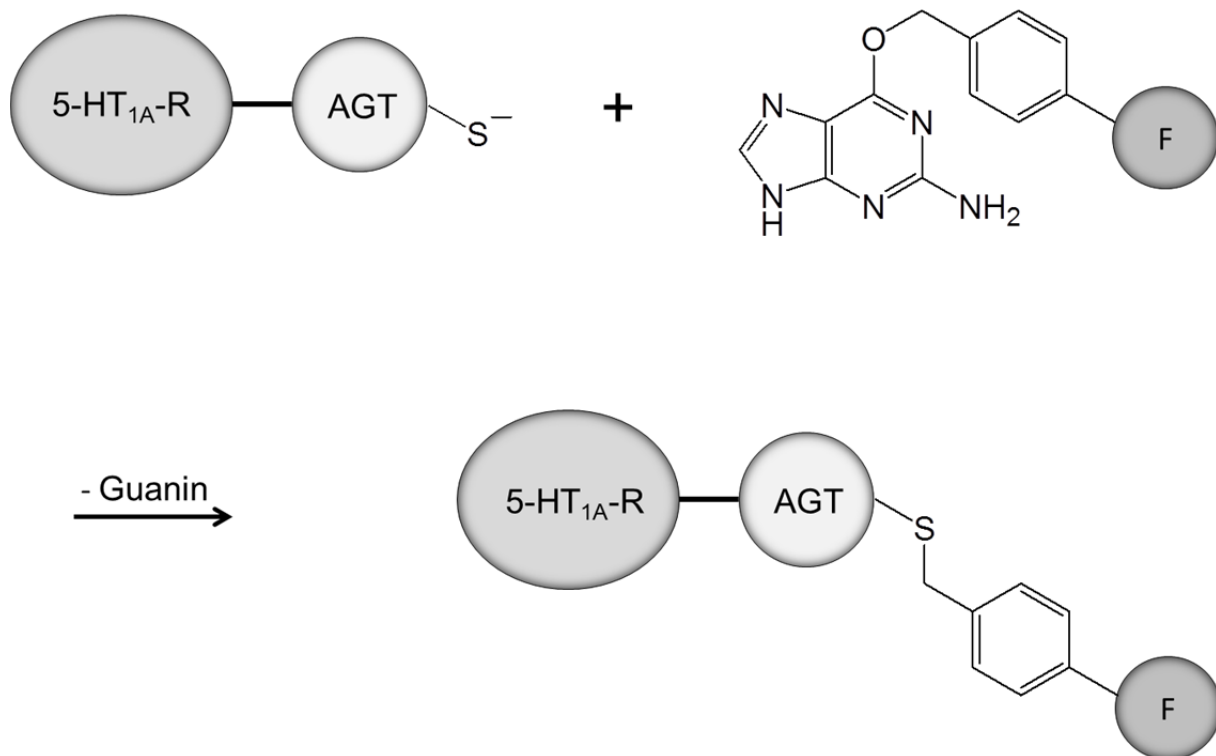


Abbildung 1.2: Fluoreszenzmarkierung eines AGT-5-HT_{1A}-Rezeptor-Fusionsproteins

An das Fusionsprotein, bestehend aus dem 5-HT_{1A}-Rezeptor (5-HT_{1A}-R) und der O-6-Alkylguaninalkyltransferase (AGT), wird ein Farbstoff (F) als Benzylguanin-Farbstoff-Derivat gekoppelt. Bei der Reaktion wird Guanin frei.

Auch eine Kopplung des Rezeptors mit einem autofluoreszierenden Protein, beispielsweise GFP, wäre möglich. Autofluoreszierende Proteine weisen allerdings keine hohe Photostabilität auf und bleichen bei intensiver Laserbestrahlung schnell aus [87]. Synthetische Farbstoffe, die an den SNAP-tag gekoppelt werden können, besitzen diese Problematik nicht. Darüber hinaus sind sie in verschiedenen Varianten mit unterschiedlichen Absorptions- und Emissionscharakteristika verfügbar. So kann bei Bedarf zum Beispiel auf längerwellige Varianten ausgewichen werden, wodurch störende Autofluoreszenz während des Experiments minimiert wird [88, 89].

Um die laterale Mobilität belegter 5-HT_{1A}-Rezeptoren und den Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe auf diese zu untersuchen, musste ein fluoreszierender 5-HT_{1A}-Rezeptor Ligand gefunden werden. Für eine Synthese eines derartigen Liganden stehen grundsätzlich zwei Strategien zur Auswahl [90]. Entweder wird ein bereits bekannter Ligand mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt oder ein fluoreszierender Ligand wird vollständig *de-novo* synthetisiert. Ein solcher Ligand muss eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen und für die Messung an lebenden Zellen

geeignet sein. Darüber hinaus sollte der Farbstoffanteil nicht die Bindung des Liganden an den Rezeptor stören und der Ligand als solcher sollte eine geringe unspezifische Bindung und eine hohe photophysikalische Stabilität aufweisen [90].

1.9 Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) ist eine biophysikalische Methode, die es erlaubt, einzelne Moleküle zu detektieren und Aussagen über deren Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration zu treffen [84]. In der FCS wird ein Laser so fokussiert, dass ein 0,1 – 1 fl großes Volumenelement entsteht. Diffundieren fluoreszierende oder fluoreszenzmarkierte Teilchen durch dieses Volumenelement, emittieren sie Photonen, die mit Hilfe einer Lawinenphotodiode (APD, *avalanche photodiode detector*) detektiert werden. Die Fluktuationen der Photonenemissionen werden über die Zeit korreliert.

Die Hauptkomponenten eines FCS-Aufbaus sind ein konfokales Mikroskop, das typischerweise mit einem Wasserimmersionsobjektiv ausgestattet ist, ein Exzitationsfilter, ein dichroitischer Spiegel, ein Emissionsfilter, eine Lichtquelle, eine Lochblende und ein hochempfindlicher Detektor (Abbildung 1.3). Das Laserlicht wird durch den Exzitationsfilter und den dichroitischen Spiegel über das Objektiv in die Probe fokussiert. Das von der Probe emittierte Licht längerer Wellenlänge wird vom Objektiv aufgefangen und passiert den dichroitischen Spiegel, der das Anregungslicht hingegen nicht durchtreten lässt. Das emittierte Licht wird zunächst durch einen Emissionsfilter und von dort über eine variable Lochblende zur APD geleitet. Die räumliche Definition des Beobachtungselementes ist von dem Durchmesser und der Position der Lochblende abhängig [91]. Jedes von dem Detektor aufgefangene Photon löst einen lawinenartigen Strompuls aus, der an einen Hardwarekorrelator übermittelt wird. Der Hardwarekorrelator wiederum generiert die Autokorrelationskurve (ACC) aus den Fluoreszenzfluktuationen.

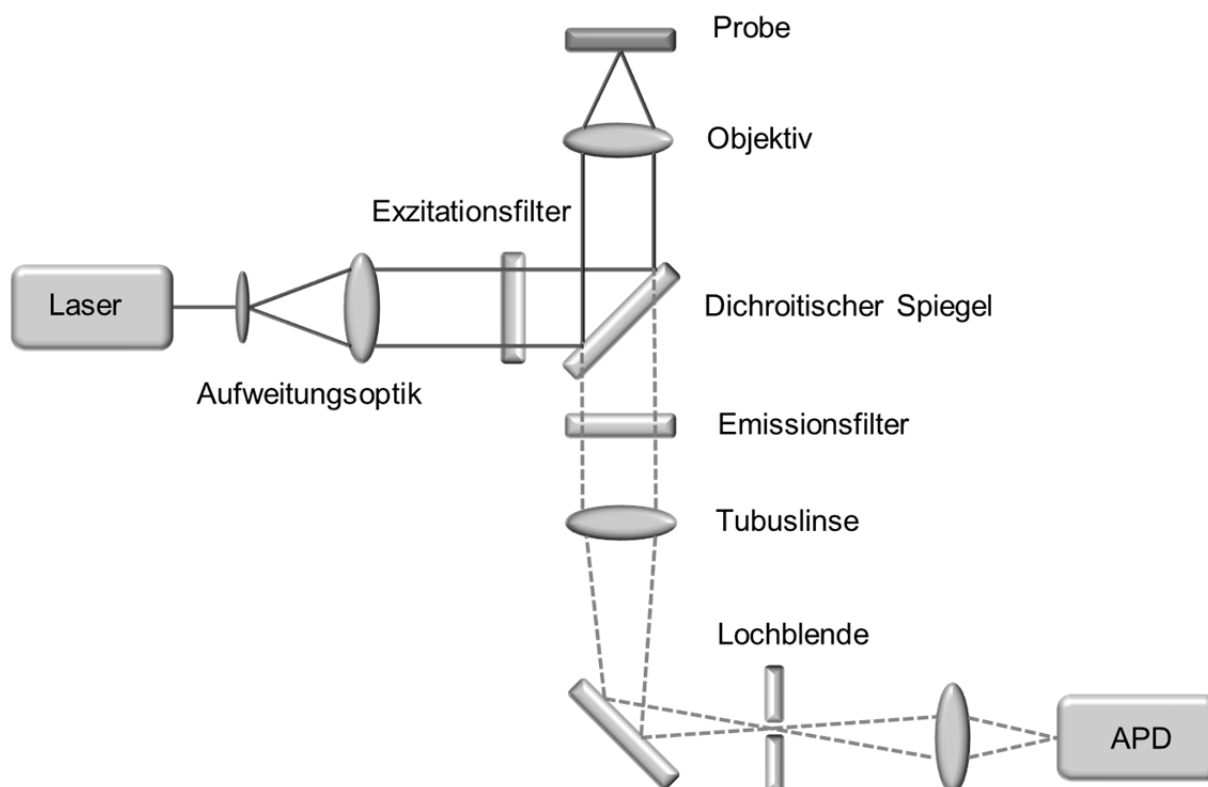


Abbildung 1.3: Aufbau eines Fluoreszenzkorrelationspektroskops

Die Autokorrelationskurve kann durch die Autokorrelationsfunktion ($G(\tau)$) für dreidimensionale Diffusion, beispielsweise von Molekülen in Lösung, oder für zweidimensionale Diffusion, zum Beispiel eines Rezeptors in einer Zellmembran, beschrieben werden. Der Verlauf der Autokorrelationskurve hängt dabei von der Anzahl der Partikel im Laserfokus (N), dem Korrekturfaktor für die Quantenausbeute (Q), der Anzahl der Komponenten (M), der Triplettfraction (t), der Tripletzeit (τ_{trip}), dem Intervall für die Korrelationen der zeitlichen Fluoreszenzfluktuationen (τ), der Diffusionszeitkonstante (τ_D) und dem Strukturparameter (SP), der als Quotient der Höhe ($2 \times \omega_1$) und der Breite ($2 \times \omega_0$) des Fokus definiert ist, ab [91]. Für dreidimensionale Diffusion gilt Gleichung 1.

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{i=1}^M Q_i^2 N_i}{\left(\sum_{i=1}^M Q_i N_i \right)^2} \times \frac{1}{1 + \tau / \tau_{Di}} \times \sqrt{\frac{1}{1 + SP^2 \times \tau / \tau_{Di}}} \times \left(1 + \frac{t}{1-t} e^{-\frac{\tau}{\tau_{trip}}} \right) \quad (\text{Gl. 1})$$

Q ist abhängig vom Absorptionskoeffizienten (σ), der Fluoreszenzquantenausbeute (η) und der Fluoreszenzdetektionseffizienz (g).

$$Q_i = \sigma_i \cdot \eta_i \cdot g_i \quad (\text{Gl. 2})$$

Der Diffusionskoeffizient (D) kann aus der Diffusionszeitkonstante (τ_D) und dem Radius (ω_0) des Fokusvolumens berechnet werden.

$$D_i = \frac{\omega_0^2}{4\tau_{Di}} \quad (\text{Gl. 3})$$

Das Fokusvolumen (V) erhält man aus dem Radius des Fokusvolumens ω_0 und dem Radius des Fokusvolumens in Strahlrichtung (ω_1).

$$V = \omega_0^2 \cdot 2\pi \cdot \omega_1 \quad (\text{Gl. 4})$$

ω_0 und V können aus FCS-Messungen eines Fluoreszenzfarbstoffes mit bekanntem Diffusionskoeffizienten abgeleitet werden.

Die Diffusion eines fluoreszenzmarkierten Rezeptors oder eines Rezeptor-Ligand-Komplexes in der Plasmamembran einer Zelle findet zweidimensional statt.

Gleichung 1 vereinfacht sich zu Gleichung 5:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{i=1}^M Q_i^2 N_i}{\left(\sum_{i=1}^M Q_i N_i\right)^2} \times \frac{1}{1 + \tau / \tau_{Di}} \times \left(1 + \frac{t}{1-t} e^{-\frac{\tau}{\tau_{rip}}}\right)$$

(Gl. 5)

Aus den Gleichungen 1 und 5 wird deutlich, dass die Amplitude der Autokorrelationsfunktion ($G(\tau)$) mit abnehmender Partikelzahl (N) zunimmt. Damit kann für den Fall, dass nur ein Partikel in das Beobachtungsvolumen hinein- oder hinausdiffundiert, die größte Veränderung der relativen Helligkeit erwartet werden. Daraus ergibt sich, dass im Fall der FCS bemerkenswerterweise das Signal der Fluoreszenzfluktuationen bei abnehmenden Konzentrationen zunimmt.

1.10 Einzelmolekülverfolgung

Bei der Einzelmolekülverfolgung (SPT, single particle tracking) wird die Bewegung einzelner fluoreszierender oder fluoreszenzmarkierter Partikel in einem Medium verfolgt [85]. Dabei kann es sich um Partikel in Lösung, aber auch um Moleküle in subzellulären Strukturen oder in der Plasmamembran von Zellen handeln. Verbindet man die über die Zeit aufgezeichneten Koordinaten (x, y, z), erhält man einen Molekülpfad oder auch Trajektorie. Die Trajektorien können auf verschiedenste Eigenschaften wie zum Beispiel ihren Diffusionskoeffizienten oder ihren Diffusionstyp hin untersucht werden [85].

Das Einzelmolekülsetup baut auf einem Weitfeldepifluoreszenzmikroskop auf (Abbildung 1.4). Als Lichtquelle dient ein Laser, der durch einen akustooptischen Modulator (AOM) geleitet und dann in die Lichtfaser eingekoppelt wird. Der AOM besteht aus einem transparenten Festkörper, dessen Beugungseigenschaften durch akustische Signale gesteuert werden können. Dies erlaubt die Intensität des Laserlichtes stufenlos zu regeln und ermöglicht außerdem eine Steuerung des Zeitpunktes der Laserbeleuchtung durch Signale der Kamera.

Die Lichtfaser endet im Mikroskopkörper. Der kollimierte Laserstrahl wird durch eine Tubuslinse über den dichroitischen Spiegel und durch das Wasserimmersionsobjektiv in die Probe fokussiert.

Das Fluoreszenzlicht wird durch das Objektiv gesammelt und ist im Gegensatz zum Laserlicht in der Lage, den dichroitischen Spiegel zu passieren. Das Fluoreszenzlicht wird durch einen Emissionsfilter, eine weitere Tubuslinse und durch eine Vierfachvergrößerungsoptik auf den Chip der *electron multiplying charge-coupled device*-Kamera (EMCCD-Kamera) geleitet. Durch die Vierfachvergrößerung entspricht ein Pixel der Kamera einer Fläche von 100 x 100 nm im Objektraum.

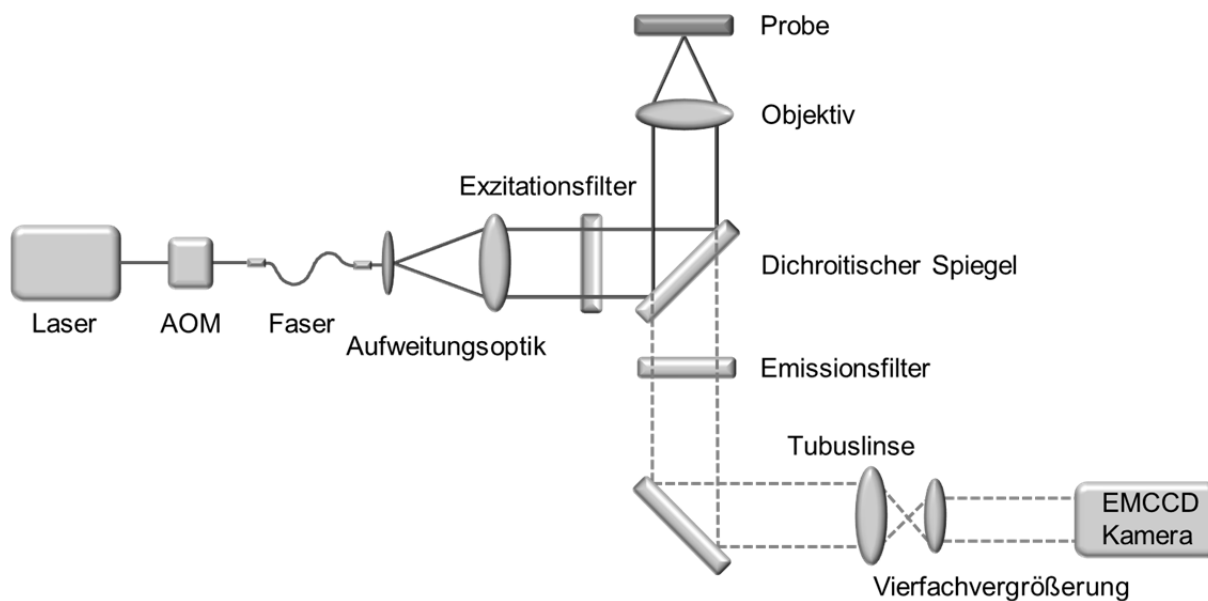


Abbildung 1.4: Aufbau eines Einzelmolekülverfolgungsmikroskops

1.10.1 Sprungweitenanalyse

Die gefundenen Trajektorien werden einer Sprungweitenanalyse unterzogen. Diese ermöglicht es Rückschlüsse auf die Beweglichkeit der detektierten Teilchen zu ziehen. Die Wahrscheinlichkeit $p(r,t)$, ein Partikel, das im Ursprung startet, mit dem Diffusionskoeffizienten D in einem Kreisring mit dem Radius r und der Breite dr nach der Zeit t zu finden, ist gegeben durch:

$$p(r,t)dr = \frac{1}{2Dt} e^{-r^2/4Dt} r dr \quad (\text{Gl. 6})$$

Diese Wahrscheinlichkeitsdichtefunktion gilt für zweidimensional diffundierende Partikel. Sind mehrere Mobilitäten zu erwarten, erweitert sich diese Funktion um die Anzahl der Sprünge M und den Anteil der Molekülfraktion f :

$$p(r,t)dr = \sum_{j=1}^n \frac{Mf_j}{2D_j t} \frac{1}{2Dt} e^{-r^2/4Dt} r dr \quad (\text{Gl. 7})$$

1.10.2 Analyse des mittleren Verschiebungsquadrates

Eine weitere Methode, die erhaltenen Trajektorien zu untersuchen, ist die Analyse des mittleren Verschiebungsquadrates $\langle r^2(t) \rangle$ (MSD, *mean square displacement*). Wird dieses gegen die Zeit aufgetragen, können verschiedene Bewegungsmodi unterschieden und die Art der Diffusion charakterisiert werden.

Im Falle von freier brownischer Molekularbewegung steht das MSD in einer linearen Beziehung mit dem Diffusionskoeffizienten der Partikel (Gl. 8, Abbildung 1.5).

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt \tag{Gl. 8}$$

Wird die brownische Molekularbewegung von einem gerichteten Fluss mit der Geschwindigkeit v überlagert, so ergibt sich ein Kurvenverlauf des MSD mit positiver Krümmung (Gl. 9, Abbildung 1.5).

$$\langle r^2(t) \rangle = 4Dt + (vt)^2 \tag{Gl. 9}$$

Diffundieren die Partikel in einer räumlich begrenzten Domäne, ist das MSD von der Domänenengröße r_D^2 abhängig. Das MSD strebt dann asymptotisch r_D^2 entgegen (Gl.10, Abbildung. 1.5).

$$\langle r^2(t) \rangle = \langle r_D^2 \rangle \left[1 - A_1 e^{\frac{-4A_2Dt}{\langle r_D^2 \rangle}} \right] \tag{Gl. 10}$$

Bei A_1 und A_2 handelt es sich um Konstanten, die die Geometrie der Domäne definieren.

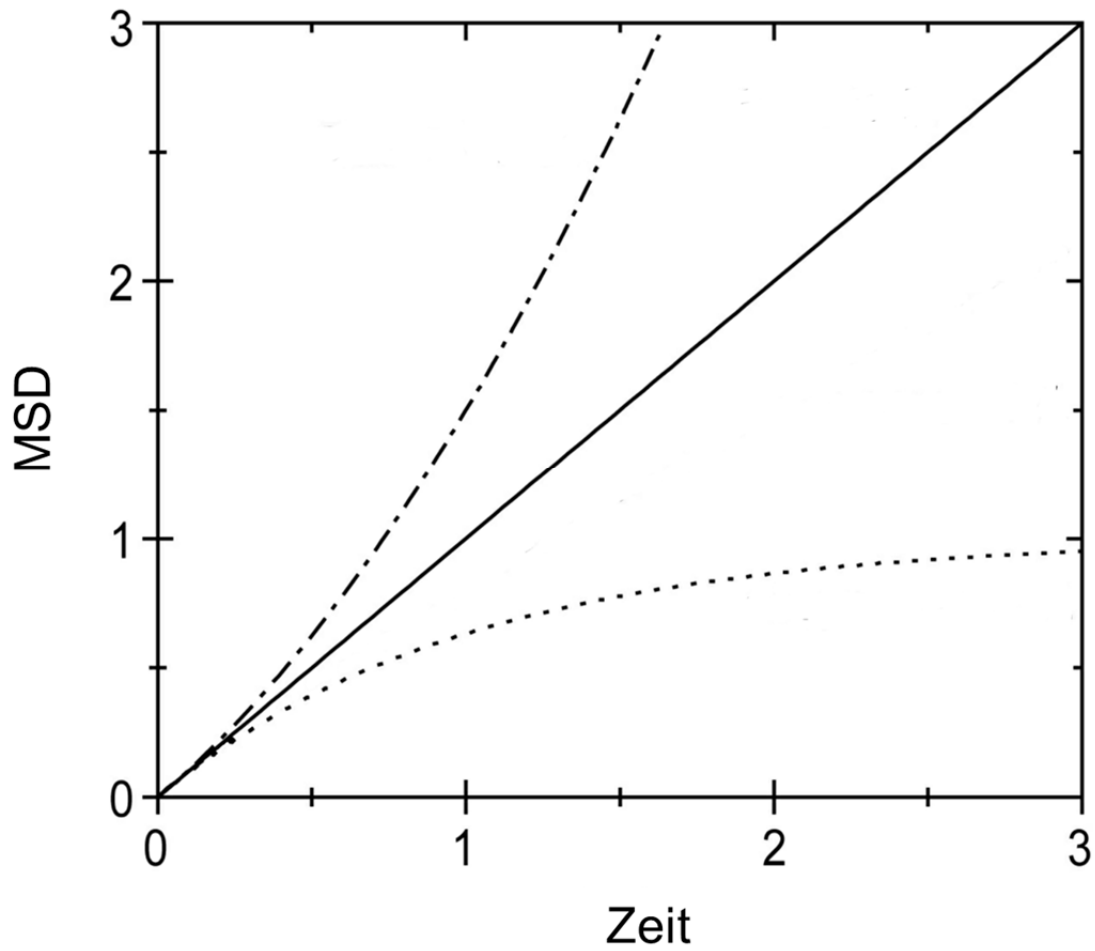


Abbildung 1.5: MSD-Verläufe als Funktion der Zeit t

Dargestellt sind freie Diffusion (—), räumlich eingeschränkte Diffusion (··) und Diffusion mit Fluss (-·-·).

1.11 Zielsetzung

Johanniskrautextrakt ist ein etabliertes Therapeutikum für depressive Erkrankungsbilder. Er ist in Deutschland für die kurzzeitige Behandlung der Symptome leichter depressiver Störungen sowie für die Therapie von leichten bis mittelschweren Depressionen zugelassen. Der Johanniskrautextrakt wird in der S3-Leitlinie „Unipolare Depression“ für erste Therapieversuche bei leichten bis mittelgradigen depressiven Episoden empfohlen und ist für diese Indikation verschreibungspflichtig. Während bei synthetischen Antidepressiva als Einzelstoffpräparate meist ein einzelner Wirkungsmechanismus dominiert, setzt sich der Johanniskrautextrakt aus verschiedenen Inhaltsstoffen zusammen, die potentiell auch verschiedene Wirkungsmechanismen bedienen können. Als wirksamkeitsmitbestimmende Hauptinhaltsstoffe werden Hyperforin, Hyperosid und Hypericin angesehen. Johanniskrautpräparate haben in klinischen Studien ihre Wirksamkeit belegt, allerdings ist ihr Wirkungsmechanismus bislang noch nicht hinreichend geklärt. Für synthetische Antidepressiva und für Johanniskrautpräparate sind gleichermaßen die zentralnervösen noradrenergen, dopaminergen und serotonergen Rezeptorsysteme pharmakologisch relevant.

Diese Dissertation widmet sich dem sieben transmembranären G-Proteingekoppelten 5-HT_{1A}-Rezeptor. Eine Störung in der Signalverarbeitung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren wird als mögliche Ursache für Depressionen diskutiert. In der vorliegenden Arbeit soll der Effekt der Johanniskrautinhaltsstoffe Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor untersucht werden.

Nach der mobilen Rezeptor-Hypothese wird angenommen, dass die laterale Mobilität des Rezeptors dessen Signaltransduktion beeinflusst. Um Aussagen über einen eventuell vorhandenen Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe auf die laterale Mobilität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren treffen zu können, wurden diese mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Einzelmolekülverfolgung untersucht. Sollte ein solcher Einfluss vorliegen, könnte sich dieser in der Signaltransduktion des Rezeptors fortsetzen. Ob die Inhaltsstoffe die Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors ins Zellinnere verändern, soll anhand einer quantitativen Bestimmung des *Second Messengers* cAMP überprüft werden.

2 Ergebnisse

2.1 Etablierung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Die Effekte von Johanniskrautinhaltstoffen auf den 5-HT_{1A}-Rezeptor sollten in einem postsynaptischen Zellmodell untersucht werden. Dafür wurden C6-Glioblastomzellen der Ratte ausgewählt. Diese exprimieren den 5-HT_{1A}-Rezeptor nativ nicht [92]. Daher wurden C6-Zellen mit der DNS des 5-HT_{1A}-Rezeptors transfiziert. Der Rezeptor wurde an einen SNAP-tag gekoppelt und als Fusionsprotein (5-HT_{1A}-ST) überexprimiert. Über den SNAP-tag kann der Rezeptor bei Bedarf fluoreszenzmarkiert werden.

Um die transfizierte C6-5-HT_{1A}-ST Zelllinie zu etablieren, wurde sie zwei Prüfungen unterzogen. Zunächst wurde der SNAP-tag mit dem Farbstoff SNAP-Cell® Oregon Green® gekoppelt. Es konnte eine gleichmäßige Membranfärbung beobachtet werden (Abbildung 2.1).

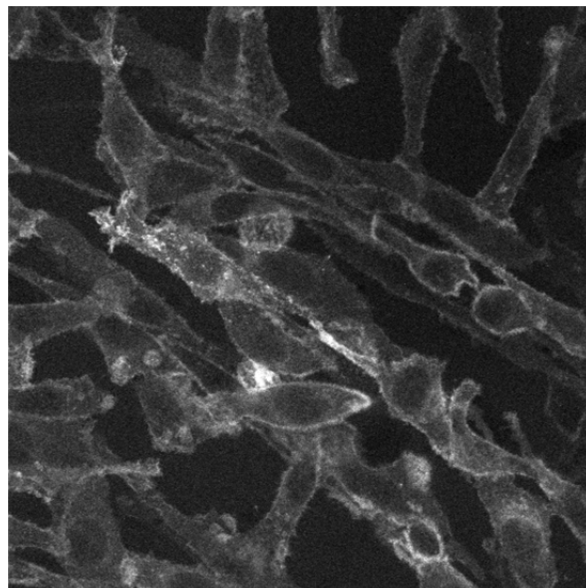


Abbildung 2.1: Laser-Scanning-Mikroskop Aufnahme fixierter C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Der SNAP-tag von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen wurde mit SNAP-Cell® Oregon Green® gekoppelt. Die Zellen wurden mit Paraformaldehyd fixiert.

Des Weiteren wurde untersucht, wie sich die Zellen in einem cAMP Assay verhalten. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist mit dem G-Protein G_i gekoppelt. G_i wiederum hat eine inhibitorische Wirkung auf die durch die Adenylylcyclase (AC) vermittelte cAMP Synthese und leitet so ein Signal von außen über den 5-HT_{1A}-Rezeptor ins Zellinnere. Um die Aktivität des Rezeptors herauszuarbeiten, wurden die Zellen

zunächst mit Forskolin, einem rezeptorunabhängigen AC-Agonisten, stimuliert. Anschließend wurde untersucht, ob sich diese Aktivierung der AC durch Gabe des 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT reduzieren oder hemmen lässt.

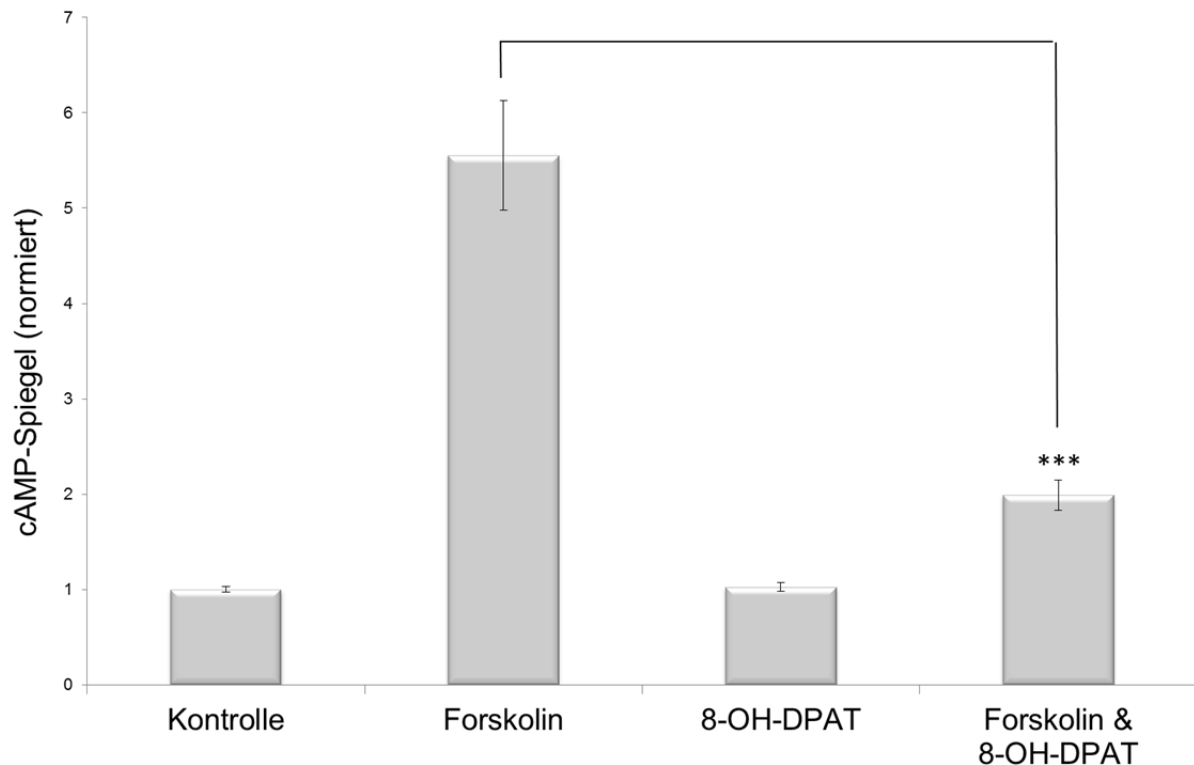


Abbildung 2.2: cAMP-Assay in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Vorbehandlung mit PBS (Kontrolle), 10 μ M Forskolin, 10 μ M 8-OH-DPAT oder jeweils 10 μ M Forskolin und 8-OH-DPAT (n = 8)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; p*** < 0,001

Wie in Abbildung 2.2 zu entnehmen ist, führte eine Stimulation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 10 μ M Forskolin zu einem um den Faktor 5,5 (\pm 0,6) erhöhten cAMP-Spiegel. Eine Stimulation mit 10 μ M 8-OH-DPAT alleine führte zu keiner Veränderung des cAMP-Spiegels. Wurden beide Substanzen parallel verabreicht, war der cAMP-Spiegel nur um den Faktor 1,9 (\pm 0,2) im Vergleich zum Ausgangsniveau erhöht, und eine statistisch signifikante Hemmung der Forskolin vermittelten Stimulation durch 8-OH-DPAT wurde ersichtlich. Daraus kann abgeleitet werden, dass der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor erfolgreich in die C6-Zellen transfiziert wurde und dieser dort in typischer Weise mit dem *Second Messenger System* der AC gekoppelt ist.

2.2 Synthese eines fluoreszierenden Liganden

Neben der Fluoreszenzmarkierung des 5-HT_{1A}-Rezeptors sollte auch ein fluoreszierender 5-HT_{1A}-Rezeptor-Ligand generiert werden. Als Ausgangsverbindung für die Synthese des Agonisten diene der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist 8-OH-DPAT. Dieser sollte mit dem Farbstoff Alexa Fluor® 532 gekoppelt werden. Alexa Fluor® 532 weist sehr gute photophysikalische Eigenschaften auf. Es ist photostabil, besitzt eine gute Quantenausbeute (0,61) und wurde bereits erfolgreich für Lebendzellmessungen verwendet [93, 94]. Alexa Fluor® 532-succinimidylester kann an eine primäre Aminfunktion eines Moleküls gekoppelt werden. 8-OH-DPAT weist allerdings keine solche funktionelle Gruppe auf. In Kooperation mit Prof. Marcello Leopoldo (Universität Bari, Italien) wurde eine der beiden Propyl-Gruppen des tertiären Aminanteils von 8-OH-DPAT durch eine Hexylamingruppe ausgetauscht und damit eine primäre Aminfunktion eingeführt. Als Ausgangssubstanz diene 8-Methoxy-2-propylamino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen (EL401), welches mit 6-Bromhexannitril alkyliert wurde. Nach Reduktion des Nitrils mit Boran-Dimethylsulfid-Komplex und dem Entfernen der Methoxy-Schutzgruppe entstand EL409 (Abbildung 2.3).

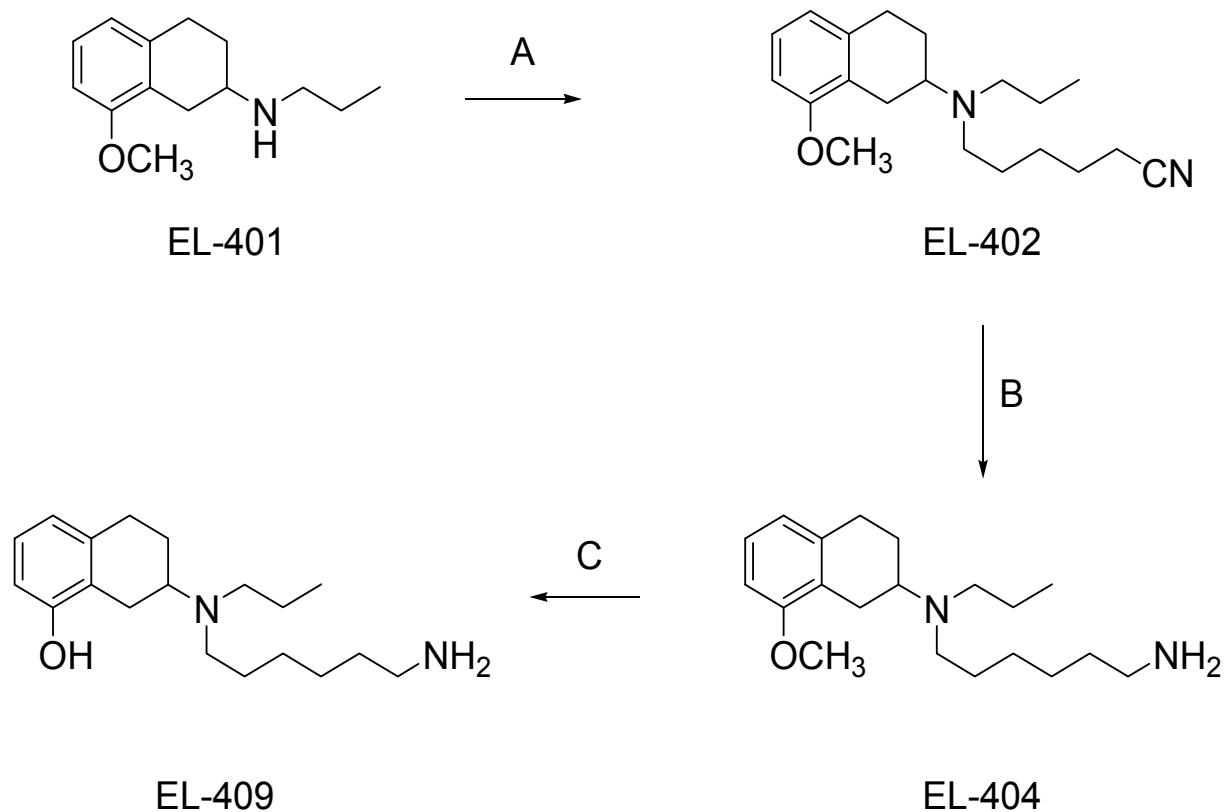


Abbildung 2.3: Synthese von EL409, einem 8-OH-DPAT Derivat mit primärer Aminfunktion in Kooperation mit Prof. Marcello Leopoldo (Universität Bari, Italien)

Reagenzien: A) 6-Bromhexannitril, Na_2CO_3 ; B) 1. Boran-Dimethylsulfid-Komplex 2. 3 N HCl
C) konz. HBr

Nach der Derivatisierung wurde mittels eines cAMP-Assays an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen überprüft, ob das agonistische Wirkprofil von 8-OH-DPAT in EL409 qualitativ und quantitativ erhalten blieb (Abbildung 2.4).

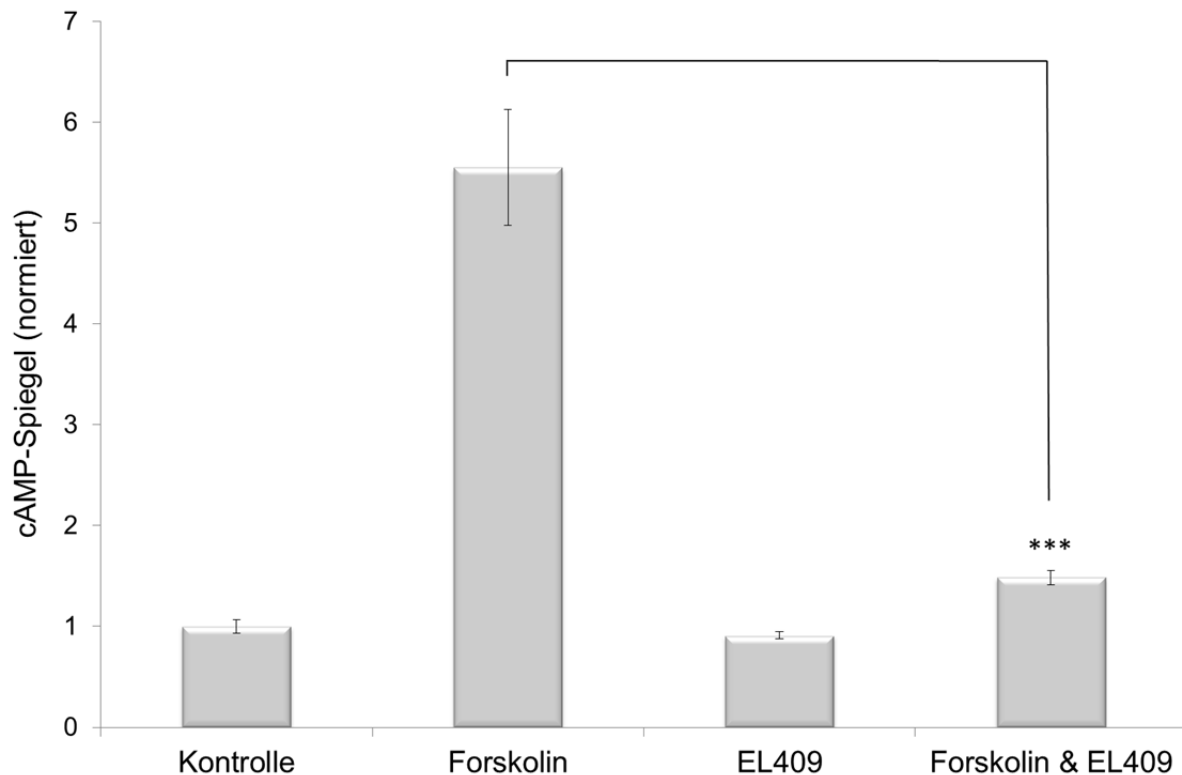


Abbildung 2.4: 5-HT_{1A}-agonistisches Wirkprofil von EL409

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Vorbehandlung mit PBS (Kontrolle), 10 μ M Forskolin, 10 μ M EL409 oder jeweils 10 μ M Forskolin und EL409; (n = 6)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; p*** < 0,001

Die Stimulation mit 10 μ M Forskolin führte zu einem um den Faktor 5,5 (\pm 0,6) erhöhten cAMP-Spiegel. Die alleinige Gabe von 10 μ M EL409 senkte den cAMP-Spiegel um 9 (\pm 3) %. Gleichzeitige Gabe von je 10 μ M EL409 sowie Forskolin führte zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels auf das 1,5 (\pm 0,1)-Fache. EL409 hemmte statistisch signifikant die Forskolin vermittelte Stimulation der AC. Im Vergleich liegen die Hemmaktivitäten von 8-OH-DPAT (Abbildung 2.2) und EL409 (Abbildung 2.4) in der gleichen Größenordnung. Offenkundig hat der Austausch einer Propylgruppe mit einer Hexylamingruppe keinen nennenswerten Einfluss auf das 5-HT_{1A}-Rezeptor-agonistische Wirkprofil von 8-OH-DPAT.

2.2.1 Kopplung EL409 mit Alexa Fluor[®] 532

EL409 wurde mit Alexa Fluor[®] 532-succinimidylester bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss umgesetzt (Abbildung 2.5). Um den Farbstoff möglichst vollständig zu koppeln, wurde ein fünffacher Überschuss an EL409 eingesetzt.

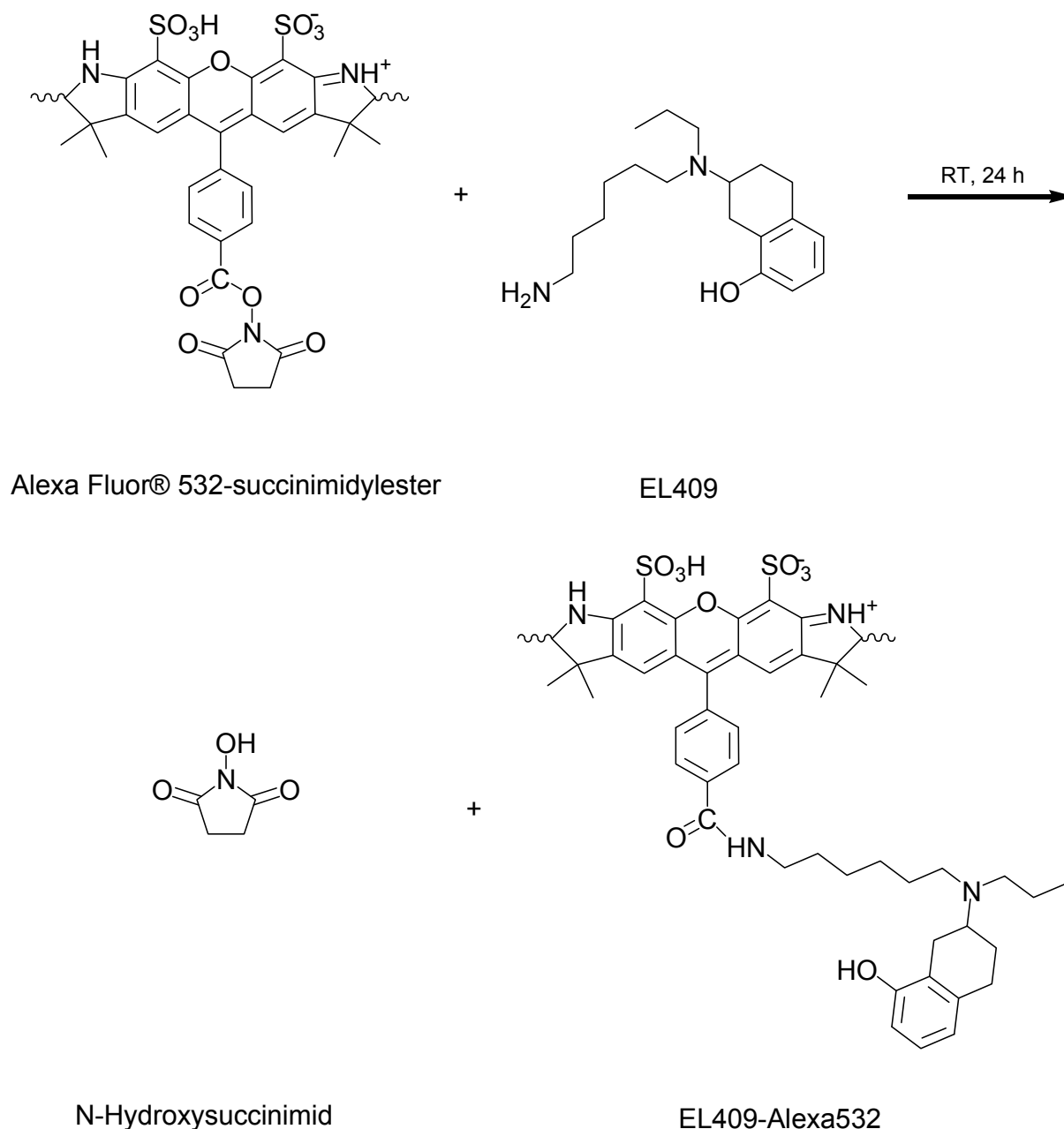


Abbildung 2.5: Kopplungsreaktion von Alexa Fluor[®] 532-succinimidylester und EL409

Ergebnisse

Das Reaktionsgemisch wurde mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) auf einer LiChrospher® 60 RP-Select B Säule getrennt (Abbildung 2.6).

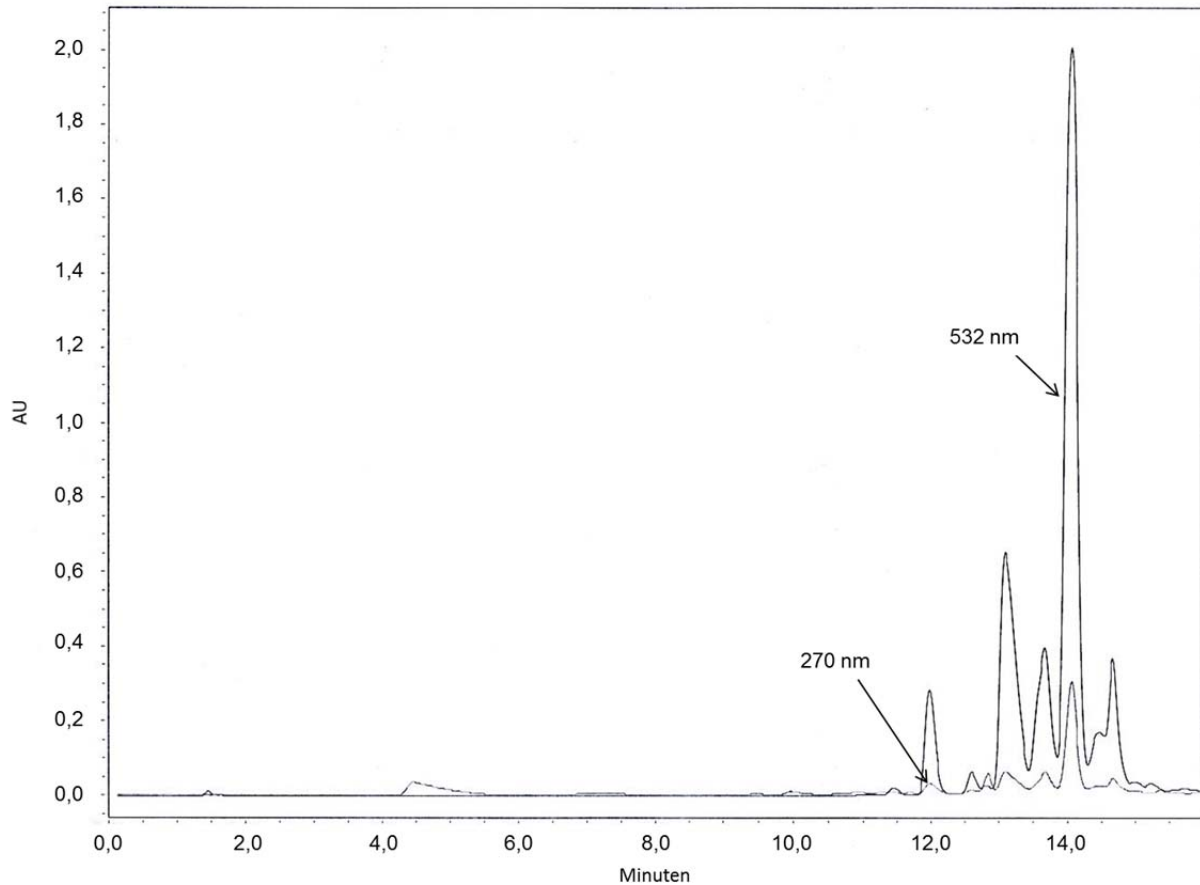


Abbildung 2.6: HPLC-Analyse des Reaktionsansatzes nach Umsetzung von EL409 mit Alexa Fluor® 532-succinimidylester

UV/Vis-Detektion bei 270 nm und 532 nm. Das Kopplungsprodukt eluiert nach 14 Minuten.

EL409-Alexa532 erschien im Chromatogramm bei 14 Minuten und hatte das unten abgebildete UV/Vis-Absorptionsspektrum (Abbildung 2.7). Das Spektrum des Kopplungsproduktes setzt sich aus den Einzelspektren von EL409 und Alexa Fluor® 532 zusammen. Charakteristisch für Alexa Fluor® 532 ist vor allem der starke Anstieg des Absorptionsverlaufs um 532 nm. Das UV/Vis-Spektrum von EL409 wird im Wesentlichen durch den Aromaten charakterisiert und absorbiert stark im Bereich zwischen 200 und 250 nm.

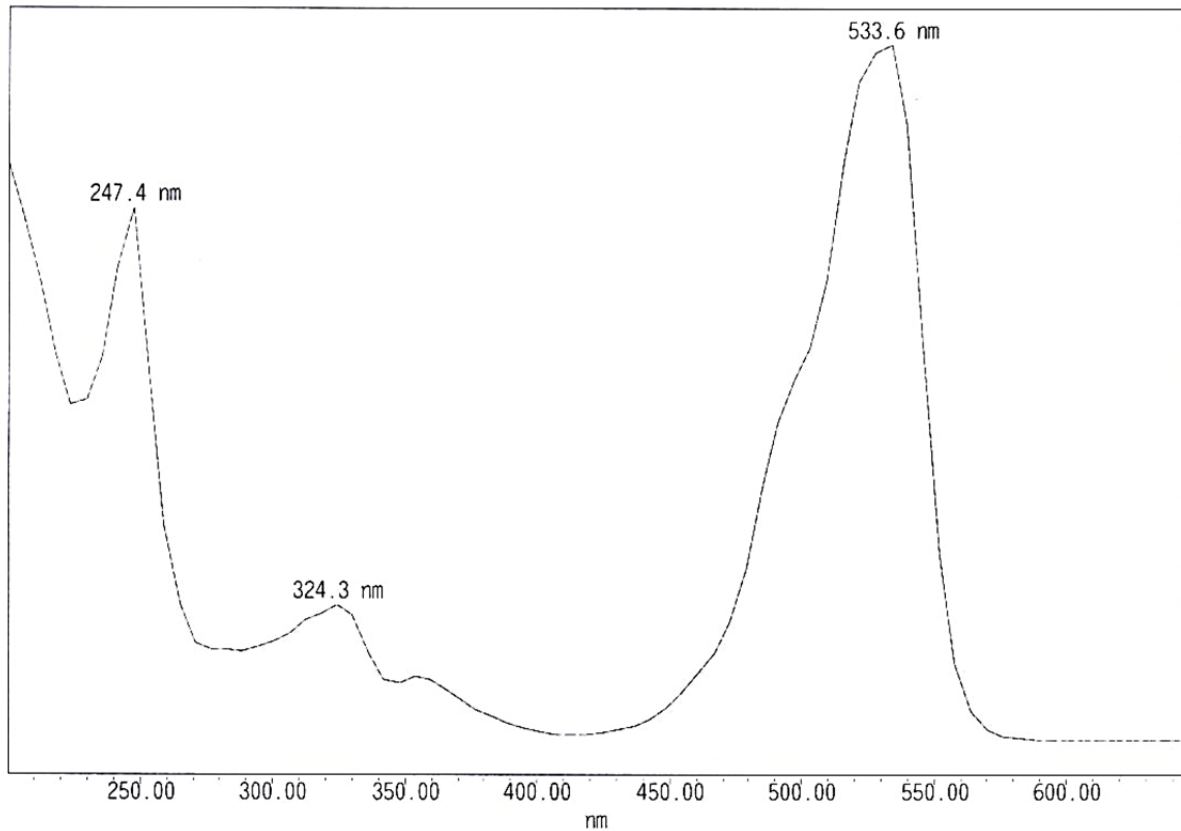


Abbildung 2.7: UV/VIS-Spektrum von EL409-Alexa532

Die Identität von EL409-Alexa532 wurde mittels hochauflösender Massenspektrometrie nachgewiesen. Die Summenformel für EL409-Alexa532 lautet $C_{49}H_{60}N_4O_9S_2$. Das simulierte Massenspektrum lässt eine Masse von $m/z = 913,3874$ für das H^+ -Addukt von EL409-Alexa532 samt zugehörigem Isotopenmuster von $m/z = 914,3908$ und $m/z = 915,3942$ erwarten (Abbildung 2.8).

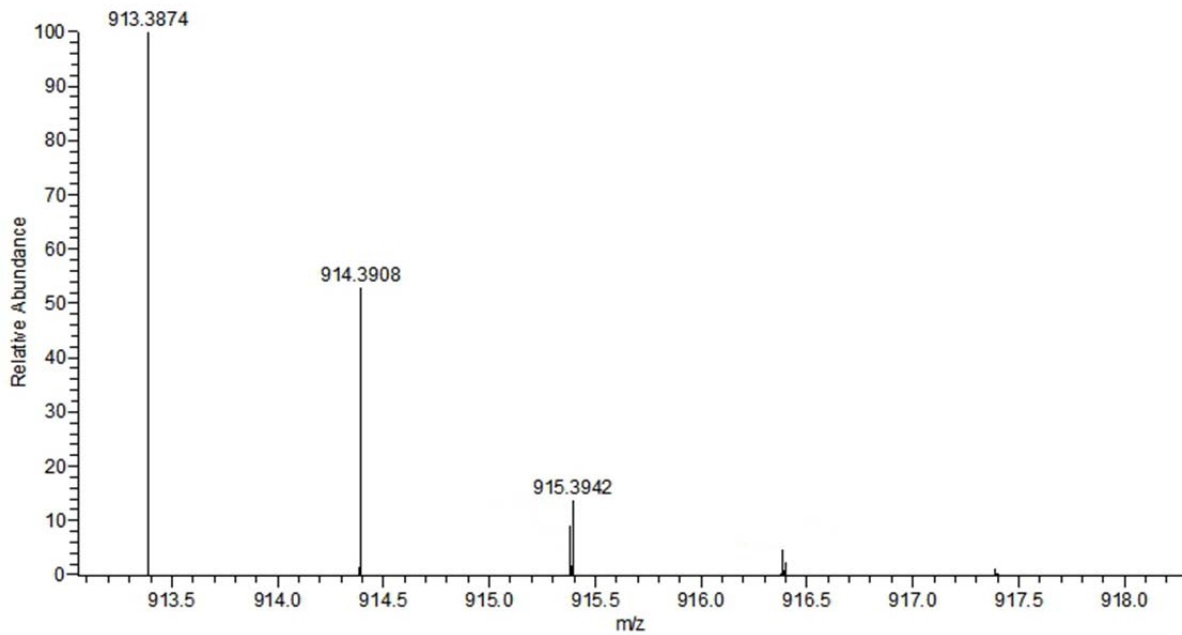


Abbildung 2.8: Simuliertes Massenspektrum des H⁺-Addukts von EL409-Alexa532

Das mittels Orbitrap LTQ Velos Massenspektrometer bestimmte hochaufgelöste Massenspektrum von EL409-Alexa532 zeigt einen Molekülpeak des H⁺-Addukts von m/z = 913,3868 sowie zwei Isotopenpeaks bei m/z = 914,3901 und m/z = 915,3910 (Abbildung 2.9). Die Differenzen zu den simulierten Massen betragen damit nur 0,6 ppm, 0,7 ppm beziehungsweise 3,2 ppm und bestätigen zusammen mit dem charakteristischen Isotopenmuster die Identität von EL409-Alexa532.

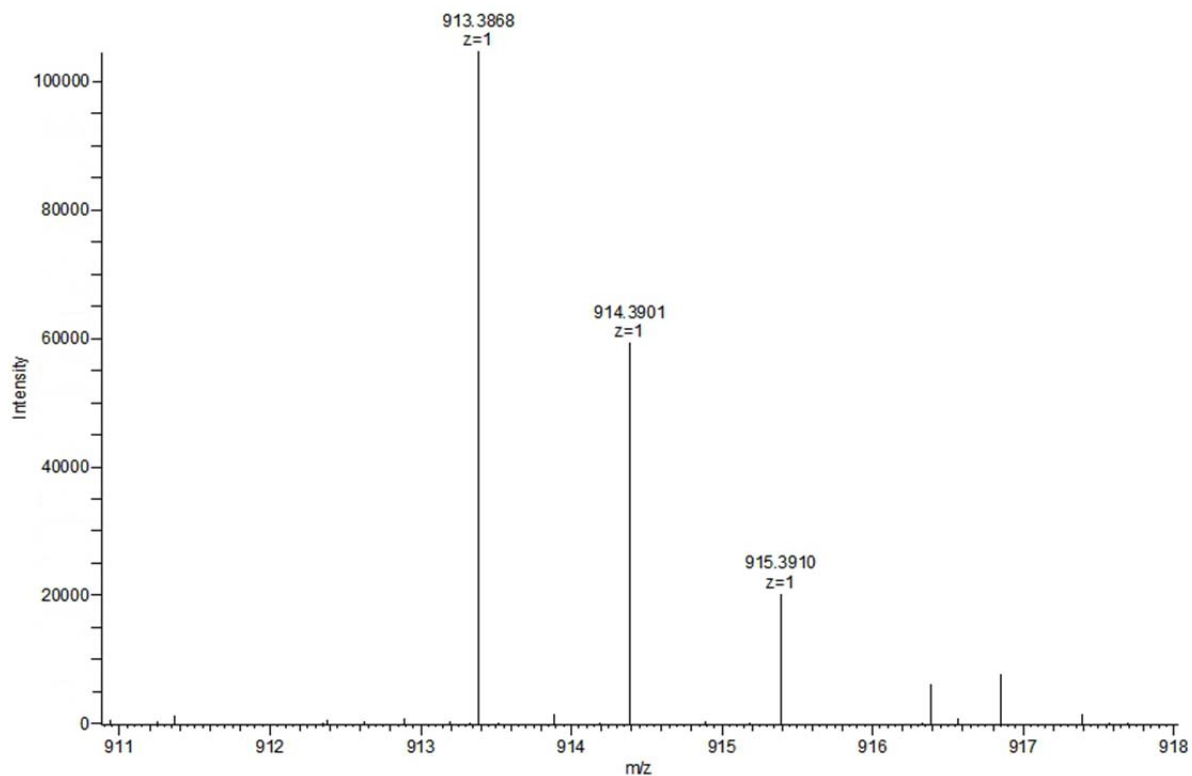


Abbildung 2.9: Hochaufgelöstes Massenspektrum des H⁺-Addukts von EL409-Alexa532

Das agonistische Wirkprofil von EL409-Alexa532 wurde mittels eines cAMP-Assays an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen überprüft (Abbildung 2.10).

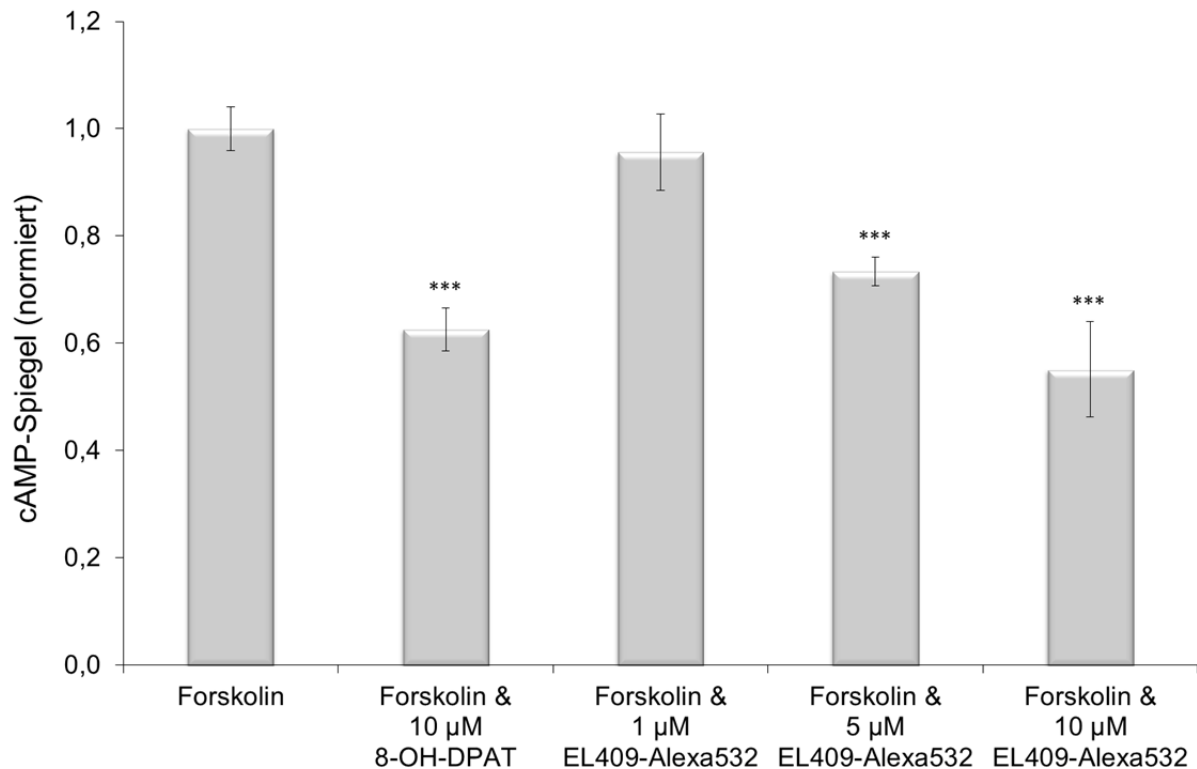


Abbildung 2.10: 5-HT_{1A}-agonistisches Wirkprofil von EL409-Alexa532

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Stimulation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 10 µM Forskolin. Darüber hinaus wurden die Zellen zusätzlich mit 10 µM 8-OH-DPAT, 1 µM, 5 µM oder 10 µM EL409-Alexa532 stimuliert; (n = 4)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; p*** < 0,001

Ausgehend von der Forskolin (10 µM) vermittelten Stimulation wurde die Senkung der cAMP-Spiegel durch gleichzeitige Gabe von 10 µM 8-OH-DPAT sowie von 1 µM, 5 µM oder 10 µM EL409-Alexa532 untersucht. 8-OH-DPAT diente als Positivkontrolle und führte bei gleichzeitiger Gabe zu einer Verminderung der durch Forskolin vermittelten cAMP-Bildung um 37 (± 4) %. Für 1 µM EL409-Alexa532 konnte eine Minderung der cAMP-Bildung um 4 (± 7) %, für 5 µM um 27 (± 3) % und für 10 µM um 45 (± 9) % beobachtet werden. Die Hemmung der cAMP-Bildung durch 10 µM 8-OH-DPAT sowie durch 5 µM und 10 µM EL409-Alexa532 war statistisch signifikant.

2.3 Charakterisierung der lateralen Mobilität des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

2.3.1 Einzelmolekülverfolgung von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren

Das Diffusionsverhalten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in der Zellmembran von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen sollte mittels Einzelmolekülverfolgung (SPT, *single particle tracking*) untersucht werden. Dazu wurde der SNAP-tag des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit dem SNAP-Cell® Farbstoff TMR-Star gekoppelt. Der Farbstoff, mit dem die Rezeptoren markiert wurden, wurde im SPT-Setup durch einen Laser angeregt und das Fluoreszenzlicht mit einer hochsensitiven Kamera aufgenommen und als Film aufgezeichnet. In den so gewonnenen Rohdaten wurden mittels Diatrack Software vollautomatisch Punkte einer bestimmten Mindesthelligkeit registriert und in aufeinanderfolgenden Bildern zu Trajektorien verbunden. Um Fehler bei der Erstellung der Trajektorien auszuschließen, wurden im weiteren Verlauf nur solche Trajektorien in die Auswertung eingeschlossen, die mindestens in fünf aufeinanderfolgenden Einzelbildern zu sehen waren und deren Rezeptoren sich im jeweils nachfolgenden Bild nicht weiter als 1000 nm bewegt hatten. Aus diesen Daten wurden Sprungweitenverteilungen (JD) gewonnen. Es wurden insgesamt zehn einzelne Verteilungen erstellt. Die erste (JD1) setzte sich aus den Sprungweitenverteilungen für die Sprünge im jeweils nächsten Bild zusammen; die zweite (JD2) aus Sprungweiten im jeweils übernächsten Bild; die dritte (JD3) aus Sprungweiten im jeweils drittnächsten Bild und so weiter (JD4-10). Der Fit aller Verteilungen (Abbildung 2.11) ließ drei Rezeptorpopulationen mit unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten D_1 - D_3 erkennen, die im Folgenden mittels Analyse des mittleren Abstandsquadrats (MSD, *mean square displacement*) genauer bestimmt wurden.

Ergebnisse

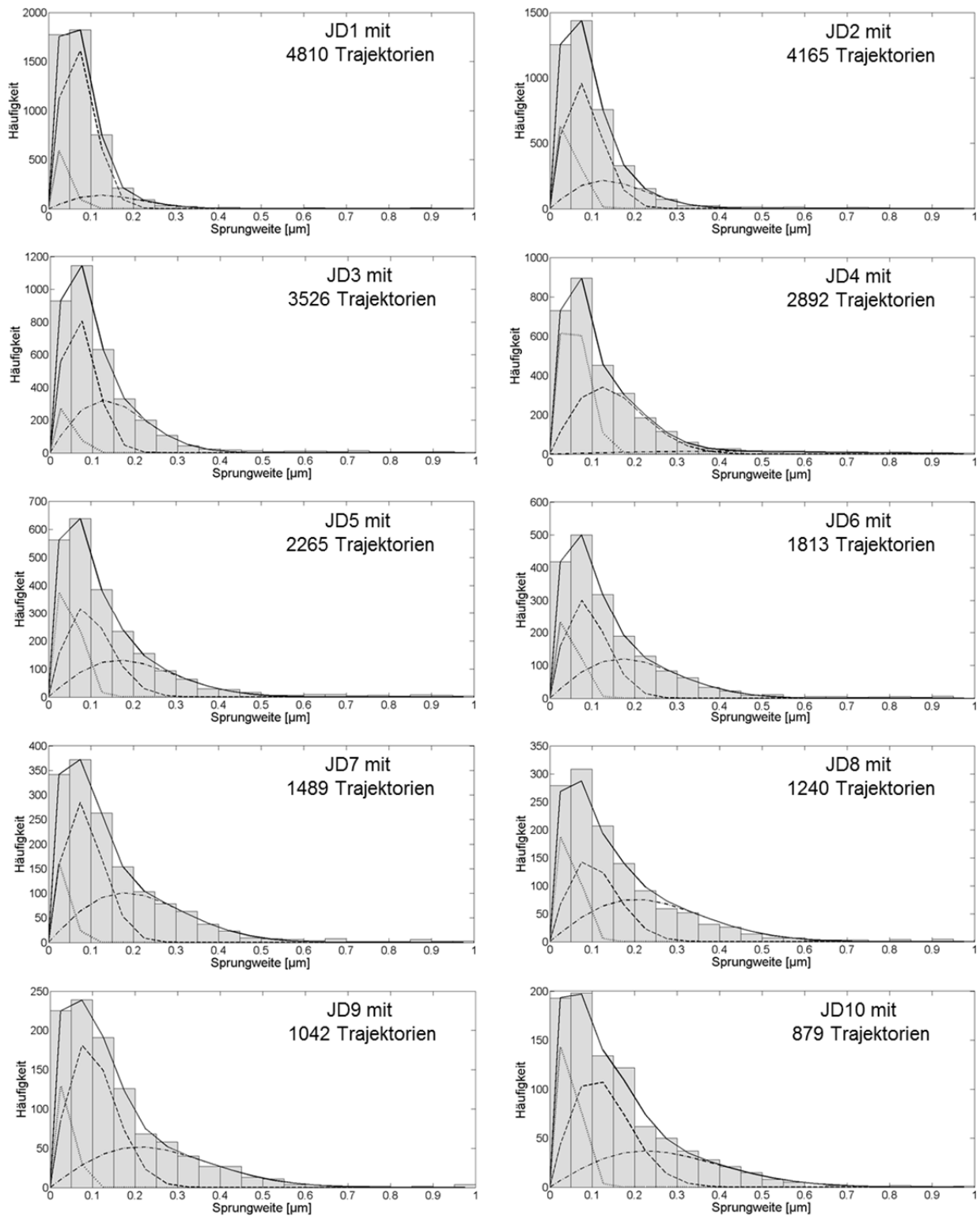


Abbildung 2.11: Sprungweitenverteilung für JD1-JD10 von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren

C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen wurden mit SNAP-Cell[®] TMR-Star gekoppelt. Klasseneinteilung 50 nm. Kurvenanpassung für drei Komponenten (—) bzw. für D₁ (---), D₂ (---) und D₃ (---).

Aus den zehn Sprungweitenverteilungen wurden nun für die Rezeptorpopulationen jeweils die mittleren Abstandsquadrate bestimmt. Diese wurden in einem Diagramm gegen Δt aufgetragen. Aus der Steigung der durch die Punkte gelegten Geraden kann der exakte Diffusionskoeffizient der Rezeptorpopulation bestimmen werden (Abbildung 2.12). Um den eingehenden, unterschiedlich großen Datenmengen beim Erstellen der Geraden Rechnung zu tragen, wurden die MSD Einzelwerte nach ihren Häufigkeiten (N) gewichtet. Am Schnittpunkt der Geraden mit der Y-Achse lässt sich die jeweilige Messungenauigkeit der Bestimmung ablesen. Die Anteile der verschiedenen Rezeptorpopulationen wurden aus den gemittelten Einzelwerten der Sprungweitenverteilungen JD5 bis JD10 generiert. Um die Qualität der durch die Punkte gelegten Regressionsgeraden bewerten zu können, wurde für jede Gerade das Bestimmtheitsmaß R^2 berechnet.

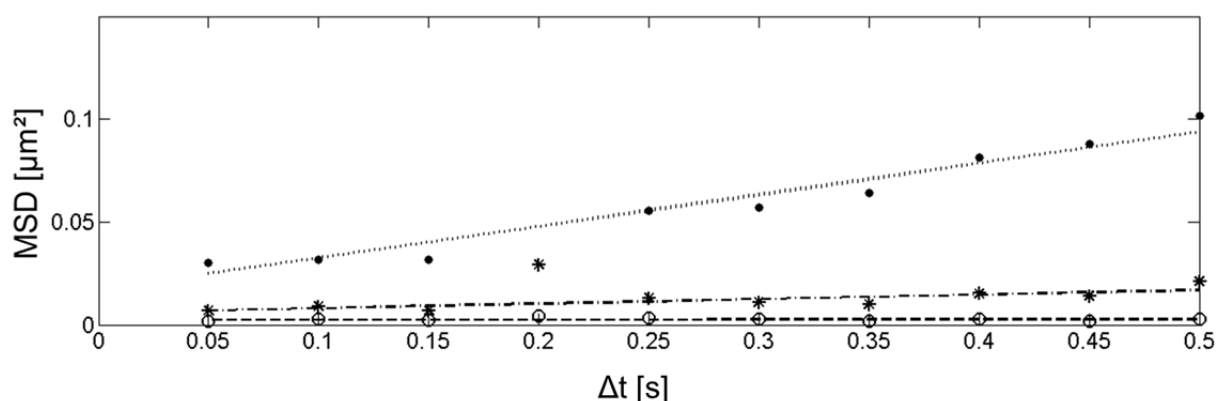


Abbildung 2.12: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Die Daten der Filme von 18 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer (°) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (•) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

Für den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor ergab die Auswertung somit eine Rezeptorpopulation mit einem Diffusionskoeffizienten $D_1 = 0,00022 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($R^2 = 0,06$), die zu 20 % vorlag, eine Fraktion mit einem Diffusionskoeffizienten $D_2 = 0,0055 \mu\text{m}^2/\text{s}$ ($R^2 = 0,75$) mit einem Anteil von 43 % und eine Population mit einem Diffusionskoeffizienten $D_3 = 0,038 \mu\text{m}^2/\text{s}$ zu 37 % ($R^2 = 0,96$).

Der sehr niedrige Wert des Diffusionskoeffizienten D_1 in Kombination mit dem äußerst niedrigen zugehörigen Wert des Bestimmtheitsmaßes R^2 lässt darauf schließen, dass es sich bei D_1 um eine immobile Komponente handelt und die Punkte

Ergebnisse

im MSD-Plot nur zufällig um die Regressionsgerade streuen. Dies wird beim Betrachten des vergrößerten MSD-Plots (Abbildung 2.13) noch deutlicher. In diesem ist die Steigung von D_2 sehr gut ersichtlich, während die Regressionsgerade von D_1 nahezu parallel mit der X-Achse verläuft. Der R^2 Wert für D_2 ist deutlich größer als der für D_1 .

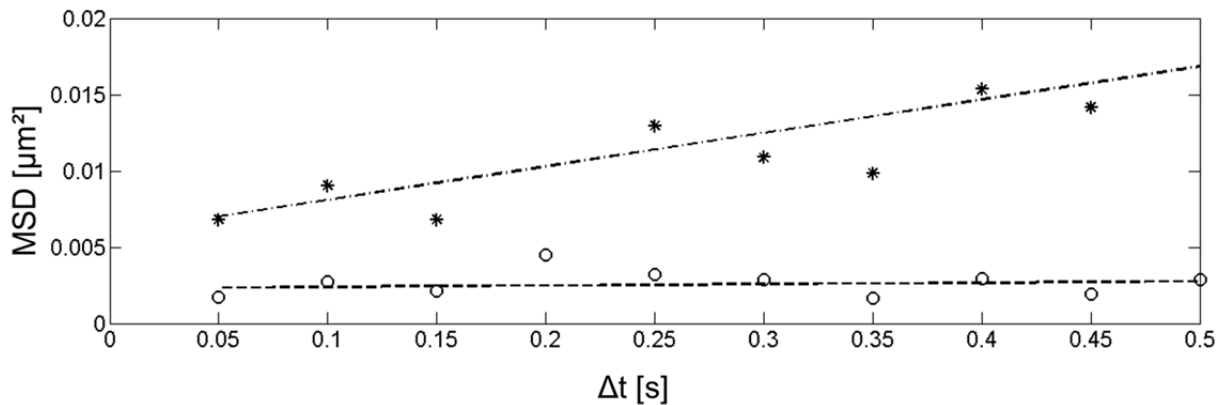


Abbildung 2.13: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 2.12

Dargestellt sind die MSD-Plots der Rezeptorpopulationen mit D_1 ($^\circ$) und D_2 (*).

Diese Tatsache, in Kombination mit dem größeren Wert für D_2 , lässt auf eine mäßig mobile Rezeptorpopulation schließen, die sich hinter D_2 verbirgt. D_3 ist um den Faktor 7 größer als D_2 , und die Rezeptorpopulation mit diesem Diffusionskoeffizienten wird daher als mobil klassifiziert.

2.3.2 FCS Untersuchungen von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Das Diffusionsverhalten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren wurde mittels FCS untersucht. Um den Rezeptor ohne Agonistbelegung zu charakterisieren, wurde der SNAP-tag der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit dem SNAP-Cell[®] Farbstoff TMR-Star gekoppelt. Der mittlere Teil des Laserfokus wurde bei der Messung in die Zellmembran positioniert, während der untere Teil in die Zellen eintauchte und der obere in der Lösung über der Zelle verblieb. Trotz mehrerer Waschschriffe konnte der nicht gekoppelte SNAP-Cell[®] TMR-Star-Farbstoff nicht restlos aus der Zelle entfernt werden und wurde bei den FCS Messungen miterfasst. Seine Diffusionszeitkonstante betrug $48 (\pm 1) \mu\text{s}$, welche beim Fit der Daten als feste vorhandene Diffusionszeitkonstante τ_{Diff1} festgelegt und quantifiziert wurde. Es wurde getestet, ob sich der Farbstoff auch außerhalb der Zelle befindet. Dieser Test war negativ. Der mittels SPT gefundene Diffusionskoeffizient D_3 lässt auf Diffusionszeitkonstanten von Partikeln beim Durchqueren des Fokus schließen, die auch mittels FCS erfasst werden könnten. Er wurde daher nach Gleichung 3 in eine Diffusionszeitkonstante (τ_{Diff4}) umgerechnet und ebenfalls festgelegt. τ_{Diff4} betrug demnach für die Kontrollzellen 351 ms und wurde mit einem Anteil von $4 (\pm 3) \%$ detektiert; der freie Farbstoff machte $15 (\pm 3) \%$ aus. Neben diesen Komponenten wurden zwei weitere Rezeptormobilitäten gefunden. τ_{Diff2} mit $1,8 (\pm 0,1) \text{ ms}$ lag zu $36 (\pm 7) \%$ vor und τ_{Diff3} mit $24 (\pm 7) \text{ ms}$ hatte einen Anteil von $44 (\pm 6) \%$.

2.3.3 FCS Untersuchungen von EL409-Alexa532 an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Neben den Untersuchungen der unstimulierten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren sollte nachgeforscht werden, ob sich nach Bindung eines Liganden die laterale Mobilität des Rezeptors verändert. Zu diesem Zweck wurde das 8-OH-DPAT-Derivat EL409-Alexa532 synthetisiert, welches ein agonistisches Wirkprofil am 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor aufweist.

Zunächst wurden die Bindungseigenschaften von EL409-Alexa532 an 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen durch ein Sättigungsexperiment untersucht. Obgleich Ligandkonzentrationen von über 1000 nM eingesetzt wurden, konnte mittels FCS keine Sättigung der Rezeptorbindung festgestellt werden, was auf eine sehr hohe Rezeptordichte in der Plasmamembran der transfizierten Zellen schließen lässt (Abbildung 2.14). Höhere Ligandkonzentrationen konnten aus messtechnischen Gründen im FCS-Experiment nicht eingesetzt werden, da der Arbeitsbereich der Photodiode überschritten wurde. Demzufolge konnten die maximale Bindungsdichte (B_{max}) und die Dissoziationskonstante K_D für EL409-Alexa532 nicht bestimmt werden.

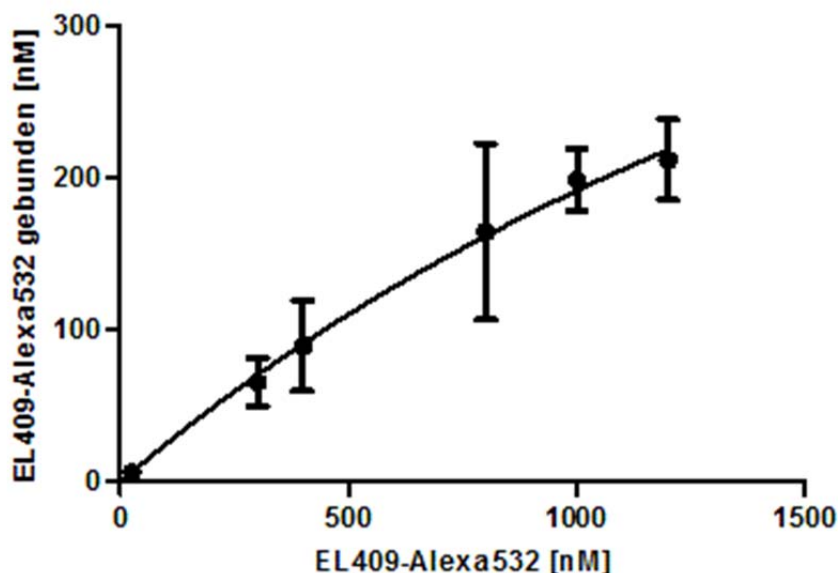


Abbildung 2.14: FCS-Sättigungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Für die folgenden FCS-Experimente wurden 20 nM EL409-Alexa532 verwendet. Bei dieser Konzentration konnte davon ausgegangen werden, dass einerseits genügend Rezeptor-Ligand-Komplexe entstehen, um deren laterale Mobilität mittels FCS zu erfassen. Andererseits reicht die Stimulation der Zelle als Folge der Rezeptor-Ligand-Bindung nicht aus, um regulatorische Prozesse auszulösen, die wiederum das Diffusionsverhalten der Rezeptor-Ligand-Komplexe verändert hätten.

Nach Auswertung der Autokorrelationskurven (ACC) ergab sich für 20 nM EL409-Alexa532 eine Rezeptorbindung von 26 (± 3) %, die sich auf zwei unterschiedlich diffundierende Rezeptor-Ligand-Komplexe mit Diffusionszeitkonstanten von $\tau_{\text{Diff}2} = 1,2 (\pm 0,5)$ und $\tau_{\text{Diff}3} = 30,2 (\pm 9,8)$ ms zu 49 % und 51 % verteilte (Abbildung 2.15). Der nicht gebundene, frei diffundierende Ligand zeigte über den Zellen im Messpuffer (*Locke's Solution*) eine Diffusionszeitkonstante von $\tau_{\text{Diff}1} = 69 (\pm 1,2)$ μs . Diese wurde bei der Auswertung der ACC für alle weiteren FCS-Experimente festgelegt.

Aus den Diffusionszeitkonstanten $\tau_{\text{Diff}1}$, $\tau_{\text{Diff}2}$ und $\tau_{\text{Diff}3}$ konnten Diffusionskoeffizienten für den frei diffundierenden Liganden von $D_L = 196 \mu\text{m}^2/\text{s}$ sowie $D_{\text{RLK}1} = 11,3 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_{\text{RLK}2} = 0,45 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für die Rezeptor-Ligand-Komplexe berechnet werden.

Die Spezifität der Bindung von EL409-Alexa532 wurde durch ein Verdrängungsexperiment bestimmt. Bei gleichzeitiger Gabe eines 1000-fachen Überschusses an nicht markiertem 8-OH-DPAT, zusätzlich zu 20 nM EL409-Alexa532, verblieb eine unspezifische Bindung von 8 (± 3) % auf der Plasmamembran von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen (Abbildung 2.15).

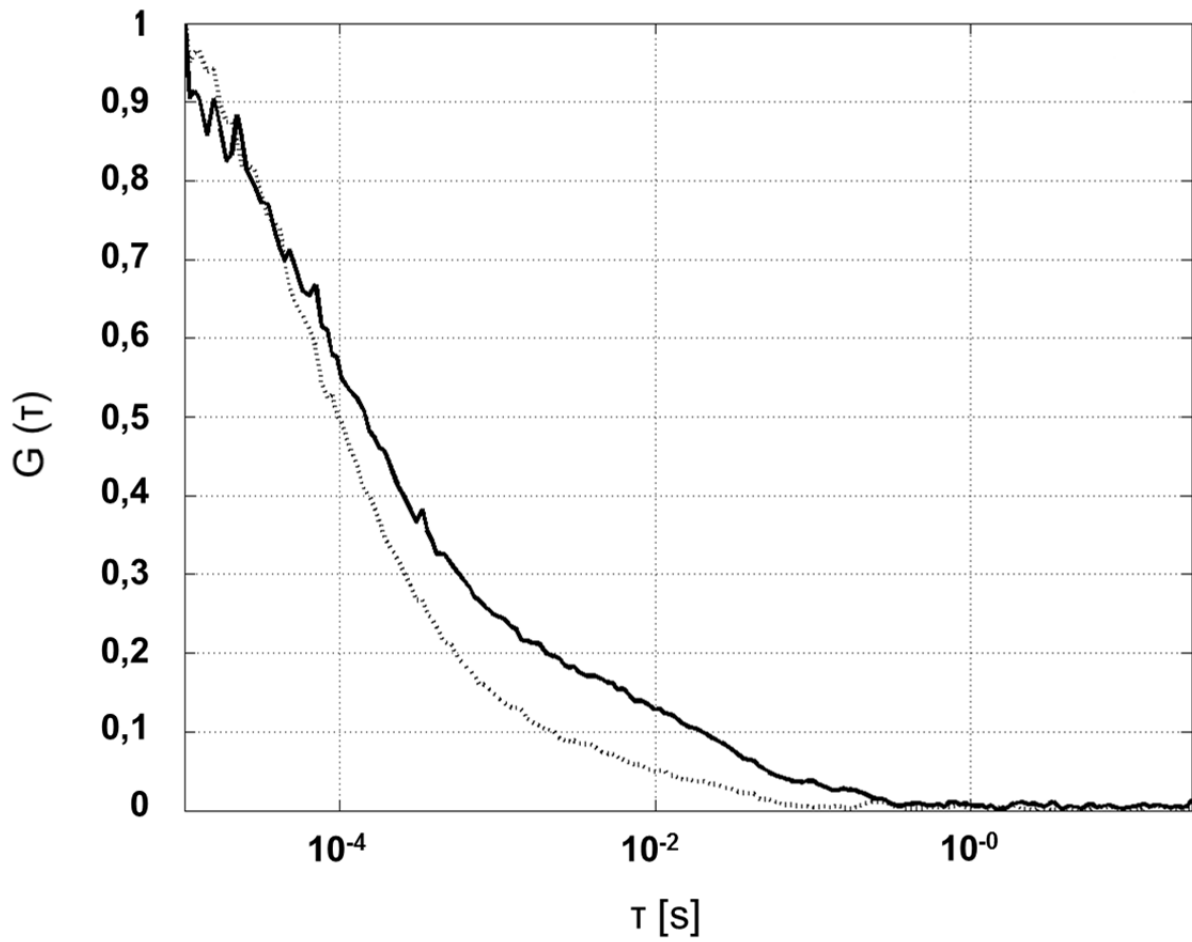


Abbildung 2.15: Normierte Autokorrelationskurven von 20 nM EL409-Alexa532 vor (—) und nach Zugabe von 20 μ M 8-OH-DPAT (...)

2.4 Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die laterale Mobilität des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Nachdem der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor unter nicht stimulierenden Bedingungen in seiner lateralen Mobilität beschrieben wurde, ist es Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die Dynamik der Rezeptoren in der Zellmembran von C6-Zellen zu untersuchen. Dazu wurden die stabil transfizierten C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen für sechs Tage mit diesen Substanzen vorbehandelt. Es wurden für Hyperforin und Hyperosid jeweils Konzentrationen von 1 µM getestet. Hypericin wurde mit einer Konzentration von 0,1 µM verwendet. Höhere Konzentrationen an Hypericin führten zu artifiziellen Veränderungen der Zellen bis hin zum Zelltod und wurden daher nicht eingesetzt. Neben diesen Johanniskrautinhaltsstoffen wurde auch der Einfluss des trizyklischen Antidepressivums Desipramin sowie des selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmers Citalopram getestet. Beide Substanzen wurden ebenfalls in einer Konzentration von 1 µM verwendet.

2.4.1 SPT-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf das Verhalten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren

Der Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe auf die laterale Mobilität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren sollte mit Hilfe der Methode der Einzelmolekülverfolgung untersucht werden. Dazu wurden Filme mit einer Frequenz von 20 Hz und einer Länge von 4000 Bildern von vorbehandelten C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen aufgezeichnet, deren SNAP-getaggte 5-HT_{1A}-Rezeptoren mit dem Farbstoff SNAP-Cell® TMR-Star zuvor markiert wurden. In die Auswertung der Filme gingen nur Trajektorien ein, die mindestens fünf Bilder lang zu sehen waren, und deren Rezeptoren in aufeinanderfolgenden Bildern eine Strecke von nicht mehr als 1000 nm zurückgelegt hatten. Aus diesen Trajektorien wurden für die beobachteten Rezeptoren

Sprungweitenverteilungen erstellt, deren Fits jeweils drei Diffusionskoeffizienten ergaben. Diese Diffusionskoeffizienten wurden im Anschluss mit Hilfe einer MSD-Analyse genauer bestimmt (Abbildungen 2.16 - 2.20).

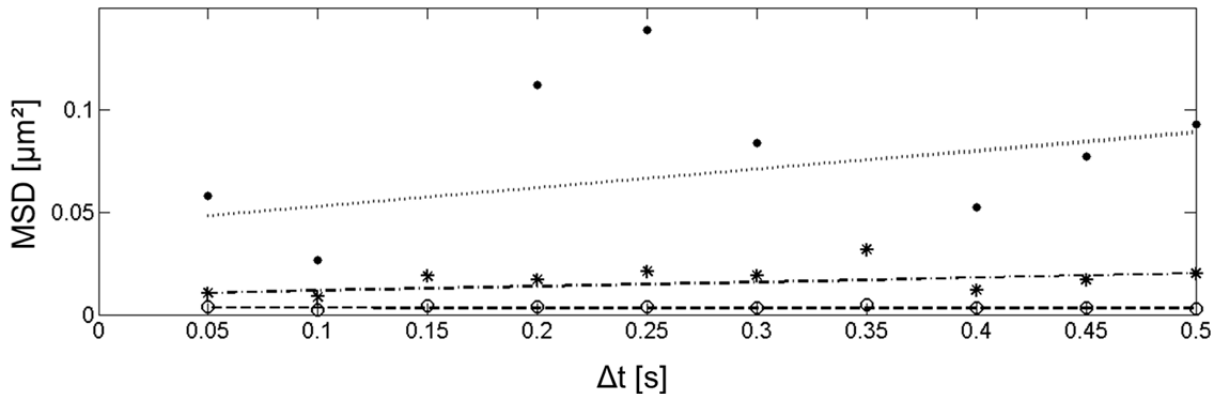


Abbildung 2.16: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperforin

Die Zellen wurden für sechs Tage mit 1 μM Hyperforin vorbehandelt. Die Daten der Filme von 16 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer ($^{\circ}$) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (\bullet) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

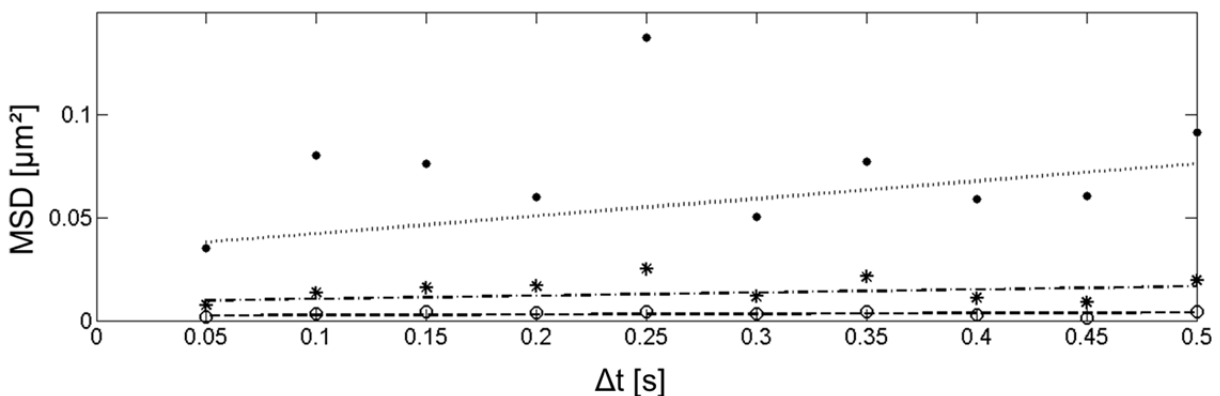


Abbildung 2.17: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperosid

Die Zellen wurden für sechs Tage mit 1 μM Hyperosid vorbehandelt. Die Daten der Filme von 17 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer ($^{\circ}$) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (\bullet) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

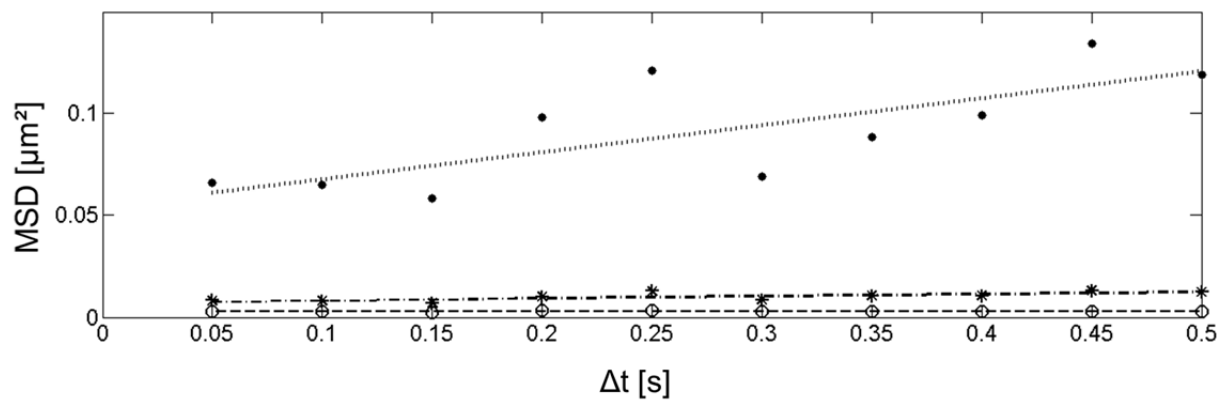


Abbildung 2.18: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hypericin

Die Zellen wurden für sechs Tage mit 0,1 µM Hypericin vorbehandelt. Die Daten der Filme von 20 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer (°) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (•) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

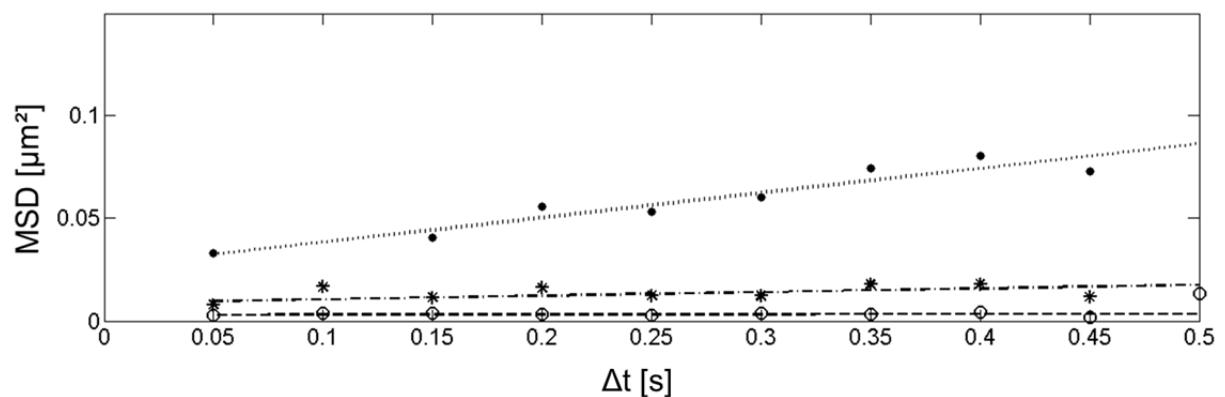


Abbildung 2.19: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Desipramin

Die Zellen wurden für sechs Tage mit 1 µM Desipramin vorbehandelt. Die Daten der Filme von 16 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer (°) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (•) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

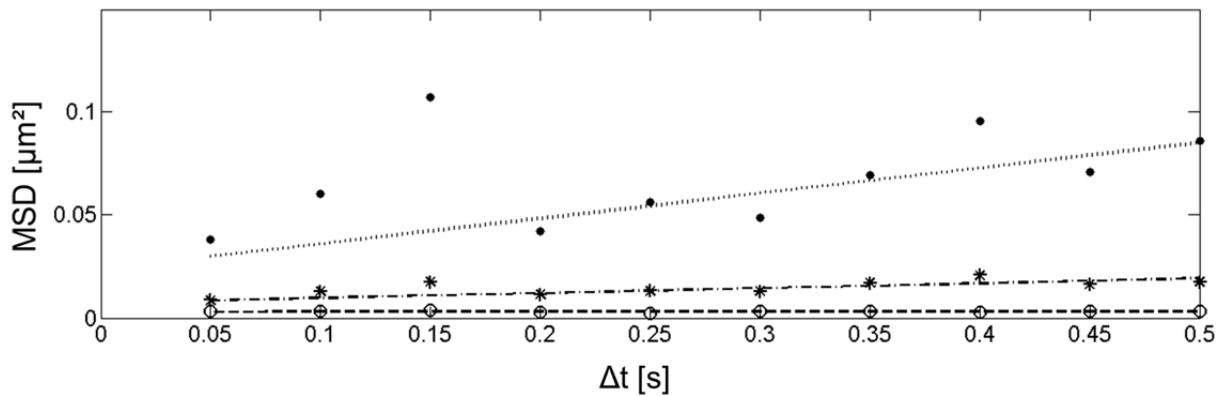


Abbildung 2.20: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Citalopram

Die Zellen wurden für sechs Tage mit 1 µM Citalopram vorbehandelt. Die Daten der Filme von 16 Zellen mit jeweils 4000 Bildern wurden für die Erstellung von Regressionsgeraden einer (°) immobilen (D_1), (*) einer mäßig mobilen (D_2) und (•) einer mobilen (D_3) Komponente verwendet.

Aus den Regressionsgeraden der MSD-Plots können über die Steigungen und die Schnittpunkte mit der Y-Achse erneut die Diffusionskoeffizienten und Lokalisierungs-genauigkeiten entnommen werden. Es wurden Diffusionskoeffizienten erhalten, die denen der unbehandelten Zellen ähneln und die ebenfalls einer immobilen, einer mäßig mobilen und einer mobilen Rezeptorpopulation zugeordnet werden können. Die erhaltenen Werte sind in den Tabellen 1-3 zusammengefasst.

Tabelle 1 zeigt die Diffusionskoeffizienten D_1 der immobilen Rezeptorpopulation sowie deren unterschiedlichen Anteile.

Tabelle 1: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_1), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_1) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit jeweils 1 µM Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 µM Hypericin.

Vorinkubation	D_1 [µm ² /s]	LG_1 [µm]	Anteil 1 [%]	R^2
Kontrolle	0,00022	0,048	20	0,06
Hyperforin	0,00022	0,058	21	0,03
Hyperosid	0,00081	0,048	17	0,25
Hypericin	0,00006	0,054	60	0,02
Citalopram	0,00010	0,055	24	0,04
Desipramin	0,00023	0,054	21	0,04

Bei der mäßig mobilen Rezeptorpopulation mit dem Diffusionskoeffizienten D_2 (Tabelle 2) wiesen die mit Desipramin und Hyperosid vorbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine um 18 %, respektive 29 %, leicht geringere Mobilität auf, während Hyperforin und Citalopram keinen merklichen Einfluss hatten. Mit Hypericin vorbehandelte Zellen zeigten dagegen eine um 50 % langsamere mäßig mobile Rezeptorpopulation (D_2).

Tabelle 2: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_2), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_2) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit jeweils 1 μ M Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 μ M Hypericin.

Vorinkubation	D_2 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	LG_2 [μm]	Anteil 2 [%]	R^2
Kontrolle	0,0055	0,077	43	0,75
Hyperforin	0,0053	0,098	49	0,35
Hyperosid	0,0039	0,094	44	0,23
Hypericin	0,0027	0,084	30	0,55
Citalopram	0,0060	0,085	41	0,81
Desipramin	0,0045	0,093	32	0,44

Bei der Mobilität von Rezeptoren mit dem Diffusionskoeffizienten D_3 (Tabelle 3) zeigte eine Vorbehandlung sowohl mit Hyperforin als auch mit Hyperosid eine deutliche Verlangsamung der Rezeptorpopulation um 41 % und 45 %. Auch die anderen Vorinkubationen führten zu einer Verlangsamung der Rezeptormobilität mit dem Diffusionskoeffizienten D_3 . Die Einflüsse von Hypericin mit 13 %, Desipramin mit 22 % und Citalopram mit 20 % waren allerdings deutlich geringer.

Tabelle 3: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_3), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_3) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit jeweils 1 μ M Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 μ M Hypericin.

Vorinkubation	D_3 [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	LG_3 [μm]	Anteil 3 [%]	R^2
Kontrolle	0,038	0,13	37	0,96
Hyperforin	0,023	0,21	30	0,09
Hyperosid	0,021	0,18	39	0,57
Hypericin	0,033	0,23	10	0,54
Citalopram	0,031	0,15	35	0,73
Desipramin	0,030	0,16	47	0,90

Ein Blick auf die Anteile der einzelnen Diffusionskoeffizienten nach Vorinkubation macht deutlich, dass Hypericin im Vergleich zu den Kontrollzellen eine deutlich veränderte Verteilung der einzelnen Diffusionskoeffizienten zeigte. Der Anteil von D_1 stieg von 20 % in den Kontrollzellen auf 60 %, der Anteil von D_2 sank von 43 % auf 30 % und der von D_3 fiel von 37 % auf 10 %. Die anderen Vorinkubationen zeigten auf die Anteile von D_1 nahezu keinen Einfluss. Diese liegen alle in einem Bereich zwischen 18 % und 24 %. Citalopram und Hyperosid zeigen auch bei D_2 und D_3 keine veränderte Verteilung der Anteile. Die Vorinkubation mit Hyperforin führte beim Anteil von D_2 zu einem Anstieg auf 49 % und zu einer Absenkung des Anteils von D_3 auf 30 %. Desipramin senkte den Anteil von D_2 auf 32 %, während es den Anteil von D_3 auf 47 % steigerte.

2.4.2 FCS-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf das Verhalten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren

Um den Einfluss von Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf die mittels FCS bestimmten lateralen Mobilitäten von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren zu untersuchen, wurden C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen für sechs Tage mit den Johanniskrautinhaltstoffen vorbehandelt. Als Vergleichsproben wurden darüber hinaus Desipramin und Citalopram untersucht. Die Rezeptoren wurden für die FCS-Messungen über ihren SNAP-tag mit dem Farbstoff SNAP-Cell[®] TMR-Star markiert. Es wurde, wie bereits bei der Charakterisierung des Rezeptors in Kontrollzellen, eine Auswertung der FCS-Daten mit einem Vierkomponentenmodell durchgeführt. Zwei der vier Komponenten waren bereits bekannt. τ_{Diff1} ist die Diffusionszeitkonstante des freien Farbstoffes, der bei den FCS-Messungen miterfasst wird und die daher festgelegt wurde. τ_{Diff1} lag bei $48 (\pm 1) \mu s$. In den SPT-Versuchen wurden nach den Vorinkubationen mit D₃ Diffusionskoeffizienten gefunden, die Diffusionszeitkonstanten von Rezeptoren entsprechen, die auch mittels FCS erfasst werden könnten. Aus den Diffusionskoeffizienten D₃ wurde dementsprechend für jede Vorinkubation eine Diffusionszeitkonstante berechnet und diese als τ_{Diff4} ebenfalls festgelegt. Damit konnte geprüft werden, ob die im SPT gemessene laterale Rezeptormobilität im FCS ebenfalls gefunden werden konnte. Je nach Vorinkubation lag τ_{Diff4} dabei im Bereich zwischen 350 ms und 650 ms. τ_{Diff2} und τ_{Diff3} wurden nicht festgelegt und konnten bei der Auswertung der Autokorrelationskurven frei gefittet werden (Tabelle 4).

Tabelle 4: Vergleich der nach Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Johanniskrautinhaltstoffen im FCS erhaltenen Diffusionszeitkonstanten der markierten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren sowie deren Anteile

Vorinkubation	$T_{Diff1}^{\#}$	T_{Diff2}	T_{Diff3}	$T_{Diff4}^{\#}$	Anteil	Anteil	Anteil	Anteil
	[ms]	[ms]	[ms]	[ms]	T_{Diff1} [%]	T_{Diff2} [%]	T_{Diff3} [%]	T_{Diff4} [%]
Kontrolle	0,048	1,8 ($\pm 0,1$)	24 (± 7)	351	15 (± 3)	36 (± 7)	44 (± 6)	4 (± 3)
Hyperforin	0,048	1,9 ($\pm 0,5$)	32 (± 12)	593	17 (± 4)	35 (± 6)	44 (± 8)	4 (± 3)
Hyperosid	0,048	2,1 ($\pm 0,2$)	27 (± 11)	634	16 (± 4)	28 (± 7) ^c	52 (± 8) ^c	4 (± 3)
Hypericin	0,048	2,5 ($\pm 0,7$)	28 (± 14)	405	28 (± 4) ^c	41 (± 7)	25 (± 8) ^c	6 (± 3)
Citalopram	0,048	2,1 ($\pm 0,5$)	32 (± 11)	438	19 (± 5) ^a	33 (± 9)	43 (± 6)	5 (± 3)
Desipramin	0,048	1,9 ($\pm 0,4$)	33 (± 15)	448	18 (± 7)	26 (± 9) ^c	43 (± 7)	12 (± 8) ^c

Wert festgelegt

Kontrolle (n = 39), 0,1 μ M Hypericin (n = 52), 1 μ M Hyperforin (n = 35), 1 μ M Hyperosid (n = 31), 1 μ M Citalopram (n = 32), 1 μ M Desipramin (n = 27)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; ^a p* < 0,05; ^b p** < 0,01; ^c p*** < 0,001

Die Vorbehandlung der Zellen mit den verschiedenen Johanniskrautinhaltstoffen sowie den Vergleichssubstanzen zeigte keine Veränderung der Diffusionszeitkonstanten T_{Diff2} und T_{Diff3} . Diese lagen jeweils in Bereichen zwischen 1,8 ms - 2,5 ms für T_{Diff2} und 24 ms – 33 ms für T_{Diff3} . Betrachtet man die Verteilung der Anteile der verschiedenen Mobilitäten, so werden Verschiebungen ersichtlich (Abbildung 2.21). Nach Behandlung mit Hyperosid sank der Anteil von T_{Diff2} statistisch signifikant auf 28 (± 7) % im Vergleich zu 36 (± 7) % in Kontrollzellen, während der Anteil von T_{Diff3} von 44 (± 6) % auf 52 (± 8) % statistisch signifikant stieg. Desipramin senkte ebenfalls den Anteil von T_{Diff2} im Vergleich zu Kontrollzellen statistisch signifikant auf 26 (± 9) %. Dieser Rückgang im Anteil von T_{Diff2} war mit einem statistisch signifikanten Anstieg des Anteils von T_{Diff4} von 4 (± 3) % auf 12 (± 8) % verbunden. Dahingegen zeigte eine Vorinkubation mit Hyperforin keinen Effekt auf die Verteilung der Rezeptormobilitäten. Der Anteil des freien Farbstoffes war unter Citalopramvorbehandlung statistisch signifikant um 4 % erhöht.

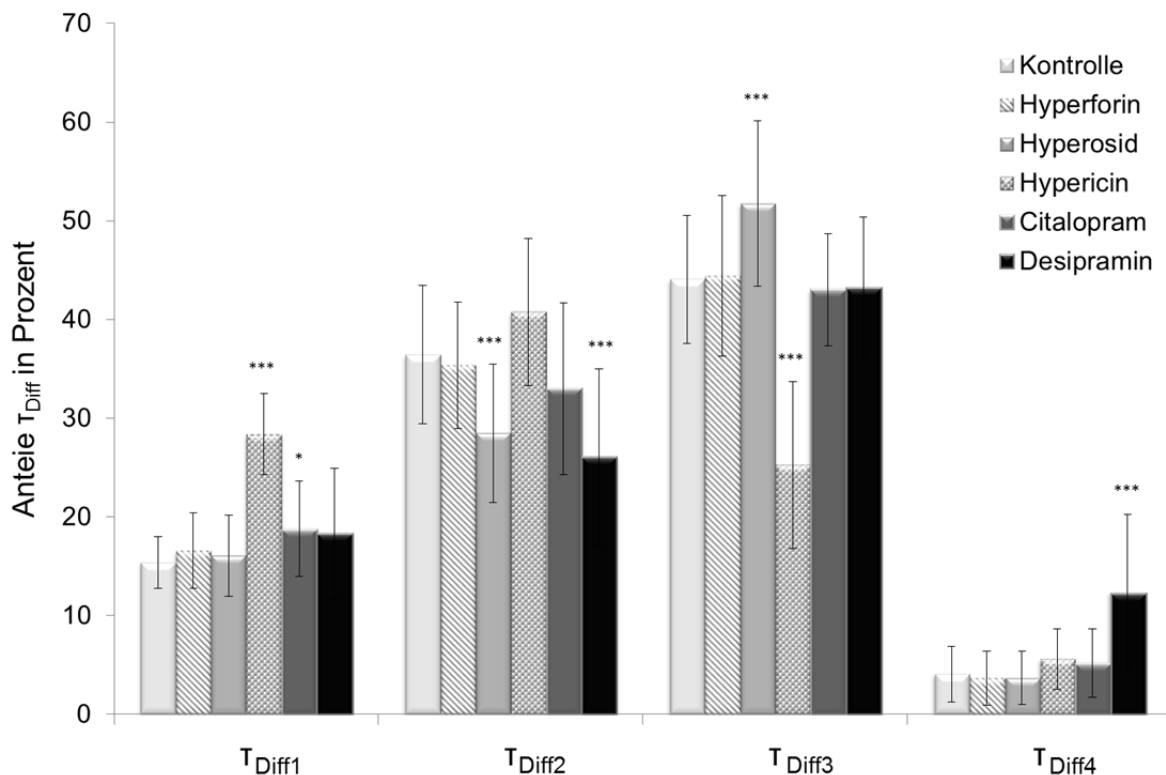


Abbildung 2.21: Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe auf die Verteilung der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptormobilitäten in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Mittels FCS bestimmte Anteile der Diffusionszeitkonstanten T_{Diff1} - T_{Diff4} nach Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 39), 0,1 μ M Hypericin (n = 52), 1 μ M Hyperforin (n = 35), 1 μ M Hyperosid (n = 31), 1 μ M Citalopram (n = 32) oder 1 μ M Desipramin (n = 27)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{***} < 0,001$

Wurden Zellen mit Hypericin vorinkubiert, stieg der Anteil von T_{Diff1} im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen statistisch signifikant von $15 (\pm 3) \%$ auf $28 (\pm 4) \%$ und T_{Diff2} von $36 (\pm 7) \%$ auf $41 (\pm 7) \%$, während der Anteil von T_{Diff4} unverändert blieb und der von T_{Diff3} von $44 (\pm 6) \%$ auf $25 (\pm 8) \%$ statistisch signifikant sank.

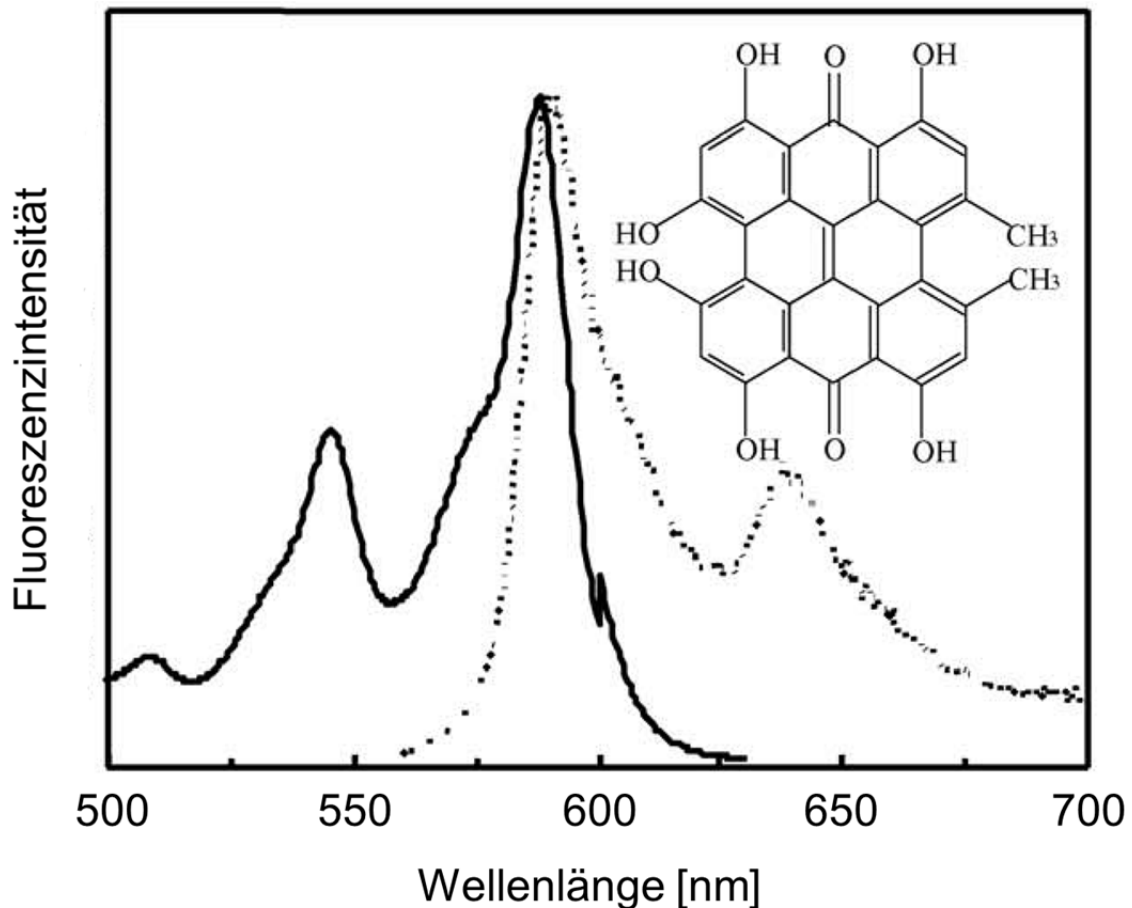


Abbildung 2.22: Fluoreszenzspektrum von Hypericin in Methanol nach Gadzovska et al. [93]

Wie am Absorptions- und Emissionsspektrum von Hypericin ersichtlich ist, könnte dieses bei den FCS-Untersuchungen, bei denen mit einem Argonlaser und einer Wellenlänge von 514 nm eingestrahlt wird, miterfasst werden (Abbildung 2.22). Um auszuschließen, dass der starke Anstieg des Anteils von T_{Diff1} nach Hypericinvorinkubation von Hypericin im Messpuffer herrührte, wurden FCS-Messungen oberhalb von vorinkubierten, mit SNAP-Cell[®] TMR-Star angefärbten Zellen durchgeführt. Dort konnte kein autokorrelierbares Signal gefunden werden. Darüber hinaus wurden mit Hypericin vorinkubierte C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen im FCS, ohne dass deren SNAP-getaggte 5-HT_{1A}-Rezeptoren mit Farbstoff gekoppelt wurden, untersucht. In den Plasmamembranen konnte ein schwaches, autokorrelierbares Signal gefunden werden (Abbildung 2.23).

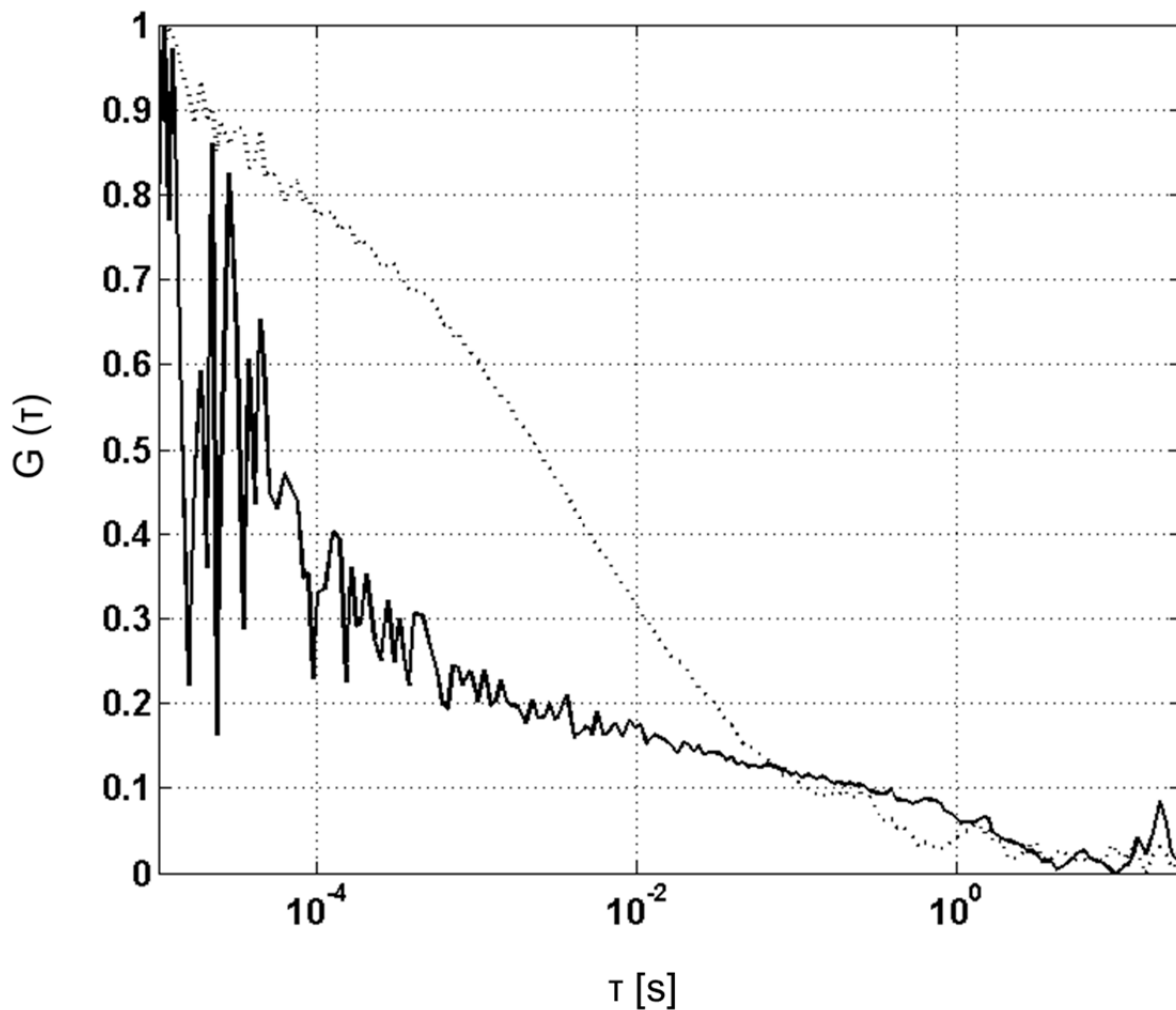


Abbildung 2.23: Normierte Autokorrelationskurven von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen die mit 0,1 μ M Hypericin vorinkubiert wurden

Zellen wurden entweder nicht (—) oder mit SNAP-Cell® TMR-Star (···) gekoppelt

Die gefundenen Autokorrelationskurven ließen sich am besten mit einem Dreikomponentenfit auswerten. τ_{Diff1} wurde dabei mit der Diffusionszeitkonstante von 48 μ s des freien Farbstoffes festgelegt und zeigte einen Anteil von 73 (\pm 9) %. Darüber hinaus konnten Diffusionszeitkonstanten mit $\tau_{\text{Diff2}} = 13$ (\pm 9) ms und $\tau_{\text{Diff3}} = 1221$ (\pm 823) ms gefunden werden, die zu 15 (\pm 6) % bzw. 12 (\pm 5) % vorlagen. Bemerkenswert ist, dass Diffusionszeitkonstanten im einstelligen bzw. dreistelligen Millisekundenbereich nicht vorkamen.

2.4.3 FCS-Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die laterale Mobilität von EL409-Alexa532-5-HT_{1A}-ST-Rezeptor-Komplexen in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Nachdem der Einfluss von den Johanniskrautinhaltstoffen auf unstimulierte 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren bereits ermittelt wurde, sollte anschließend ihr Effekt auf die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor-Agonist-Komplexen aufgeklärt werden. Dazu wurden die C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen für sechs Tage mit 0,1 µM Hypericin, 1 µM Hyperforin und 1 µM Hyperosid sowie mit jeweils 1 µM der Vergleichssubstanzen Citalopram und Desipramin vorbehandelt. Für die FCS-Untersuchungen wurden die Zellen mit 20 nM EL409-Alexa532 inkubiert. Die Diffusionszeitkonstante des freien Liganden wurde mit 69 (± 1,2) µs bestimmt und als τ_{Diff1} für die Auswertung festgelegt. Es wurde sowohl eine Drei- als auch eine Vierkomponentenauswertung der Autokorrelationskurven durchgeführt. Für die Hypericinvorinkubation wurden vier Diffusionszeitkonstanten gefunden, für alle anderen jeweils nur drei (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der im FCS-Bindungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen gefundenen Diffusionszeitkonstanten sowie deren Anteile nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltstoffen

Vorinkubation	T _{Diff1} [#]	T _{Diff2}	T _{Diff3}	T _{Diff4}	Anteil	Anteil	Anteil	Anteil
	[ms]	[ms]	[ms]	[ms]	T _{Diff1} [%]	T _{Diff2} [%]	T _{Diff3} [%]	T _{Diff4} [%]
Kontrolle	0,069	1,2 (± 0,5)	30 (± 10)		74 (± 6)	13 (± 5)	13 (± 3)	
Hyperforin	0,069	1,9 (± 1)	28 (± 8)		79 (± 4) ^c	9 (± 3) ^b	12 (± 2)	
Hyperosid	0,069	1,2 (± 0,4)	32 (± 12)		63 (± 7) ^c	21 (± 6) ^c	16 (± 2) ^c	
Hypericin	0,069	1,9 (± 0,6)	25 (± 8)	4956 (± 1016)	35 (± 5) ^c	43 (± 3) ^c	17 (± 2) ^c	6 (± 3)
Citalopram	0,069	1,8 (± 1)	34 (± 17)		75 (± 9)	10 (± 5)	15 (± 5) ^a	
Desipramin	0,069	0,8 (± 0,2)	35 (± 20)		72 (± 4)	14 (± 5)	14 (± 2)	

Wert festgelegt

Kontrolle (n = 156), 0,1 µM Hypericin (n = 61), 1 µM Hyperforin (n = 77), 1 µM Hyperosid (n = 56), 1 µM Citalopram (n = 40), 1 µM Desipramin (n = 60)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; ^a p* < 0,05; ^b p** < 0,01; ^c p*** < 0,001;

Die Diffusionszeitkonstanten der Rezeptor-EL409-Alexa532-Komplexe nach Vorinkubation lagen für alle Vorinkubationen im Bereich von 0,8 – 1,9 ms für T_{Diff2} und 25 – 35 ms für T_{Diff3}. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Hypericin ließ sich zusätzlich zu den beiden gefundenen Rezeptor-Ligand-Mobilitäten T_{Diff2} und T_{Diff3} eine dritte Rezeptor-Ligand-Mobilität T_{Diff4} detektieren. Diese lag bei 4956 (± 1016) ms.

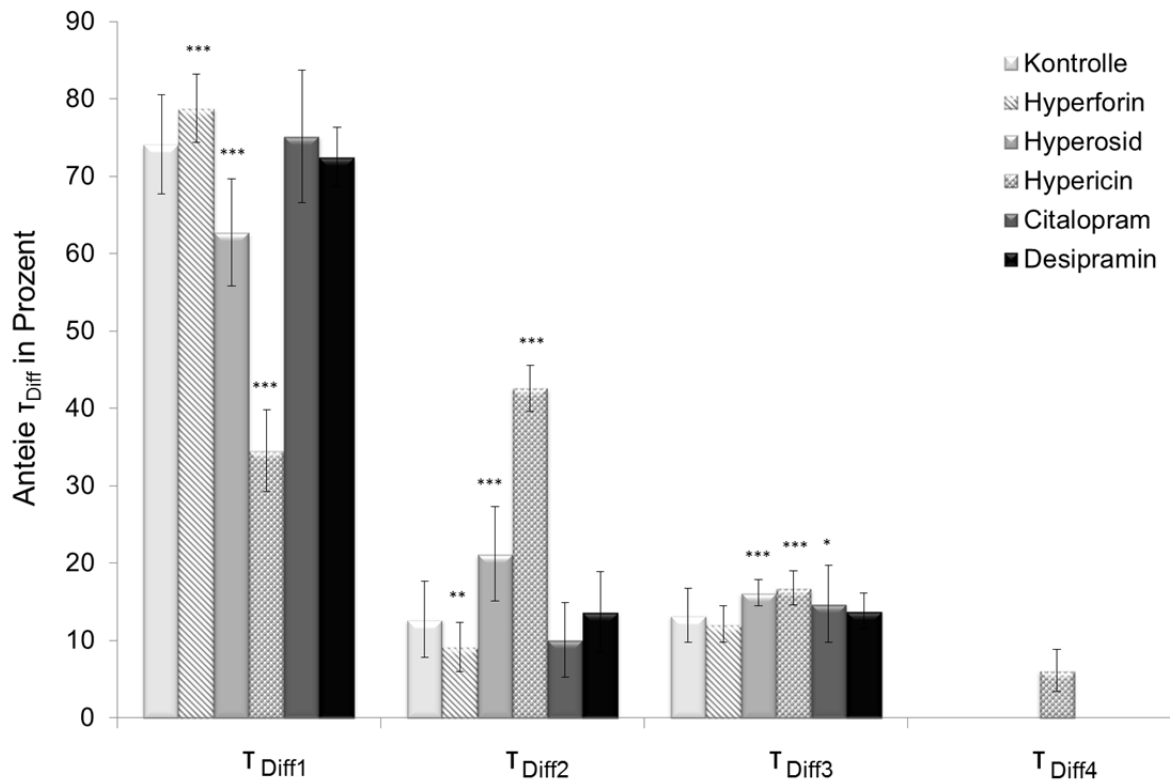


Abbildung 2.24: Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe auf die Verteilung der Diffusionszeitkonstanten von EL409-Alexa532 (T_{Diff1}) und EL409-Alexa532-5-HT_{1A}-ST-Rezeptor-Komplexen (T_{Diff2} - T_{Diff4}) in FCS-Experimenten an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Mittels FCS ermittelte Anteile der Diffusionszeitkonstanten von EL409-Alexa532 nach Vorinkubation der Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 156), 0,1 μ M Hypericin (n = 61), 1 μ M Hyperforin (n = 77), 1 μ M Hyperosid (n = 56), 1 μ M Citalopram (n = 40) oder 1 μ M Desipramin (n = 60)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$

Unter Hyperforinvorbehandlung stieg der Anteil von T_{Diff1} statistisch signifikant auf 79 (\pm 4) % an, während der Anteil von T_{Diff2} statistisch signifikant auf 9 (\pm 3) % sank (Abbildung 2.24). T_{Diff3} lag bei 12 (\pm 2) %. Hyperosid führte nach sechstägiger Vorbehandlung zu einem Absinken des Anteils von T_{Diff1} auf 63 (\pm 7) % und einem Anstieg der Anteile von T_{Diff2} auf 21 (\pm 6) % und T_{Diff3} auf 16 (\pm 2) %. Alle drei Veränderungen waren statistisch signifikant. Unter Citalopramvorbehandlung stieg der Anteil von T_{Diff1} auf 75 (\pm 9) %, während der von T_{Diff2} auf 10 (\pm 5) % fiel. Der Anteil von T_{Diff3} stieg statistisch signifikant auf 15 (\pm 5) %. Desipramin führte nicht zu statistisch signifikanten Veränderungen der Anteile der Diffusionszeitkonstanten. Diese lagen bei 72 (\pm 4) % für T_{Diff1} , bei 14 (\pm 5) % für T_{Diff2} und bei 14 (\pm 2) % für T_{Diff3} .

Unter Hypericinvorbehandlung zeigten sich die größten Veränderungen. So sank der Anteil von $\tau_{\text{Diff}1}$ von 74 (± 6) % auf 35 (± 5) %, der von $\tau_{\text{Diff}2}$ stieg von 13 (± 5) % auf 43 (± 3) % und der von $\tau_{\text{Diff}3}$ von 13 (± 3) % auf 17 (± 2) % an. Diese Veränderungen waren jeweils statistisch signifikant. Darüber hinaus wiesen Zellen, die mit Hypericin vorbehandelt wurden, eine Diffusionszeitkonstante $\tau_{\text{Diff}4}$ von 6 (± 3) % auf, welche bei Kontrollzellen nicht zu finden war.

Bei den FCS-Experimenten wurde mit einem Laser mit einer Wellenlänge von 514 nm angeregt. Wie dem Absorptions- und Emissionsspektrum von Hypericin entnommen werden kann, könnte dieses daher bei den FCS-Untersuchungen miterfasst werden (Abbildung 2.22). Aus diesem Grunde wurde EL409 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 647 gekoppelt, der im deutlich längeren Wellenlängenbereich angeregt wird. Allerdings konnte im FCS Experiment keine 5-HT_{1A}-ST-Rezeptorbindung von EL409-Alexa647 an den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen gefunden werden. Daher wurde EL409 mit dem bereits in FCS-Messungen an C6-Zellen erprobten Alexa Fluor[®] 532 gekoppelt.

2.4.4 Einfluss von Hypericin, Hyperforin und Hyperosid auf die Signaltransduktion der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren

Die Vorinkubation mit den Johanniskrautinhaltsstoffen führte zu Veränderungen in den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptormobilitäten sowie deren Anteilen. Es sollte überprüft werden, inwiefern sich diese gefundenen Einflüsse auch in der Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors fortsetzten. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist mit dem *Second Messenger System* der Adenylylcyclase negativ gekoppelt. Eine Aktivierung des Rezeptors führt also zu einer Abnahme des cAMP-Niveaus innerhalb der Zellen. Um mögliche Effekte der Inhaltsstoffe herauszuarbeiten, wurden verschiedene Aspekte untersucht. Es wurde geprüft, ob eine Vorinkubation unter nicht stimulierenden Bedingungen bereits den basalen cAMP-Spiegel verändert. Weiterhin wurde getestet, ob es einen direkten Effekt auf die Adenylylcyclase (AC) gibt. Dazu wurde diese mit Forskolin rezeptorunabhängig stimuliert. Darüber hinaus wurde ein Effekt der Vorinkubationen auf die mittels eines 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten (8-OH-DPAT) stimulierten Zellen oder auf die sowohl mit Forskolin als auch mit 8-OH-DPAT stimulierten Zellen untersucht.

Die Einflüsse von Hyperosid, Desipramin und Citalopram wurden jeweils in Konzentrationen von 0,1 µM, 0,5 µM und 1 µM getestet. Hypericin wurde in Konzentrationen von 0,01 µM, 0,05 µM und 0,1 µM zur Vorbehandlung eingesetzt (Tabelle 6).

Tabelle 6: Vergleich der normierten cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltstoffen sowie nach Stimulation mit 10 µM Forskolin, 10 µM 8-OH-DPAT oder mit 10 µM Forskolin und 10 µM 8-OH-DPAT.

	PBS	10 µM Forskolin	10 µM 8-OH-DPAT	10 µM Forskolin & 10 µM 8-OH-DPAT
Kontrolle	1,00 (± 0,08)	2,74 (± 0,18)	0,98 (± 0,07)	1,70 (± 0,12)
Hyperforin				
0,1 µM	1,08 (± 0,12) ^b	2,49 (± 0,25) ^c	0,97 (± 0,12)	1,48 (± 0,13) ^c
0,5 µM	1,02 (± 0,06)	2,80 (± 0,19)	0,83 (± 0,08) ^c	1,43 (± 0,25) ^b
1 µM	0,91 (± 0,06) ^c	3,19 (± 0,30) ^c	0,94 (± 0,08) ^a	1,71 (± 0,15)
Hyperosid				
0,1 µM	1,02 (± 0,12)	2,58 (± 0,26) ^a	1,00 (± 0,10)	1,64 (± 0,18)
0,5 µM	0,95 (± 0,12)	3,10 (± 0,23) ^c	0,99 (± 0,12)	1,67 (± 0,23)
1 µM	1,01 (± 0,10)	3,08 (± 0,51) ^c	0,96 (± 0,10)	1,69 (± 0,17)
Hypericin				
0,01 µM	1,08 (± 0,09) ^a	2,45 (± 0,22) ^c	0,95 (± 0,10)	1,55 (± 0,13)
0,05 µM	1,03 (± 0,10)	2,42 (± 0,35) ^c	0,96 (± 0,12)	1,48 (± 0,20) ^c
0,1 µM	1,14 (± 0,14) ^c	2,53 (± 0,35) ^a	1,00 (± 0,13)	1,65 (± 0,17) ^c
Citalopram				
1 µM	0,91 (± 0,10) ^b	3,22 (± 0,22) ^c	0,98 (± 0,07)	1,93 (± 0,17) ^c
Desipramin				
1 µM	0,86 (± 0,11) ^c	3,10 (± 0,29) ^c	0,90 (± 0,09) ^b	1,69 (± 0,16)

Kontrolle (n = 93), 0,1 µM Hyperforin (n = 31), 0,5 µM Hyperforin (n = 16), 1 µM Hyperforin (n = 27), 0,1 µM Hyperosid (n = 20), 0,5 µM Hyperosid (n = 17), 1 µM Hyperosid (n = 40), 0,01 µM Hypericin (n = 18), 0,05 µM Hypericin (n = 28), 0,1 µM Hypericin (n = 21), 1 µM Citalopram (n = 18), 1 µM Desipramin (n = 18)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; ^a p* < 0,05; ^b p** < 0,01; ^c p*** < 0,001;

In Abbildung 2.25 werden die normierten cAMP-Spiegel nach Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit den jeweils höchsten eingesetzten Konzentrationen verglichen. Dabei fällt auf, dass bereits die basalen cAMP-Spiegel durch die Vorinkubationen verändert wurden. Einzige Ausnahme bildet hier Hyperosid, das nicht zu einer Änderung der basalen cAMP-Spiegel führte. Hyperforin sowie Desipramin und Citalopram senkten den basalen cAMP-Spiegel statistisch signifikant um 9 %, 14 % beziehungsweise 9 %. Hypericin hingegen steigerte das cAMP-Niveau statistisch signifikant um 14 %. Wurde die AC rezeptorunabhängig mit Forskolin stimuliert, so stieg der cAMP-Spiegel jeweils statistisch signifikant im Vergleich zu

den Kontrollzellen nach Vorinkubation mit Hyperforin um 16 %, mit Hyperosid um 12 %, mit Desipramin um 13 % und mit Citalopram um 17 %. Auch hier verhielt sich Hypericin wieder entgegengesetzt und senkt die cAMP-Spiegel nach Forskolin vermittelter Stimulation statistisch signifikant um 8 %.

Wurden die C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 8-OH-DPAT stimuliert, war nur für die Hyperforin- und die Desipraminvorinkubation ein statistisch signifikanter Effekt zu beobachten. Hyperforin und Desipramin führten zu einer Absenkung der cAMP-Spiegel um 4 % bzw. 8 %. Eine Vorbehandlung der Zellen vor Gabe von sowohl Forskolin als auch 8-OH-DPAT führte nur bei Citalopram zu einer statistisch signifikanten Veränderung. Hier waren die cAMP-Spiegel nach der Stimulation um 14 % erhöht, während bei den anderen Vorinkubationen kein Effekt zu beobachten war.

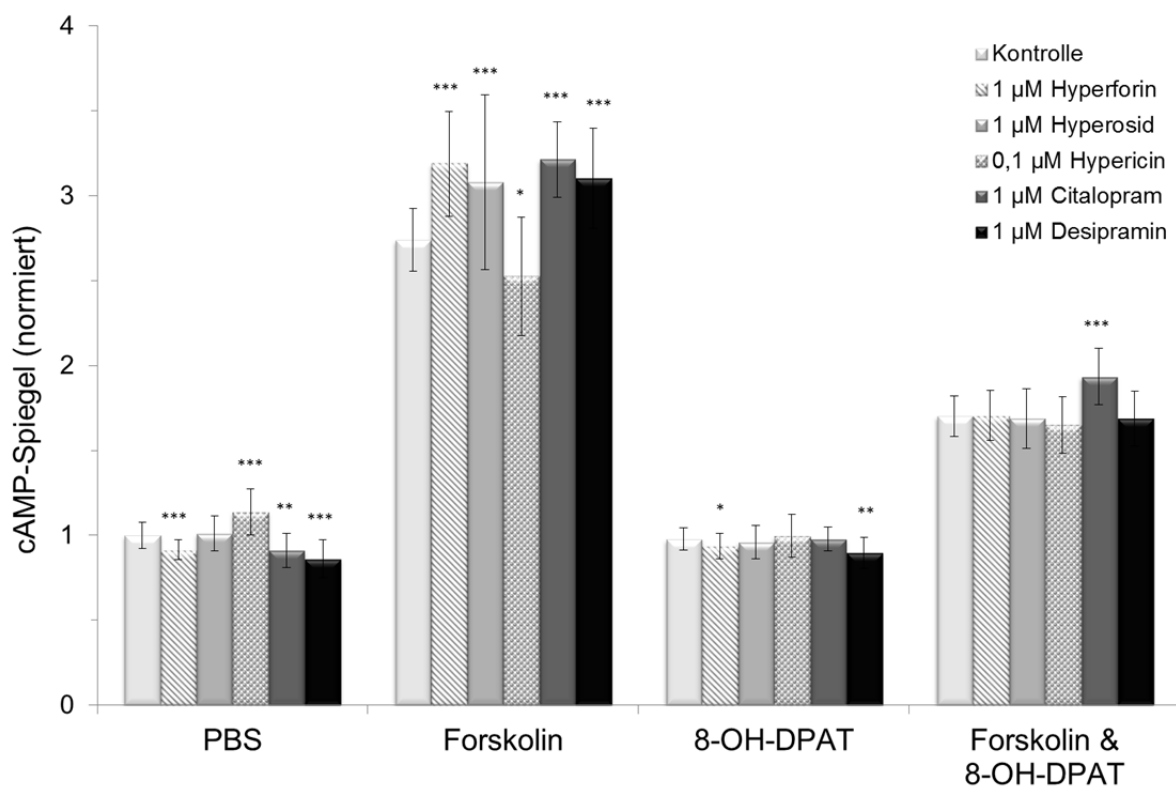


Abbildung 2.25: Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Stimulation mit PBS, 10 µM Forskolin, 10 µM 8-OH-DPAT oder jeweils 10 µM Forskolin und 8-OH-DPAT. Vorinkubation der Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 93), 0,1 µM Hypericin (n = 21), 1 µM Hyperforin (n = 27), 1 µM Hyperosid (n = 40), 1 µM Citalopram (n = 18) oder 1 µM Desipramin (n = 18)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$

In Abbildung 2.26 ist der Einfluss der Vorinkubation mit 0,1 μ M, 0,5 μ M oder 1 μ M Hyperforin dargestellt. C6-5HT_{1A}-ST-Zellen, die mit 0,1 μ M Hyperforin vorbehandelt wurden, zeigten eine statistisch signifikante Zunahme im basalen cAMP-Spiegel von 8 %. Demgegenüber erniedrigte eine Konzentration von 1 μ M die cAMP-Konzentration signifikant um 9 %, während 0,5 μ M Hyperforin keinen Effekt auf den Basalwert zeigte. Der cAMP-Spiegel nach direkter Stimulation der AC mit Forskolin wurde durch eine Vorinkubation mit 0,1 μ M Hyperforin signifikant um 9 % abgesenkt. Während 0,5 μ M Hyperforin keinen Einfluss hatte, steigerte eine Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 1 μ M Hyperforin den cAMP-Spiegel nach Stimulation im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant um 16 %.

Eine Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Hyperforin zeigte für die Konzentration von 0,5 μ M und 1 μ M einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Stimulation der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren mit 8-OH-DPAT. Diese senkten den cAMP-Spiegel um 15 % und 4 % ab, während 0,1 μ M keinen Einfluss hatte.

Wurden die Zellen sowohl mit Forskolin als auch 8-OH-DPAT stimuliert, konnten sowohl für eine Vorbehandlung mit 0,1 μ M als auch 0,5 μ M eine Senkung der cAMP-Spiegel um 13 % beziehungsweise 16% beobachtet werden. 1 μ M Hyperforin hatte keinen Einfluss auf den cAMP-Spiegel.

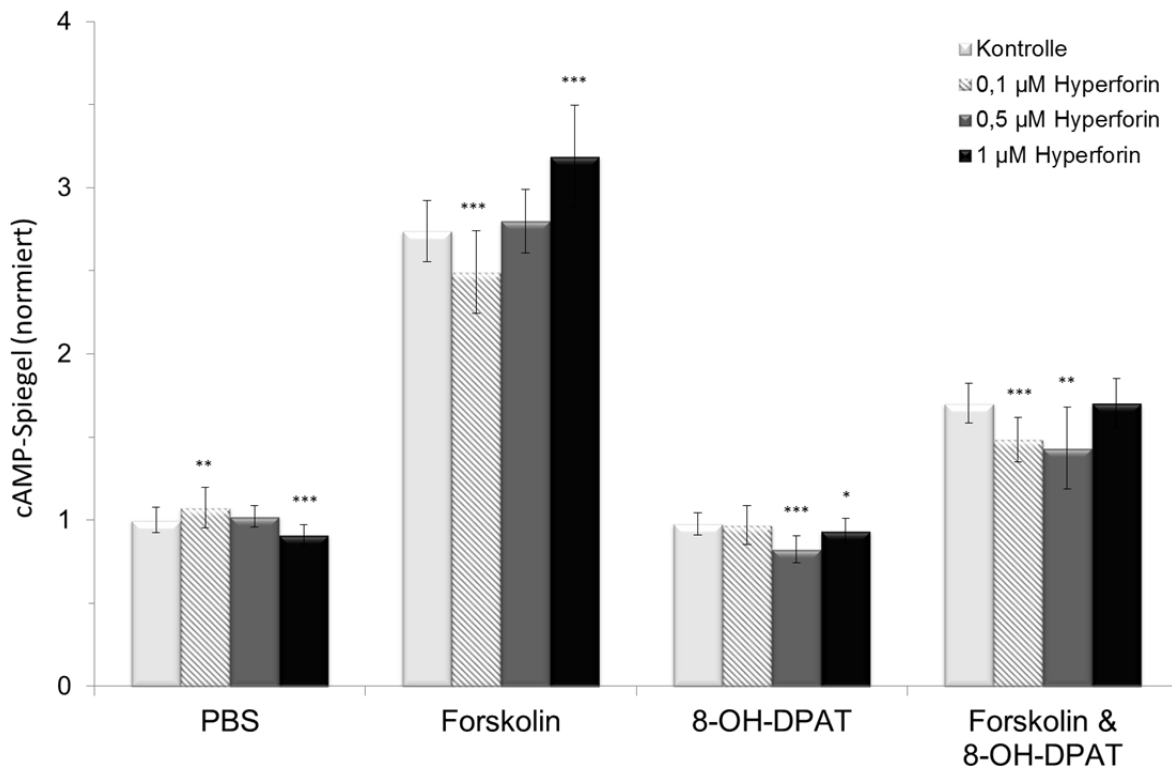


Abbildung 2.26: Einfluss von Hyperforin auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Stimulation mit PBS, 10 µM Forskolin, 10 µM 8-OH-DPAT oder jeweils 10 µM Forskolin und 8-OH-DPAT. Vorinkubation der Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 93), 0,1 µM (n = 31); 0,5 µM (n = 16) oder 1 µM Hyperforin (n = 27)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$

Der Einfluss von Hyperosid auf die cAMP-Spiegel bei gleicher Versuchsanordnung beschränkte sich auf die Forskolin vermittelte Stimulation (Abbildung 2.27). Hier führte eine Vorinkubation mit 0,1 µM Hyperosid zu einer Absenkung des cAMP-Spiegels nach der Stimulation um 6 %, während 0,5 µM und 1 µM Hyperosid den cAMP-Spiegel um 13 % beziehungsweise 12 % erhöhten. Alle Werte sind statistisch signifikant. Auf die Basalwerte, die Stimulation mit 8-OH-DPAT oder mit Forskolin und 8-OH-DPAT zeigte Hyperosid keine Auswirkung.

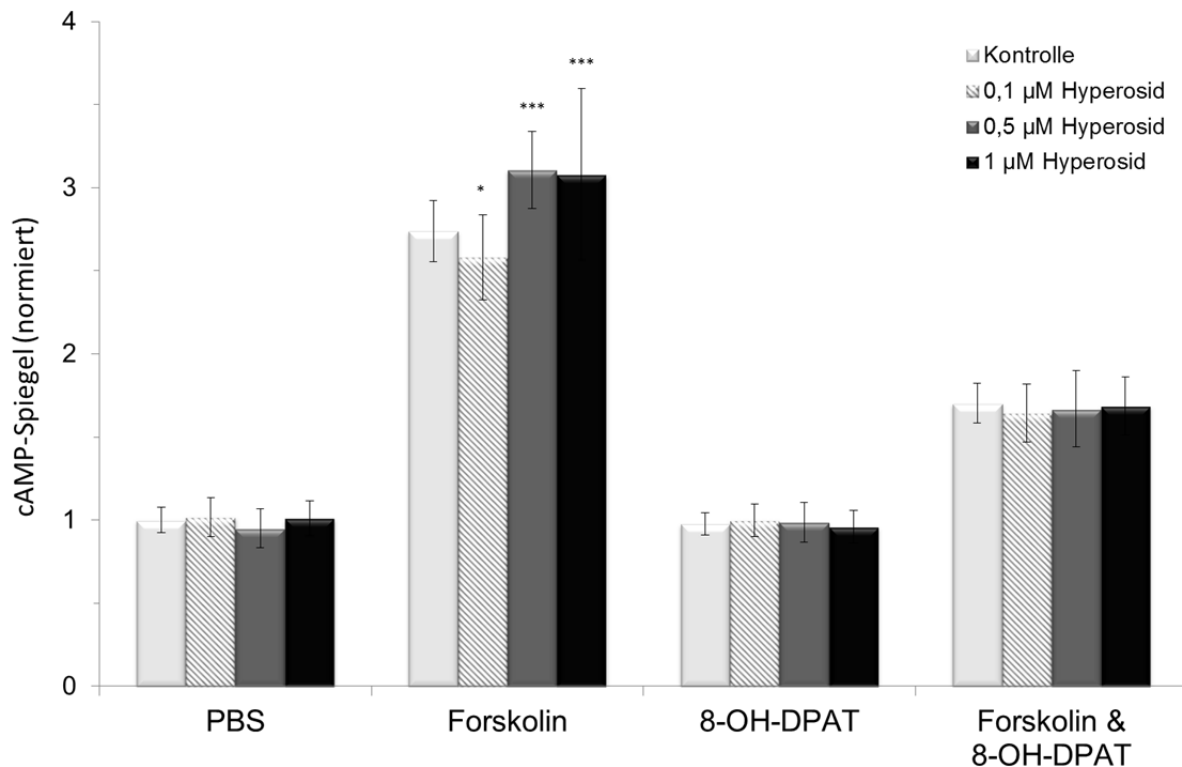


Abbildung 2.27: Einfluss von Hyperosid auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Stimulation mit PBS, 10 µM Forskolin, 10 µM 8-OH-DPAT oder jeweils 10 µM Forskolin und 8-OH-DPAT. Vorinkubation der Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 93), 0,1 µM (n = 20); 0,5 µM (n = 17) oder 1 µM Hyperosid (n = 40)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{***} < 0,001$

Die Ergebnisse der Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 0,01 µM, 0,05 µM oder 0,1 µM Hypericin sind in Abbildung 2.28 dargestellt. Hypericin steigerte bereits die basalen cAMP-Spiegel der Zellen um 8 % für 0,01 µM, um 3 % für 0,05 µM und um 14% für 0,1 µM. Die jeweiligen Steigerungen durch 0,01 µM und 0,1 µM sind statistisch signifikant. Auch auf die AC-Stimulation mit Forskolin hatte Hypericin einen Einfluss. Diese wurde um 11 % für 0,01 µM Hypericin, um 12 % für 0,05 µM Hypericin und um 9 % für 0,1 µM Hypericin statistisch signifikant vermindert. Auf die Stimulation der Zellen mit 8-OH-DPAT zeigte Hypericin keinen Einfluss. Wurden die Zellen allerdings sowohl mit Forskolin als auch mit 8-OH-DPAT vorbehandelt, konnte für 0,01 µM, 0,05 µM und 0,1 µM Hypericin ein absenkender Effekt von 9 %, 13 % beziehungsweise 3 % beobachtet werden. Dieser ist für die Konzentrationen von 0,1 µM und 0,5 µM statistisch signifikant.

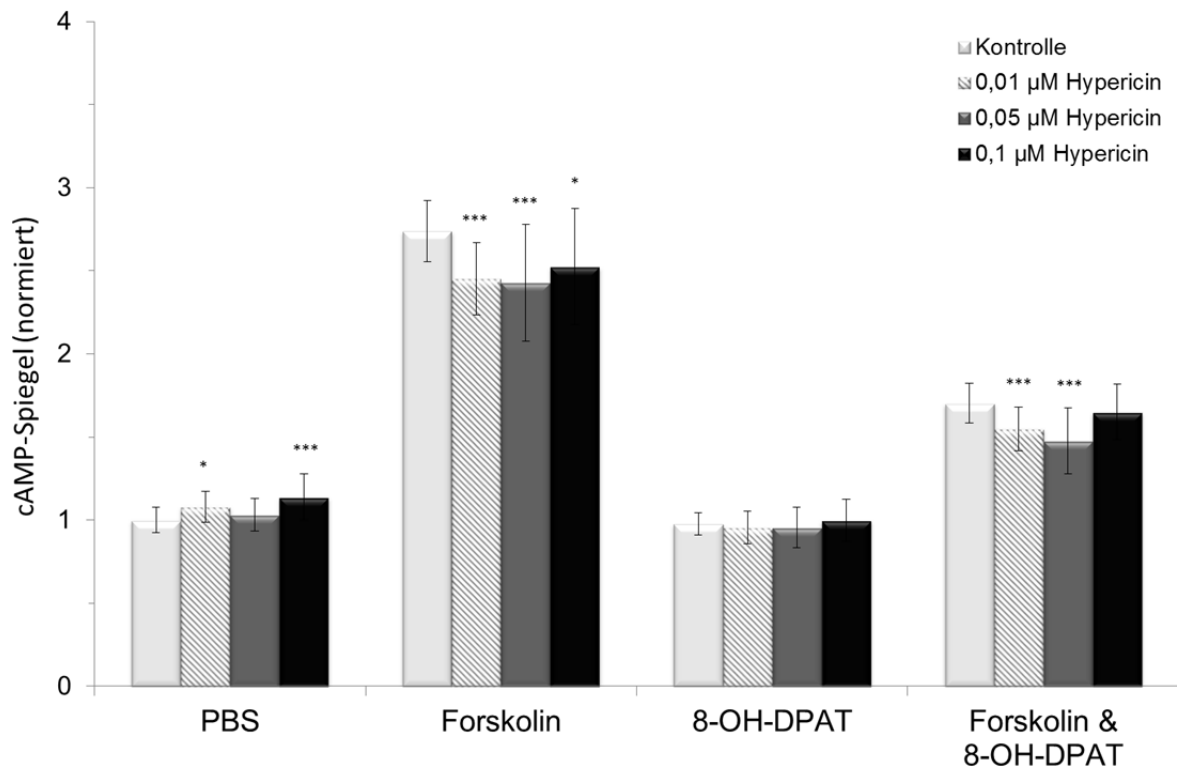


Abbildung 2.28: Einfluss von Hypericin auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Normierte cAMP-Spiegel nach 30-minütiger Stimulation mit PBS, 10 µM Forskolin, 10 µM 8-OH-DPAT oder jeweils 10 µM Forskolin und 8-OH-DPAT. Vorinkubation der Zellen für sechs Tage mit Vehikel (Kontrolle) (n = 93), 0,01 µM (n = 18); 0,05 µM (n = 28) oder 0,1 µM Hypericin (n = 21)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; $p^* < 0,05$; $p^{***} < 0,001$

3 Diskussion

3.1 Diskussion

Die Depression stellt die am häufigsten auftretende psychische Störung dar [95]. Ihre Prävalenz in den Vereinigten Staaten von Amerika liegt bei etwa 17 % [1]. Es wird prognostiziert, dass sie im Jahr 2030 nach HIV/Aids zur weltweit zweitbedeutendsten Krankheit wird [96]. Daher ist ein besseres Verständnis über die Entstehung dieser Erkrankung und ihre erfolgreiche Behandlung von größtem Interesse.

Es deutet vieles darauf hin, dass die serotonerge Neurotransmission im Mittelpunkt des Erkrankungsbildes der Depression steht [13]. Aufgrund einer komplexen Verschaltung der serotonergen Neuronen im ZNS sowie durch die Existenz verschiedenster Regelkreise sind andere Neurotransmitter wie etwa Noradrenalin, Dopamin und Glutamat ebenfalls involviert [14]. Der Großteil der heute verfügbaren Antidepressiva vermittelt seine Wirkung direkt oder indirekt über serotonerge Rezeptoren. Allerdings existieren auch diverse Therapeutika, beispielsweise Noradrenalinwiederaufnahmehemmer, die ihre antidepressive Wirkung über andere Rezeptorsysteme ausüben. Einer der wichtigsten Serotoninrezeptoren ist der 5-HT_{1A}-Rezeptor. Er tritt in zwei verschiedenen Formen auf. Es wird zwischen präsynaptischen Autorezeptoren in den Raphe-Kernen und postsynaptischen Rezeptoren im Hippocampus, der Amygdala und in der Hirnrinde unterschieden.

Durch PET-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei depressiven Patienten die Anzahl der postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren erniedrigt ist [66, 67]. Mittels Radiorezeptoruntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die 5-HT_{1A}-Autorezeptordichte in depressiven Suizidopfern erhöht war [68, 69].

Knockout-Mäuse, die keine postsynaptischen 5-HT_{1A}-Rezeptoren besitzen, zeigen depressive Symptome [71]. Werden die postsynaptischen Rezeptoren in der frühen Entwicklung wieder exprimiert, verschwindet das depressive Verhalten [72].

Der überwiegende Anteil der eingesetzten Antidepressiva zeigt seine antidepressive Wirkung erst nach einer gewissen Latenzzeit. Aus der zeitlichen Diskrepanz zwischen Beginn der Therapie und dem Einsetzen der antidepressiven Wirkung wurde geschlossen, dass nicht die von den Antidepressiva ausgelösten unmittelbaren Veränderungen der neuronalen Botenstoffkonzentrationen für die antidepressive Wirkung verantwortlich sind. Vielmehr werden durch die veränderten Botenstoffkonzentrationen angestoßene Anpassungsmechanismen für die

antidepressive Wirkung verantwortlich gemacht. So erreichen beispielsweise SSRI innerhalb kurzer Zeit nach Einnahme das ZNS und hindern dort Serotonintransporter daran, von Nervenzellen ausgeschüttetes Serotonin wiederaufzunehmen [74]. Infolgedessen steigt der Serotoninspiegel im ZNS. Dieser erhöhte Serotoninspiegel stimuliert unter anderem die 5-HT_{1A}-Autorezeptoren, welche eine weitere Ausschüttung von Serotonin verhindern und damit den Serotoninspiegel absenken. Erst nachdem die Autorezeptoren nach ein bis zwei Wochen desensitiviert sind, kommt es zu einem langfristig erhöhten Anstieg der Serotoninkonzentration an postsynaptischen Rezeptoren [76, 77]. Durch die erhöhte Serotoninkonzentration an der Postsynapse werden nun weitere Anpassungsmechanismen ausgelöst. So konnte unter anderem eine Desensitivierung von 5-HT_{2A}-Rezeptoren gefunden werden [97].

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Damit es zu einer erfolgreichen Transduktion eines externen Signals durch den Rezeptor ins Zellinnere kommt, muss ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ein G-Protein binden und dieses durch Austausch eines GDP mit einem GTP aktivieren. Das G-Protein spaltet sich nach der Aktivierung in seine α - und $\beta\gamma$ -Unterformen auf und aktiviert wiederum Effektorproteine wie beispielsweise die Adenylylcyclase (AC). Diese Protein-Protein-Interaktionen finden alle an der Plasmamembran statt und werden maßgeblich von der lateralen Mobilität der einzelnen Komponenten in der Membran beeinflusst. Diese als „mobile Rezeptor-Hypothese“ bezeichnete Theorie diente als Grundlage für die vorliegende Arbeit [83]. Um zu prüfen, ob Johanniskrautinhaltstoffe Einflüsse auf die laterale Mobilität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren haben, wurden diese mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie und Einzelmolekülverfolgung untersucht.

Beide Techniken erlauben eine gleichzeitige Bestimmung verschiedener Mobilitäten eines fluoreszierenden Partikels [85, 98]. Mittels FCS können schnell diffundierende Mobilitäten gut bestimmt werden, während nahezu immobile Partikel von der Technik nicht erfasst werden. Diese können allerdings gut unter Verwendung der Einzelmolekülverfolgung (SPT, *single particle tracking*) beobachtet werden. Das SPT ist hingegen nicht in der Lage, schnell diffundierende Partikel zu detektieren. Bei der in dieser Arbeit in SPT-Experimenten verwendeten, maximal zugelassenen Sprungweite von 1000 nm in aufeinander folgenden Bildern und einer

Aufnahmefrequenz von 20 Hz liegt der schnellste noch zu detektierende Diffusionskoeffizient bei $5 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Aufgrund der sich überlappenden Detektionsbereiche ergänzen sich beide Techniken sehr gut und sind in der Lage, ein umfassendes Bild der lateralen Mobilität des 5-HT_{1A}-Rezeptors zu zeichnen.

Läge ein Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe auf die laterale Mobilität des Rezeptors vor, könnte sich dieser in der Signaltransduktion des Rezeptors fortsetzen. Ob die Inhaltsstoffe die Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors ins Zellinnere verändern, sollte anhand einer quantitativen Bestimmung des *Second Messengers* cAMP überprüft werden.

Es wurden bereits Untersuchungen zur lateralen Mobilität des 5-HT_{1A}-Rezeptors in der Arbeitsgruppe von Professor Amitabha Chattopadhyay durchgeführt [99-102]. Diese fanden mit Hilfe von FRAP statt. Es wurde ein eYFP-Konstrukt des Rezeptors verwendet und in CHO-Zellen untersucht. Die Arbeitsgruppe beschäftigt sich insbesondere mit dem Einfluss von Agonisten und Antagonisten, aber auch von Aktinzytoskelet, Cholesterol, G-Proteinen auf die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-Rezeptoren. So konnten Pucadyil et al. zeigen, dass 5-HT_{1A}-Rezeptoren nach Stimulation nicht internalisiert werden [99]. Wurden die Rezeptoren durch Gabe von Serotonin stimuliert, erhöhte sich ihr Diffusionskoeffizient in FRAP-Experimenten von $0,077 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf $0,093 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Eine Stimulation mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Antagonisten p-MPPI hatte keinen Einfluss auf den Diffusionskoeffizienten. Als Ursache für die Steigerung der Diffusionsgeschwindigkeit wurde eine Abspaltung des gekoppelten G-Proteins vom 5-HT_{1A}-Rezeptor verantwortlich gemacht. So konnte eine vergleichbare Steigerung der Diffusionsgeschwindigkeit von 5-HT_{1A}-Rezeptoren nach rezeptorunabhängiger Stimulation der G-Proteine durch Mastoparan, bzw. AIF₄⁻ sowie nach Gabe von Pertussistoxin ebenfalls beobachtet werden. Ganguly et al. konnten in FRAP-Experimenten zeigen, dass eine Destabilisierung des Aktinzytoskeletts durch Gabe von Cytochalasin zu einer Erhöhung der mobilen Rezeptorfraktion führt [100]. Paila et al. wiesen in Radioligand-Bindungsstudien nach, dass die Bindung von 8-OH-DPAT an 5-HT_{1A}-Rezeptoren in CHO-Zellen nach Entfernung der Sphingolipide durch Inkubation der Zellen mit Fumonisin B₁ aus der Zellmembran reduziert ist [103]. Wurden den Membranen wieder Sphingolipide in Form von Sphingosin hinzugefügt, erreichte die 8-OH-DPAT-Bindung das Ausgangsniveau. Shrivastava et al. konnten zeigen, dass ein chronischer Entzug von Cholesterol durch die Gabe von Mevastatin in CHO-Zellen zu einer Reduktion der

8-OH-DPAT-Bindung in Radioligand-Bindungsstudien führte [102]. Diese Reduktion ist mit einem Absinken des Diffusionskoeffizienten in FRAP-Experiment bei gleichzeitigem Anstieg des mobilen Anteils des Rezeptors in der Zellmembran verbunden. Wurden den Zellmembranen Cholesterol hinzugefügt, erreichte die 8-OH-DPAT-Bindung das Ausgangsniveau.

Für die angestrebten Untersuchungen musste ein geeignetes Zellmodell gefunden werden. C6-Rattenglioblastomzellen sind als postsynaptisches Zellmodell etabliert [104], weil sie unter anderem über ein funktionierendes GPCR-AC-Signaltransduktionssystem verfügen und keine synaptischen Strukturen zu Nachbarzellen ausbilden. C6-Zellen exprimieren verschiedene GPCR, wie zum Beispiel den β_1 -adrenergen Rezeptor, den 5-HT_{1A}-Rezeptor allerdings nativ nicht [92]. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor musste daher stabil in die C6-Zellen transfiziert werden.

Um den 5-HT_{1A}-Rezeptor mittels FCS und SPT untersuchen zu können, musste er fluoreszenzmarkiert werden. Dafür stehen verschiedene Techniken zur Verfügung. Am häufigsten werden Rezeptoren gentechnisch mit autofluoreszierenden Proteinen gekoppelt. Wie oben bereits beschrieben, wurde durch Pucadyil et al. beispielsweise ein 5-HT_{1A}-Rezeptor-eYFP-Fusionsprotein erstellt und in CHO-Zellen transfiziert [99]. Anhand dessen wurden verschiedene Einflüsse auf die Mobilität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren untersucht. Allerdings weisen autofluoreszierende Proteine einen großen Nachteil auf. Sie sind nicht sonderlich photostabil [87] und können daher in SPT-Untersuchungen nicht verwendet werden. So wurde in der eigenen Arbeitsgruppe die Erfahrung gemacht, dass GFP im SPT bei den vorliegenden Aufnahmeparametern innerhalb von drei aufeinander folgenden Bildern ausbleicht. Für die in dieser Arbeit gewählte Auswertemethode war allerdings eine Mindesttrajektorienlänge von fünf Bildern gefordert und GFP zur Markierung der 5-HT_{1A}-Rezeptoren für diese Untersuchungen demnach ungeeignet. Daher wurde stattdessen der C-Terminus des 5-HT_{1A}-Rezeptors gentechnisch mit einem SNAP-tag gekoppelt. Diese Technik ermöglicht es, verschiedene synthetische Farbstoffe mit deutlich besseren photophysikalischen Eigenschaften über den SNAP-tag an den Rezeptor zu koppeln. Diese können daher länger auf der Zellmembran verfolgt werden und ermöglichen, die 5-HT_{1A}-Rezeptoren mittels SPT zu untersuchen.

Für diese Untersuchungen wurde ein SNAP-tag-Konstrukt des 5-HT_{1A}-Rezeptors gentechnisch generiert und C6-Zellen damit stabil transfiziert. Dies konnte mit zwei Tests bestätigt werden. Nach Inkubation mit dem Farbstoff SNAP-Cell® Oregon Green® war die Plasmamembran im Fluoreszenzmikroskop deutlich zu erkennen (Abbildung 2.1). Darüber hinaus sollte sichergestellt werden, dass der SNAP-getaggte Rezeptor funktionell war. Dies konnte anhand von cAMP-Assays nachgewiesen werden. Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist mit dem inhibitorischen G-Protein G_i gekoppelt, welches nach Aktivierung die AC hemmt. Dementsprechend sollten positiv transfizierte Zellen in der Lage sein, eine mittels Forskolin vermittelte, rezeptorunabhängige Stimulation der AC über eine Aktivierung des SNAP-getagkten 5-HT_{1A}-Rezeptors zu hemmen. In der Tat konnte eine 65%ige Hemmung der Forskolin vermittelten Stimulation gezeigt werden. Das Ausmaß der Hemmung ist vergleichbar mit den bei Fargin et al. [62] gefundenen Werten. Deren Untersuchungen in transient mit 5-HT_{1A}-Rezeptoren transfizierten COS-7-Zellen zeigten eine 80%ige Hemmung des β_2 -adrenerg vermittelten Anstieges des cAMP-Niveaus nach simultaner Stimulation mit Serotonin. Aufgrund dessen kann die erfolgreiche Expression eines funktionierenden SNAP-getagkten 5-HT_{1A}-Rezeptors in C6-Zellen festgestellt werden.

Neben einer Markierung des Rezeptors sollte für die FCS-Untersuchungen ebenfalls ein fluoreszierender Ligand etabliert werden. In der Arbeitsgruppe von Professor Marcello Leopoldo wurde eine Reihe solcher Liganden *de-novo* synthetisiert [105-107], die allerdings aufgrund ihrer photophysikalischen Eigenschaften nicht verwendet werden konnten. Von Nachteil waren beispielsweise zu geringe Quantenausbeuten oder die Löschung der Fluoreszenz in wässrigen Lösungen. Daher wurde in Kooperation mit Professor Leopoldo eine neue Strategie verfolgt. Der bereits bekannte spezifische 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist 8-OH-DPAT sollte so abgewandelt werden, dass er einer Kopplung mit einem bekannten und erprobten Farbstoff zugänglich wurde (Abbildung 2.3). Ausgehend von 8-Methoxy-2-propylamino-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen (EL401) wurde das 8-OH-DPAT Derivat EL409 synthetisiert, welches über eine Hexylamingruppe verfügt und daher eine Kopplung mit Succinimidylester-aktivierten Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht. In cAMP-Assays konnte gezeigt werden, dass der Ligand EL409 genau wie 8-OH-DPAT in der Lage ist, die Forskolin vermittelte Stimulation der AC um 73 % zu hemmen (Abbildung 2.4).

EL409 wurde mit Alexa Fluor® 532-succinimidylester umgesetzt. Dieser Farbstoff wurde in der eigenen Arbeitsgruppe bereits mehrfach erfolgreich verwendet und zeigte dabei eine gute Quantenausbeute, eine gute Löslichkeit und keine Fluoreszenzlöschung in wässrigen Lösungen sowie eine geringe unspezifische Bindung an die lipophile Plasmamembran von C6-Zellen aufgrund seiner hydrophilen Molekülstruktur [93, 94].

Nach der Kopplungsreaktion fand die Auftrennung des Reaktionsgemisches mittels HPLC statt und die Identität von EL409-Alexa532 konnte über sein UV/VIS-Spektrum (Abbildung 2.7) und mittels hochauflösender Massenspektrometrie (MS) bestätigt werden. So lag der Unterschied zwischen dem simulierten und dem gemessenen MS-Spektrum bei nur 0,6 ppm für den Molekülpeak und bei 0,7 ppm und 3,2 ppm für die Isotopenpeaks. Im cAMP-Assay zeigte EL409-Alexa532 ein dosisabhängiges, agonistisches Wirkprofil (Abbildung 2.10). Im FCS konnte eine Bindung von $26 (\pm 3) \%$ nach Inkubation mit 20 nM EL409-Alexa532 an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen gefunden werden. Diese Bindung konnte mit einem 1000-fachen Überschuss an nicht markiertem 8-OH-DPAT verdrängt werden, und es verblieb eine unspezifische Bindung von $8 (\pm 3) \%$. Damit zeigte EL409-Alexa532 eine bemerkenswert hohe spezifische Bindung im Vergleich zu anderen fluoreszenzmarkierten Liganden. Für NA-Alexa532, einem Noradrenalin-Derivat, lag beispielsweise die unspezifische Bindung an C6-Zellen bei 25 % [94].

Es konnten für den Rezeptor-Ligand-Komplex zwei verschiedene laterale Mobilitäten gefunden werden. Die Diffusionszeitkonstanten lagen bei $T_{Diff1} = 1,2 (\pm 0,5) \text{ ms}$ und bei $T_{Diff2} = 30,2 (\pm 9,8) \text{ ms}$, und die Anteile lagen bei 49 % für T_{Diff1} und 51 % für T_{Diff2} . In der eigenen Arbeitsgruppe durchgeführte Versuche mit NA-Alexa532 an C6-Zellen zeigten für den β_2 -adrenergen Rezeptor ebenfalls zwei laterale Mobilitäten für den Rezeptor-Ligand-Komplex mit vergleichbaren Diffusionszeitkonstanten von $T_{Diff1} = 0,65 \text{ ms}$ und T_{Diff2} mit 9,4 ms [33]. Für den β_2 -adrenergen Rezeptor wurden nach Bindung von NA-Alexa532 in A549-Zellen Diffusionszeitkonstanten von 1,4 ms und 34,7 ms gefunden [108]. Darüber hinaus wurden jeweils zwei Diffusionszeitkonstanten für Rezeptor-Ligand-Komplexe für den Endothelin ET_A-Rezeptor in A10-Zellen von 1,8 ms und 64 ms [109], für die Adenosin A₁- und A₃-Rezeptoren in CHO-Zellen von 8 ms und 233 ms sowie 6 ms und 131 ms [110, 111] und für Galanin-Rezeptoren in den Insulinom Zellen Rinm5f von 22 ms und 700 ms [112] nachgewiesen.

Für EL409-Alexa532 sollten auch die Dissoziationskonstante (K_D) und die maximale Bindungsdichte B_{\max} an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen bestimmt werden. Dies war aufgrund des hohen Expressionsniveaus des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors in den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nicht möglich. Für die Sättigung der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptorbindung waren EL409-Alexa532-Konzentrationen erforderlich, die durch den Arbeitsbereich der Photodiode nicht mehr erfasst wurden (Abbildung 2.14).

Der unstimulierte 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor sollte mittels SPT-Untersuchungen charakterisiert werden. Dabei konnten drei verschiedene laterale Mobilitäten mit Diffusionskoeffizienten von $D_1 = 0,00033 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_2 = 0,0055 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_3 = 0,038 \mu\text{m}^2/\text{s}$ differenziert werden.

Die von Grünwald et al. [113] und Sieben et al. [114] zur Charakterisierung einer Mobilität herangezogene Vorgehensweise, die Mindestsprungweite der dreifachen Lokalisierungsgenauigkeit als Grenzwert festzulegen, schränkt den zu beobachtenden Diffusionsgeschwindigkeitsbereich ein. Wird die Aufnahme­frequenz erhöht und damit der beobachtete Zeitraum verkürzt, in dem die Partikel diese Mindestsprungweite überschreiten müssen, wird der überwiegende Anteil der gefundenen Trajektorien als immobil eingeteilt. Bei einer für das verwendete Setup gefundenen Lokalisierungsgenauigkeit von 27 nm [114] und einer Aufnahme­frequenz von 20 Hz wären demnach alle Partikel, die langsamer als $0,033 \mu\text{m}^2/\text{s}$ diffundieren, als immobil zu klassifizieren. Um dieser Einschränkung zu entgehen, wurde der Diffusionskoeffizient aus der Steigung der Regressionsgeraden aus der Auftragung der einzelnen MSDs gegen Δt gewonnen. Dieses Verfahren ermöglicht es Diffusionskoeffizienten, die deutlich unterhalb der von Grünwald und Sieben gegebenen Mobilitätsdetektionsgrenze liegen, zu bestimmen. Die Lokalisierungsgenauigkeit kann darüber hinaus am Schnittpunkt der jeweiligen Regressionsgeraden mit der Y-Achse abgelesen werden.

Bei den Rezeptoren mit dem Diffusionskoeffizienten D_1 handelt es sich um eine immobile Komponente. Die entsprechende Regressionsgerade im MSD-Plot lässt keinerlei Steigung erkennen (Abbildung 2.13). Das Bestimmtheitsmaß R^2 der Regressionsgeraden ist mit 0,06 dazu sehr niedrig. Ein Anteil immobiler Rezeptoren konnte bereits für andere GPCR wie beispielsweise den β_2 -adrenergen und den

Geruchsrezeptor OR17-40 gefunden werden [114, 115]. Für die Immobilität wurden Interaktionen mit zytosolischen Proteinen, „clathrin-coated pits“ oder immobile membranäre Hindernisse als ursächlich angesehen.

Die Rezeptoren mit dem Diffusionskoeffizienten D_2 und D_3 können als mäßig mobil und mobil bezeichnet werden. Die Regressionsgerade von D_2 zeigt eine deutliche Steigung im MSD-Plot. Das Bestimmtheitsmaß R^2 mit 0,75 lässt darauf schließen, dass die gefundenen Daten gut zur Regressionsgeraden liegen (Abbildung 2.13). D_3 ist um den Faktor 7 größer als D_2 und das R^2 liegt bei 0,96 (Abbildung 2.12).

Die Diffusionskoeffizienten D_2 und D_3 charakterisieren typische in der Plasmamembran anzutreffende laterale Rezeptormobilitäten, die in der Literatur mehrfach beschrieben wurden. NK1-Rezeptoren, μ Opiod-Rezeptoren oder der metabotrope Glutamat Rezeptor 5 zeigen laterale Diffusionskoeffizienten mit Werten in Bereichen von 0,01 bis 0,25 $\mu\text{m}^2/\text{s}$, die mittels SPT gefunden wurden [116-118].

Sieben fand für den β_2 -adrenergen Rezeptor insgesamt vier verschiedene Rezeptormobilitäten mittels SPT [119]. Neben den beiden mäßig mobilen Populationen mit D_2 von 0,026 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und D_3 mit 0,087 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ konnte sie ebenfalls eine Fraktion immobiler Rezeptoren detektieren und fand darüber hinaus eine seltene, sehr schnelle Population mit einem Diffusionskoeffizienten von 2,15 $\mu\text{m}^2/\text{s}$.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit liegt in der Detektion der Einflüsse der Johanniskrautinhaltstoffe auf die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-Rezeptoren im Vergleich zu dem trizyklischen Antidepressivum (TZA) Desipramin und dem selektiven Serotonin Wiederaufnahmehemmer (SSRI) Citalopram. Die mittels SPT erfassten Daten lassen unter anderem auch immobile Rezeptoren erkennen, deren Diffusionskoeffizienten je nach Vorbehandlung formal unterschiedliche Werte aufweisen (Tabelle 1), welche aber für die Betrachtung von Einflüssen auf die laterale Mobilität keine Relevanz besitzen und daher nicht weiter verfolgt wurden. Relevant sind allerdings Veränderungen in den Anteilen der immobilen Komponente. Hier fällt vor allem der starke Anstieg des immobilen Anteils der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren nach Hypericinvorbehandlung von 20 % auf 60 % auf. Offensichtlich wird die Diffusion der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in der Zellmembran durch Hypericin massiv verlangsamt. Ein Grund hierfür könnte eine Veränderung der membranären Zusammensetzung durch Hypericin sein, was möglicherweise zu einer Abnahme in der Membranfluidität führt. Des Weiteren wären auch Veränderungen des

Zytoskelets, z.B. durch Ausbildung von membranären Hindernissen, denkbar [120]. Werden C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen, die für sechs Tage mit Hypericin vorinkubiert wurden, mit einer Wellenlänge von 532 nm angeregt, so ist eine starke Membranfärbung zu beobachten. Hypericin wird also massiv in die Membran eingelagert und könnte dadurch mobile 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren teilweise immobilisieren oder als möglicherweise immobile Komponente den Anteil immobilisierter 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren zu hoch erscheinen lassen. Eine nennenswerte direkte Erfassung des Hypericins im SPT-Experiment kann allerdings ausgeschlossen werden. Hypericin weist einen molaren Extinktionskoeffizienten von $40.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ und eine Quantenausbeute von 0,3 auf [121]. Im Vergleich dazu liegt der molare Extinktionskoeffizient von TMR bei $75.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [122] und die Quantenausbeute bei 0,7 [123]. Damit strahlt TMR bei gleich starker Anregung bereits fünfmal intensivere Fluoreszenz aus. Hinzu kommt, dass das Absorptionsmaximum von Hypericin bei 590 nm liegt (siehe Abbildung 2.22), während für die SPT-Untersuchungen ein Laser mit einer Wellenlänge von 532 nm verwendet wurde. In Anbetracht der damit zu erwartenden niedrigen Anregungseffizienz ist von einem noch größeren Unterschied in der Helligkeit zwischen Hypericin und TMR auszugehen. Eventuell erfasste Hypericinmoleküle würden demnach unter den Schwellenwert fallen, der für die Diatrack-Auswertung gesetzt wurde und für die Generierung von Trajektorien daher keine Berücksichtigung finden.

Die Vorinkubation der Zellen mit den anderen Testsubstanzen führte zu keinen bemerkenswerten Veränderungen der Anteile der immobilisierter 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren.

Bei den mobilen Rezeptorpopulationen mit den Diffusionskoeffizienten D_2 und D_3 müssen Effekte der Vorinkubationen auf die Diffusionskoeffizienten selbst sowie auf ihre Anteile der verschiedenen Mobilitäten unterschieden werden. Werden die Diffusionskoeffizienten D_2 der mäßig mobilen Rezeptorpopulation betrachtet, so wurden Veränderungen in der lateralen Diffusion nach Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen offensichtlich. Während Hyperforin und Citalopram keinen Einfluss aufweisen, führte die Vorinkubation mit Hyperosid, Hypericin und Desipramin zu einer sichtbaren Verlangsamung der Rezeptormobilität, die im Falle von Hypericin am deutlichsten war (Tabelle 2). Auch bei der mobilen Rezeptorpopulation, charakterisiert durch den Diffusionskoeffizienten D_3 , war ein verlangsamender Effekt nach Vorinkubation mit Hyperforin, Hyperosid und Desipramin auf die

Diffusionskoeffizienten zu beobachten, während Hypericin und Citalopram keinen Einfluss zeigten (Tabelle 3).

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist ein konstitutiv aktiver Rezeptor [124]. Das bedeutet, dass ein Teil der Rezeptoren immer aktiv ist, selbst wenn diese nicht von Agonisten belegt sind. Wird davon ausgegangen, dass verschiedene Rezeptorzustände sich jeweils durch ein charakteristisches laterales Diffusionsverhalten unterscheiden lassen, dann sollten Wirkstoffe mit Einfluss auf die Aktivität von Rezeptoren auch deren Diffusionsprofil mit den dazugehörigen Anteilen verändern.

Die Auswertung der Diffusionsdaten von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperforin ergibt eine Abnahme der mobilen Rezeptorpopulation von 37 % auf 30 %, während der Anteil mäßig mobiler Rezeptoren von 43 % auf 49 % ansteigt. Für Hyperosid und Citalopram ist eine solche Veränderung nicht zu erkennen. Im Falle von Hypericin sinken die Anteile der beiden mobilen Rezeptorpopulationen deutlich auf 30% bzw. 10%. Unter Einfluss von Desipramin ist ein Anstieg der mobilen Population von 37% auf 47 % zu verzeichnen, wobei das Vorkommen mäßig mobiler Rezeptoren nahezu um den gleichen Betrag von 43% auf 32 % abnimmt. Die Befunde lassen erkennen, dass sowohl die synthetischen Antidepressiva als auch die Inhaltsstoffe aus Johanniskraut die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren sehr unterschiedlich beeinflussen. Während das Diffusionsverhalten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren unter Hyperforin- und Hyperosidvorbehandlung im Vergleich zu Kontrollzellen insgesamt langsamer wird, wurde unter Desipraminvorbehandlung eine Zunahme mobiler Rezeptoren gefunden. Die in SPT-Experimenten erfasste mobile Rezeptorpopulation liegt in einem Diffusionsgeschwindigkeitsbereich, der auch mittels FCS detektiert werden kann, während die mäßig mobilen und immobilen Rezeptoren keinen Beitrag zur Fluoreszenzfluktuation leisten und daher in der Autokorrelationskurve nicht in Erscheinung treten. Daher wurde der Diffusionskoeffizient der mobilen Komponente aus den SPT-Versuchen nach Gleichung 3 in eine Diffusionszeitkonstante umgerechnet. Bei der Auswertung der FCS-Daten mittels eines Vierkomponentenmodells wurden sie sowie die Diffusionszeitkonstante des freien Farbstoffes festgelegt. Neben diesen beiden festgelegten Komponenten konnten zwei weitere mobile Rezeptorpopulationen mit den Diffusionskoeffizienten D_4 und D_5 bestimmt werden. Im FCS konnte im Gegensatz zum SPT kein Einfluss einer Vorinkubation auf die Diffusionskoeffizienten gefunden werden (Tabelle 7).

Tabelle 7: Vergleich der nach Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Johanniskrautinhaltstoffen mittels SPT und FCS erhaltenen Diffusionskoeffizienten der markierten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren sowie deren Anteile

D₁ und D₂ wurden mittels SPT, D₃ sowohl mit Hilfe von SPT als auch FCS und D₄ und D₅ mittels FCS bestimmt. D_{frei} ist der Diffusionskoeffizient des nicht gekoppelten Farbstoffes. Die Diffusionskoeffizienten der FCS-Untersuchungen wurden aus den Diffusionszeitkonstanten anhand Gleichung 3 errechnet.

	Kontrolle	Hyperforin	Hyperosid	Hypericin	Citalopram	Desipramin
D ₁ [µm ² /s]	0,0002	0,0001	0,0008	0,0001	0,0001	0,0002
Anteil [%]	20	21	17	60	24	21
D ₂ [µm ² /s]	0,0055	0,0053	0,0039	0,0027	0,0060	0,0045
Anteil [%]	43	49	44	30	41	32
D ₃ [µm ² /s]	0,038	0,023	0,021	0,033	0,031	0,030
Anteil SPT [%]	37	30	39	10	35	47
Anteil FCS [%]	4	4	4	6	5	12
D ₄ [µm ² /s]	0,55	0,42	0,50	0,48	0,42	0,40
Anteil [%]	44	44	52	25	43	43
D ₅ [µm ² /s]	7,3	7,0	6,3	5,4	6,4	7,2
Anteil [%]	36	35	28	41	33	26
D _{frei} [µm ² /s]	280	280	280	280	280	280
Anteil [%]	15	17	16	28	19	18

Für den β₁-adrenergen Rezeptor konnten Diffusionskoeffizienten von 0.07 µm²/s und 12 µm²/s in C6-β₁AR-GFP-Zellen gefunden werden [32]. Für den β₂-adrenergen Rezeptor lagen die Diffusionskoeffizienten in HEK293β₂AR-GFP-Zellen bei 0.07 µm²/s und 6 µm²/s [125]. Die beobachteten Diffusionskoeffizienten liegen daher in durchaus üblichen Bereichen.

Während die verschiedenen Vorinkubationen keinen Einfluss auf die beobachteten Diffusionskoeffizienten haben, ist teilweise eine Verschiebung der Anteile der verschiedenen Mobilitäten zu sehen. So nimmt unter Hyperosidvorbehandlung der Anteil von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren mit D₅ von 36 % auf 28 % ab, während der Anteil der langsameren Rezeptoren mit D₄ von 44 % auf 52 % steigt. Neben der Verlangsamung in den mittels SPT bestimmten Diffusionskoeffizienten der mobilen Rezeptorpopulationen kann hier also für Hyperosid eine weitere Veränderung der Rezeptormobilitäten hin zu langsameren Diffusionszeiten beobachtet werden. Für Hyperforin ist weder eine Veränderung der Diffusionskoeffizienten noch der Anteile der verschiedenen Mobilitäten zu beobachten.

Für Hypericin ist bei den FCS-Untersuchungen eine massive Verschiebung der Anteile zu sehen. So geht der Anteil der Rezeptorpopulation mit D_4 von 44 % auf 25 % zurück, und der Anteil der Rezeptoren mit D_5 steigt von 36 % auf 41 %. Darüber hinaus ist ein Anstieg des Anteils mit dem Diffusionskoeffizienten des freien Farbstoffes von 16 % auf 28 % zu beobachten. Speziell letztere Veränderung geht auf die Tatsache zurück, dass Hypericin aufgrund seines Absorptions- und Emissionsspektrums (Abbildung 2.22) im FCS-Experiment bei der verwendeten Wellenlänge von 514 nm fluoresziert und ebenfalls detektiert wird (Abbildung 2.23). Das Laservolumenelement erfasst neben der Zellmembran selbst auch ein Teil ober- und unterhalb der Membran. Außerhalb der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen, die für sechs Tage mit Hypericin vorbehandelt worden waren, konnte kein autokorrelierbares Signal gefunden werden. Dementsprechend handelt es sich bei dem Anstieg der schnellsten Mobilität nicht um freies, außerhalb der Zelle diffundierendes Hypericin. Eine Erfassung zytosolischen Hypericins kann angenommen werden. Darüber hinaus trägt ein weiterer Effekt zum Anstieg der Anteile der beiden schnellsten Komponenten bei. Aufgrund seiner geringen Photostabilität bleicht erfasstes Hypericin im Laufe der FCS-Messung aus. Geschieht dies, während ein Zytosol- oder Membran-lokalisiertes Hypericinmolekül durch das Volumenelement diffundiert, wird das Ausbleichen und der damit verbundene Abfall der Fluoreszenzintensität vom FCS so interpretiert, als habe das Teilchen das Volumenelement bereits durchquert. Dadurch erscheinen Anteile der schnellsten Diffusionskoeffizienten fälschlicherweise größer, als sie wirklich sind. Wird Hypericin in der Membran von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen, die für sechs Tage inkubiert wurden, vermessen, so ergeben sich neben einem schnellen, frei diffundierenden Anteil zwei weitere Mobilitäten. Diese liegen bei $0,011 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $1,04 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und sind zu 15 % und 12 % vorhanden. Die Diffusionskoeffizienten sind denen des untersuchten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors durchaus ähnlich und machen eine Interpretation der beobachteten Veränderungen im FCS-Experiment unmöglich. Ein Farbstoff, der bei längeren Wellenlängen absorbiert, wäre für die gewünschten Untersuchungen besser geeignet, allerdings gibt es einen solchen SNAP-Cell-Farbstoff derzeit für den SNAP-tag noch nicht. Sollte ein solcher Farbstoff in Zukunft erhältlich sein, wäre es sinnvoll, die Untersuchungen zum Einfluss von Hypericin auf die 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren erneut durchzuführen. Eine Vorinkubation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Citalopram führte weder zu einer Änderung der Diffusionskoeffizienten noch zu einer Verschiebung der Anteile.

Unter Desipraminvorbehandlung konnte im FCS-Experiment indessen eine Verschiebung der Anteile der verschiedenen Mobilitäten hin zu einem langsameren Diffusionsverhalten beobachtet werden. Der Anteil der schnellsten Komponente mit D_5 sank von 36 % auf 26 %. Dahingegen stieg der Anteil der Rezeptorpopulation mit D_3 in FCS-Experimenten von 4 % auf 12 %. Interessanterweise ist der Anstieg des Anteils dieser Rezeptorpopulation sowohl im SPT wie auch im FCS gut zu sehen. Offenkundig verändern mäßig mobile Rezeptoren mit D_2 und schnell diffundierende Rezeptoren mit D_5 ihr Diffusionsverhalten unter dem Einfluss von Desipramin und sind nun durch eine mittlere mobile Mobilität mit D_3 charakterisiert.

Mit Hilfe der SNAP-tag-markierten 5-HT_{1A}-Rezeptoren konnten die Einflüsse der Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltstoffen und den Vergleichssubstanzen auf die laterale Mobilität unbelegter Rezeptoren charakterisiert werden (Tabelle 7). Neben diesen Versuchen wurde unter Zuhilfenahme des fluoreszenzmarkierten 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten EL409-Alexa532 die laterale Mobilität der Rezeptor-Ligand-Komplexe im FCS-Experiment an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen untersucht. Die hierfür verwendete Konzentration von 20 nM generierte nach 10 Minuten eine ausreichende Anzahl von Rezeptor-Ligand-Komplexen auf der Plasmamembran, die eine Aufzeichnung von wenig verrauschten Autokorrelationskurven ermöglichte, die Zelle aber nicht in der Weise stimulierte, dass mit regulatorischen Prozessen zu rechnen war, die wiederum die laterale Mobilität beeinflusst hätten.

In Kontrollzellen konnten neben dem frei diffundierenden EL409-Alexa532 zwei weitere laterale Mobilitäten mit D_{RLK1} von 11,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und D_{RLK2} von 0,45 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ für die Rezeptor-Ligand-Komplexe beobachtet werden. Aufgrund der hohen Spezifität der Bindung kann davon ausgegangen werden, dass die gefundenen Mobilitäten das Diffusionsverhalten von Rezeptor-Ligand-Komplexen charakterisieren. Im Vergleich zu den unbelegten Rezeptoren werden für die Rezeptor-Ligand-Komplexe nicht drei, sondern nur zwei Mobilitäten gefunden. Nach Vorinkubation mit den Johanniskrautinhaltstoffen und den Vergleichssubstanzen konnten für die Rezeptor-Ligand-Komplexe laterale Mobilitäten mit den Diffusionskoeffizienten D_{RLK2} von 0,38 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ bis 0,53 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ und D_{RLK1} von 6,9 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ bis 16,3 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ gefunden werden (Tabelle 8). Die am wenigsten mobile Komponente der unbelegten Rezeptoren, die je nach Vorinkubation im Bereich von 0,021 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ bis 0,038 $\mu\text{m}^2/\text{s}$ liegt, ist nicht zu sehen.

Einzigste Ausnahme bildet die Hypericinvorinkubation, in deren Folge eine dritte mobile Rezeptor-Ligand-Komplex-Populationen mit einem D_{RLK3} von $0,0027 \mu\text{m}^2/\text{s}$ erhalten wurde. Keine der getesteten Substanzen zeigte einen bemerkenswerten Einfluss auf die Rezeptor-Ligand-Komplex-Populationen mit den Diffusionskoeffizienten D_{RLK1} und D_{RLK2} im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Auch bei den Anteilen sind nur relativ geringe Einflüsse festzustellen. Für die Hypericinvorbehandlung fällt allerdings eine deutliche Zunahme im Anteil der RLKs mit D_{RLK1} von 13 % auf 43 % auf.

Das an EL409 gekoppelte Alexa Fluor[®] 532 wird in den FCS-Experimenten mit einem Argonlaser bei 514 nm angeregt. Dabei wird, wie bereits bei den Ergebnissen der FCS-Experimente mit den unbelegten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren beschrieben, auch das in der Plasmamembran und im Zytosol eingelagerte Hypericin erfasst. Dies führt zu einem fälschlich hohen Wert für Rezeptor-Ligand-Komplexe mit D_{RLK1} im FCS-Experiment, da sich die Diffusionskoeffizienten von Hypericin in der Plasmamembran und Rezeptor-Ligand-Komplexen mit D_{RLK1} kaum unterscheiden. Dieser Einfluss kann leider nicht quantifiziert werden und macht eine Interpretation der erhaltenen Daten unmöglich.

Dieses Problem wurde versucht zu umgehen. EL409 wurde mit Alexa Fluor[®] 647 gekoppelt, um den fluoreszenzmarkierten Liganden bei einer längeren Wellenlänge anregen zu können. Es konnte allerdings im FCS-Experiment keine Bindung von EL409-Alexa647 an den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor gefunden werden. Im Gegensatz zu Alexa Fluor[®] 532 behindert der Alexa Fluor[®] 647-Anteil die Interaktion des fluoreszenz-markierten EL409 mit dem Rezeptor erheblich, möglicherweise aus sterischen Gründen.

Nach Citalopramvorinkubation zeigte sich ein statistisch signifikanter Anstieg der weniger mobilen Komponente mit dem Diffusionskoeffizienten D_{RLK2} . Da es sich allerdings nur um einen zweiprozentigen Anstieg handelt, und dies die einzige statistisch signifikante Veränderung nach Citalopramvorinkubation im Vergleich zu Kontrollzellen darstellt, wird diesem keine weitere Beachtung geschenkt. Desipramin zeigte ebenfalls keinen Einfluss auf das Diffusionsverhalten der Rezeptor-Ligand-Komplexe.

Tabelle 8: Vergleich der im FCS-Bindungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen gefundenen Diffusionskoeffizienten der Rezeptor-Ligand-Komplexe sowie deren Anteile nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltstoffen

Die Diffusionskoeffizienten wurden aus den mittels FCS bestimmten Diffusionszeitkonstanten anhand Gleichung 3 errechnet.

	Kontrolle	Hyperforin	Hyperosid	Hypericin	Citalopram	Desipramin
D _{RLK3} [µm ² /s] Anteil				0,0027 6		
D _{RLK2} [µm ² /s] Anteil	0,45 13	0,48 12	0,42 16	0,53 17	0,39 15	0,38 14
D _{RLK1} [µm ² /s] Anteil	11,3 13	7,1 9	11,4 21	6,9 43	7,3 10	16,3 14

Nachdem Einflüsse der Johanniskrautinhaltstoffe Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf die laterale Mobilität von unbelegten und belegten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren gefunden wurden, sollte geprüft werden, ob sich diese auch im weiteren Verlauf der Signalkaskade des Rezeptors nachweisen lassen. Darüber hinaus sollte einer Dosis-Wirkungs-Beziehung nachgegangen werden, wobei die Zellen mit Konzentrationen zwischen 0,1 µM und 1 µM für Hyperosid und Hyperforin sowie zwischen 0,01 µM und 0,1 µM für Hypericin vorbehandelt wurden.

Der 5-HT_{1A}-Rezeptor ist über das G-Protein G_i gekoppelt und hemmt bei Aktivierung folglich die cAMP-Produktion [62]. Eine Stimulation der C6-5-HT_{1A}-ST-Kontrollzellen mit 8-OH-DPAT führte nur zu einer 2%igen Senkung des cAMP-Spiegels. Dieser geringe Effekt entspricht den bei Fargin et al. gefundenen Werten für transient transfizierte COS-7-Zellen [62].

Um den hemmenden Einfluss aktivierter 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren auf die cAMP-Spiegel im Experiment deutlicher darstellen zu können, wurde die cAMP-Synthese mit Forskolin, einem direkten Aktivator der AC, simultan mit 8-OH-DPAT stimuliert. Zunächst wurde allerdings der Effekt der reinen Forskolin vermittelten rezeptorunabhängigen Stimulation der AC bestimmt, indem die C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen alleinig mit Forskolin stimuliert wurden. Unbehandelte Kontrollzellen zeigten im Vergleich zum Basalwert eine um den Faktor 2,74 erhöhte cAMP-Konzentration nach Stimulation mit Forskolin. Die gleichzeitige Gabe von 8-OH-DPAT senkte den Faktor

deutlich von 2,74 auf 1,7. Einflüsse auf den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor oder auch direkt auf die AC lassen sich unter diesen experimentellen Parametern eindeutig feststellen.

Dementsprechend wurde nach Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Johanniskrautinhaltstoffen und synthetischen Antidepressiva der basale cAMP-Spiegel, die Bildung von cAMP nach direkter Aktivierung der AC durch Forskolin sowie nach Stimulation der Zellen mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonisten 8-OH-DPAT und nach simultaner Stimulation der Zellen sowohl mit Forskolin als auch 8-OH-DPAT bestimmt.

Es ließen sich bereits Veränderungen der basalen cAMP-Spiegel nach Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen für sechs Tage nachweisen. So stieg dieser bei 0,1 µM Hyperforin um 8 % an, änderte sich bei 0,5 µM Hyperforin nicht und sank nach Vorbehandlung mit 1 µM Hyperforin um 9 %. Hyperosid hatte keinen Einfluss auf die basalen cAMP-Spiegel. Eine Vorinkubation mit Hypericin führte jeweils zu einer Zunahme der basalen cAMP-Spiegel. Diese waren für 0,01 µM Hypericin und 0,1 µM Hypericin um 8 % und 14 % erhöht. Die Steigerung des basalen Spiegels durch 0,05 µM Hypericin war nicht statistisch signifikant. Citalopram und Desipramin führten jeweils zu einer Senkung des basalen Spiegels um 9 % bzw. 14 %.

Die Interpretation der basalen cAMP-Spiegel stellt sich insofern schwierig dar, als dass diese von verschiedenen Faktoren und Rezeptoren der Zellen abhängig sind. Neben den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren werden beispielsweise auch β_1 - und β_2 -Rezeptoren von den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen exprimiert. Für nicht transfizierte C6-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass die basalen cAMP-Spiegel durch Hyperforin, Hyperosid und Desipramin dosisabhängig gesenkt werden [32]. Hyperforin senkte hier den basalen cAMP-Spiegel um bis zu 10 %, Hyperosid um bis zu 5 % und Desipramin sogar um bis zu 15 %. Eine solche Dosis-Wirkung scheint auch für Hyperforin in den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen zu finden zu sein. Allerdings wird der cAMP-Spiegel im Vergleich zu untransfizierten Zellen nicht stringent gesenkt, sondern wird unter Vorbehandlung mit 0,1 µM Hyperforin erst einmal erhöht. Auch unter Vorinkubation der Zellen mit 0,5 µM Hyperforin ist der basale cAMP-Spiegel im Vergleich zu untransfizierten Zellen erhöht. Erst bei einer Konzentration von 1 µM Hyperforin findet man eine Absenkung des cAMP-Spiegels sowohl in untransfizierten C6-Zellen als auch in den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen.

Obwohl in untransfizierten Zellen ein Absenken des basalen cAMP-Niveaus durch Vorbehandlung mit Hyperosid zu sehen ist [32], kann dies in den C6-5-HT_{1A}-ST-

Zellen nicht beobachtet werden. Hier zeigt sich kein Einfluss der Vorinkubation auf die basalen cAMP-Spiegel.

Hypericin erhöht den basalen cAMP-Spiegel untransfizierter C6-Zellen dosisabhängig, aber nicht statistisch signifikant um bis zu 9 % [unveröffentlichte Daten Hage-Hülsmann, A]. Diese Erhöhung zeigt sich, wenn auch nicht dosisabhängig, ebenfalls für die C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen.

Der senkende Effekt von Desipramin auf den basalen cAMP-Spiegel fiel in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Zellen vergleichbar aus. Quantitative Aussagen bezüglich der Effekte der verschiedenen Vorinkubationen auf die basalen cAMP-Spiegel der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen zu treffen, fällt schwer. Der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor wird in den Zellen überexprimiert, wodurch die anderen Einflüsse auf den cAMP-Spiegel etwas in den Hintergrund gerückt werden. Allerdings zeigt sich der AC-hemmende Effekt von aktivierten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren auch erst in seinem ganzen Ausmaß, wenn die AC stimuliert wird. Werden die Zellen nur mit 8-OH-DPAT stimuliert, senkt dies das cAMP-Niveau nur um 2 %. Daher können die beobachteten Effekte auf den basalen cAMP-Spiegel nach Vorbehandlung mit den Testsubstanzen nicht isoliert auf den 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor bezogen werden und müssen als eine Kombination aus verschiedenen Effekten, vermittelt über Interaktionen mit mehreren Rezeptoren und/oder Effektorproteinen, angesehen werden.

Interessanterweise zeigen die verschiedenen Vorinkubationen auch einen Einfluss auf die cAMP-Bildung nach rezeptorunabhängiger Stimulation der AC durch Forskolin. Hier konnte für Hyperforin eine dosisabhängige Veränderung gefunden werden. Diese verhält sich genau umgekehrt zu den basalen Spiegeln. 0,1 µM Hyperforin hemmt die cAMP-Bildung, 0,5 µM Hyperforin hat abermals keine Auswirkung und durch 1 µM Hyperforin steigt das relative cAMP-Niveau von 2,74 auf 3,19. Ein vergleichbarer Befund ergibt sich nach Vorbehandlung mit Hyperosid. 0,1 µM Hyperosid hemmt die Forskolin vermittelte cAMP-Bildung, während 0,5 µM und 1 µM Hyperosid zu einem gleichstarken Anstieg der cAMP-Produktion führen. Auch bei diesem Experiment bildet Hypericin eine Ausnahme. Während die beiden anderen Johanniskrautinhaltsstoffe zumindest in der höchsten eingesetzten Konzentration die cAMP-Bildung nach Forskolin Stimulation verstärken, zeigt

Hypericin in allen getesteten Konzentrationen eine Hemmung der Forskolin vermittelten cAMP-Produktion, allerdings ohne klare Dosis-Wirkungs-Beziehung.

Auch unter Citalopram- und Desipraminvorinkubation steigt die cAMP-Bildung auf mit Hyperforin und Hyperosid vergleichbare Spiegel.

Bei den Ergebnissen nach Stimulation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit 8-OH-DPAT gibt es statistisch signifikante Veränderungen der cAMP-Niveaus nach Vorbehandlung mit Hyperforin und Desipramin. Allerdings ist der Effekt der 8-OH-DPAT-Stimulation in den unbehandelten Kontrollzellen bereits so niedrig, dass einer Veränderung der hier beobachteten Werte keine weitere Bedeutung zugemessen wird.

Die Ergebnisse der parallelen Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT hingegen sind äußerst aussagekräftig. Bei diesem Teilversuch kann der Effekt der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren auf die cAMP-Spiegel beobachtet werden. Diese sind in der Lage, die Forskolin vermittelte Stimulation deutlich zu hemmen, wie die Ergebnisse der Kontrollzellen zeigen. Es werden vermutlich auch andere, in dem verwendeten Zellsystem existierende Effekte auf die cAMP-Spiegel vorhanden sein. In Anbetracht dessen, dass der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor in den C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen allerdings überexprimiert wird, sollten diese bei voller Aktivierung der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor-Signaltransduktion in den Hintergrund treten. Nach Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin konnte eine verstärkte Hemmung der cAMP-Produktion beobachtet werden. Der relative cAMP-Spiegel fiel hier von 1,7 auf 1,48 für 0,1 µM und 1,43 für 0,5 µM Hyperforin im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Nach Vorbehandlung der Zellen mit 1 µM Hyperforin zeigte sich kein Unterschied zu den Kontrollzellen. Allerdings müssen zur vollständigen Interpretation dieser Ergebnisse auch die Daten der Forskolin Stimulation herangezogen werden. Einflüsse auf die direkte AC-Stimulation sollten sich auch im Ergebnis der parallelen Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT widerspiegeln. Bei der Differenz der relativen cAMP-Spiegel nach Forskolinstimulation und paralleler Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT (Tabelle 9) zeigt sich in Kontrollzellen eine Differenz von 1,04. Bei der Vorinkubation der Zellen mit 0,1 µM Hyperforin ist diese Differenz unverändert. Bei der Vorbehandlung mit 0,5 µM und 1 µM Hyperforin zeigt sich eine Differenz von 1,36 und 1,48. In Zellen, die so vorbehandelt wurden, ist also eine gesteigerte Hemmung der Forskolin vermittelten Stimulation der AC durch die 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren zu beobachten (Tabelle 9).

Tabelle 9: Vergleich der Differenzen aus den normierten cAMP-Spiegel von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltstoffen sowie nach Stimulation mit 10 µM Forskolin oder 10 µM Forskolin und 10 µM 8-OH-DPAT.

		10 µM Forskolin	10 µM Forskolin & 10 µM 8-OH-DPAT	Differenz
Kontrolle		2.74 (± 0.18)	1.70 (± 0.12)	1,04
Hyperforin	0,1 µM	2.49 (± 0.25) ^c	1.48 (± 0.13) ^c	1,01
	0,5 µM	2.80 (± 0.19)	1.43 (± 0.25) ^b	1,36
	1 µM	3.19 (± 0.30) ^c	1.71 (± 0.15)	1,48
Hyperosid	0,1 µM	2.58 (± 0.26) ^a	1.64 (± 0.18)	0,94
	0,5 µM	3.10 (± 0.23) ^c	1.67 (± 0.23)	1,43
	1 µM	3.08 (± 0.51) ^c	1.69 (± 0.17)	1,39
Hypericin	0,01 µM	2.45 (± 0.22) ^c	1.55 (± 0.13)	0,90
	0,05 µM	2.42 (± 0.35) ^c	1.48 (± 0.20) ^c	0,95
	0,1 µM	2.53 (± 0.35) ^a	1.65 (± 0.17) ^c	0,88
Citalopram	1 µM	3.22 (± 0.22) ^c	1.93 (± 0.17) ^c	1,29
Desipramin	1 µM	3.10 (± 0.29) ^c	1.69 (± 0.16)	1,41

Kontrolle (n = 93), 0,1 µM Hyperforin (n = 31), 0,5 µM Hyperforin (n = 16), 1 µM Hyperforin (n = 27), 0,1 µM Hyperosid (n = 20), 0,5 µM Hyperosid (n = 17), 1 µM Hyperosid (n = 40), 0,01 µM Hypericin (n = 18), 0,05 µM Hypericin (n = 28), 0,1 µM Hypericin (n = 21), 1 µM Citalopram (n = 18), 1 µM Desipramin (n = 18)

Statistische Signifikanz bestimmt mittels einfaktorieller Varianzanalyse, post hoc Test: Dunnett-Test; ^a p < 0,05; ^b p^{**} < 0,01; ^c p^{***} < 0,001

Aufgrund dieser erhöhten Differenz zwischen den Stimulationen mit Forskolin und der simultanen Forskolin- und 8-OH-DPAT-Stimulation könnte man eine durch Hyperforin vermittelte erhöhte Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren annehmen. Dieser Theorie steht allerdings der erhöhte cAMP-Spiegel nach reiner Forskolin Stimulation entgegen, der dann erniedrigt sein müsste.

Auch ein bisher in der Literatur noch nicht beschriebener Effekt von Hyperforin auf die AC käme als Erklärung für die gefundenen Werte in Frage. Würde deren Aktivität durch Hyperforin erhöht, wären allerdings auch erhöhte cAMP-Spiegel nach simultaner Stimulation der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Forskolin und 8-OH-DPAT zu erwarten. Dies ist jedoch nicht der Fall.

Es könnte auch ein Einfluss auf die konstitutive Aktivität des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors durch 1 µM Hyperforin vorliegen. Eine Hemmung dieser Aktivität würde die gefundene Erhöhung der cAMP-Spiegel nach Forskolin-Stimulation erklären. Werden die Rezeptoren durch 8-OH-DPAT aktiviert, tritt die konstitutive Aktivität in den

Hintergrund und es zeigt sich ein im Vergleich zu Kontrollzellen unverändertes Bild. Für die weitere Interpretation der Daten sollte man nun die Ergebnisse der SPT- und FCS-Untersuchungen heranziehen. Dort wurde eine Verlangsamung des unbelegten Rezeptors, charakterisiert durch einen niedrigeren Wert für D_3 sowie einen erhöhten Anteil an D_2 , gefunden. In FCS-Studien mit belegtem Rezeptor konnte keine Veränderung beobachtet werden.

Ganguly et al. [100] konnten mittels FRAP-Experimenten einen direkten Zusammenhang zwischen dem Anteil der mobilen Fraktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors und seiner Signaltransduktion finden. Ein Anstieg des Anteils der mobilen Fraktion des Rezeptors war mit einer verstärkten Signaltransduktion des Rezeptors verbunden, was sich in einer verstärkten Hemmung der AC widerspiegelte.

Demnach müsste die in dieser Arbeit gefundene Verlangsamung der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren und die Verschiebung der Anteile hin zu weniger mobilen Rezeptorpopulationen eine verminderte Signaltransduktion des unbelegten Rezeptors erwarten lassen. Belegte Rezeptoren sollten eine unveränderte Signaltransduktion zeigen. Und in der Tat ist die Signaltransduktion der unbelegten Rezeptoren nach Vorbehandlung mit 1 μ M Hyperforin vermindert, was sich in einem erhöhten cAMP-Spiegel nach Stimulation mit Forskolin ausdrückt. Weder im FCS noch in den cAMP-Untersuchungen wurde ein Einfluss auf die belegten Rezeptoren gefunden und die cAMP-Spiegel liegen nach simultaner Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT auf Kontrollniveau. Demnach wird für Hyperforin eine Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren angenommen. Ein Einfluss auf die belegten Rezeptoren scheint nicht vorzuliegen.

Die Einflüsse von Hyperosid auf die cAMP-Bildung von C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen ähneln den Befunden, die nach einer Hyperforinvorbehandlung festgestellt wurden. Auch hier ist ein Anstieg der Forskolin vermittelten cAMP-Bildung für 0,5 μ M und 1 μ M Hyperosid im Vergleich zu unbehandelten C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen zu beobachten. Werden die Zellen gleichzeitig mit Forskolin und 8-OH-DPAT behandelt, liegen die cAMP-Werte auf gleichem Niveau wie die der Kontrollzellen. Die Differenz zwischen Forskolin- und paralleler Forskolin- und 8-OH-DPAT-Stimulation ist mit 1,43 und 1,39 für 0,5 μ M und 1 μ M Hyperosid vergleichbar zu 1 μ M Hyperforin. Um zu prüfen, ob die Ergebnisse der Hyperosidvorbehandlung eine ähnliche Interpretation wie die der Hyperforinvorinkubation zulassen, müssen erneut die SPT- und FCS-Ergebnisse

herangezogen werden. In diesen konnte eine deutliche Verlangsamung der lateralen Mobilitäten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren, charakterisiert durch niedrigere Werte der Diffusionskoeffizienten D_2 und D_3 , sowie eine Verschiebung der Anteile von der Rezeptormobilität mit D_5 zu Gunsten der weniger mobilen Population mit D_4 beobachtet werden. Ein Einfluss der Hyperosidvorinkubation auf die Mobilität der belegten Rezeptoren ist nicht zu sehen. Dies würde eine ähnliche Interpretation der Ergebnisse wie für Hyperforin zulassen und eine Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren nahelegen.

Die nach Hypericinvorbehandlung erhaltenen cAMP-Werte unterscheiden sich deutlich von denen, die nach Hyperforin- und Hyperosidvorinkubation gefunden wurden. Daher liegt es nahe, dass Hypericin einen anderen Effekt als Hyperforin und Hyperosid auf die 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren aufweist. In den Daten, die nach Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Hypericin erhalten wurden, fällt vor allem ein massiver Anstieg des Anteils der immobilen Komponente im SPT auf. Dieser Anstieg von 20 % auf 60 % sollte mit einer stark verminderten Signaltransduktion der Rezeptoren einhergehen. Allerdings liegen die cAMP-Werte nach simultaner Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT auf Kontrollniveau. Werden allerdings die Differenzen zwischen Forskolin Stimulation und simultaner Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT betrachtet, so ist zu sehen, dass diese mit 0,9, 0,95 und 0,88 niedriger als bei Kontrollzellen ausfällt (Table 9). Dies würde eine Hemmung der Signaltransduktion widerspiegeln, lässt allerdings die Frage aufkommen, was für die Hemmung der cAMP-Produktion nach Stimulation mit Forskolin durch die Vorbehandlung der Zellen mit Hypericin verantwortlich ist. Diese scheint dosisunabhängig zu sein. Ob es sich hierbei um eine konstitutive Aktivierung der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren oder um eine direkte Hemmung der AC durch Hypericin handelt, ist nicht zu unterscheiden. Auch eine Überlappung verschiedener Effekte wäre denkbar.

C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen, die mit Desipramin vorbehandelt wurden, zeigten einen dem Hyperforin und Hyperosid vergleichbaren Einfluss auf die Stimulation mit Forskolin und auch auf die parallele Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT. Die Differenz aus beiden Stimulationen ist mit 1,41 ebenfalls auf einem vergleichbaren Niveau. Werden zur weiteren Interpretation die mittels SPT und FCS erhaltenen lateralen

Mobilitäten der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren betrachtet, so ist hier im FCS ein Anstieg des Anteils der langsamen Komponente mit D₃ zu Ungunsten der schnellen Komponente mit D₅ zu sehen. Der Anteil der beiden mobilen Komponenten verschiebt sich im SPT von der mäßig mobilen mit D₂ hin zur mobileren Komponente mit D₃. Der Anteil von D₃ steigt also in beiden Techniken. Es werden demnach entgegengesetzte Einflüsse gefunden. Obwohl die Verschiebung der Anteile von D₂ zu Gunsten von D₃ im SPT auf mobilere Rezeptoren hindeutet, ist aufgrund der Senkung der Diffusionskoeffizienten D₂ und D₃ sowie der Verschiebung des Anteils von D₅ zu D₃ insgesamt von einer Verlangsamung der lateralen Mobilität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren auszugehen. Diese spiegelt sich in der erhöhten cAMP-Bildung nach Forskolin Stimulation wider. In den FCS-Studien der belegten Rezeptoren konnte keine Veränderung nach Vorinkubation mit Desipramin gefunden werden. Dies würde eine unveränderte Signaltransduktion nahelegen und konnte durch die unveränderten cAMP-Spiegel nach paralleler Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT auch gefunden werden. Demnach wird für Desipramin, eine mit Hyperforin und Hyperosid vergleichbare Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren angenommen.

Die Ergebnisse der cAMP-Bestimmung nach Citalopramvorinkubation weichen von den bisher beobachteten Resultaten ab. Im Vergleich zur Kontrolle ist hier eine Erhöhung der cAMP-Spiegel sowohl nach Stimulation mit Forskolin, als auch nach paralleler Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT zu sehen. Die Differenz zwischen den verschiedenen Stimulationen ist mit 1,29 einerseits höher als bei Kontrollzellen, andererseits fällt sie im Vergleich zur Hyperforin-, Hyperosid- oder Desipraminvorinkubation niedriger aus. Weder in SPT- noch in FCS-Untersuchungen konnte ein Einfluss der Citalopramvorinkubation auf die laterale Mobilität unbelegter 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren gefunden werden. Daher ist eine Involvierung des unbelegten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors in die Erhöhung der cAMP-Spiegel nach Forskolin Stimulation nicht zu erwarten. Bei den FCS-Experimenten mit EL409-Alexa532 konnte eine statistisch signifikante Verschiebung der Anteile von D_{RLK1} auf D_{RLK2} beobachtet werden. Diese würde eine geringere Signaltransduktion erwarten lassen und die Erhöhung der cAMP-Werte nach paralleler Stimulation mit Forskolin und 8-OH-DPAT erklären. Ob die relativ geringe Verschiebung im unteren einstelligen Prozentbereich der Anteile der belegten Rezeptoren dafür ausreicht, ist allerdings fraglich.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Einflüsse der Johanniskrautinhaltstoffe Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf die laterale Mobilität sowie die Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-Rezeptors zu untersuchen.

Nach dem „*membrane skeleton fence model*“ befindet sich ein Netz an Aktinfilamenten, welche Teil des Zytoskeletts der Zellen ist, in unmittelbarer Nähe zur Zellmembran und unterteilt diese in verschiedene Mikrodomänen [126]. Hinzu kommen transmembranäre Proteine, die nach dem „*anchored transmembrane protein picket model*“ an die Aktinfilamente gebunden sind und Diffusionsbarrieren innerhalb der Membran darstellen [127].

Die so entstehenden Mikrodomänen der Zellmembran stellen semipermeable Diffusionsbarrieren für Rezeptoren dar. Rezeptoren diffundieren entweder in der Mikrodomäne oder können sie durch „hop diffusion“ verlassen [127]. Demzufolge weist jede Rezeptortrajektorie zwei verschiedene Diffusionskoeffizienten auf. Diese werden als D_{mikro} oder D_{makro} bezeichnet. D_{mikro} beschreibt dabei die Diffusionsgeschwindigkeit innerhalb einer Mikrodomäne, während D_{makro} die Geschwindigkeit der „hop diffusion“ zwischen zwei Mikrodomänen beschreibt [127]. In den verschiedenen Mikrodomänen können Rezeptoren mit Signalproteinen bereits vorsortiert vorliegen [128]. Dies ermöglicht eine deutlich schnellere Signaltransduktion von äußeren Reizen ins Zellinnere und ist gerade für die Signalweiterleitung von Nervenzellen von großer Bedeutung. Rezeptortheorien unterscheiden mittlerweile nicht mehr nur zwei distinkte Rezeptorzustände „inaktiv“ oder „aktiv“. Es wird vielmehr davon ausgegangen, dass verschiedene kinetische Zustände des Rezeptors existieren, die ineinander übergehen können [129]. Verschiedene Rezeptorzustände wiederum weisen unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Signalproteine auf [130]. Aus dem Profil der Interaktionen eines Rezeptors mit Molekülen innerhalb einer Mikrodomäne leitet sich seine Aufenthaltswahrscheinlichkeit in der Mikrodomäne und als Folge dessen seine laterale Mobilität ab. Die in dieser Arbeit beschriebenen verschiedenen Rezeptormobilitäten charakterisieren demnach unterschiedliche Rezeptorzustände, die jeweils anders mit ihrer Umgebung in der Zellmembran interagieren, und die unterschiedliche Aufenthaltswahrscheinlichkeiten in verschiedenen Mikrodomänen aufweisen. Beeinflusst nun eine der Testsubstanzen das Gleichgewicht zwischen den verschiedenen Rezeptorzuständen, so resultiert daraus eine Veränderung der

Diffusionszeiten und der Anteile der verschiedenen gefundenen Rezeptormobilitäten. Da einzelne Rezeptorzustände unterschiedliche Affinitäten zu nachgeordneten Signalproteinen aufweisen, könnte eine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen den verschiedenen Rezeptorzuständen auch eine veränderte Signaltransduktion bewirken.

Ein Teil der Rezeptorzustände interagiert dabei mit Signalproteinen, obwohl der Rezeptor nicht durch einen Agonisten belegt ist [131]. Diese Eigenschaft wird als konstitutive Aktivität bezeichnet und konnte für den 5-HT_{1A}-Rezeptor nachgewiesen werden [132]. Durch Bindung eines Liganden kann das Gleichgewicht zwischen den unterschiedlichen Rezeptorzuständen verschoben werden [130]. Wird dabei beispielsweise ein Rezeptorzustand bevorzugt, der an ein Signalprotein bindet, spricht man bei dem Liganden von einem Agonisten.

Anhand der FCS- und SPT-Untersuchungen konnten die lateralen Mobilitäten für verschiedene Zustände des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors sowie die Einflüsse der Johanniskrautinhaltstoffe auf sie bestimmt werden.

Für alle untersuchten Johanniskrautinhaltstoffe sowie Desipramin konnte eine Beeinflussung der lateralen Rezeptormobilität gefunden werden. Sie wird charakterisiert durch einen veränderten Diffusionskoeffizienten und/oder eine Veränderung der Anteile der verschiedenen Zustände, sowie der Signaltransduktion. Eine Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Citalopram führte nicht zu Veränderungen der lateralen Mobilität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren. Daher ist nicht von einer direkten Beeinflussung des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors durch Citalopram auszugehen.

Eine Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen mit Hypericin lässt den Anteil immobiliser 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren stark ansteigen und hemmt deren Signaltransduktion. Allerdings ist bedingt durch die chromatische Überlappung von Hypericin mit den verwendeten Farbstoffen die Datenlage zur weiteren Interpretation der gefundenen Effekte schlecht und eine Einordnung dieser fällt äußerst schwer. Aufgrund des starken Anstiegs des immobilisierten Anteils der Rezeptoren in den SPT-Experimenten ist auf jeden Fall eine starke Beeinflussung der Rezeptormobilität durch Hypericin festzustellen. Es wäre vorstellbar, dass Hypericin einen Rezeptorzustand stabilisiert, der nicht mit Signalproteinen interagiert, was zu der gefundenen gehemmten Signaltransduktion führen würde.

Es konnte beobachtet werden, dass sich Hypericin stark in die Zellmembran einlagert. Hypericin könnte insofern eine Diffusionsbarriere für 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in der Zellmembran darstellen, die diese nur schwer überwinden können und damit den gefundenen Anstieg des Anteils der immobilen Rezeptormobilität verursachen. Es wäre allerdings auch eine Beeinflussung der Zellmembranzusammensetzung und/oder des Zytoskeletts durch Hypericin denkbar, welche wiederum zu einer Immobilisierung des Rezeptors führen könnten. Weitere Untersuchungen sollten dies klären.

Aufgrund der geringen Datenlage können keine Aussagen zu einem möglichen Beitrag Hypericins zu einem über den 5-HT_{1A}-Rezeptor vermittelten antidepressiven Wirkungsmechanismus von Johanniskrautextrakt getroffen werden. In Zukunft wäre es wünschenswert, den Einfluss von Hypericin auf die 5-HT_{1A}-Rezeptoren durch Generierung einer Versuchsanordnung, die den Fluoreszenzeigenschaften des Hypericin Rechnung tragen können, erneut zu untersuchen.

Hyperforin und Hyperosid unterscheiden sich in ihrer Wirkung auf die 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen deutlich von Hypericin. Ihr Einfluss wird als eine Hemmung der konstitutiven Aktivität des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors angesehen, während kein Einfluss auf Agonist belegte Rezeptoren und die daraus folgende Signaltransduktion gefunden wurde.

Es stellt sich die Frage, ob die gefundene Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren durch Hyperforin und Hyperosid mit den derzeitigen Theorien zum Wirkungsmechanismus von Antidepressiva in Einklang gebracht werden kann. Dem klassischen Ansatz, durch eine Erhöhung der Serotonintransmissionen depressive Störungen zu bekämpfen, entsprechen die gefundenen Ergebnisse nicht. Interessanterweise zeigt das TZA Desipramin einen mit Hyperforin und Hyperosid vergleichbaren Effekt auf die laterale Mobilität und die Signaltransduktion der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren. Es wäre daher vorstellbar, dass die Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-Rezeptoren einen zusätzlichen Beitrag von Hyperforin und Hyperosid zu einer antidepressiven Wirkung des Johanniskrautextraktes darstellt.

Eine veränderte konstitutive Aktivität von Rezeptoren konnte bereits als Ursache für verschiedene Krankheitsbilder nachgewiesen werden [133]. So führt beispielsweise die G90D-Mutation von Rhodopsin zu Nachtblindheit [134], eine Mutation des LH-Rezeptors zu einem frühzeitigen Einsetzen der Pubertät bei Jungen [135] oder

eine Mutation des PTH–PTHrP Rezeptors zu einer Störung des Skelettwachstums [136].

Auch für neuropsychiatrische Krankheiten wird eine Veränderung der konstitutiven Aktivität von Serotoninrezeptoren als Ursache in Betracht gezogen [132]. Diese Theorie stützt sich unter anderem auf Befunde, die diverse klinisch relevante Arzneistoffe mittlerweile als inverse Agonisten identifiziert haben. So konnte beispielsweise für Olanzapin und Risperidon gezeigt werden, dass diese invers-agonistische Eigenschaften aufweisen [137].

Es wäre demnach denkbar, dass bei bestimmten depressiven Störungen eine erhöhte konstitutive Aktivität des 5-HT_{1A}-Rezeptors vorläge, durch deren Signaltransduktion eine depressive Störung verursacht würde.

Eine solche erhöhte konstitutive Aktivität von 5-HT_{1A}-Rezeptoren könnte durch einen Einsatz von Hyperforin oder Hyperosid, welche diese hemmen, therapiert werden.

Rezeptorliganden können bestimmte Rezeptorzustände stabilisieren, die damit vermehrt auftreten [138]. Verschiedene Rezeptorzustände wiederum weisen voneinander abweichende Affinitäten zu Signalproteinen auf [130, 139]. Demnach können, je nachdem, welcher Ligand an einen Rezeptor bindet, unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert oder gehemmt werden. Dies wird als funktionelle Selektivität von Liganden bezeichnet.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der 5-HT_{1A}-Rezeptor mit verschiedenen Signaltransduktionswegen gekoppelt ist [48]. So wurde neben einer Beeinflussung der AC beispielsweise auch ein Einfluss des 5-HT_{1A}-Rezeptors auf die Phosphoinositid-Phospholipase C und die Proteinkinase C nachgewiesen [48].

Eine funktionelle Selektivität ist nicht nur für verschiedene Liganden denkbar, sondern auch für konstitutiv aktive Rezeptorzustände [139].

So konnte für den konstitutiv aktiven TSH-Rezeptor gezeigt werden, dass dieser hauptsächlich das G-Protein G_s aktiviert, welches wiederum die AC stimuliert [140]. Bei hohen TSH-Konzentrationen wird allerdings neben G_s auch G_q und infolgedessen die Phospholipase C aktiviert. Eine Reihe an Mutationen verändern die konstitutive Aktivität des TSH-Rezeptor [133]. Der überwiegende Anteil der Mutationen erhöht die konstitutive Aktivierung von G_s, während sich kein Einfluss auf G_q zeigte. Es konnten

Diskussion

allerdings auch Mutationen identifiziert werden, die zu einer erhöhten konstitutiven Aktivierung von G_q führen [141, 142].

Dieses Beispiel veranschaulicht, dass neben einer erhöhten konstitutiven Aktivität auch eine veränderte konstitutive Selektivität für die Entstehung einer depressiven Störung denkbar wäre.

Wäre dies der Fall, könnte eine Therapie mit Hyperforin und Hyperosid diese erhöhte oder gestörte konstitutive Aktivität hemmen.

Die hier präsentierten Daten könnten einen ersten Hinweis auf einen derartigen Wirkungsmechanismus der Johanniskrautinhaltsstoffe Hyperforin und Hyperosid darstellen und sollten durch weitere Untersuchungen bestätigt und weiter aufgeklärt werden.

3.2 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals der Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (FCS) und Einzelmolekülverfolgung (SPT) untersucht und über entsprechende cAMP-Daten mit der Signaltransduktion korreliert.

Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die laterale Mobilität von 5-HT_{1A}-Rezeptoren einen Hinweis auf den Rezeptorstatus gibt. Demnach ist die Signaltransduktion mit nachfolgender *Second Messenger* Synthese bei langsam diffundierenden 5-HT_{1A}-Rezeptoren herabgesetzt. Es kann nur darüber spekuliert werden, welche biochemischen Prozesse insbesondere langsam diffundierende 5-HT_{1A}-Rezeptoren erfahren. Denkbar wären beispielsweise eine veränderte Interaktion mit anderen Proteinen in der Membran und eine damit veränderte Aufenthaltswahrscheinlichkeit in bestimmten Mikrodomänen auf der Zelloberfläche.

Die vorliegenden Resultate untermauern die mobile Rezeptor-Hypothese, wonach die laterale Mobilität im Zusammenhang mit der Signaltransduktion steht.

Die getesteten Johanniskrautinhaltstoffe und Desipramin beeinflussen im Gegensatz zu Citalopram in unterschiedlicher Weise die laterale Mobilität sowie die Signaltransduktion von 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren in einem postsynaptischen Zellmodell unter nicht stimulierenden Bedingungen. Vor allem die Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren durch Hyperforin, Hyperosid und Desipramin scheint hier von Bedeutung zu sein.

Dieser Befund leistet einen Beitrag, den komplexen Wirkungsmechanismus von Johanniskrautextrakt zu entschlüsseln und bedarf gleichzeitig weiterer Nachforschungen in Bezug auf seine Auswirkungen auf die neuronale Plastizität und der Frage, ob und inwieweit die beobachteten Effekte für die antidepressive Wirkung relevant sind.

Ein postsynaptischer Effekt hat im Gegensatz zu den Effekten, die durch Wiederaufnahme- oder MAO-Hemmer erzielt werden, den Vorteil, dass eine initial hohe Neurotransmitterkonzentration in der Synapse für die sich anschließenden

adaptiven Prozesse nicht zwingend erforderlich ist. Die in klinischen Studien belegte niedrige Abbruchrate unter Verwendung von Johanniskrautpräparaten, gerade zu Beginn der Behandlung einer depressiven Störung, könnte durchaus auch in diesem Zusammenhang gesehen werden.

Mit Hilfe der FCS und der SPT lassen sich mehrere laterale Mobilitäten sowohl für den freien 5-HT_{1A}-ST-Rezeptor als auch für den entsprechenden Rezeptor-Ligand-Komplex unterscheiden. Für andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wurden ebenfalls verschiedene laterale Mobilitäten festgestellt.

Die Umverteilung von GPCR von einer lateralen Mobilität in eine andere kann heute im Moment des Geschehens an lebenden Zellen verfolgt werden. Eine simultane Erfassung der rezeptorassoziierten Signaltransduktion in Form einer Identifizierung und Quantifizierung von beteiligten Effektorproteinen oder von *Second Messengern* würde das Verständnis über den molekularen Mechanismus verbessern und möglicherweise zusätzlich Optionen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien eröffnen.

3.3 Zusammenfassung

Johanniskrautextraktpräparate sind in Deutschland für die kurzzeitige Behandlung der Symptome leichter depressiver Störungen sowie für die Therapie von leichten bis mittelschweren Depressionen zugelassen. Die antidepressive Wirkung von Johanniskrautextraktpräparaten ist klinisch belegt, der zugrunde liegende Wirkungsmechanismus allerdings noch nicht vollständig geklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss der Johanniskrautinhaltstoffe Hyperforin, Hyperosid und Hypericin auf die laterale Mobilität unbelegter sowie belegter 5-HT_{1A}-Rezeptoren sowie deren Signaltransduktion untersucht werden.

Die laterale Mobilität wurde sowohl mittels Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie als auch Einzelmolekülverfolgung bestimmt. Um diese Untersuchungen zu ermöglichen, wurde ein SNAP-tag-Konstrukt des 5-HT_{1A}-Rezeptors gentechnisch generiert und C6-Zellen damit stabil transfiziert. Dieses Konstrukt ermöglicht es, die 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren bei Bedarf mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu koppeln. Darüber hinaus wurde der 5-HT_{1A}-Rezeptor-Agonist 8-OH-DPAT chemisch so verändert, dass er einer Fluoreszenzmarkierung mit Alexa Fluor® 532-Carbonsäuresuccinimidylester zugänglich wurde.

Mit Hilfe der stabil transfizierten C6-Zellen sowie des fluoreszenzmarkierten 5-HT_{1A}-Rezeptoragonisten EL409-Alexa532, konnte die laterale Mobilität von fünf unbelegten Rezeptormobilitäten sowie zwei Rezeptor-Ligand-Komplex-Mobilitäten beschrieben werden.

Im Anschluss daran wurde der Einfluss einer sechstägigen Vorbehandlung mit Hyperforin, Hyperosid und Hyperforin sowie den Vergleichssubstanzen Citalopram und Desipramin auf die laterale Mobilität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren untersucht. Für die Vorbehandlung der Zellen mit Hyperforin, Hyperosid und Desipramin konnte eine Verlangsamung der unbelegten Rezeptormobilitäten, die sich einerseits in einem geringeren Diffusionskoeffizienten und andererseits in einer Verschiebung der Anteile hin zu weniger mobilen Rezeptormobilitäten äußerte, gefunden werden. Die Hypericinvorinkubation führte zu einem starken Anstieg der immobilen, unbelegten Rezeptorpopulation. Citalopram zeigte keinen Einfluss auf die unbelegten 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren. Auf die laterale Mobilität der Rezeptor-Ligand-Komplexe konnte kein Einfluss der Testsubstanzen entdeckt werden.

Eine Veränderung der lateralen Mobilität eines Rezeptors kann sich auf dessen Signaltransduktion auswirken. Daher wurde die Konzentration des mit dem 5-HT_{1A}-Rezeptor gekoppelten *Second Messengers* cAMP nach Vorbehandlung der Zellen mit den Johanniskrautinhaltsstoffen sowie den Vergleichssubstanzen untersucht. Es wurde der cAMP-Spiegel unstimulierter C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen sowie die cAMP-Spiegel von mit Forskolin, 8-OH-DPAT oder simultan mit Forskolin und 8-OH-DPAT stimulierten Zellen quantifiziert. Die gefundene Veränderung der lateralen Mobilität pflanzte sich in einer veränderten Signaltransduktion der vorbehandelten Zellen fort. So konnte für Hyperforin, Hyperosid und Desipramin jeweils eine Hemmung der konstitutiven Aktivität der 5-HT_{1A}-ST-Rezeptoren, die sich in einer verstärkten cAMP-Synthese nach Stimulation mit Forskolin bemerkbar machte, gefunden werden. Der starke Anstieg des immobilen Rezeptoranteils nach Hypericinvorbehandlung ging mit einer verminderten Signaltransduktion des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors einher. Dies machte sich in einer verminderten Differenz der cAMP-Spiegel zwischen Forskolin- und simultaner Forskolin- und 8-OH-DPAT-Stimulation bemerkbar. Die chromatischen Eigenschaften von Hypericin verhindern eine Auswertung der FCS-Untersuchungen. Die daher unvollständige Datenlage macht eine Einschätzung, ob Hypericin einen Beitrag über den 5-HT_{1A}-Rezeptor zum antidepressiven Wirkungsmechanismus des Johanniskrautextraktes leistet, unmöglich.

Die gefundene Hemmung der konstitutiven Aktivität des 5-HT_{1A}-ST-Rezeptors durch Hyperforin und Hyperosid könnte in Fällen einer veränderten oder gestörten konstitutiven Aktivität des 5-HT_{1A}-Rezeptors von Vorteil sein.

Die gefundenen Ergebnisse stellen einen Beitrag zur Entschlüsselung des antidepressiven Wirkungsmechanismus von Johanniskraut dar.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Chemikalien

Hyperforin, Hyperosid und Hypericin wurden über HWI-Analytik GmbH (Rülzheim, Deutschland) und Desipramin und Citalopram von Sigma (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Zellkulturchemikalien wurden bei Life Technologies erworben. Alle anderen Chemikalien wurden bei Sigma im jeweils höchsten verfügbaren Reinheitsgrad gekauft.

4.1.2 Lösungen

Locke's Solution

154 mM NaCl

5,6 mM KCl

2,3 mM CaCl₂

1,0 mM MgCl₂

3,6 mM NaHCO₃

5,0 mM HEPES

20,0 mM D(+)-Glucose

pH 7,4

PBS-Puffer

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na₂HPO₄

2 mM KH₂PO₄

pH 7,4

TAE

40 mM Tris

20 mM Essigsäure

1 mM EDTA

pH 8,0

Mowiol-Lösung

12 g Glycerol

4,8 g Mowiol

in 12 ml H₂O lösen (über Nacht)

24 ml 0,2 M Tris, pH 6,8

für 10 min auf 50 °C erwärmen

15 min, 4000 rpm

4 °C

Zellkulturmedium

DMEM-F12-Medium

2 mM Glutamin

100 U/mL Penicillin/Streptomycin

5 % fötales Kälberserum

4.2 Methoden

4.2.1 Synthese von EL409-Alexa532

Es wurden 0.1 mg Alexa Fluor[®] 532-Carbonsäuresuccinimidylester (Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit einem fünffachen Überschuss an EL409 (synthetisiert von Prof. Marcello Leopoldo, Universität Bari, Italien) umgesetzt. Die Reaktion fand in einem 0,1 M Natriumhydrogencarbonatpuffer (pH 8,5) unter Lichtausschluss statt. Die Isolierung des Kopplungsproduktes erfolgte mittels HPLC. Das HPLC-System bestand aus einer HPLC-Pumpe MSDS 600 E, einem Autosampler WISP 712, einem Dioden Array Detektor 996 (alle Waters, Eschborn, Deutschland) sowie einem Entgaser (Knauer, Berlin, Deutschland) und wurde mit der Millennium Software V2.1 (Waters) betrieben. Alle UV/VIS-spektroskopischen Daten wurden mit einer Auflösung von 6 nm aufgezeichnet. Für die Auftrennung wurde eine LiChrospher[®] RP-Select B Säule (125 x 4 mm, 5 µm) (Merck, Darmstadt, Deutschland) und eine Flussrate von 1 ml/min verwendet. Das Fließmittel A setzte sich aus Wasser (90 %), Methanol (10 %) sowie 85%iger H₃PO₄ (1 ‰) (v/v/v) zusammen; Fließmittel B bestand aus Methanol. Es wurde von 0-15 Minuten ein linearer Gradient von 100 % A zu 100 % B gefahren. Die bei 532 nm detektierten Peaks wurden fraktioniert und jeweils in 20 µl Elektrospray-Lösungsmittel gelöst (30 % Acetonitril, 0,1% Ameisensäure). Als statische Elektrospray-Ionenquelle wurde der Nanospray-Roboter Triversa Nanomate (Advion Ltd., Harlow, Großbritannien) mit 5 µm Düsen eingesetzt. Pro Injektion wurden 10 µl Probe mit 20 hPa Gasdruck bei 1,6 kV Spannung ionisiert und in einem Orbitrap LTQ Velos Massenspektrometer analysiert (Thermo Fisher Scientific, Bremen). Hierbei wurde der Orbitrap-Massenanalysator im Positiv-Modus mit einer Auflösung von 30000 eingesetzt.

4.2.2 Generierung einer stabil transfizierten C6-5-HT_{1A}-SNAP-tag Zelllinie

5-HT_{1A}-Rezeptor cDNS (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland) wurde in den pSNAP-ADR2 Vektor (NEB, Frankfurt am Main, Deutschland) mit Hilfe der Restriktionsenzyme EcoRV und EcoRI (beide Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) kloniert. Nach der Restriktion wurden die DNS Fragmente in einem 1%igen Agarose-TAE-Gel aufgetrennt und anschließend mit dem QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben herausgelöst. cDNS und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 mit T4 DNS Ligase (Fermentas) ligiert und anschließend in chemisch-kompetente XL1 Blue Bakterien (AG Giesemann, IBMB, Bonn, Deutschland) transformiert. Dazu wurde die DNS der Bakteriensuspension hinzugefügt und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Bakterien einem 42 °C Hitzeschock für 90 s ausgesetzt, ehe sie erneut für 90 s auf Eis kamen. Anschließend wurden die Zellen nach Zugabe von 400 µl vorgewärmtem LB-Medium für eine Stunde bei 37 °C kultiviert. Daraufhin wurden sie auf Kanamycin-LB-Agar-Platten (200 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nachfolgenden Tag wurden einzelne Kolonien von der Platte gepickt und 3 ml LB-Medium (enthält 200 µg/ml Kanamycin) mit ihnen geimpft. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 225 U/min bei 37 °C inkubiert und am nächsten Tag einer Miniprep (Qiagen; durchgeführt nach Herstellervorgaben) zugeführt. Die daraus erhaltene DNS wurde benutzt, um mittels eines erneuten Restriktionsverdau den erfolgreichen Einbau des Rezeptors in die Klone zu prüfen. Die DNS positiver Klone wurde anschließend mit Hilfe einer Midi-Prep (Qiagen; durchgeführt nach Herstellervorgaben) vermehrt.

Die C6-Zellen (DSMZ No. ACC 550 Braunschweig, Deutschland) wurden mittels Elektroporation mit diesen Plasmiden transfiziert. Dafür mussten zunächst Feederzellen, die während der Selektionsphase der Klone für essentielle Zell-Zell-Kontakte sorgen, generiert werden. Zu diesem Zweck wurden 3T3 NIH-Zellen (freundliche Gabe der AG Magin, IBMB, Bonn, Deutschland) mit einer Geneticinresistenz versehen. Dazu wurden sie ebenfalls mit dem pSNAP-ADR2 Vektor transfiziert (Exgene, nach Herstellerangaben, Fermentas) und 24 h später mit 750 µg/ml Geneticin selektiert. Bevor die nunmehr geneticinresistenten 3T3 NIH-Zellen den C6-Zellen zugegeben wurden, musste ihnen ihre Teilungsfähigkeit

genommen werden. Dazu wurden sie für 2 h mit 4 µg/ml Mitomycin C inkubiert und dann dreifach mit PBS gewaschen. Die C6-Zellen wurden nun mit dem Amaxa Nucleofector Kit (Lonsa, Köln, Deutschland) per Elektroporation transfiziert. Dazu wurde das Programm U 30 genutzt, welches speziell für C6-Zellen entworfen wurde und dort für hohe Expressionsspiegel sorgen soll. Nach 24 h wurde mit der Selektion der positiven Klone begonnen. Hierfür wurden 750 µg/ml Geneticin verwendet. Einen weiteren Tag später wurde damit begonnen, Feederzellen hinzuzugeben. Absterbende Feederzellen wurden täglich ersetzt. Es sollte ständig eine ca. 20-30%ige Konfluenz gegeben sein. Nach zwei Wochen waren in den Schalen C6-5-HT_{1A}-ST Zell-Klone zu erkennen, die gepickt und vermehrt wurden.

4.2.3 cAMP-Assay

Zur Vorbehandlung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen wurden den Zellmedien für sechs Tage entsprechende Mengen der zu untersuchenden Substanzen beigemischt und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Zwei Tage vor dem Assay wurden die Zellen in einer Dichte von 15.000 Zellen/Well in eine 96-Well-Platte überführt. Sie wurden zu Beginn des Assays für 10 min mit serumfreiem Medium inkubiert und dann, sofern vermerkt, für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit entsprechenden Agonistkonzentrationen stimuliert. Die intrazelluläre cAMP-Konzentration wurde mittels des HitHunter cAMP Assay-Kits (for adherent cells) (DiscoverX, Birmingham, UK) entsprechend den Herstellerangaben bestimmt. Die 96-Well-Platten wurden mit Hilfe eines Tecan GENios (Tecan, Männedorf, Schweiz) Fluoreszenzreaders ausgelesen und die Daten mit der Magellan 3.0 Software analysiert.

4.2.4 Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden mit folgendem Setup aufgenommen: LSM510 Meta (Carl Zeiss, Jena, Germany); Objektiv Plan-Apochromat 63x/1.4 Öl DIC; Laser: 488 nm Argon Laser, Hauptfarbteiler 488/543 Bandpassfilter BP505-530.

4.2.5 Lebendzellmessungen

Für FCS- und SPT-Untersuchungen wurden 100.000 – 150.000 C6-Zellen auf sterilen Glasplättchen (Ø 18 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) in 12 x Multiwellschalen ausgesät und für 2 - 4 Tage bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die Zellen wurden je nach Experiment für sechs Tage mit verschiedenen Johanniskrautinhaltsstoffen oder Referenzsubstanzen vorbehandelt. Vor den Messungen wurden die Plättchen jeweils dreimal mit Locke's Solution bei 37 °C gewaschen. Die Plättchen wurden in einen selbstgebauten Halter mit 400 µL Inkubationsvolumen montiert und bei 20 °C bis zu 60 min lang verwendet.

4.2.6 Anfärben und Fixierung der C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen

Für die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden 125.000 C6-5-HT_{1A}-ST-Zellen auf sterile Glasplättchen ausgesät und zwei Tage später mit Snap-Cell® Oregon Green® gekoppelt. Anschließend wurden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd und 15 % Saccharose für 15 min bei 37 °C fixiert und mit Mowiol-Lösung eingedeckelt.

4.2.7 FCS-Messungen

Die FCS-Messungen wurden mit folgendem Setup aufgenommen: ConfoCor1 (Zeiss/Evotec, Jena/Hamburg, Deutschland); Argon Laser LGK 7812 ML 2 (Lasos, Jena, Deutschland); Wasserimmersions-Objektiv C-Apochromat, 63x NA 1.2 Anregungsfilter BP 485 / 20, Farbteiler FT 510 und Emissionsfilter BP 515 - 565 (alle Zeiss). Zur Anregung wurde die 514 nm Linie eines Argon-Ionen-Lasers LGK 7812 ML 2 (Lasos, Jena) verwendet, dessen Leistung mit Hilfe eines Graufilters der Stärke OD = 1,5 (Linos, Göttingen, Deutschland) auf 2,4 kW/cm² eingestellt wurde. Die Lochblende wurde mit einem Durchmesser von 40 µm betrieben. Die Detektion erfolgte durch eine Lawinenphotodiode (APD) SPCM-AQRH-13 Single Photon Counting Module (PerkinElmer, Waltham, USA), deren Signale über einen digitalen Hardware Korrelator (ALV-5000, ALV, Langen) in eine Autokorrelationskurve gewandelt werden konnte. Gesteuert wurde das Setup durch die FCS Access Control Software V. 1.2 und für die Auswertung der Daten wurde ein von Dr. Thomas Sorkalla in der eigenen Arbeitsgruppe geschriebenes Matlab Skript verwendet. Die Lasereinkopplung und Probenausleuchtung wurde an jedem Messtag mit Hilfe der AxioCam-Kamera (MRm, Kamerasoftware Axiovision AC, Zeiss) symmetrisch justiert. Dabei wurde die Lochblende an die Position des stärksten Signals einer 100 nM Tetramethylrhodaminlösung (TMR, Life Technologies GmbH) positioniert. Das Beobachtungsvolumen wurde ebenfalls für jeden Messtag bestimmt. Dazu wurde eine 10 nM TMR-Lösung verwendet und deren Diffusionszeitkonstante 15-fach bestimmt und gemittelt. Über den bekannten Diffusionskoeffizienten von 280 µm²/s kann auf die Symmetrie und Ausdehnung des Volumenelementes geschlossen werden.

4.2.8 Einzelmolekülverfolgung

Ein Weitfeld Epi-Fluoreszenz Mikroskop (TE2000-S, Nikon, Kanagawa, Japan) wurde mit einem 50 mW diodengepumpten Festkörperlaser (LasNova GLK 3250 T01, 532 nm, 50 mW, Lasos, Jena, Germany) ausgestattet, der, nachdem er einen akusto-optischen Modulator (AOM, A.A Sa, Saint-Rémy-Lès-Chevreuse, Frankreich) passiert hatte, in eine Monomodefaser (kineFLEX, Point Source, Hamble, UK) eingekoppelt wurde. Der kollimierte Laserstrahl wies einen Durchmesser von 0,7 mm auf und wurde über den Backport in das Mikroskop geleitet. Dort passierte er zuerst eine Tubuslinse ($f = 200$ mm), dann einen dichroitischen Spiegel (Q540lp, Chroma Technology, Rockingham, USA), bevor er durch ein Wasserimmersionsobjektiv (Plan Apo VC, 60 \times /1.2 NA, Nikon) in die Objektebene geleitet wurde, in der eine Fläche von ca. 12 μm^2 beleuchtet wurde. Fluoreszenzlicht wurde vom Anregungslicht durch den dichroitischen Filter und einen Emissionsfilter (HQ 560/30, Chroma Technology) abgetrennt und nach einer Vierfachvergrößerung (VM Lens C-4 \times Nikon) mit einer EMCCD Kamera (iXon DV-860DCS-BV, Andor, Belfast, Nordirland) aufgenommen. Der verwendete Kamerachip wies eine Auflösung von 128 \times 128 Pixel mit einer Pixelgröße von 24 μm auf. Damit lag die effektive Pixelgröße in der Objektebene bei 100 nm. Die EMCCD Kamera wurde auf -85 °C gekühlt. Die Kamerasignale steuern den AOM und damit die Leistung und Frequenz der Laserbestrahlung. Die Laserleistung wurde auf 1 kW/cm² justiert. Die Zellen wurden bei 22 °C vermessen, jedoch nicht länger als 60 min verwendet. Die Aufnahmebedingungen wurden bei allen Messungen konstant gehalten (Beleuchtungszeit 50 ms; Aufnahmefrequenz 20 Hz; Ausleserate 1MHz; Vertical Shift Speed 0,9 μs ; Vorverstärker 4,5x; EMCCD Verstärker 120).

Datenanalyse: Lokalisierung und Verfolgung der einzelnen Moleküle in 4000 Bilder langen Filmen wurde mit Hilfe der automatisierten Trackingsoftware DiaTrack 3.01 (Semasopht, Chavannes, Schweiz) durchgeführt. Aus den daraus erhaltenen Molekülpfaden wurden mit einer automatisierten Software auf Matlab-Basis aus der AG Kubitscheck MSD-Analysen generiert.

4.2.9 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des GraphPad Prism[®] Programms (Version 5.01) durchgeführt. Diese beinhaltet eine Bestimmung des Mittelwertes und der Standardabweichung. Die Daten wurden einer einfaktoriellen Varianzanalyse zugeführt, nachdem ihre Normalverteilung mittels eines D'Agostino & Pearson Normalitätstests sichergestellt wurde. An die einfaktorielle Varianzanalyse schloss sich der post hoc Test nach Dunnett an. Statistische Signifikanz wurde für eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p^* < 0,05$; $p^{**} < 0,01$; $p^{***} < 0,001$ angenommen.

5 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Strukturformeln von Hyperforin, Hyperosid und Hypericin	7
Abbildung 1.2: Fluoreszenzmarkierung eines AGT-5-HT _{1A} -Rezeptor-Fusionsproteins	16
Abbildung 1.3: Aufbau eines Fluoreszenzkorrelationsspektroskops	19
Abbildung 1.4: Aufbau eines Einzelmolekülverfolgungsmikroskops	23
Abbildung 1.5: MSD-Verläufe als Funktion der Zeit t	25
Abbildung 2.1: Laser-Scanning-Mikroskop Aufnahme fixierter C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	28
Abbildung 2.2: cAMP-Assay in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	29
Abbildung 2.3: Synthese von EL409, einem 8-OH-DPAT Derivat mit primärer Aminfunktion in Kooperation mit Prof. Marcello Leopoldo (Universität Bari, Italien)	31
Abbildung 2.4: 5-HT _{1A} -agonistisches Wirkprofil von EL409	32
Abbildung 2.5: Kopplungsreaktion von Alexa Fluor®532-succinimidylester und EL409	33
Abbildung 2.6: HPLC-Analyse des Reaktionsansatzes nach Umsetzung von EL409 mit Alexa Fluor® 532-succinimidylester	34
Abbildung 2.7: UV/VIS-Spektrum von EL409-Alexa532	35
Abbildung 2.8: Simuliertes Massenspektrum des H ⁺ -Addukts von EL409-Alexa532	36
Abbildung 2.9: Hoचाufgelöstes Massenspektrum des H ⁺ -Addukts von EL409-Alexa532	37
Abbildung 2.10: 5-HT _{1A} -agonistisches Wirkprofil von EL409-Alexa532	38
Abbildung 2.11: Sprungweitenverteilung für JD1-JD10 von 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren	40
Abbildung 2.12: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	41
Abbildung 2.13: Vergrößerte Darstellung von Abbildung 2.12	42
Abbildung 2.14: FCS-Sättigungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	44
Abbildung 2.15: Normierte Autokorrelationskurven von 20 nM EL409-Alexa532 vor (—) und nach Zugabe von 20 µM 8-OH-DPAT (...)	46
Abbildung 2.16: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperforin	48
Abbildung 2.17: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hyperosid	48
Abbildung 2.18: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Hypericin	49

Abbildung 2.19: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Desipramin	49
Abbildung 2.20: MSD Analyse zur Bestimmung der Diffusionskoeffizienten der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorbehandlung mit Citalopram.....	50
Abbildung 2.21: Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe auf die Verteilung der 5-HT _{1A} -ST-Rezeptormobilitäten in C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	55
Abbildung 2.22: Fluoreszenzspektrum von Hypericin in Methanol nach Gadzovska et al. [93]	56
Abbildung 2.23: Normierte Autokorrelationskurven von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen die mit 0,1 µM Hypericin vorinkubiert wurden	57
Abbildung 2.24: Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe auf die Verteilung der Diffusionszeitkonstanten von EL409-Alexa532 (T _{Diff1}) und EL409-Alexa532-5-HT _{1A} -ST-Rezeptor-Komplexen (T _{Diff2} -T _{Diff4}) in FCS-Experimenten an C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	60
Abbildung 2.25: Einfluss der Johanniskrautinhaltsstoffe auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen.....	64
Abbildung 2.26: Einfluss von Hyperforin auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	66
Abbildung 2.27: Einfluss von Hyperosid auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	67
Abbildung 2.28: Einfluss von Hypericin auf die cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen	68

6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_1), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_1) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen mit jeweils 1 μ M Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 μ M Hypericin.	50
Tabelle 2: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_2), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_2) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen mit jeweils 1 μ M Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 μ M Hypericin.	51
Tabelle 3: Vergleich der mittels SPT erhaltenen Diffusionskoeffizienten (D_3), deren Anteile, Lokalisierungsgenauigkeiten (LG_3) und Bestimmtheitsmaße (R^2) nach Vorinkubation von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen mit jeweils 1 μ M Hyperforin, Hyperosid, Citalopram und Desipramin sowie 0,1 μ M Hypericin.	52
Tabelle 4: Vergleich der nach Vorinkubation der C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen mit Johanniskrautinhaltsstoffen im FCS erhaltenen Diffusionszeitkonstanten der markierten 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren sowie deren Anteile	54
Tabelle 5: Vergleich der im FCS-Bindungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen gefundenen Diffusionszeitkonstanten sowie deren Anteile nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltsstoffen	59
Tabelle 6: Vergleich der normierten cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltsstoffen sowie nach Stimulation mit 10 μ M Forskolin, 10 μ M 8-OH-DPAT oder mit 10 μ M Forskolin und 10 μ M 8-OH-DPAT.	63
Tabelle 7: Vergleich der nach Vorinkubation der C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen mit Johanniskrautinhaltsstoffen mittels SPT und FCS erhaltenen Diffusionskoeffizienten der markierten 5-HT _{1A} -ST-Rezeptoren sowie deren Anteile.....	80
Tabelle 8: Vergleich der im FCS-Bindungsexperiment von EL409-Alexa532 an C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen gefundenen Diffusionskoeffizienten der Rezeptor-Ligand-Komplexe sowie deren Anteile nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltsstoffen	84
Tabelle 9: Vergleich der Differenzen aus den normierten cAMP-Spiegel von C6-5-HT _{1A} -ST-Zellen nach Vorinkubation mit Johanniskrautinhaltsstoffen sowie nach Stimulation mit 10 μ M Forskolin oder 10 μ M Forskolin und 10 μ M 8-OH-DPAT.	88

7 Literaturverzeichnis

- [1] Kessler RC, Berglund P, Demler O, Jin R, Koretz D, Merikangas KR, Rush AJ, Walters EE, Wang PS. The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *JAMA* 2003;289:3095.
- [2] Andrade L, Caraveo-Anduaga JJ, Berglund P, Bijl RV, De Graaf R, Vollebergh W, Dragomirecka E, Kohn R, Keller M, Kessler RC, Kawakami N, Kilic C, Offord D, Ustun TB, Wittchen HU. The epidemiology of major depressive episodes: results from the International Consortium of Psychiatric Epidemiology (ICPE) Surveys. *Int J Methods Psychiatr Res* 2003;12:3.
- [3] Bair MJ, Robinson RL, Katon W, Kroenke K. Depression and pain comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* 2003;163:2433.
- [4] Hirschfeld RM. The Comorbidity of Major Depression and Anxiety Disorders: Recognition and Management in Primary Care. *Prim Care Companion J Clin Psychiatry* 2001;3:244.
- [5] Grant BF, Harford TC. Comorbidity between DSM-IV alcohol use disorders and major depression: results of a national survey. *Drug Alcohol Depend* 1995;39:197.
- [6] Grant BF. Comorbidity between DSM-IV drug use disorders and major depression: results of a national survey of adults. *J Subst Abuse* 1995;7:481.
- [7] Murray CJ, Vos T, Lozano R, Naghavi M, Flaxman AD, Michaud C, Ezzati M, Shibuya K, Salomon JA, Abdalla S, Aboyans V, Abraham J, Ackerman I, Aggarwal R, Ahn SY, Ali MK, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Bahalim AN, Barker-Collo S, Barrero LH, Bartels DH, Basanez MG, Baxter A, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bernabe E, Bhalra K, Bhandari B, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Black JA, Blencowe H, Blore JD, Blyth F, Bolliger I, Bonaventure A, Boufous S, Bourne R, Boussinesq M, Braithwaite T, Brayne C, Bridgett L, Brooker S, Brooks P, Brughra TS, Bryan-Hancock C, Bucello C, Buchbinder R, Buckle G, Budke CM, Burch M, Burney P, Burstein R, Calabria B, Campbell B, Canter CE, Carabin H, Carapetis J, Carmona L, Cella C, Charlson F, Chen H, Cheng AT, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahiya M, Dahodwala N, Damsere-Derry J, Danaei G, Davis A, De Leo D, Degenhardt L, Dellavalle R, Delossantos A, Denenberg J, Derrett S, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dherani M, Diaz-Torne C, Dolk H, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Edmond K, Elbaz A, Ali SE, Erskine H, Erwin PJ, Espindola P, Ewoigbokhan SE, Farzadfar F, Feigin V, Felson DT, Ferrari A, Ferri CP, Fevre EM, Finucane MM, Flaxman S, Flood L, Foreman K, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Fransen M, Freeman MK, Gabbe BJ, Gabriel SE, Gakidou E, Ganatra HA, Garcia B, Gaspari F, Gillum RF, Gmel G, Gonzalez-Medina D, Gosselin R, Grainger R, Grant B, Groeger J, Guillemin F, Gunnell D, Gupta R, Haagsma J, Hagan H, Halasa YA, Hall

- W, Haring D, Haro JM, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Higashi H, Hill C, Hoen B, Hoffman H, Hotez PJ, Hoy D, Huang JJ, Ibeanusi SE, Jacobsen KH, James SL, Jarvis D, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Jonas JB, Karthikeyan G, Kassebaum N, Kawakami N, Keren A, Khoo JP, King CH, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Laden F, Lalloo R, Laslett LL, Lathlean T, Leasher JL, Lee YY, Leigh J, Levinson D, Lim SS, Limb E, Lin JK, Lipnick M, Lipshultz SE, Liu W, Loane M, Ohno SL, Lyons R, Mabweijano J, MacIntyre MF, Malekzadeh R, Mallinger L, Manivannan S, Marcenes W, March L, Margolis DJ, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGill N, McGrath J, Medina-Mora ME, Meltzer M, Mensah GA, Merriman TR, Meyer AC, Miglioli V, Miller M, Miller TR, Mitchell PB, Mock C, Mocumbi AO, Moffitt TE, Mokdad AA, Monasta L, Montico M, Moradi-Lakeh M, Moran A, Morawska L, Mori R, Murdoch ME, Mwaniki MK, Naidoo K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nelson PK, Nelson RG, Nevitt MC, Newton CR, Nolte S, Norman P, Norman R, O'Donnell M, O'Hanlon S, Olives C, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Page A, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Patten SB, Pearce N, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Pesudovs K, Phillips D, Phillips MR, Pierce K, Pion S, Polanczyk GV, Polinder S, Pope CA, 3rd, Popova S, Porrini E, Pourmalek F, Prince M, Pullan RL, Ramaiah KD, Ranganathan D, Razavi H, Regan M, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Richardson K, Rivara FP, Roberts T, Robinson C, De Leon FR, Ronfani L, Room R, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Saha S, Sampson U, Sanchez-Riera L, Sanman E, Schwebel DC, Scott JG, Segui-Gomez M, Shahrzad S, Shepard DS, Shin H, Shivakoti R, Singh D, Singh GM, Singh JA, Singleton J, Sleet DA, Sliwa K, Smith E, Smith JL, Stapelberg NJ, Steer A, Steiner T, Stolk WA, Stovner LJ, Sudfeld C, Syed S, Tamburlini G, Tavakkoli M, Taylor HR, Taylor JA, Taylor WJ, Thomas B, Thomson WM, Thurston GD, Tleyjeh IM, Tonelli M, Towbin JA, Truelsen T, Tsilimbaris MK, Ubeda C, Undurraga EA, van der Werf MJ, van Os J, Vavilala MS, Venketasubramanian N, Wang M, Wang W, Watt K, Weatherall DJ, Weinstock MA, Weintraub R, Weisskopf MG, Weissman MM, White RA, Whiteford H, Wiebe N, Wiersma ST, Wilkinson JD, Williams HC, Williams SR, Witt E, Wolfe F, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Zaidi AK, Zheng ZJ, Zonies D, Lopez AD, AlMazroa MA, Memish ZA. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380:2197.
- [8] Kuehner C. Gender differences in unipolar depression: an update of epidemiological findings and possible explanations. *Acta Psychiatr Scand* 2003;108:163.
- [9] Krishnan V, Nestler E. The molecular neurobiology of depression. *Nature* 2008;455:894.
- [10] Schildkraut JJ. The catecholamine hypothesis of affective disorders: a review of supporting evidence. *Am J Psychiatry* 1965;122:509.
- [11] Frazer A, Benmansour S. Delayed pharmacological effects of antidepressants. *Mol Psychiatry* 2002;7 Suppl 1:S23.

- [12] Pilar-Cuellar F, Vidal R, Diaz A, Castro E, dos Anjos S, Pascual-Brazo J, Linge R, Vargas V, Blanco H, Martinez-Villayandre B, Pazos A, Valdizan EM. Neural plasticity and proliferation in the generation of antidepressant effects: hippocampal implication. *Neural Plast* 2013;2013:537265.
- [13] Blier P, Mansari ME. Serotonin and beyond: therapeutics for major depression. *Philos Trans R Soc B: Biol Sci* 2013;368:20120536.
- [14] Harmon M, Blier P. Monoamine neurocircuitry in depression and strategies for new treatments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2013;45:54.
- [15] Szabo ST, Blier P. Serotonin (1A) receptor ligands act on norepinephrine neuron firing through excitatory amino acid and GABA(A) receptors: a microiontophoretic study in the rat locus coeruleus. *Synapse* 2001;42:203.
- [16] Kendler KS, Hettema JM, Butera F, Gardner CO, Prescott CA. Life event dimensions of loss, humiliation, entrapment, and danger in the prediction of onsets of major depression and generalized anxiety. *Arch Gen Psychiatry* 2003;60:789.
- [17] Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA. Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 1999;156:837.
- [18] Teasdale JD. Change in cognition during depression psychopathological implications: discussion paper. *J R Soc Med* 1983;76:1038.
- [19] DGPPN, BÄK, KBV, AWMF, AkdÄ, BpTK, BApK, DAGSHG, DEGAM, DGPM, DGPs, DGRW (Hrsg). für die Leitliniengruppe Unipolare Depression. S3-Leitlinie/Nationale VersorgungsLeitlinie Unipolare Depression-Kurzfassung, 1. Auflage 2009. DGPPN, ÄZQ, AWMF - Berlin, Düsseldorf 2009. .
- [20] Gillman PK. Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated. *Br J Pharmacol* 2007;151:737.
- [21] Anderson IM. Selective serotonin reuptake inhibitors versus tricyclic antidepressants: a meta-analysis of efficacy and tolerability. *J Affect Disord* 2000;58:19.
- [22] Nair NP, Ahmed SK, Kin NM. Biochemistry and pharmacology of reversible inhibitors of MAO-A agents: focus on moclobemide. *J Psychiatry Neurosci* 1993;18:214.
- [23] McCabe-Sellers BJ, Staggs CG, Bogle ML. Tyramine in foods and monoamine oxidase inhibitor drugs: A crossroad where medicine, nutrition, pharmacy, and food industry converge. *J Food Compost Anal* 2006;19 (Supple. 1):58.
- [24] Nahrstedt A, Butterweck V. Lessons learned from herbal medicinal products: the example of St. John's Wort (perpendicular). *J Nat Prod* 2010;73:1015.
- [25] Lohse MJ, Müller-Oerlinghausen B. Psychopharmaka. In: Schwabe U, Paffrath D (Hrsg.) *Arzneimittelreport 2012*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2012.
- [26] Linde K, Berner MM, Kriston L. St John's wort for major depression. *Cochrane Database Syst Rev* 2008:CD000448.

- [27] Russo E, Scicchitano F, Whalley B, Mazzitello C, Ciriaco M, Esposito S, Patanè M, Upton R, Pugliese M, Chimirri S, Mammi M, Palleria C, De Sarro G. *Hypericum perforatum*: Pharmacokinetic, Mechanism of Action, Tolerability, and Clinical Drug-Drug Interactions. *Phytother Res* 2014;28:643
- [28] Butterweck V, Schmidt M. St. John's wort: role of active compounds for its mechanism of action and efficacy. *Wien Med Wochenschr* 2007;157:356.
- [29] Butterweck V, Petereit F, Winterhoff H, Nahrstedt A. Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 1998;64:291.
- [30] Butterweck V, Böckers T, Korte B, Wittkowski W. Long-term effects of St. John's wort and hypericin on monoamine levels in rat hypothalamus and hippocampus. *Brain Res* 2002;930:21.
- [31] Butterweck V, Winterhoff H, Herkenham M. St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol Psychiatry* 2001;6:547.
- [32] Jakobs D, Hage-Hülsmann A, Prenner L, Kolb C, Weiser D, Häberlein H. Downregulation of β_1 -adrenergic receptors in rat C6 glioblastoma cells by hyperforin and hyperoside from St John's wort. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:907.
- [33] Prenner L, Sieben A, Zeller K, Weiser D, Häberlein H. Reduction of high-affinity beta2-adrenergic receptor binding by hyperforin and hyperoside on rat C6 glioblastoma cells measured by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 2007;46:5106.
- [34] Chatterjee SS, Bhattacharya S, Wonnemann M, Singer A, Müller WE. Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci* 1998;63:499.
- [35] Leuner K, Kazanski V, Müller M, Essin K, Henke B, Gollasch M, Harteneck C, Müller WE. Hyperforin--a key constituent of St. John's wort specifically activates TRPC6 channels. *FASEB J* 2007;21:4101.
- [36] Muller WE, Singer A, Wonnemann M. Hyperforin--antidepressant activity by a novel mechanism of action. *Pharmacopsychiatry* 2001;34 Suppl 1:S98.
- [37] Dietrich A, Gudermann T. Trpc6. *Handb Exp Pharmacol* 2007:125.
- [38] Henderson L, Yue Q, Bergquist C, Gerden B, Arlett P. St John's wort (*Hypericum perforatum*): drug interactions and clinical outcomes. *B J Clin Pharmacol* 2002;54:349.
- [39] Moore L, Goodwin B, Jones S, Wisely G, Serabjit-Singh C, Willson T, Collins J, Kliewer S. St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:7500.
- [40] Lehmann J, McKee D, Watson M, Willson T, Moore J, Kliewer S. The human orphan nuclear receptor PXR is activated by compounds that regulate CYP3A4 gene expression and cause drug interactions. *J Clin Invest* 1998;102:1016.
- [41] Chen XW, Sneed KB, Pan SY, Cao C, Kanwar JR, Chew H, Zhou SF. Herb-drug interactions and mechanistic and clinical considerations. *Curr Drug Metab* 2012;13:640.

- [42] Borrelli F, Izzo AA. Herb-drug interactions with St John's wort (*Hypericum perforatum*): an update on clinical observations. *AAPS J* 2009;11:710.
- [43] Caraci F, Crupi R, Drago F, Spina E. Metabolic drug interactions between antidepressants and anticancer drugs: focus on selective serotonin reuptake inhibitors and hypericum extract. *Curr Drug Metab* 2011;12:570.
- [44] Zhou S, Chan E, Pan SQ, Huang M, Lee EJ. Pharmacokinetic interactions of drugs with St John's wort. *J Psychopharmacol* 2004;18:262.
- [45] Jiang X, Williams KM, Liauw WS, Ammit AJ, Roufogalis BD, Duke CC, Day RO, McLachlan AJ. Effect of St John's wort and ginseng on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 2004;57:592.
- [46] Nöldner M, Schötz K. Rutin is essential for the antidepressant activity of *Hypericum perforatum* extracts in the forced swimming test. *Planta Med* 2002;68:577.
- [47] Butterweck V, Lieflander-Wulf U, Winterhoff H, Nahrstedt A. Plasma levels of hypericin in presence of procyanidin B2 and hyperoside: a pharmacokinetic study in rats. *Planta Med* 2003;69:189.
- [48] Raymond J, Mukhin Y, Gelasco A, Turner J, Collinsworth G, Gettys T, Grewal J, Garnovskaya M. Multiplicity of mechanisms of serotonin receptor signal transduction. *Pharmacol Ther* 2001;92:179.
- [49] Ito H, Halldin C, Farde L. Localization of 5-HT_{1A} receptors in the living human brain using [carbonyl-¹¹C]WAY-100635: PET with anatomic standardization technique. *J Nucl Med* 1999;40:102.
- [50] Edagawa Y, Saito H, Abe K. 5-HT_{1A} receptor-mediated inhibition of long-term potentiation in rat visual cortex. *Eur J Pharmacol* 1998;349:221.
- [51] Ogren SO, Eriksson TM, Elvander-Tottie E, D'Addario C, Ekstrom JC, Svenningsson P, Meister B, Kehr J, Stiedl O. The role of 5-HT_{1A} receptors in learning and memory. *Behav Brain Res* 2008;195:54.
- [52] Ahlenius S, Larsson K. Antagonism by pindolol, but not betaxolol, of 8-OH-DPAT-induced facilitation of male rat sexual behavior. *J Neural Transm* 1989;77:163.
- [53] Maswood N, Caldarola-Pastuszka M, Uphouse L. Functional integration among 5-hydroxytryptamine receptor families in the control of female rat sexual behavior. *Brain Res* 1998;802:98.
- [54] Dabire H. Central 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptors in blood pressure regulation. *Therapie* 1991;46:421.
- [55] Goodwin GM, De Souza RJ, Green AR. The pharmacology of the hypothermic response in mice to 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetrilin (8-OH-DPAT). A model of presynaptic 5-HT₁ function. *Neuropharmacology* 1985;24:1187.
- [56] Hjorth S. Hypothermia in the rat induced by the potent serotonergic agent 8-OH-DPAT. *J Neural Transm* 1985;61:131.
- [57] Rusyniak DE, Zaretskaia MV, Zaretsky DV, DiMicco JA. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine- and 8-hydroxy-2-di-n-propylamino-tetrilin-induced hypothermia: role and location of 5-hydroxytryptamine 1A receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2007;323:477.
- [58] Cohn J, Rickels K. A pooled, double-blind comparison of the effects of buspirone, diazepam and placebo in women with chronic anxiety. *Curr Med Res Opin* 1989;11:304.

- [59] Kennett G, Dourish C, Curzon G. Antidepressant-like action of 5-HT_{1A} agonists and conventional antidepressants in an animal model of depression. *Eur J Pharmacol* 1987;134:265.
- [60] Sprouse JS, Aghajanian GK. (-)-Propranolol blocks the inhibition of serotonergic dorsal raphe cell firing by 5-HT_{1A} selective agonists. *Eur J Pharmacol* 1986;128:295.
- [61] Sprouse JS, Aghajanian GK. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse* 1987;1:3.
- [62] Fargin A, Raymond J, Regan J, Cotecchia S, Lefkowitz R, Caron M. Effector coupling mechanisms of the cloned 5-HT_{1A} receptor. *J Bio Chem* 1989;264:14848.
- [63] Witkowski G, Rola R, Szulczyk P. Effect of cyclic adenosine monophosphate on the G protein-dependent inward rectifier K⁽⁺⁾-like channel current in medial prefrontal cortex pyramidal neurons. *J Physiol Pharmacol* 2012;63:457.
- [64] Lüscher C, Jan L, Stoffel M, Malenka R, Nicoll R. G protein-coupled inwardly rectifying K⁺ channels (GIRKs) mediate postsynaptic but not presynaptic transmitter actions in hippocampal neurons. *Neuron* 1997;19:687.
- [65] Artigas F. Serotonin receptors involved in antidepressant effects. *Pharmacol Ther* 2013;137:119.
- [66] Drevets W, Thase M, Moses-Kolko E, Price J, Frank E, Kupfer D, Mathis C. Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nucl med bio* 2007;34:865.
- [67] Bhagwagar Z, Rabiner EA, Sargent PA, Grasby PM, Cowen PJ. Persistent reduction in brain serotonin 1A receptor binding in recovered depressed men measured by positron emission tomography with [¹¹C]WAY-100635. *Mol Psychiatry* 2004;9:386.
- [68] Stockmeier CA, Shapiro LA, Dilley GE, Kolli TN, Friedman L, Rajkowska G. Increase in serotonin-1A autoreceptors in the midbrain of suicide victims with major depression—postmortem evidence for decreased serotonin activity. *J Neurosci* 1998;18:7394.
- [69] Boldrini M, Underwood MD, Mann JJ, Arango V. Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. *J Psychiatr Res* 2008;42:433.
- [70] Heisler L, Chu H, Brennan T, Danao J, Bajwa P, Parsons L, Tecott L. Elevated anxiety and antidepressant-like responses in serotonin 5-HT_{1A} receptor mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15049.
- [71] Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003;301:805.
- [72] Gross C, Zhuang X, Stark K, Ramboz S, Oosting R, Kirby L, Santarelli L, Beck S, Hen R. Serotonin 1A receptor acts during development to establish normal anxiety-like behaviour in the adult. *Nature* 2002;416:396.
- [73] Cryan JF, Redmond AM, Kelly JP, Leonard BE. The effects of the 5-HT_{1A} agonist flesinoxan, in three paradigms for assessing antidepressant potential in the rat. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997;7:109.
- [74] Albert P, Lemonde S. 5-HT_{1A} receptors, gene repression, and depression: guilt by association. *Neuroscientist* 2004;10:575.

- [75] Bel N, Artigas F. Fluvoxamine preferentially increases extracellular 5-hydroxytryptamine in the raphe nuclei: an in vivo microdialysis study. *Eur J Pharmacol* 1992;229:101.
- [76] Hervas I, Vilaro MT, Romero L, Scorza MC, Mengod G, Artigas F. Desensitization of 5-HT(1A) autoreceptors by a low chronic fluoxetine dose effect of the concurrent administration of WAY-100635. *Neuropsychopharmacology* 2001;24:11.
- [77] El Mansari M, Sanchez C, Chouvet G, Renaud B, Haddjeri N. Effects of acute and long-term administration of escitalopram and citalopram on serotonin neurotransmission: an in vivo electrophysiological study in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 2005;30:1269.
- [78] Briley M, Moret C. Neurobiological mechanisms involved in antidepressant therapies. *Clin Neuropharmacol* 1993;16:387.
- [79] Artigas F, Romero L, de Montigny C, Blier P. Acceleration of the effect of selected antidepressant drugs in major depression by 5-HT1A antagonists. *Trends Neurosci* 1996;19:378.
- [80] Hjorth S, Bengtsson HJ, Kullberg A, Carlzon D, Peilot H, Auerbach SB. Serotonin autoreceptor function and antidepressant drug action. *J Psychopharmacol* 2000;14.
- [81] Page ME, Cryan JF, Sullivan A, Dalvi A, Saucy B, Manning DR, Lucki I. Behavioral and neurochemical effects of 5-(4-[4-(5-Cyano-3-indolyl)-butyl]-butyl)-1-piperazinyl)-benzofuran-2-carboxamide (EMD 68843): a combined selective inhibitor of serotonin reuptake and 5-hydroxytryptamine(1A) receptor partial agonist. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;302:1220.
- [82] de Paulis T. Drug evaluation: Vilazodone a combined SSRI and 5-HT1A partial agonist for the treatment of depression. *IDrugs* 2007;10:193.
- [83] Jacobs S, Cuatrecasas P. The mobile receptor hypothesis for cell membrane receptor action. *Trends Biochem Sci* 1977;2:280.
- [84] Rigler R. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J Biotechnol* 1995;41:177.
- [85] Saxton M, Jacobson K. Single-particle tracking: applications to membrane dynamics. *Annual Rev Biophys Biomolecul Struct* 1997;26:373.
- [86] Keppler A, Kindermann M, Gendreizig S, Pick H, Vogel H, Johnsson K. Labeling of fusion proteins of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase with small molecules in vivo and in vitro. *Methods* 2004;32:437.
- [87] Shaner N, Steinbach P, Tsien R. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2005;2:905.
- [88] Billinton N, Knight A. Seeing the wood through the trees: a review of techniques for distinguishing green fluorescent protein from endogenous autofluorescence. *Anal Biochem* 2001;291:175.
- [89] Brock R, Hink M, Jovin T. Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys J* 1998;75:2547.
- [90] Jakobs D, Sorkalla T, Häberlein H. Ligands for fluorescence correlation spectroscopy on G protein-coupled receptors. *Curr Med Chem* 2012;19:4722.
- [91] Krichevsky O, Bonnet G. Fluorescence correlation spectroscopy: the technique and its applications. *Rep Prog Phys* 2002;65:251.

- [92] Pauwels P, Tardif S, Wurch T, Colpaert F. Stimulated [35S] GTP γ S binding by 5-HT_{1A} receptor agonists in recombinant cell lines Modulation of apparent efficacy by G-protein activation state. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1997;356:551.
- [93] Hegener O, Jordan R, Häberlein H. Benzodiazepine binding studies on living cells: application of small ligands for fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* 2002;383:1801.
- [94] Hegener O, Prenner L, Runkel F, Baader S, Kappler J, Häberlein H. Dynamics of beta₂-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 2004;43:6190.
- [95] Collins PY, Patel V, Joestl SS, March D, Insel TR, Daar AS, Anderson W, Dhansay MA, Phillips A, Shurin S, Walport M, Ewart W, Savill SJ, Bordin IA, Costello EJ, Durkin M, Fairburn C, Glass RI, Hall W, Huang Y, Hyman SE, Jamison K, Kaaya S, Kapur S, Kleinman A, Ogunniyi A, Otero-Ojeda A, Poo MM, Ravindranath V, Sahakian BJ, Saxena S, Singer PA, Stein DJ. Grand challenges in global mental health. *Nature* 2011;475:27.
- [96] Mathers C, Loncar D. Projections of global mortality and burden of disease from 2002 to 2030. *PLoS Med* 2006;3:e442.
- [97] Eison AS, Mullins UL. Regulation of central 5-HT_{2A} receptors: a review of in vivo studies. *Behav Brain Res* 1996;73:177.
- [98] Pramanik A. Ligand-receptor interactions in live cells by fluorescence correlation spectroscopy. *Curr Pharm Biotechnol* 2004;5:205.
- [99] Pucadyil T, Kalipatnapu S, Harikumar K, Rangaraj N, Karnik S, Chattopadhyay A. G-protein-dependent cell surface dynamics of the human serotonin_{1A} receptor tagged to yellow fluorescent protein. *Biochemistry* 2004;43:15852.
- [100] Ganguly S, Pucadyil T, Chattopadhyay A. Actin cytoskeleton-dependent dynamics of the human serotonin_{1A} receptor correlates with receptor signaling. *Biophys J* 2008;95:451.
- [101] Paila Y, Kombrabail M, Krishnamoorthy G, Chattopadhyay A. Oligomerization of the serotonin(1A) receptor in live cells: a time-resolved fluorescence anisotropy approach. *J Phys Chem B* 2011;115:11439.
- [102] Shrivastava S, Pucadyil T, Paila Y, Ganguly S, Chattopadhyay A. Chronic cholesterol depletion using statin impairs the function and dynamics of human serotonin(1A) receptors. *Biochemistry* 2010;49:5426.
- [103] Paila Y, Ganguly S, Chattopadhyay A. Metabolic depletion of sphingolipids impairs ligand binding and signaling of human serotonin_{1A} receptors. *Biochemistry* 2010;49:2389.
- [104] Chen J, Rasenick M. Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant drugs increases functional coupling between a G protein (G_s) and adenylyl cyclase. *J Neurochem* 1995;64:724.
- [105] Lacivita E, Masotti A, Jafurulla M, Saxena R, Rangaraj N, Chattopadhyay A, Colabufo N, Berardi F, Perrone R, Leopoldo M. Identification of a red-emitting fluorescent ligand for in vitro visualization of human serotonin 5-HT(1A) receptors. *Bioorg Med Chem Lett* 2010;20:6628.
- [106] Lacivita E, Leopoldo M, Masotti A, Inglese C, Berardi F, Perrone R, Ganguly S, Jafurulla M, Chattopadhyay A. Synthesis and characterization of environment-sensitive fluorescent ligands for human 5-HT_{1A} receptors with 1-arylpiperazine structure. *J Med Chem* 2009;52:7892.

- [107] Lacivita E, Leopoldo M. N-[omega-[4-(2-methoxyphenyl)-1-piperazinyl]alkyl]-2-quinolinamines as high-affinity fluorescent 5-HT_{1A} receptor ligands. *J Med Chem* 2008;51:1492.
- [108] Sieben A, Prenner L, Sorkalla T, Wolf A, Jakobs D, Runkel F, Häberlein H. Alpha-hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of beta 2-adrenergic receptors. *Biochemistry* 2009;48:3477.
- [109] Caballero-George C, Sorkalla T, Jakobs D, Bolaños J, Raja H, Shearer C, Bermingham E, Häberlein H. Fluorescence correlation spectroscopy in drug discovery: study of Alexa532-endothelin 1 binding to the endothelin ETA receptor to describe the pharmacological profile of natural products. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:524169.
- [110] Briddon S, Middleton R, Yates A, George M, Kellam B, Hill S. Application of fluorescence correlation spectroscopy to the measurement of agonist binding to a G-protein coupled receptor at the single cell level. *Faraday Discuss* 2004;126:197.
- [111] Cordeaux Y, Briddon S, Alexander S, Kellam B, Hill S. Agonist-occupied A₃ adenosine receptors exist within heterogeneous complexes in membrane microdomains of individual living cells. *FASEB J* 2008;22:850.
- [112] Pramanik A, Olsson M, Langel U, Bartfai T, Rigler R. Fluorescence correlation spectroscopy detects galanin receptor diversity on insulinoma cells. *Biochemistry* 2001;40:10839.
- [113] Grünwald D, Spottke B, Buschmann V, Kubitscheck U. Intranuclear binding kinetics and mobility of single native U1 snRNP particles in living cells. *Mol Biol Cell* 2006;17:5017.
- [114] Sieben A, Kaminski T, Kubitscheck U, Häberlein H. Terbutaline causes immobilization of single β_2 -adrenergic receptor-ligand complexes in the plasma membrane of living A549 cells as revealed by single-molecule microscopy. *J Biomed Opt* 2011;16:26013.
- [115] Jacquier V, Prummer M, Segura JM, Pick H, Vogel H. Visualizing odorant receptor trafficking in living cells down to the single-molecule level. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:14325.
- [116] Lill Y, Martinez K, Lill M, Meyer B, Vogel H, Hecht B. Kinetics of the initial steps of G protein-coupled receptor-mediated cellular signaling revealed by single-molecule imaging. *Chemphyschem* 2005;6:1633.
- [117] Suzuki K, Ritchie K, Kajikawa E, Fujiwara T, Kusumi A. Rapid hop diffusion of a G-protein-coupled receptor in the plasma membrane as revealed by single-molecule techniques. *Biophys J* 2005;88:3659.
- [118] Sergé A, Fourgeaud L, Hémar A, Choquet D. Receptor activation and homer differentially control the lateral mobility of metabotropic glutamate receptor 5 in the neuronal membrane. *J Neurosci* 2002;22:3910.
- [119] Sieben A. Charakterisierung der lateralen Diffusion einzelner β_2 -adrenerger Rezeptor-Ligand-Komplexe an lebenden Zellen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2008.
- [120] Choquet D, Triller A. The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:251.
- [121] English DS, Das K, Ashby KD, Park J, Petrich JW, Castner EW. Confirmation of Excited-State Proton Transfer and Ground-State Heterogeneity in Hypericin by Fluorescence Upconversion. *J Am Chem Soc* 1997;119:11585.

- [122] Kwon G, Remmers A, Datta S, Neubig R. Synthesis and characterization of fluorescently labeled bovine brain G protein subunits. *Biochemistry* 1993;32:2401.
- [123] Kvach M, Stepanova I, Prokhorenko I, Stupak A, Bolibrukh D, Korshun V, Shmanai V. Practical synthesis of isomerically pure 5- and 6-carboxytetramethylrhodamines, useful dyes for DNA probes. *Bioconjug Chem* 2009;20:1673.
- [124] Newman-Tancredi A, Conte C, Chaput C, Spedding M, Millan M. Inhibition of the constitutive activity of human 5-HT_{1A} receptors by the inverse agonist, spiperone but not the neutral antagonist, WAY 100,635. *Br J Pharmacol* 1997;120:737.
- [125] Prenner L. Untersuchungen zum Einfluss von Inhaltsstoffen aus *Hypericum perforatum* L. auf das β -adrenerge Rezeptorsystem am postsynaptischen Modell lebender Zellen. Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn 2006.
- [126] Kusumi A, Sako Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 1996;8:566.
- [127] Fujiwara T, Ritchie K, Murakoshi H, Jacobson K, Kusumi A. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *J Cell Biol* 2002;157:1071.
- [128] Kusumi A, Fujiwara TK, Chadda R, Xie M, Tsunoyama TA, Kalay Z, Kasai RS, Suzuki KG. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2012;28:215.
- [129] Kenakin T. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;336:296.
- [130] Kobilka BK, Deupi X. Conformational complexity of G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2007;28:397.
- [131] Milligan G. Constitutive activity and inverse agonists of G protein-coupled receptors: a current perspective. *Mol Pharmacol* 2003;64:1271.
- [132] Martel J-C, Ormière A-M, Leduc N, Assié M-B, Cussac D, Newman-Tancredi A. Native rat hippocampal 5-HT_{1A} receptors show constitutive activity. *Mol Pharmacol* 2007;71:638.
- [133] Tao YX. Constitutive activation of G protein-coupled receptors and diseases: insights into mechanisms of activation and therapeutics. *Pharmacol Ther* 2008;120:129.
- [134] Sieving P, Richards J, Naarendorp F, Bingham E, Scott K, Alpern M. Dark-light: model for nightblindness from the human rhodopsin Gly-90-->Asp mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:880.
- [135] Shenker A, Laue L, Kosugi S, Merendino J, Minegishi T, Cutler G. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. *Nature* 1993;365:652.
- [136] Schipani E, Langman C, Parfitt A, Jensen G, Kikuchi S, Kooh S, Cole W, Jüppner H. Constitutively activated receptors for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide in Jansen's metaphyseal chondrodysplasia. *N Engl J Med* 1996;335:708.
- [137] Herrick-Davis K, Grinde E, Teitler M. Inverse agonist activity of atypical antipsychotic drugs at human 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 2000;295:226.

- [138] Kenakin T, Miller LJ. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev* 2010;62:265.
- [139] Park PS. Ensemble of G protein-coupled receptor active states. *Curr Med Chem* 2012;19:1146.
- [140] Laugwitz KL, Allgeier A, Offermanns S, Spicher K, Van Sande J, Dumont JE, Schultz G. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:116.
- [141] Parma J, Van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G. Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca²⁺ cascades. *Mol Endocrinol* 1995;9:725.
- [142] Wonerow P, Chey S, Fuhrer D, Holzapfel HP, Paschke R. Functional characterization of five constitutively activating thyrotrophin receptor mutations. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2000;53:461.

8 Anhang

8.1 Publikationen

Jakobs D, Hage-Hülsmann A, Prenner L, Kolb C, Weiser D, Häberlein H. Downregulation of β_1 -adrenergic receptors in rat C6 glioblastoma cells by hyperforin and hyperoside from St John's wort. *J Pharm Pharmacol* 2013;65:907.

Jakobs D, Sorkalla T, Häberlein H. Ligands for fluorescence correlation spectroscopy on G protein-coupled receptors. *Current medicinal chemistry* 2012;19:4722.

Sieben A, Prenner L, Sorkalla T, Wolf A, Jakobs D, Runkel F, Häberlein H. Alpha-hederin, but not hederacoside C and hederagenin from *Hedera helix*, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of beta 2-adrenergic receptors. *Biochemistry* 2009;48:3477.

Caballero-George C, Sorkalla T, Jakobs D, Bolaños J, Raja H, Shearer C, Bermingham E, Häberlein H. Fluorescence correlation spectroscopy in drug discovery: study of Alexa532-endothelin 1 binding to the endothelin ETA receptor to describe the pharmacological profile of natural products. *ScientificWorldJournal* 2012;2012:524169.

8.2 Poster

Jakobs D, Hage-Hülsmann A, Kolb C, Häberlein H. Einfluss von Johanniskrautinhaltstoffen auf das Verhalten und die Regulation von postsynaptischen β_1 -adrenergen Rezeptoren: Ein neuer Ansatz zum Wirkmechanismus
40 Jahre Gesellschaft für Phytotherapie 2011, Köln

Jakobs D, Hage-Hülsmann A, Kolb C, Häberlein H. Effekt von Johanniskrautinhaltstoffen auf die postsynaptische Dichte von β_1 -adrenergen Rezeptoren unter nicht stimulierenden Bedingungen
Deutsche Gesellschaft für Psychiatrie und Psychotherapie, Psychosomatik und Naturheilkunde Kongress 2010, Berlin

Jakobs D, Hage-Hülsmann A, Kolb C, Häberlein H. Influence of hyperoside and hyperforin on the regulation of β_1 -adrenergic receptors on living C6 glioblastoma cells: A new postsynaptic approach to the mode of action of St. John's wort
58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research 2010, Berlin