

**Untersuchungen zur β -Arrestin 2 Rekrutierung und
lateralen Mobilität von 5HT_{1a}-Rezeptoren allein
sowie unter dem Einfluss koexprimierter
5HT_{2a}- bzw. 5HT₇-Rezeptoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Eva Weitkemper

aus

Aachen

Bonn 2024

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

Gutachter/Betreuer: Prof. Dr. Hanns Häberlein

Gutachterin: Prof. Dr. Christa E. Müller

Tag der Promotion: 16.09.2024

Erscheinungsjahr: 2024

Die vorliegende Arbeit ist in der Zeit von November 2020 bis Juni 2024 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein angefertigt worden.

Zusammenfassung

Dem 5HT_{1a}-Rezeptor (5HT_{1a}R) wird in der Familie der Serotoninrezeptoren besondere Aufmerksamkeit zuteil, da er eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Serotonin-Systems im Gehirn einnimmt.^{1,2} Darüber hinaus ist seine Funktion für physiologische Prozesse wie Schlaf und Stressantwort, aber auch für Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen wichtig.³⁻⁶ Um die Pathomechanismen dieser Erkrankungen umfassend aufklären zu können, ist es von essentieller Bedeutung, die Funktion der beteiligten Rezeptoren vollständig zu verstehen. Dazu wird im Rahmen dieser Arbeit die Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R mit Hilfe von 5HT_{1a}R-NanoBiT[®]-Assays in transient transfizierten HEK 293 Zellen (HEK Zellen) analysiert. Der prototypische 5HT_{1a}R-Agonist 8-OH-DPAT kann dabei auf Basis der aus der Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung zu bestimmenden Initialen Rate⁷ (IR) als Partialagonist eingestuft werden. Für den 5HT_{1a}R-Agonist U92016A stellt sich eine Initiation des Signals in vollagonistischer Weise dar, die Gegenregulation des Signals erfolgt jedoch so stark, dass die über 60 min rekrutierte β -Arrestin 2 Menge der eines Partialagonisten gleicht.

Das Verständnis von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) hat sich in den letzten Jahrzehnten immer weiter dahin entwickelt, GPCR nicht als isolierte Einheiten zu verstehen, sondern sie im Kontext ihrer Signalproteine sowie anderer GPCR zu sehen. Es ist zudem bekannt, dass 5HT_{1a}R mit den Serotoninrezeptoren 5HT_{2a}⁸ und 5HT₇⁹ (5HT_{2a}R, 5HT₇R) oligomerisieren.

So wird mittels 5HT_{1a}R-NanoBiT[®]-Assays in HEK Zellen überprüft, wie sich die Koexpression und Aktivierung der 5HT_{2a}R auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung an 5HT_{1a}R auswirken. Dabei ist eine deutlich reduzierte Rekrutierung von β -Arrestin 2 an den 5HT_{1a}R zu verzeichnen.

Die Signaltransduktion von GPCR kann maßgeblich von der lateralen Mobilität der beteiligten Proteine in der Zellmembran abhängen.^{10,11} Im Rahmen von Single Particle Tracking (SPT) Experimenten soll daher untersucht werden, wie sich die Koexpression des 5HT_{2a}R auf die laterale Mobilität von 5HT_{1a}R auswirkt. Dazu werden HEK Zellen stabil transfiziert, die SNAP-5HT_{1a}R alleine oder in Kombination mit HiBiT-5HT_{2a}R überexprimieren. Dabei ist unter anderem festzustellen, dass 5HT_{2a}R die laterale Mobilität von 5HT_{1a}R deutlich modulieren. So nehmen besonders im unbehandelten Zustand in den langsam diffundierenden (S2) und

immobilen Rezeptorzuständen (S1) die Diffusionskoeffizienten für 5HT_{1a}R ab, der Anteil der 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand (S3) sinkt unter 5HT_{2a}R-Koexpression. Zu welchem Maß die gezeigten Veränderungen auf die Heteromerisierung der 5HT-Rezeptoren zurückzuführen ist, welche Rolle eine mögliche Internalisierung der 5HT_{1a}R spielt oder welche Einflüsse aufgrund von nachgeschalteten Signalkaskaden vermittelt werden, wird im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig geklärt werden können.

Auch die Effekte der Koexpression und Aktivierung von 5HT₇R auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R werden im 5HT_{1a}R-NanoBiT[®]-Assay analysiert. Dabei zeigt sich, dass 5HT₇R die β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R nicht verändern. Stattdessen kann der 5HT₇R-Agonist AS-19 als inverser 5HT_{1a}R-Agonist identifiziert werden. Mit Hilfe von SPT-Experimenten ist zu untersuchen, ob die Reduktion der konstitutiven 5HT_{1a}R-Aktivität durch AS-19 oder den inversen 5HT_{1a}R-Agonisten Spiperon mit einer Veränderung der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität einhergeht. Die Behandlung der hierfür verwendeten HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mit AS-19 oder Spiperon hat keinen signifikanten Effekt auf die laterale 5HT_{1a}R-Mobilität.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XI
Tabellenverzeichnis	XIII
1. Einleitung	1
2. Ziel und Herangehensweise	6
3. Material	7
3.1 Chemikalien.....	7
3.2 Lösungen.....	8
3.2.1 Käuflich erworbene Lösungen	8
3.2.2 Im Labor hergestellte Lösungen.....	9
3.3 Antikörper.....	10
3.4 Enzyme	10
3.5 Zelllinien.....	11
3.5.1 Käuflich erworbene Zelllinien.....	11
3.5.2 Genetisch veränderte Zelllinien.....	11
3.6 Kits.....	12
3.7 Plastik- und Glaswaren	12
4. Methoden	13
4.1 Zellkultur	13
4.2 Transformation von XL1-blue Bakterien	13
4.3 β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT [®] -Assay	14
4.3.1 Messprinzip des Experiments.....	14

4.3.2 Klonierung der Plasmide	15
4.3.2.1 pcDNA5FRT_5HT1a	15
4.3.2.2 pcDNA3_5HT1a-LgBiT.....	16
4.3.2.3 pcDNA5FRT_5HT2a	16
4.3.2.4 pcDNA3_5HT2a-LgBiT.....	16
4.3.2.5 pcDNA5FRT_5HT7	16
4.3.2.6 pcDNA3_5HT7-LgBiT	17
4.3.2.7 pcDNA3.1Zeo_SmBiT-ARRB2.....	17
4.3.3 Transiente Transfektion von HEK Zellen	17
4.3.4 Nachweis der transient transfizierten Rezeptoren	19
4.3.5 Durchführung des NanoBiT [®] -Assays.....	20
4.3.6 Verarbeitung der NanoBiT [®] -Rohdaten	20
4.4 Single Particle Tracking von 5HT _{1a} -Rezeptoren	22
4.4.1 Messprinzip des Experiments.....	22
4.4.2 Klonierung der Plasmide	24
4.4.2.1 pcDNA3_SNAP-5HT1a	24
4.4.2.2 pcDNA3.1Zeo_HiBiT-5HT2a.....	24
4.4.2.3 pQE80L_His-LgBiT	25
4.4.3 Transfektion und stabile Selektion von HEK Zellen.....	25
4.4.4 Expression und Aufreinigung des rekombinanten His-LgBiT Proteins.....	26
4.4.5 Nachweis stabil transfizierter Rezeptoren	27
4.4.6 Durchführung der SPT-Messungen	27
4.4.6.1 Vorbereitung der Zellen.....	28
4.4.6.2 Einstellungen des SPT-Messaufbaus.....	28
4.4.7 Verarbeitung der SPT-Rohdaten	28
4.4.7.1 Detektion der Fluoreszenzsignale und Bewegungsmuster	28
4.4.7.2 Analyse der räumlich begrenzten Diffusion.....	29

4.4.7.3 Analyse des 5HT _{1a} R-Oligomerisierungsgrads	30
4.4.7.4 Statistische Analyse der Daten	30
5. Ergebnisse	31
5.1 Transfektion von HEK Zellen	31
5.1.1 Nachweis der transient transfizierten 5HT _{1a} -, 5HT _{2a} - und 5HT ₇ -Rezeptoren.....	31
5.1.2 Stabile Zelllinie HEK SNAP-5HT _{1a}	35
5.1.3 Stabile Zelllinie HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a}	36
5.2 Charakterisierung der β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT _{1a} -Rezeptor	38
5.3 Untersuchung des Einflusses von 5HT _{2a} -Rezeptoren auf 5HT _{1a} -Rezeptoren	43
5.3.1 Untersuchung des Einflusses des 5HT _{2a} -Rezeptors auf die 5HT _{1a} R-induzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung.....	43
5.3.2 Untersuchung des Einflusses des 5HT _{2a} -Rezeptors auf die laterale Mobilität des 5HT _{1a} -Rezeptors	46
5.3.2.1 5HT _{2a} R-Einfluss auf den Diffusionskoeffizient des 5HT _{1a} Rezeptors.....	46
5.3.2.2 5HT _{2a} R-Einfluss auf die Verteilung der 5HT _{1a} -Rezeptorzustände	49
5.3.2.3 5HT _{2a} R-Einfluss auf die räumliche Begrenzung der 5HT _{1a} R-Diffusion..	51
5.3.2.4 5HT _{2a} R-Einfluss auf die Homooligomerisierung von 5HT _{1a} -Rezeptoren	57
5.4 Untersuchung des Einflusses von 5HT ₇ -Rezeptoren auf 5HT _{1a} -Rezeptoren	60
5.4.1 Untersuchung des Einflusses des 5HT ₇ -Rezeptors auf die 5HT _{1a} R-induzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung.....	60
5.4.2 Identifizierung von AS-19 als inverser 5HT _{1a} R-Agonist	64
5.4.3 Untersuchung des Einflusses von AS-19 auf die laterale Mobilität des 5HT _{1a} -Rezeptors	65
5.4.3.1 Einfluss der 5HT _{1a} R-Liganden auf den Diffusionskoeffizienten	65
5.4.3.2 Einfluss der 5HT _{1a} R-Liganden auf die Verteilung der Rezeptorzustände	67
5.4.3.3 Einfluss der 5HT _{1a} R-Liganden auf die räumliche Begrenzung der 5HT _{1a} R-Diffusion.....	68
5.4.3.4 Einfluss der 5HT _{1a} R-Liganden auf die 5HT _{1a} R-Homooligomerisierung.	71

6. Diskussion.....	73
7. Zusammenfassung und Ausblick.....	98
8. Literaturverzeichnis.....	102
9. Anhang.....	118
10. Danksagung.....	126
11. Publikation.....	127

Abkürzungsverzeichnis

5HT _{1a} R	Serotoninrezeptor 5HT _{1a}
5HT _{2a} R	Serotoninrezeptor 5HT _{2a}
5HT ₇ R	Serotoninrezeptor 5HT ₇
% E _{max}	prozentualer Anteil des maximalen Effekts eines Referenzliganden
AC	Adenylatcyklase
Amp	Ampicillin
AUC	Fläche unter einer Kurve
β ₁ AR	β ₁ -adrenerger Rezeptor
β ₂ AR	β ₂ -adrenerger Rezeptor
BSA	Bovines Serumalbumin
BRET	Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer
CaCl ₂ * 6 H ₂ O	Calciumchlorid Hexahydrat
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device
ERK	Extrazellular-Signal Regulierte Kinasen
FCS	Fötales Kälberserum
FD-Enzym	FastDigest-Enzym
G418	Geneticin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GIRK	G-Protein-aktivierte Kaliumkanäle
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HBSS	Salzlösung nach Hanks
HBSS/HEPES	HEPES gepufferte Salzlösung nach Hanks
HCl	Salzsäure
HEK	Humane embryonale Nierenzellen
HiBiT	kleines Proteinfragment der Nanoluciferase (hohe LgBiT-Affinität)
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

IP ₃	Inositoltriphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IR	Initiale Rate
LB	Lysogenie-Brühe-Medium
LgBiT	großes Proteinfragment der Nanoluciferase
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Magnesiumchlorid Hexahydrat
NaCl	Natriumchlorid
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat
NanoLuc	Nanoluciferase
NaOH	Natriumhydroxid
NGS	Normales Ziegenserum
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
Pc	Verdichtungsfaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
phosphoPKA	phosphorylierte Proteinkinase A
P/S	Penicillin/Streptomycin
Rluc	Renilla Luciferase
SmBiT	kleines Proteinfragment der Nanoluciferase (niedrige LgBiT-Affinität)
SPT	Single Particle Tracking
SSRI	selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren
TCEP	Tris-(2-carboxyethyl)-phosphinhydrochlorid
T/E	Trypsin-EDTA
Zeo	Zeocin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Messprinzip des 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assays	15
Abbildung 2:	Enzymatische Reaktion eines SNAP-Fusionsproteins mit einem Benzylguanin-gekoppelten Dy549-Molekül	22
Abbildung 3:	Generierung und Auswertung der SPT-Daten	23
Abbildung 4:	Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT _{1a} R	32
Abbildung 5:	Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT _{2a} R	33
Abbildung 6:	Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT ₇ R	34
Abbildung 7:	SNAP- Färbung stabil transfizierter SNAP-5HT _{1a} R in HEK SNAP-5HT _{1a} Zellen	35
Abbildung 8:	SNAP- Färbung stabil transfizierter SNAP-5HT _{1a} R in HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a} Zellen	36
Abbildung 9:	Komplementierungsassay in stabilen HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a} Zellen	37
Abbildung 10:	β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay und Verarbeitung der Rohdaten	39
Abbildung 11:	β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay	40
Abbildung 12:	Vergleich der AUC- und IR-Auswertung des 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assays	42
Abbildung 13:	β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{2a} -NanoBiT [®] -Assay	43
Abbildung 14:	Einfluss gleichzeitiger 5HT _{2a} R-Stimulation auf die 5HT _{1a} R-vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] - Assay	44
Abbildung 15:	Diffusionsverhalten von SNAP-5HT _{1a} R	48
Abbildung 16:	Verteilung der Rezeptorzustände S1-S3 von SNAP-5HT _{1a} R	51
Abbildung 17:	Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT _{1a} R	53
Abbildung 18:	Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT _{1a} R	56
Abbildung 19:	Analyse der Homooligomierzustände von SNAP-5HT _{1a} R	59
Abbildung 20:	β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT ₇ -NanoBiT [®] -Assay	60
Abbildung 21:	Einfluss von 5HT ₇ R auf die 5HT _{1a} R-vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung	62
Abbildung 22:	AS-19 vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay	63
Abbildung 23:	β-Arrestin 2 Rekrutierung inverser Agonisten im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay	64
Abbildung 24:	Diffusionsverhalten von SNAP-5HT _{1a} R	66
		XI

Abbildung 25:	Verteilung der Rezeptorzustände S1-S3 von SNAP-5HT _{1a} R	68
Abbildung 26:	Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT _{1a} R	69
Abbildung 27:	Mittlere Größe des räumlich begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT _{1a} R	71
Abbildung 28:	Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT _{1a} R	72
Abbildung 29:	Vergleich der AUC- und Endpunktanalyse der β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay	75
Abbildung A 1:	Protokoll des NucleoBond [®] Xtra Midi Kits	118
Abbildung A 2:	Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT1a	119
Abbildung A 3:	Plasmidkarte pcDNA3_5HT1a-LgBiT	119
Abbildung A 4:	Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT2a	120
Abbildung A 5:	Plasmidkarte pcDNA3_5HT2a-LgBiT	120
Abbildung A 6:	Protokoll des NucleoSpin [®] Gel und PCR Clean-up Kits	121
Abbildung A 7:	Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT7	122
Abbildung A 8:	Plasmidkarte pcDNA3_5HT7-LgBiT	122
Abbildung A 9:	Plasmidkarte pcDNA3.1Zeo_SmBiT-ARRB2	123
Abbildung A 10:	Plasmidkarte pBlueskript SK (-)	123
Abbildung A 11:	Plasmidkarte pcDNA3_SNAP-5HT1a	124
Abbildung A 12:	Plasmidkarte pcDNA3.1Zeo_HiBiT-5HT2a	124
Abbildung A 13:	Plasmidkarte pQE80L_His-LgBiT	125

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Auflistung der käuflich erworbenen Chemikalien	7
Tabelle 2:	Auflistung der käuflich erworbenen Lösungen	8
Tabelle 3:	Auflistung der im Labor hergestellten Lösungen	9
Tabelle 4:	Auflistung der käuflich erworbenen Antikörper	10
Tabelle 5:	Auflistung der käuflich erworbenen Enzyme	10
Tabelle 6:	Auflistung der käuflich erworbener Zelllinien	11
Tabelle 7:	Auflistung genetisch veränderter Zelllinien	11
Tabelle 8:	Auflistung der käuflich erworbenen Kits	12
Tabelle 9:	Auflistung der genutzten Plastik- und Glaswaren	12
Tabelle 10:	Transiente Transfektionen für die Messung der β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT [®] -Assay	18
Tabelle 11:	Stabile Transfektion von HEK Zellen für die SPT-Messung am 5HT _{1a} -Rezeptor	26
Tabelle 12:	Einstellungen „u-track“ SPT-Auswertung	29
Tabelle 13:	Einstellungen vbSPT-Auswertung	29
Tabelle 14:	Kennzahlen der β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT _{1a} -NanoBiT [®] -Assay	40
Tabelle 15:	Diffusionskoeffizienten (D) für die Rezeptorzustände S1 bis S3	47
Tabelle 16:	Verteilung SNAP-5HT _{1a} R auf die Zustände S1 bis S3	50
Tabelle 17:	Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT _{1a} R	52
Tabelle 18:	Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT _{1a} R	54
Tabelle 19:	Analyse der Homooligomierzustände von SNAP-5HT _{1a} R	58
Tabelle 20:	Einfluss des 5HT ₇ R auf die 5HT _{1a} R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT _{1a} -NanoBiT Zellen	61
Tabelle 21:	Einfluss von 8-OH-DPAT und AS-19 auf die 5HT _{1a} R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT _{1a} -NanoBiT 5HT ₇ Zellen	62
Tabelle 22:	Einfluss von Serotonin und SB267790 auf die 5HT _{1a} R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT _{1a} -NanoBiT 5HT ₇ Zellen	63
Tabelle 23:	Diffusionsverhalten von SNAP-5HT _{1a} R	66
Tabelle 24:	Verteilung von SNAP-5HT _{1a} R auf die Zustände S1 bis S3	67
Tabelle 25:	Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT _{1a} R	69

Tabelle 26:	Mittlere Größe des räumlich begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT _{1a} R	70
Tabelle 27:	Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT _{1a} R	72

1. Einleitung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen eine große diverse Familie von Membranproteinen dar, die an der Regulation vieler Zellfunktionen beteiligt sind und wichtige Targets für die Arzneistoffentwicklung darstellen.^{1,2} Der 5HT_{1a}-Rezeptor (5HT_{1a}R) gehört zur Familie der Serotoninrezeptoren, die in sieben verschiedene Untergruppen aufgeteilt sind (5HT₁ bis 5HT₇).¹³

Unter den Serotoninrezeptoren kommt dem 5HT_{1a}R besondere Aufmerksamkeit zuteil, da er eine Schlüsselrolle bei der Regulation des Serotonin-Systems im Gehirn einnimmt.^{1,2} Der 5HT_{1a}R wird in den meisten Hirnregionen exprimiert, wie Banerjee et al. 2007¹⁴ diskutieren. Dabei kommt er zum einen als präsynaptischer Rezeptor auf serotonergen Zellkörpern und Dendriten in Raphe Kernen vor.^{15,16} Die Aktivierung dieser präsynaptischen Autorezeptoren führt zu einer herabgesetzten Signallrate von serotonergen Neuronen.^{1,2} 5HT_{1a}R kommen zum andern als postsynaptische Rezeptoren vor. Als solche werden sie in Regionen des Vorderhirns¹³ wie dem Cortex, Hippocampus und Hypothalamus exprimiert.^{16,17} 5HT_{1a}R koppeln an G_{i/o}-Proteine, aktivieren die Phospholipase C und Extrazellular-Signal Regulierte Kinasen (ERK).¹⁸⁻²⁰ Die Aktivierung präsynaptischer Autorezeptoren hemmt die cAMP-Akkumulation durch G_{i/o}-Kopplung.²¹ Gleichzeitig führt die G_{i2}-Kopplung postsynaptischer Heterorezeptoren zur Erhöhung des zellulären cAMP-Spiegels durch die Aktivierung der Adenylatcyclase AC₂.^{19,22}

Die komplexen Funktionen des 5HT_{1a}R bedingen seine bedeutende regulatorische Rolle in der serotonergen Neurotransmission sowohl prä- als auch postsynaptisch. Diese ist elementar in physiologische Mechanismen wie Schlaf, Stressantwort, Appetit, Sexualverhalten, aggressives Verhalten, Depression und Angst involviert.^{3,4} Um Pathomechanismen von Erkrankungen wie Angst⁶ und Depressionen,⁵ die sich immer mehr zu Volkskrankheiten entwickeln, vollständig verstehen und besser behandeln zu können, ist es von essentieller Bedeutung, die Funktion der an der Pathogenese beteiligten Rezeptoren vollständig zu verstehen.

Neben den G-Protein abhängigen Signalwegen vermitteln 5HT_{1a}R auch G-Protein unabhängige Signaltransduktion.^{23,24} Die GPCR-Aktivierung führt dabei grundsätzlich zur Phosphorylierung von C-terminalen Serin/Threonin Residuen durch GPCR Kinasen (GRK).^{25,26} Diese Phosphorylierung ermöglicht die Rekrutierung der Gerüstproteine Arrestin,^{27,28} welche sowohl

für die Regulation^{29,30} von GPCR als auch für anderweitige nachgelagerte Signaltransduktion verantwortlich sind.^{31,32} Die Proteinfamilie der Arrestine besteht aus den vier Isoformen 1 bis 4 und ist in die visuellen (1 und 4) und nicht-visuellen (2 und 3) Arrestine zu unterteilen. Die nicht-visuellen Arrestine sind in Säugetierzellen ubiquitär zu finden und werden auch als β -Arrestin 1 und 2 bezeichnet.³³

Es ist von großem Interesse, die Signalwege des β -Arrestin 2 am 5HT_{1a}R besser zu verstehen. Auch an anderen GPCR haben Arrestine wichtige Funktionen. So verbessert die Rekrutierung von β -Arrestin 1 und 2 am Angiotensin 1-Rezeptor beispielsweise die Herzleistung von speziellen Liganden im Tiermodell.³⁴⁻³⁶ Am μ -Opioidrezeptor ist die β -Arrestin 2 Rekrutierung an Opioid-vermittelten unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie der Toleranzentwicklung beteiligt.³⁷⁻³⁹

Auch das Interesse an der Kinetik und Dynamik der GPCR-Signaltransduktion wird immer größer, da das therapeutische Potential von Liganden optimiert werden soll.⁴⁰⁻⁴² Die Quantifizierung der Signalkinetik mit nützlichen Arzneimittelparametern würde die Entwicklung kinetisch optimierter Moleküle unterstützen, die beispielsweise auf die Dauer der Signalgeneration, den Zeitrahmen der Desensibilisierung und die Verweildauer in signalgebenden Kompartimenten abgestimmt sind.⁴³

8-OH-DPAT ist ein Agonist am 5HT_{1a}R und gilt an diesem als prototypischer Agonist. Aus diesem Grund wird er in der Literatur häufig als Referenzligand für Studien der Radioligandbindung oder anderen funktionellen Untersuchungen am 5HT_{1a}R genutzt.^{3,23,44-46} Ziel der Arbeiten im Rahmen dieser Dissertation ist es, die Kinetik der 5HT_{1a}R-vermittelten β -Arrestin 2 Rekrutierung zu charakterisieren und dadurch dynamisch zu zeigen, ob der 5HT_{1a}R-Prototypagonist 8-OH-DPAT als Voll- oder Partialagonist auf die β -Arrestin 2 Signaltransduktion wirkt. Die 8-OH-DPAT vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung ist in der Literatur sehr heterogen und ausschließlich in Form von Endpunktbestimmungen beschrieben.^{3,23,24,47,48}

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte ist das Verständnis von GPCR-Signaltransduktion nicht nur in Bezug auf nachgelagerte Signalkaskaden ausgeweitet worden. Man ist auch dazu übergegangen, GPCR weniger als einzelne, voneinander isolierte Einheiten anzusehen. Stattdessen ist man sich mittlerweile einig, dass GPCR sowohl mit gleichen Rezeptoren als auch anderen Rezeptoren der gleichen^{49,50} oder sogar verschiedener⁵¹⁻⁵³ GPCR-Klassen

oligomerisieren können. Eine solche gegenseitige Beeinflussung ist in der Literatur sowohl für die Kombination aus 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-⁸, als auch für die Kombination aus 5HT_{1a}- und 5HT₇-Rezeptoren⁹ besprochen.

5HT_{2a}-Rezeptoren (5HT_{2a}R) werden in weiten Teilen des humanen Gehirns mit hoher Rezeptordichte neben dem 5HT_{1a}R koexprimiert, wobei die 5HT_{2a}R-Dichte in Thalamus, Mittelhirn und Pons eher gering ist.⁵⁴⁻⁵⁶ Eine 5HT_{2a}R-Aktivierung führt bei den Rezeptor-exprimierenden Neuronen zu einer erhöhten Erregbarkeit der Zellen.⁵⁷ Abhängig davon, ob sich die Rezeptoren auf exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen befinden, unterscheiden sich auch die für die nachgeschalteten Zellen resultierenden Effekte.^{58,59} 5HT_{2a}R koppeln G_q-Proteine,⁶⁰ wobei Serotonin eine höhere Affinität zu Rezeptoren aufweist, die sich in Komplexen mit G-Proteinen befinden.⁶¹ Wie auch 5HT_{1a}R, spielen 5HT_{2a}R eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Therapie von psychiatrischen Erkrankungen. Im Falle des 5HT_{2a}R ist ein Einfluss vor allem auf Depressionen, Schizophrenie, zwanghaften Verhaltensstörungen und Essstörungen diskutiert.¹⁴ Die ersten Theorien über einen möglichen Crosstalk von 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R haben bereits Eison und Mullins 1996⁶² aufgestellt. Borroto-Escuela et al. 2017⁸ weisen das erste Mal Isorezeptorkomplexe nach. Aufgrund der entgegengesetzten Effekte, die postsynaptische 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R an ihre Wirtsneuronen vermitteln, und ihrer Assoziation mit psychiatrischen Erkrankungen ist von großem Interesse, die physiologische Wechselwirkung der beiden Rezeptoren zu verstehen.

Der 5HT₇-Rezeptor (5HT₇R) ist der zuletzt beschriebene Rezeptor der Familie der Serotoninrezeptoren.⁶³ Im menschlichen Gehirn wird er mit hoher Rezeptordichte v.a. in Teilen des Hippocampus, in dorsalen Raphekernen und in der Substantia Nigra exprimiert.^{64,65} 5HT₇R koppeln G_s-Proteine und aktivieren ERK.⁶⁶⁻⁶⁸ Sie sind an der Serotonin-vermittelten Regulation des zirkadianen Rhythmus⁶⁷ sowie an der altersabhängigen Veränderung der zirkadianen Zeitbestimmung beteiligt.⁶⁹ Darüber hinaus sind 5HT₇R nicht nur bei der Entwicklung von Angstzuständen und Depressionen, sondern auch an der Therapie von Depressionen beteiligt.⁷⁰ Für das Zusammenspiel von 5HT₇R und 5HT_{1a}R ist bekannt, dass die 5HT_{1a}R-vermittelte Signaltransduktion beeinflusst wird. So zeigen Renner et al. 2012,⁹ dass die gleichzeitige Expression von 5HT₇R die G_i-Kopplung am 5HT_{1a}R spezifisch abschwächt. Die 5HT_{1a}R-vermittelte Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 steigt an, wenn 5HT₇R zusätzlich exprimiert werden. Des Weiteren beschreibt die Arbeitsgruppe, dass die Heteromerisierung von 5HT_{1a}R und 5HT₇R die Internalisierung von 5HT_{1a}R initiiert.

Diese 5HT₇R-vermittelte Kointernalisierung des 5HT_{1a}R scheint die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin-abhängige ERK-Phosphorylierung zu verstärken. Denn wenn hauptsächlich 5HT_{1a}R-Monomere oder -Homodimere vorliegen, ist die 5HT_{1a}R-vermittelte ERK-Phosphorylierung in erster Linie von der Aktivierung der G_i-Proteine abhängig.⁷¹ Dies wirft die Frage auf, welchen Einfluss die Koexpression des 5HT₇R auf die Rekrutierung von β -Arrestin 2 an den 5HT_{1a}R hat.

Besonders für Depressionen scheint die Interaktion von 5HT_{1a}R und 5HT₇R eine wichtige Rolle zu spielen, wie Naumenko et al. 2014⁷² und Popova et al. 2022⁴ diskutieren. Die Arbeitsgruppen schlagen vor, dass das Verhältnis von 5HT_{1a}R-Homooligomeren zu 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterooligomeren auf prä- und postsynaptischen Membranen eine unterschiedliche 5HT_{1a}-Rezeptordesensitivierung steuert. Als Grund dafür nennen sie die 5HT₇R-vermittelte Internalisierung von 5HT_{1a}R aus 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterooligomeren. Ihrer Theorie zur Folge liegen in der präsynaptischen Membran 5HT_{1a}R verstärkt in 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterooligomeren vor, verglichen mit der postsynaptischen Membran. Ist im synaptischen Spalt beispielsweise durch die Therapie mit selektiven Serotonin-Wiederaufnahme-Inhibitoren (SSRI) die Serotoninkonzentration erhöht, werden die präsynaptischen 5HT_{1a}R verstärkt internalisiert. Hierdurch nimmt die Aktivität dieser 5HT_{1a}-Autorezeptoren ab, was durch das Ausbleiben des negativen Feedbackmechanismus die Aktivität des Serotonin-Systems im Gehirn erhöht. Popova et. al 2022⁴ führen weiter aus, dass sie davon ausgehen, dass das Verhältnis von 5HT_{1a}R-Homooligomeren zu 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterodimeren in präsynaptischen Neuronen bei einer Depression in Richtung der 5HT_{1a}R-Homooligomere verschoben ist. Hierdurch käme es zu einer verzögerten Internalisierung von 5HT_{1a}-Autorezeptoren bei SSRI-Einnahme, wodurch das für SSRI bekannte verspätete Einsetzen der Wirkung möglicherweise zu erklären ist. Auf Basis dieses Regulationsmechanismus schreiben sie der Bildung von 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterooligomeren eine wichtige Rolle sowohl für die Entstehung als auch für die Therapie von Depressionen zu. Über die exakte Stöchiometrie der Homo- sowie Heterooligomere liegen bisher noch keine Informationen vor.

Die Signaltransduktion von GPCR beruht auf der funktionalen Interaktion von räumlich und zeitlich voneinander getrennten Proteinen der nachgeschalteten Signalkaskade. Die Dynamik dieser Komponenten in der Zellmembran spielt daher eine wichtige Rolle für die Funktionalität von GPCR. Die Hypothese der mobilen Rezeptoren ist das erste Konzept, das diesen Aspekt der rezeptorvermittelten Signaltransduktion formuliert hat.¹⁰ Biologische Membranen sind fluide, was die laterale Diffusion ihrer Protein- und Lipidbestandteile ermöglicht. Weil die

einzelnen Komponenten nicht die gleiche Affinität zueinander aufweisen, ergibt sich ein sehr heterogenes Verteilungsmuster. Hieraus ergibt sich die Kompartimentierung in funktionale Mikrodomänen, deren Eigenschaften deutlich von den durchschnittlichen Membraneigenschaften abweichen.⁷³ Die Arbeitsgruppe um A. Kusumi^{11,74,75} schlägt für diese Kompartimentierung in verschiedene Domänen zum einen das Fence-Picket-Modell vor. Hierbei beschreiben sie das unter der Plasmamembran liegende Aktin-Skelett als Zaunanalogon. Die in der Membran vorkommenden transmembranären Proteine, die am Aktin-Skelett verankert sind, führt die Gruppe als Zaunpfahlanaloga ein. Zusammengenommen hindern das Aktin-Skelett und die daran verankerten Transmembranproteine andere Membrankomponenten an der freien Diffusion in der Zellmembran. Darüber hinaus beschreibt die Arbeitsgruppe eine von Lipid-Lipid-Wechselwirkungen geprägte Bildung von sog. Lipid-Rafts, in denen eine erhöhte Cholesterin- und Glykosphingolipiddichte vorherrscht und die eine wichtige Rolle für die Signaltransduktion spielen.^{11,76,77} Auch die Wechselwirkungen zwischen Proteinen können laut Kusumi et al. 2012¹¹ zur Bildung von dynamischen Proteinkomplexdomänen, wie zum Beispiel Clathrin-Coated Pits führen. Die laterale Diffusion von GPCR kann durch verschiedene Faktoren beeinflusst werden. Die Behandlung mit Substanzen, die die Fluidität von Membranen verändert, kann die laterale Mobilität sowie die Aktivität von GPCR modifizieren.^{78,79} Auch der Zustand des Aktin-Skeletts,⁸⁰ die Ligand-vermittelte Aktivierung von GPCR und ihr Oligomerisierungszustand haben einen Einfluss auf die laterale GPCR-Diffusion.⁸¹⁻⁸³ Daher soll im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss einer 5HT-Rezeptorkoexpression oder der Behandlung mit diversen Liganden auf die laterale 5HT_{1a}R-Mobilität untersucht werden.

2. Ziel und Herangehensweise

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R zu untersuchen und mit Hilfe dieser die 5HT_{1a}R-Agonisten als Voll- oder Partialagonisten zu charakterisieren. Zu diesem Zweck erfolgt die Etablierung eines 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays in HEK Zellen, der die Darstellung der β -Arrestin 2 Signaltransduktion in Echtzeit über 60 min ermöglicht.

Es ist bekannt, dass GPCR nicht nur mit Proteinen interagieren, die für ihre Signaltransduktion nötig sind. Sie können darüber hinaus über nachgeschaltete Kaskaden oder durch direkte Oligomerisierung mit denselben Rezeptoren, mit GPCR der gleichen Familie oder anderer Familien reguliert werden. Für den 5HT_{1a}R ist bekannt, dass er mit den Serotoninrezeptoren 5HT_{2a} und 5HT₇ heteromerisiert. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist daher, zu untersuchen, ob die Koexpression und Aktivierung von 5HT_{2a}R oder 5HT₇R die β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R beeinflusst. Dazu werden 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays in HEK Zellen durchgeführt und die Veränderungen der 5HT_{1a}R-vermittelten Signaltransduktion abhängig von der Aktivierung der koexprimierten 5HT_{2a}R bzw. 5HT₇R untersucht.

Auch die laterale Mobilität von GPCR hat einen maßgeblichen Einfluss auf ihre Signaltransduktion. Aus diesem Grund ist das abschließende Ziel der Arbeit, die laterale Diffusion von 5HT_{1a}R zu untersuchen. Dabei soll der Einfluss des 5HT_{2a}R auf die Mobilität des 5HT_{1a}R charakterisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgt die Beschreibung des 5HT₇R-Agonisten AS-19 als inverser 5HT_{1a}R-Agonist. Welchen Einfluss die Behandlung mit AS-19 auf die laterale Mobilität von 5HT_{1a}R in HEK Zellen hat, soll daher ebenfalls analysiert werden. Die laterale Rezeptordiffusion von 5HT_{1a}R auf der Oberfläche von HEK Zellen wird mit Hilfe von Single Particle Tracking (SPT) Experimenten charakterisiert.

3. Material

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Auflistung der käuflich erworbenen Chemikalien

Name	Abkürzung	Bezogen von	Referenznummer
8-OH-DPAT	–	Sigma-Aldrich, Crailsheim, Deutschland	H8520
Agarose	–	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA	1613101
Ampicillin	Amp	Sigma-Aldrich	A0166
AS-19	–	Tocris Bioscience, Bristol, Vereinigtes Königreich	1968
Bovines Serumalbumin	BSA	VWR, Radnor, PA, USA	0332
Bacto™ Trypton	–	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA	211705
Bacto™ Hefeextrakt	–	Thermo Fisher Scientific	212750
Calciumchlorid Hexahydrat	CaCl ₂ * 6 H ₂ O	Sigma-Aldrich	442909
Coelenterazin h	–	Prolume, Pinetop-Lakeside, AZ, USA	CAT#301
Geneticin	G418	Thermo Fisher Scientific	11811064
GeneRuler 1 kb Plus DNA-Leiter	–	Thermo Fisher Scientific	SM1331
HEPES	–	AppliChem, Darmstadt, Deutschland	A1069
Isopropyl-β-D-thiogalactosid	IPTG	Thermo Fisher Scientific	B21149.06
Kanamycin	–	Sigma-Aldrich	K1377
Magnesiumchlorid Hexahydrat	MgCl ₂ * 6 H ₂ O	Thermo Fisher Scientific	012288.36
Natriumchlorid	NaCl	AppliChem	146994
Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat	NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	Sigma-Aldrich	S9638
Natriumhydroxid	NaOH	Sigma-Aldrich	221465
Paraformaldehyd	PFA	Sigma-Aldrich	158127
Polyethylenimin	PEI	Sigma-Aldrich	408727
Poly-D-Lysin	PDL	Sigma-Aldrich	79606
Saccharose	–	Thermo Fisher Scientific	A15583.0E

Salzsäure	HCl	Sigma-Aldrich	1.37007
SB269970	–	Sigma-Aldrich	5.06415
Serotonin	–	Sigma-Aldrich	50679
Spiperon	–	Sigma-Aldrich	749020
TCB-2	–	Tocris Bioscience	2592
Tris-(2-carboxyethyl)- phosphinhydrochlorid	TCEP	Sigma-Aldrich	C4706
U92016A	–	Tocris Bioscience	2739
WAY-100135	WAY	Sigma-Aldrich	W1895
Zeocin	Zeo	Thermo Fisher Scientific	R25001

3.2 Lösungen

3.2.1 Käuflich erworbene Lösungen

Tabelle 2: Auflistung der käuflich erworbenen Lösungen

Name	Abkürzung	Bezogen von	Referenznummer
Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose, pyruvate	DMEM	Thermo Fisher Scientific	31885023
Dulbecco's Modified Eagle Medium, low glucose, pyruvate, no glutamine, no phenol red	DMEM, farblos	Thermo Fisher Scientific	11054020
FluoreGuard Mounting Medium (Hard Set)	–	ScyTek Laboratories, Inc. Logan, UT, USA	FMH030
Fötales Kälberserum	FCS	Thermo Fisher Scientific	A5256701
GlutaMAX™	–	Thermo Fisher Scientific	35050061
Salzlösung nach Hanks	HBSS	Thermo Fisher Scientific	14025050
Ziegenserum	NGS	Sigma-Aldrich	G9023
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	P/S	Thermo Fisher Scientific	15140122
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung	PBS	Thermo Fisher Scientific	10010056
Trypsin-EDTA (0,05 %)	T/E	Thermo Fisher Scientific	25300104

3.2.2 Im Labor hergestellte Lösungen

Tabelle 3: Auflistung der im Labor hergestellten Lösungen

Name	Abkürzung	Zusammensetzung
HEK Kulturmedium	–	DMEM 100 Einheiten/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 10 % (V/V) FCS
HEK Kulturmedium, farblos	–	DMEM farblos 100 Einheiten/mL Penicillin 100 µg/mL Streptomycin 10 % (V/V) FCS 1 % GlutaMAX™
HEPES gepufferte Salzlösung nach Hanks	HBSS/HEPES	20 mM HEPES 500 ml HBSS mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt
Lysogenie-Brühe- Medium	LB	1 % (m/V) Bacto™ Trypton 0.5 % (m/V) Bacto™ Hefeextrakt 1 % (m/V) NaCl mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt
Lysepuffer	–	50 mM Phosphatpuffer (pH = 7) mit NaOH/HCl auf pH = 7 300 mM NaCl 2,5 mM MgCl ₂ 0,03 mg/mL Lysozym 1 mM TCEP 0,6 U/mL DNase
Natriumchloridlösung 150 mM	NaCl 150 mM	150 mM NaCl 50 mL H ₂ O

3.3 Antikörper

Tabelle 4: Auflistung der käuflich erworbenen Antikörper

Name	Art des Antikörpers	Bezogen von	Referenznummer
Anti-5HT _{1a} -Rezeptor Antikörper	Kaninchen, polyklonal	Abcam, Cambridge, Vereinigtes Königreich	ab85615
Anti-5HT _{2a} -Rezeptor Antikörper	Kaninchen, polyklonal	Antibodies.com, Limerick, PA, USA	A98936
Anti-5HT ₇ -Rezeptor Antikörper	Kaninchen, polyklonal	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen)	#PA1-41122
Anti-Kaninchen-DyLight™ 488-Antikörper	Pferd, polyklonal	Fisher Scientific (Vector Laboratories), Hampton, NH, USA	50-204-5636

3.4 Enzyme

Tabelle 5: Auflistung der käuflich erworbenen Enzyme

Name	Art des Enzyms	Bezogen von
BamHI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
DNase I, RNase-frei	DNase	Thermo Fisher Scientific
Eco32I	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
EcoRI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
HindIII	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
KpnI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
Lysozym	Lysozym	Thermo Fisher Scientific
NheI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
NotI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
XhoI	FastDigest-Restriktionsenzym	Thermo Fisher Scientific
T4 DNA Ligase	Ligase	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Q5® High-Fidelity 2X Master Mix mit Q5® High-Fidelity DNA Polymerase	Polymerase	New England Biolabs

3.5 Zelllinien

3.5.1 Käuflich erworbene Zelllinien

Tabelle 6: Auflistung der käuflich erworbener Zelllinien

Name	Zelltyp	Bezogen von	Referenznummer
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH, Braunschweig, Deutschland	ACC 305

3.5.2 Genetisch veränderte Zelllinien

Tabelle 7: Auflistung genetisch veränderter Zelllinien

Name	Exprimierte genetische Informationen	Transfektionsmethode
HEK 5HT _{1a} -NanoBiT [®]	Exprimiert 5HT _{1a} -Rezeptor mit N-terminalem LgBiT und β -Arrestin 2 mit C-terminalem SmBiT	Transiente PEI-Transfektion
HEK 5HT _{1a} -NanoBiT [®] 5HT _{2a}	Exprimiert 5HT _{1a} -Rezeptor mit N-terminalem LgBiT, β -Arrestin 2 mit C-terminalem SmBiT und 5HT _{2a} -Rezeptor	Transiente PEI-Transfektion
HEK 5HT _{1a} -NanoBiT [®] 5HT ₇	Exprimiert 5HT _{1a} -Rezeptor mit N-terminalem LgBiT, β -Arrestin 2 mit C-terminalem SmBiT und 5HT ₇ -Rezeptor	Transiente PEI-Transfektion
HEK 5HT _{2a} -NanoBiT [®]	Exprimiert 5HT _{2a} -Rezeptor mit N-terminalem LgBiT und β -Arrestin 2 mit C-terminalem SmBiT	Transiente PEI-Transfektion
HEK 5HT ₇ -NanoBiT [®]	Exprimiert 5HT ₇ -Rezeptor mit N-terminalem LgBiT und β -Arrestin 2 mit C-terminalem SmBiT	Transiente PEI-Transfektion
HEK SNAP-5HT _{1a}	Exprimiert 5HT _{1a} -Rezeptor mit C-terminalem SNAP-Tag	Stabile PEI-Transfektion
HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a}	Exprimiert 5HT _{1a} -Rezeptor mit C-terminalem SNAP-Tag und 5HT _{2a} -Rezeptor mit C-terminalem HiBiT	Stabile PEI-Transfektion

3.6 Kits

Tabelle 8: Auflistung der käuflich erworbenen Kits

Name	Bezogen von	Referenznummer
NucleoBond™ Xtra Midi Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	740410
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel	740609
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific	10678484

3.7 Plastik- und Glaswaren

Tabelle 9: Auflistung der genutzten Plastik- und Glaswaren

Name	Bezogen von	Referenznummer
Zellkulturschale, TC- behandelt, mit Greifring, 10 cm	VWR	734-2321
6-Well-Platte, flacher Boden, TC-behandelt	VWR	734-2323
12-Well-Platte, flacher Boden, TC-behandelt	VWR	734-2324
96-Well-Platte, CELLSTAR®, flacher klarer Boden	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich	655098
Deckglas rund, 18 mm	Paul Marienfeld, Lauda- Königshofen, Deutschland	0111580
Halterung für Deckgläser	Sonderanfertigung von Detlef Forst, Institut Physiologie II, Universität Bonn	–
Dialyseschlauch SERVAPOR®, MWCO 12000- 14000	SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	44145.04

4. Methoden

4.1 Zellkultur

Die Kultivierung von humanen embryonalen Nierenzellen 293 (HEK Zellen) erfolgt in DMEM-Medium mit niedriger Glucosekonzentration, 10 % (V/V) FCS und 100 IU/mL Penicillin/Streptomycin. Die verschiedenen HEK Zelltypen werden in unterschiedlichen Rhythmen verdünnt. Für HEK Wildtyp Zellen gilt der Turnus einer 1:20 Verdünnung alle 3-4 Tage. Die stabil transfizierten HEK SNAP-5HT1a und HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen sind alle 3-4 Tage 1:8 zu verdünnen. Alle HEK Zellen wachsen in 10 cm Zellkulturschalen, die sich in einem Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂ befinden.

4.2 Transformation von XL1-blue Bakterien

Die Transformation kompetenter XL1-blue Bakterien dient der Amplifikation aller klonierten Plasmide (Abschnitte 4.3.2 und 4.4.2). Zunächst erfolgen die Zugabe und vorsichtige Mischung von ca. 1 ng DNA zu 100 µL Bakterien-Aliquots. Die DNA-Bakterien-Mischung lagert für 30 min auf Eis. Es folgen der Hitzeschock für 1 min bei 42 °C und die erneute Kühlung für 2 min auf Eis. Anschließend werden 900 µL LB-Medium zu der Mischung pipettiert und diese 1 h lang bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Die Zentrifugation der Bakterien für 5 min bei 3.000 g schließt sich an, wobei der entstehende Überstand verworfen wird. Die Zugabe von 50 µL LB-Medium zum Bakterienpellet dient der Resuspension der Bakterien, dem LB-Medium ist dabei das dem Plasmid entsprechende Antibiotikum zugesetzt (50 µg/mL Ampicillin oder 25 µg/mL Kanamycin). Die Bakteriensuspension wird auf eine antibiotikahaltige LB-Agar-Platte (1,5 % (m/V) Agar in LB-Medium) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgt die Entnahme der Einzelklone, die in 5 mL antibiotikahaltigem LB-Medium für 8 h bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt werden. Nach dem Übertrag von 500 µL der Bakteriensuspension in 150 mL antibiotikahaltiges LB-Medium folgt weiteres Schütteln der Bakterienkultur über Nacht bei 37 °C und 225 rpm. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA findet mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Midi Kits (Protokoll siehe Abbildung A 1 im Anhang) statt. Alle klonierten Plasmide werden zur Kontrolle mit geeigneten Restriktionsenzymen geschnitten, die Trennung der Ansätze erfolgt mittels 1 %iger Agarose-Gelelektrophorese und die GeneRuler 1 kb DNA-Leiter dient der Größenbestimmung der

DNA-Fragmente. Zur Verifizierung der DNA-Sequenzen werden die Plasmide darüber hinaus zur Sanger-Sequenzierung an GATC-Services (Teil der Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) übergeben.

4.3 β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-Assay

4.3.1 Messprinzip des Experiments

Für die Messung der 5HT_{1a}R-vermittelten β -Arrestin 2 Rekrutierung werden HEK Zellen transient transfiziert. Folglich exprimieren sie den 5HT_{1a}R mit einem C-terminalen LgBiT-Proteintag und β -Arrestin 2 mit N-terminalem SmBiT-Tag. LgBiT und SmBiT sind die zwei Fragmente, in die die Nanoluciferase aufgespalten ist. Sie weisen eine geringe Affinität⁸⁴ zueinander auf. Kommt es durch die Bindung eines 5HT_{1a}R-Agonisten zur Rezeptoraktivierung, wird β -Arrestin 2 an den Rezeptor rekrutiert. Die resultierende unmittelbare Nähe von LgBiT und SmBiT führt zur Komplementation der Nanoluciferase. Diese setzt in einer enzymatischen Reaktion das Substrat Coelenterazin h zu Coelenteramid h unter der Emission von chemilumineszentelem Licht um (siehe Abbildung 1). Die Messung der Chemilumineszenz erfolgt im Tecan Spark[®] Multimode-Mikroplatten-Reader (Tecan Spark[®] Reader) über einen Zeitraum von 60 min und lässt Rückschlüsse über die zeitliche Entwicklung der β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R zu. In weiteren Experimenten werden neben DNA-Konstrukten, die für 5HT_{1a}R-LgBiT- und SmBiT- β -Arrestin 2-Proteine kodieren, auch für 5HT_{2a}R oder 5HT₇R kodierende Konstrukte transfiziert. Diese Experimente dienen der Überprüfung des Einflusses, den die Expression eines weiteren 5HT-Rezeptors auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung hat. Darüber hinaus ermöglicht die Etablierung von 5HT_{2a}- bzw. 5HT₇-NanoBiT[®]-Assays die Testung der 5HT_{2a}R- und 5HT₇R-Agonisten. Zu diesem Zweck werden HEK Zellen so transient transfiziert, dass sie neben SmBiT- β -Arrestin 2 auch 5HT_{2a}R- oder 5HT₇R-LgBiT exprimieren.

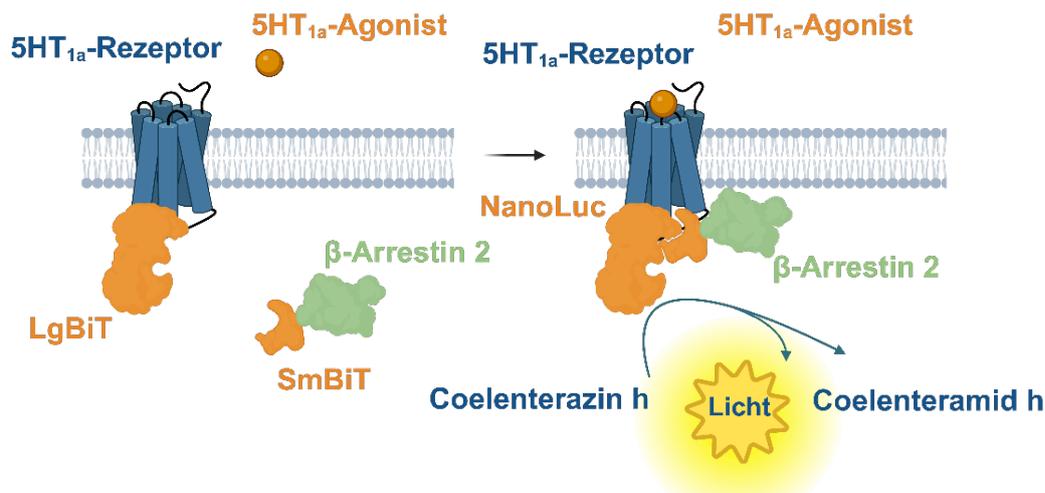


Abbildung 1: Messprinzip des 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays

Durch die Bindung des 5HT_{1a}R-Agonisten wird β -Arrestin 2 an den als LgBiT-Fusionsprotein exprimierten Rezeptor rekrutiert. Die räumliche Nähe zwischen 5HT_{1a}R und β -Arrestin 2 ermöglicht die Komplementierung des großen (LgBiT) und kleinen Proteinfragments (SmBiT) zur enzymatisch aktiven Nanoluciferase (NanoLuc). In der durch die NanoLuc katalysierten Reaktion wird Coelenterazin h unter Freisetzung von chemilumineszentem Licht zu Coelenteramid h umgewandelt. Die Abbildung ist mit Hilfe von BioRender.com erstellt worden.

Die Klonierung der Plasmide sowie die Messung der β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-Assay wird durchgeführt in Anlehnung an die von Saecker et al. 2023⁸⁵ beschriebene Messung der β -Arrestin 2 Rekrutierung am A₁AR.

4.3.2 Klonierung der Plasmide

4.3.2.1 pcDNA5FRT_5HT1a

Die für den 5HT_{1a}R kodierende DNA-Sequenz wird in den pcDNATM5/FRT Expressionsvektor für Säugetiere (Thermo Fisher Scientific; im Folgenden als pcDNA5FRT bezeichnet) kloniert. Dazu kommen für die enzymatische Spaltung von pcDNA5FRT und h5-HT1A VersaClone cDNA Plasmid (R&D Systems) die FastDigest-Restriktionsenzyme (FD-Enzyme) NheI und XhoI (Thermo Fisher Scientific) zum Einsatz. Es folgt die Ligation von pcDNA5FRT-Vektor- und 5HT_{1a}R-Insert-DNA. Dazu werden etwa 20 ng Vektor- und die dreifache Menge Insert-DNA eine Stunde lang bei Raumtemperatur unter dem Einsatz einer Einheit T4-DNA Ligase in einfach konzentriertem Ligase-Puffer inkubiert. Daraufhin erfolgt die Transformation von XL1-Blue Bakterien mit 5 μ L des Ligationsansatzes. Wie in Abschnitt 4.2 beschrieben, wird die Plasmid-DNA anschließend in Einzelklonen vervielfältigt, die DNA extrahiert, mit Hilfe von Restriktionsenzymen geschnitten und mittels Gelelektrophorese kontrolliert. Abschließend

dient die Sanger-Sequenzierung der Verifizierung der DNA-Sequenz des klonierten Plasmids (Plasmidkarte siehe Abbildung A 2 im Anhang).

4.3.2.2 pcDNA3_5HT1a-LgBiT

Über die Restriktionsschnittstellen BamHI und NotI wird die für den SmBiT kodierende DNA-Sequenz aus einem pcDNA3_5HT1a-SmBiT Plasmid ausgeschnitten (der pcDNA3 Vektor stammt ursprünglich von Life Technologies, Invitrogen). Die Extraktion der für den LgBiT kodierenden DNA erfolgt über dieselben Schnittstellen. Die LgBiT-Sequenz stammt ursprünglich aus dem Plasmid pEX-K168_LgBiT-His (Eurofins). Anschließend wird, wie im Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben, ligiert und das resultierende Plasmid vervielfältigt sowie kontrolliert (Plasmidkarte siehe Abbildung A 3 im Anhang).

4.3.2.3 pcDNA5FRT_5HT2a

Das Plasmid pcDNA5FRT_5HT2a ist dankenswerterweise von Alexander Glassmann (Hochschule Bonn-Rhein-Sieg) zur Verfügung gestellt worden (Plasmidkarte siehe Abbildung A 4 im Anhang). Der dem Plasmid zugrunde liegende Vektor pcDNATM5/FRT ist von Thermo Fisher Scientific bezogen worden.

4.3.2.4 pcDNA3_5HT2a-LgBiT

Die für den 5HT_{2a}-Rezeptor kodierende DNA wird aus dem bestehenden Plasmid pSNAPm_5HT2a über die Restriktionsschnittstellen Eco32I und EcoRI entnommen. pSNAPm_5HT2a leitet sich aus dem von Alexander Glassmann zur Verfügung gestellten pcDNA5FRT_5HT2a Plasmid ab und stammt aus einem anderen Projekt des Arbeitskreises. Die Extraktion der 5HT_{1a}R-DNA-Sequenz aus dem Plasmid pcDNA3_5HT1a-LgBiT erfolgt über die Schnittstellen Eco21 und EcoRI. Es folgt die Ligation des 5HT_{2a}R-Inserts in den pcDNA3_LgBiT-Vektor, das resultierende Plasmid (Plasmidkarte siehe Abbildung A 5 im Anhang) wird vervielfältigt und kontrolliert (wie in 4.3.2.1 beschrieben).

4.3.2.5 pcDNA5FRT_5HT7

HTR7-Tango ist als Addgene Plasmid #6641566415⁸⁶ gelistet und freundlicherweise von Bryan Roth zur Verfügung gestellt worden. Die Amplifikation der für den 5HT₇-Rezeptor kodierenden DNA erfolgt mittels PCR (Vorwärts-Primer: 5'-CTCGCTAGCGGGATCCATGATGGACGTAAACAGC-3', Rückwärts-Primer: 5'-AGACTCGAGTCATGGATCATTACCT

TC-3'). Der PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus 12,5 μL Q5[®] High-Fidelity 2x Master Mix, jeweils 1,25 μL der beiden eingesetzten Primer (10 μM), 1 μL DNA (1 $\text{ng}/\mu\text{L}$) und 9 μL Wasser. Zunächst erfolgt ein initialer DNA-Denaturierungsschritt bei 98 °C für 30 s, es folgen 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 98 °C, 15 s Primerhybridisierung bei 68 °C und 30 s Amplifikation bei 72 °C. Nach Abschluss der 25 Zyklen schließt sich ein finaler Amplifikationsschritt für 2 min bei 72 °C an, abschließend wird die Probe bei 4 °C bis zur Entnahme aus dem Gerät aufbewahrt. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgt mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits (Protokoll siehe Abbildung A 6 im Anhang). Im Anschluss werden das PCR-Produkt und der pcDNA5FRT-Vektor (Thermo Fisher Scientific) mit den FD-Enzymen NheI und XhoI geschnitten und, wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben, ligiert, vervielfältigt und kontrolliert (Plasmidkarte siehe Abbildung A 7 im Anhang).

4.3.2.6 pcDNA3_5HT7-LgBiT

Die für den 5HT_{1a}R kodierende DNA-Sequenz wird aus dem pcDNA3_5HT1a-LgBiT Plasmid (Klonierung in Abschnitt 4.3.2.2 beschrieben) ausgeschnitten. Dies erfolgt mit Hilfe der FD-Enzyme EcoRI und Eco32I. Aus einem bereits bestehenden pcDNA3.1Zeo_5HT7-SmBiT Plasmid wird die für den 5HT₇R kodierende DNA über dieselben Restriktionsschnittstellen extrahiert. Es folgen die Ligation von 5HT₇R-Insert und pcDNA3_LgBiT-Vektor (beschrieben in Abschnitt 4.3.2.1), die Trennung und Aufreinigung des resultierenden Plasmids (Plasmidkarte siehe Abbildung A 8 im Anhang).

4.3.2.7 pcDNA3.1Zeo_SmBiT-ARRB2

Die Extraktion der für β -Arrestin 2 kodierenden DNA-Sequenz erfolgt durch Restriktionsverdau des bestehenden Plasmids pECFP-N1_rARRB2 unter dem Einsatz der FD-Enzyme NheI und XhoI. pECFP-N1_rARRB2 ist freundlicherweise von M. Bouvier aus Montreal zur Verfügung gestellt worden. Die β -Arrestin 2-Sequenz wird über die o.g. Restriktionsschnittstellen in den pCDNATM3.1/Zeo (+) Expressionsvektor für Säugetiere (Invitrogen) ligiert (siehe Abschnitt 4.3.2.1). Es folgen die Vervielfältigung und Kontrolle des resultierenden Plasmids (Plasmidkarte siehe Abbildung A 9 im Anhang).

4.3.3 Transiente Transfektion von HEK Zellen

Für die Transfektion von HEK Zellen mit Polyethylenimin (PEI) werden 300.000 Zellen/Well in eine 6-Well Platte ausgesät und 24 h lang anwachsen gelassen. Die eingesetzten

Transfektionslösungen enthalten 0,75 µg DNA pro Rezeptor- oder β-Arrestin 2-Konstrukt. Für eine möglichst hohe Transfektionseffizienz empfiehlt es sich, 3 µg DNA pro Well zu transfizieren. Daher wird die Differenz zwischen Rezeptor-, β-Arrestin 2-DNA und 3 µg DNA-Gesamtmenge mit pBluescript SK(-) (Plasmidkarte siehe Abbildung A 10 im Anhang) aufgefüllt. Die DNA wird ad 200 µL in eine 150 mM NaCl-Lösung verdünnt, kurz durch Vortexen homogenisiert, dann folgt die Zugabe von 8,23 µL einer 1 mg/mL konzentrierten PEI-Lösung. Nach erneutem Vortexen inkubiert die Transfektionslösung für 10 min bei Raumtemperatur. Das Kulturmedium der Zellen wird durch 1.800 µL frisches Medium ersetzt, die Transfektionslösung tropfenweise hinzugegeben und die Platte vorsichtig geschwenkt. Die Zellen ruhen für 24 h im Inkubator, dann können sie für den Nachweis transient transfizierter Rezeptoren (siehe Abschnitt 4.3.4) oder die Durchführung der NanoBiT®-Assays (siehe Abschnitt 4.3.5) ausgesät werden.

Für die Messung der β-Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT®-Assay werden die HEK Zellen mit folgenden Plasmidkombinationen transfiziert:

Tabelle 10: Transiente Transfektionen für die Messung der β-Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT®-Assay

Plasmide	Bezeichnung der Zellen	Ziel der Messung
pcDNA3_5HT1a-LgBiT, pcDNA3.1Zeo_SmBiT- ARRB2	HEK 5HT1a-NanoBiT	β-Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT _{1a} -Rezeptor
pcDNA3_5HT1a-LgBiT, pcDNA3.1Zeo_SmBiT- ARRB2, pcDNA5FRT_5HT2a	HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT2a	Einfluss des 5HT _{2a} - Rezeptors auf die β- Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT _{1a} -Rezeptor
pcDNA3_5HT1a-LgBiT, pcDNA3.1Zeo_SmBiT- ARRB2, pcDNA5FRT_5HT7	HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7	Einfluss des 5HT ₇ -Rezeptors auf die β-Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT _{1a} - Rezeptor
pcDNA3_5HT2a-LgBiT, pcDNA3.1Zeo_SmBiT- ARRB2	HEK 5HT2a-NanoBiT®	β-Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT _{2a} -Rezeptor
pcDNA3_5HT7-LgBiT, pcDNA3.1Zeo_SmBiT- ARRB2	HEK 5HT7-NanoBiT®	β-Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT ₇ -Rezeptor

4.3.4 Nachweis der transient transfizierten Rezeptoren

Die verschiedenen Plasmidkombinationen für die Messung der β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-Assay sind in Tabelle 10 dargestellt. Die Expression der mit LgBiT- bzw. SmBiT-fusionierten Proteine wird im NanoBiT[®]-Assay gezeigt. Dabei kommt es bei der Komplementation von SmBiT und LgBiT in Anwesenheit des Luziferasesubstrats Coelenterazin h zur Freisetzung von chemilumineszentelem Licht. Es kommen auch 5HT_{1a}-, 5HT_{2a}- und 5HT₇-Rezeptorkonstrukte zum Einsatz, die weder mit LgBiT noch mit SmBiT fusioniert sind. Zum Nachweis dieser Proteine dienen Immunfluoreszenz-Experimente. Die Transfektion der Plasmide pcDNA5FRT_5HT1a, pcDBA5FRT_5HT2a und pcDBA5FRT_5HT7 erfolgt dazu wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben. Die transient transfizierten Zellen werden zu je 180.000 Zellen/Well auf PDL-beschichtete (0,1 mg/mL) Deckgläser in einer 12-Well Platte ausgesät. Als Positivkontrolle für 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R dienen die in Abschnitt 4.4.3 erstellten HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen, die in derselben Dichte ausgesät werden. HEK Wildtyp Zellen dienen als Negativkontrolle und werden ebenfalls zu 180.000 Zellen/Well ausgesät. 24 h nach dem Aussäen folgt die 10-minütige Inkubation der Zellen mit jeweils 250 μ L einer Fixierlösung. Die Fixierlösung setzt sich zusammen aus 4 % PFA mit 10 % Saccharose in PBS. Anschließend erfolgt die Permeabilisation der Zellen mit 250 μ L einer PBS mit 0,1 % Triton X-100 Lösung für 15 min. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, blockiert man freie Proteinbindungsstellen für 1 h. Die Blocklösung setzt sich zusammen aus PBS mit 0,1 % BSA und 10 % Normalem Ziegen Serum (NGS). Nach dem Blocken werden die Deckgläser dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläser der Testbedingung, der Positiv- und der Negativkontrolle inkubieren über Nacht bei 4 °C mit primären Antikörperlösungen. Dazu werden die primären polyklonalen Kaninchen-Antikörper in verschiedenen Konzentrationen (5HT_{1a}: 2 μ g/mL, 5HT_{2a}: 2 μ g/mL, 5HT₇: 1 μ g/mL) in PBS mit 1 % NGS verdünnt. Am nächsten Tag folgt dreimaliges Waschen. Anschließend wird für 1 h mit einer Färbelösung aus 6 μ g/mL Pferd-Anti-Kaninchen-DyLight[®] 488-Antikörper und 2 μ g/mL Hoechst 33258 (DNA-Farbstoff) behandelt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS und einfachem Waschen mit Wasser fixiert man die Deckgläser mit FluoreGuard Mounting Medium auf einen Objektträger und analysiert im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365$ nm, $\lambda_2 = 470$ nm) im Zeiss Axio Observer Mikroskop.

4.3.5 Durchführung des NanoBiT®-Assays

Die transient transfizierten Zellen werden in einer Dichte von 25.000 Zellen/Well in weiße 96-Well Platten mit klarem Boden ausgesät und dort 24 h lang mit vollwertigem Kulturmedium anwachsen gelassen. Das Lösen der verwendeten Liganden erfolgt in Wasser, Ethanol oder DMSO, die Verdünnung in HBSS/HEPES. Die DMSO-Konzentration übersteigt auf den Zellen 0,02 % nicht, Ethanol ist maximal 0,33 % konzentriert. Die entsprechenden Lösungsmittelkonzentrationen finden in der Pufferkontrolle des Assays Berücksichtigung.

Am Tag der Messung startet das Experiment mit dem Austausch des Mediums auf den Zellen durch 45 µL HBSS/HEPES mit 2,5 µM Coelenterazin h. Die Platte ruht 7 min lang im Inkubator und wird anschließend in den Tecan Spark® Reader überführt. Das Lumineszenzprogramm läuft 60 min lang mit Messintervallen von 1 min bei 30 °C. Die ersten 5 aufgenommenen Messpunkte definieren die Baseline. Nach 5 Zyklen wird die Messung pausiert und die Zugabe von 5 µL einer Pufferkontrolle oder einer 10-fach konzentrierten Ligandlösung erfolgt in jedes Well. Die Lumineszenzmessung schreitet für 55 weitere Zyklen fort. Für die Vorinkubation mit Antagonisten wird das Kulturmedium 30 min vor dem Wechsel zu HBSS/HEPES durch 50 µL antagonisthaltiges Medium ausgetauscht und im Inkubator ruhen gelassen. Auch die HBSS/HEPES Lösung mit Coelenterazin h enthält dann die Antagonisten in entsprechender Konzentration.

4.3.6 Verarbeitung der NanoBiT®-Rohdaten

Mindestens drei unabhängige Experimente im NanoBiT®-Assay sind durchzuführen, deren Rohdaten in Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, United States, Version 8.3.0) importiert werden. Die Rohdaten sind zunächst gegen die Zeit in Minuten aufgetragen. Um Variationen zwischen den Wells auszugleichen, folgt die Division des Werts jedes Wells durch den Mittelwert der ersten fünf Messwerte des jeweiligen Wells. Zu diesem Zweck findet die Prism-Funktion „remove baseline and column math“ Anwendung. Nachfolgend subtrahiert Prism mit Hilfe derselben Funktion die Pufferkontrolle von jeder anderen Bedingung. Die sich ergebenden Kurvenverläufe sind von Well-zu-Well Schwankungen und Puffer- bzw. Baselineeffekten bereinigt. Die Flächen unter diesen Kurven (AUC) werden bestimmt (Prism-Funktion „Area under curve“) und für Dosis-Wirkungskurven gegen den dekadischen Logarithmus der Testsubstanzen in Mol pro Liter aufgetragen.

Um die Vergleichbarkeit verschiedener Liganden zu erleichtern, kann die Ligandwirkung in Dosis-Wirkungskurven als relativer prozentualer Effekt im Vergleich zum Maximaleffekt eines Referenzliganden angegeben werden. Auf die Mittelwertbestimmung der AUC des Referenzliganden in der höchsten Konzentration folgt die Normalisierung der AUC-Werte aller Vergleichsliganden auf diese. Die resultierenden Prozentwerte werden gegen den dekadischen Logarithmus der Konzentration der Liganden aufgetragen. Den maximalen Effekt, der mit einem Liganden im Vergleich zum Referenzliganden zu erzielen ist, definiert man als % E_{max}. An die erstellten Dosis-Wirkungskurven sind sigmoidale Kurven zu fitten, um EC₅₀- und IC₅₀-Werte zu berechnen (Prism-Funktion „nonlinear regression with variable slope“).

Zusätzlich erfolgt die Berechnung der Initialen Raten (IR) mit den von Dr. Samuel Hoare (Pharmechanics LLC, Owego, NY, USA) zur Verfügung gestellten Gleichungen.⁷ Dazu findet zunächst das unter www.pharmechanics.com veröffentlichte Prism Plug-in Anwendung. Für die Modellierung der im NanoBiT[®]-Assay aufgenommenen Signalkinetik wird die als „baseline then rise and fall to steady state“ veröffentlichte Funktion verwendet. Die resultierenden Kennzahlen werden für die Berechnung der IR nach folgender Gleichung verwendet:

$$IR = SS * (Dk_1 - (D - 1)k_2)$$

Formel 1: Berechnung von Initialen Raten für die „Rise and Fall to Steady State“ Kinetik

Die von Hoare et al. 2020⁷ veröffentlichte Gleichung dient der Berechnung der Initialen Rate einer Kinetik, die sich durch einen zunächst ansteigenden und dann auf einen stationären Zustand abfallenden Verlauf auszeichnet. Die Bedeutungen der Variablen sind nachfolgend aufgeführt. IR: Initiale Rate [$\frac{\text{Signaleinheit}}{t}$], SS: Stationärer Zustand [Signaleinheit], D: einheitslose Konstante, die dem Kurvenfit dient, k₁: größere der beiden Geschwindigkeitskonstanten [t^{-1}], k₂: kleinere Geschwindigkeitskonstante [t^{-1}].

Aufgrund der transienten Transfektionen kann es besonders bei den IR-Berechnungen zu Variationen kommen. Aus diesem Grund erfolgt die Angabe der IR-Werte in Prozent bezogen auf einen Referenzliganden.

Um statistische Unterschiede bei der Auswertung der Daten feststellen zu können, werden Varianzanalysen (ANOVA) gefolgt von post-hoc Analysen (Dunnett's oder Turkey's) durchgeführt. Daten, die sich entsprechend der Varianzanalyse signifikant voneinander unterscheiden, sind mit Sternen (*) markiert. Dabei gilt: * entspricht p < 0,05, ** entspricht p < 0,01, *** entspricht p < 0,001, **** entspricht p < 0,0001.

4.4 Single Particle Tracking von 5HT_{1a}-Rezeptoren

4.4.1 Messprinzip des Experiments

Für die Messung des Single Particle Trackings (SPT) am 5HT_{1a}R werden zwei stabile HEK Zelllinien etabliert (siehe Abschnitt 4.4.3 und Tabelle 11). Die in diesen Zelllinien exprimierten 5HT_{1a}R sind N-terminal mit dem SNAP-Proteintag fusioniert, der die kovalente Bindung des Benzylguanin-gekoppelten Farbstoffes Dy549 (BG-Dy549) ermöglicht (siehe Abbildung 2). BG-Dy549 ist von Hendrik Bußmann (in seinen Veröffentlichungen Bussmann) am Institut für Biochemie und Molekularbiologie des Universitätsklinikums Bonn dargestellt und charakterisiert worden.⁸⁷

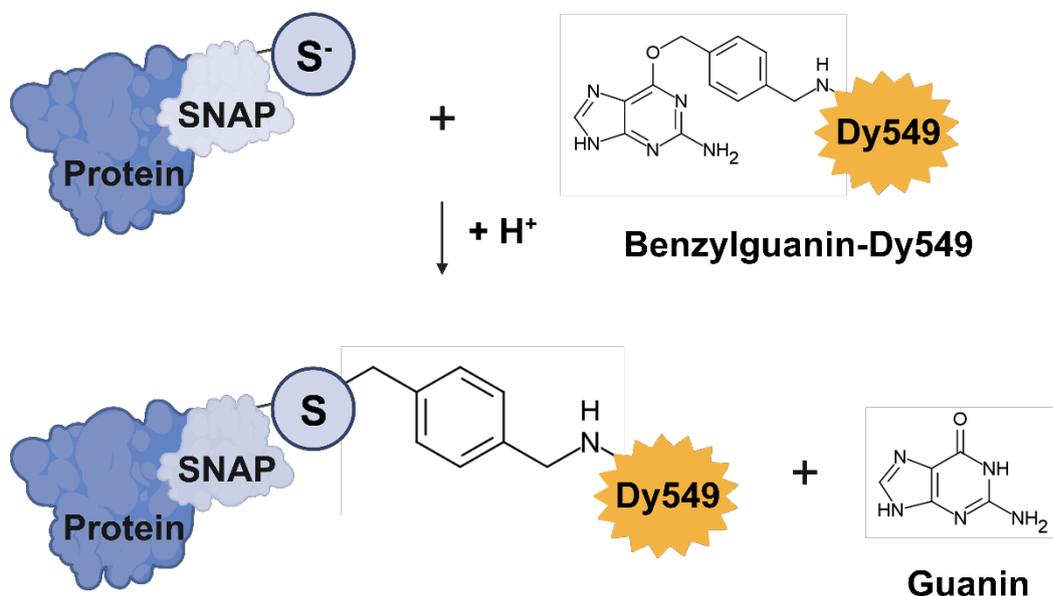


Abbildung 2: Enzymatische Reaktion eines SNAP-Fusionsproteins mit einem Benzylguanin-gekoppeltem Dy549-Molekül

Ein Benzylguanin-gekoppeltes Dy549 Molekül wird kovalent an ein SNAP-Fusionsprotein gebunden. Dabei entsteht Guanin als Nebenprodukt. Die Abbildung ist mit Hilfe von Biorender.com erstellt worden.

Die Durchführung der SPT-Messungen erfolgt innerhalb eines spezialangefertigten Aufbaus. Zu diesem gehören ein Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskop (TE2000-S, Nikon Corporation, Minato, Japan) mit Wasser-Immersionsobjektiv (Plan APO VC, 60x, 1.2 NA, Nikon) und Objektivtubus der Brennweite 200 mm. Es resultiert eine 240-fache Gesamtvergrößerung. Der Rezeptor-Farbstoff Komplex wird mit Laserlicht der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm (LasNova GLK 2350 T01, 532 nm, 50 mW, Lasos, Jena, Deutschland) angeregt, wobei die Intensität des Lasers mit Hilfe eines akusto-optisch regulierbaren Filters (AA Opto-Electronic, Orsay, Frankreich)

auf $0,733 \text{ kW/cm}^3$ in der Objektebene einzustellen ist. Die im Aufbau verwendete Kamera ist mit einem Electron Multiplying Charge Coupled Device (EMCCD) Sensor ausgestattet, der die einzelnen emittierten Photonen hochsensitiv aufnimmt, sie speichert und über ein Verstärkungsregister multipliziert. Die Bildaufnahme läuft in einer Frequenz von 20 Hz über 100 s ab. Eine MATLAB-basierte Software identifiziert die exakten Positionen der Fluoreszenzsignale durch das Fitten von 2D-Gauß-Verteilungen an ihre Fluoreszenzintensitätsprofile. Diese komplexen Profile ergeben sich aufgrund der Beugungseigenschaften des Abbildungssystems aus der im Verstärkungsregister multiplizierten Menge aufgenommener Photonen. Aus den Rezeptorpositionen der aufeinander folgenden Bilder ergeben sich die Trajektorien der $5\text{HT}_{1\text{aR}}$, die ihre Bewegungspfade auf der Zelloberfläche darstellen. Die Fluoreszenzintensitäten und Trajektorien bilden die Grundlage für die Ermittlung verschiedener Bewegungsparameter. Zu diesen Parametern zählen die Anzahl der Diffusionszustände, ihre Diffusionskoeffizienten, die Verteilung der Zustände sowie die räumliche Begrenzung der Diffusion. Die Analyse der Oligomerisierung des $5\text{HT}_{1\text{aR}}$ kann anhand der Fluoreszenzintensität erfolgen. In Abbildung 3 ist dargestellt, wie die Datenerzeugung ausgehend von auf Deckgläsern ausgesäten Zellen abläuft.

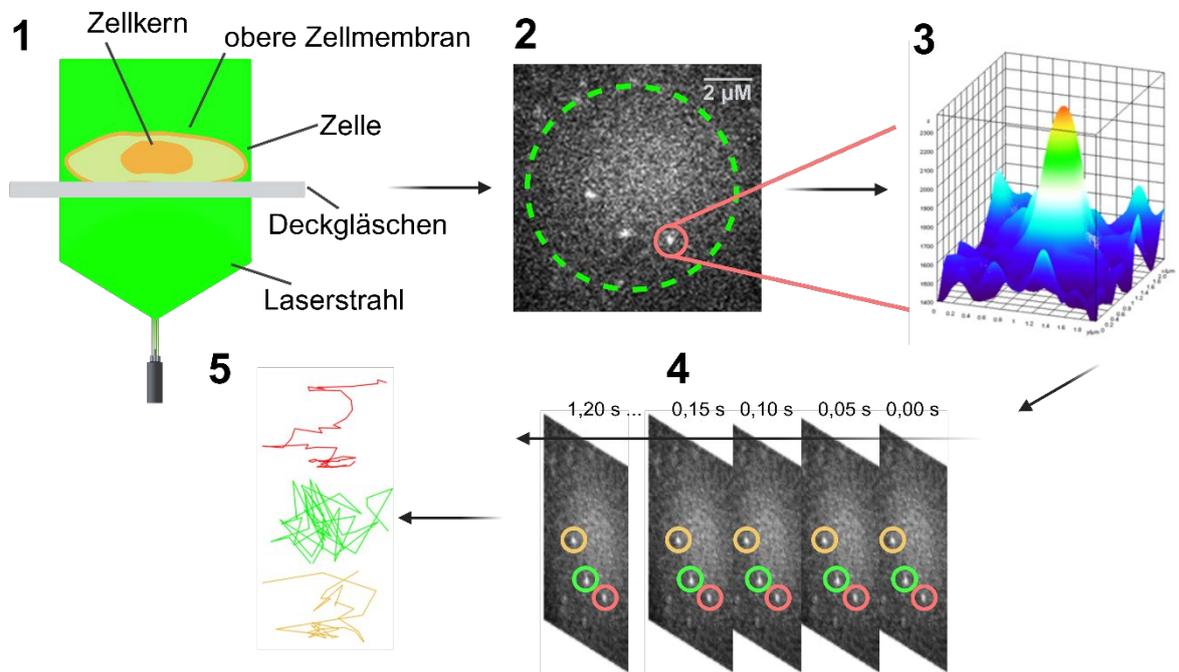


Abbildung 3: Generierung und Auswertung der SPT-Daten

Zunächst erfolgt die Fokussierung der oberen Plasmamembran einer lebenden Zelle, die auf einem PDL-beschichteten Deckglas wächst, im Mikroskop. Es folgt die Anregung des kovalent an den SNAP- $5\text{HT}_{1\text{a}}$ -Rezeptor gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs mit einem Laser der Wellenlänge $\lambda = 532 \text{ nm}$ (1). Die EMCCD Kamera nimmt die emittierten Photonen auf (2). Die MATLAB-basierte Software identifiziert die

Fluoreszenzsignale anhand ihres Fluoreszenzintensitätsprofils (3). Die Feststellung der exakten Punktpositionen erfolgt durch Fitten einer 2D-Gauß-Verteilung. Dabei wird die Identifikation der genauen Rezeptorposition für jedes Bild des aufgenommenen Films durchgeführt (4) unter Registrierung der entstehenden Bewegungspfade (5). Die aufgezeichneten Daten ermöglichen die Bestimmung verschiedener Diffusionseigenschaften. Die Abbildung ist mit Hilfe von Biorender.com in Anlehnung an die von Bussmann⁸⁷ veröffentlichte Grafik erstellt worden.

4.4.2 Klonierung der Plasmide

4.4.2.1 pcDNA3_SNAP-5HT1a

Die Amplifikation der für den 5HT_{1a}R kodierenden DNA erfolgt mittels PCR des im Abschnitt 4.3.2.1 klonierten Plasmids pcDNA5FRT_5HT1a (Vorwärts-Primer: 5'-GATCG GATCCATGGATGTGCTCAGC-3', Rückwärts-Primer: 5'-AGACTCGAGTCATGGATCAT TACCTTC-3'). Der PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus 12,5 µL Q5[®] High-Fidelity 2x Master Mix, jeweils 1,25 µL der beiden eingesetzten Primer (10 µM), 1 µL DNA (1 ng/µL) und 9 µL Wasser. Zunächst erfolgt ein initialer DNA-Denaturierungsschritt bei 98 °C für 30 s, es folgen 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 98 °C, 15 s Primerhybridisierung bei 68 °C und 30 s Amplifikation bei 72 °C. Nach Abschluss der 25 Zyklen schließt sich ein finaler Amplifikationsschritt für 2 min bei 72 °C an, abschließend wird die Probe bei 4 °C bis zur Entnahme aus dem Gerät aufbewahrt. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgt mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits (Protokoll siehe Abbildung A 6 im Anhang). Im Anschluss werden das PCR-Produkt und ein pcDNA3_SNAP Vektor (auf Basis des pcDNA3 Vektors von Life Technologies (Invitrogen)) mit den FD-Enzymen BamHI und XhoI geschnitten. Es folgen die Ligation, Vervielfältigung und Sequenzkontrolle, wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben. Die Karte des klonierten Plasmids ist in Abbildung A 11 im Anhang zu finden.

4.4.2.2 pcDNA3.1Zeo_HiBiT-5HT2a

Aus dem von Alexander Glassmann zur Verfügung gestellten Plasmid pcDNA5FRT_5HT2a wird über die Restriktionsschnittstellen NheI und XhoI die DNA-Sequenz ausgeschnitten, die für den 5HT_{2a}R kodiert. Das im Arbeitskreis vorhandene pcDNA3.1Zeo_HiBiT-ADORA2b Plasmid (basierend auf dem pCDNA[™]3.1/Zeo (+) Expressionsvektor für Säugetiere (Invitrogen)) wird ebenfalls dem Restriktionsverdau mit den o.g. FD-Enzymen unterzogen. Anschließend erfolgen die Ligation von 5HT_{2a}R-Insert und pcDNA3.1Zeo_HiBiT-Vektor, die Trennung des Ligationsansatzes und die Aufreinigung des resultierenden Plasmids, wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben (Plasmidkarte siehe Abbildung A 12 im Anhang).

4.4.2.3 pQE80L_His-LgBiT

Die Amplifikation der für den LgBiT kodierenden DNA-Sequenz erfolgt mittels PCR des im Arbeitskreis existierenden Plasmids pEX-K168_LgBiT-His. Dazu finden der Vorwärts-Primer 5'-GATCGGTACCATGGTCTTTACCCTGG-3' und der Rückwärts-Primer: 5'-GATCAAGC TTAGAGTTAATCGTTACGCGAAAC-3' Anwendung. Der PCR-Ansatz setzt sich zusammen aus 12,5 µL Q5[®] High-Fidelity 2x Master Mix, jeweils 1,25 µL der beiden eingesetzten Primer (10 µM), 1 µL DNA (1 ng/µL) und 9 µL Wasser. Zunächst erfolgt ein initialer DNA-Denaturierungsschritt bei 98 °C für 30 s, es folgen 25 Zyklen mit 10 s Denaturierung bei 98 °C, 15 s Primerhybridisierung bei 70 °C und 30 s Amplifikation bei 72 °C. Nach Abschluss der 25 Zyklen schließt sich ein finaler Amplifikationsschritt für 2 min bei 72 °C an, abschließend wird die Probe bei 4 °C bis zur Entnahme aus dem Gerät aufbewahrt. Die Aufreinigung des PCR-Produkts erfolgt mit Hilfe des NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up Kits (Protokoll siehe Abbildung A 6 im Anhang). Es folgt die Restriktion von PCR-Produkt und pQE80L-Vektor (Quiagen, Hilden, Deutschland) mit den FD-Enzymen KpnI und HindIII. Das LgBiT-Insert und der verdaute pQE80L-Vektor werden zur Ligation gebracht (wie in Abschnitt 4.3.2.1 beschrieben), das klonierte Plasmid wird in Einzelklonen vervielfältigt und die Sequenz kontrolliert. Abbildung A 13 im Anhang stellt die Plasmidkarte dar.

4.4.3 Transfektion und stabile Selektion von HEK Zellen

Die Etablierung von zwei stabilen Zelllinien dient der SPT-Messungen von 5HT_{1a}R (Tabelle 11). Die Herstellung der PEI-Transfektionslösungen erfolgt entsprechend des in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen Schemas, woraufhin die HEK Zellen 24 h lang mit den Transfektionslösungen zu inkubieren sind. Es folgt der Austausch zu frischem Kulturmedium. Nach weiteren 48 h wird das Medium der Zellen durch antibiotikahaltiges Medium ausgetauscht, um mit der Selektion der Zellen zu beginnen. HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen sind dem Selektionsdruck von 700 µg/mL Geneticin (G418) ausgesetzt, für HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen kommen zusätzlich 100 µg/mL Zeocin hinzu. Nach etwa 3 Wochen wachsen einzelne Klone in der 6-Well Platte an, die mit Hilfe von Klonierungsringen einzeln abgelöst und umgesetzt werden. Es folgt der in Abschnitt 4.4.5 beschriebene Test der Einzelklone.

Tabelle 11: Stabile Transfektion von HEK Zellen für die SPT-Messung am 5HT_{1a}-Rezeptor

Stabile Zelllinie	Eingesetzte Plasmide	Ziel der Messung
HEK SNAP-5HT _{1a}	pcDNA3_SNAP-5HT _{1a}	Laterale Mobilität des 5HT _{1a} -Rezeptors
HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a}	pcDNA3_SNAP-5HT _{1a} , pcDNA3.1Zeo_HiBiT-5HT _{2a}	Einfluss des 5HT _{2a} -Rezeptors auf die laterale Mobilität des 5HT _{1a} -Rezeptors

4.4.4 Expression und Aufreinigung des rekombinanten His-LgBiT Proteins

Zur Herstellung des LgBiT-Proteins mit N-terminalem 6 x Histidin-Tag (His-LgBiT) wird der Bakterienstamm BL21 verwendet. Dazu erfolgt die Transformation eines 100 µL Bakterien-Aliquots mit ca. 1 ng DNA (pQE80L_His-LgBiT) so, wie sie für XL1-blue Bakterien im Abschnitt 4.2 beschrieben ist. Nach Aufnahme einer einzelnen Bakterienkolonie in 5 mL LB-Medium mit Ampicillin wird diese über-Nacht bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Am nächsten Morgen wird die Kultur in 250 mL LB-Medium mit Ampicillin überführt. Es folgt weiteres Schütteln für ca. 1:45 h (37 °C, 225 rpm) bis die Kultur eine optische Dichte von 0,5-0,6 erreicht hat. Ist das der Fall, dient die Zugabe von IPTG (1 mM) der Initiation der Proteinsynthese. Nach weiteren ca. 4 h im Bakterienrührer folgt die Zentrifugation der Kultur für 10 min bei 6.000 g. Das Bakterienpellet wird dreimal mit PBS gewaschen und jeweils erneut zentrifugiert. Es folgen die Aufnahme des Pellets in 10 mL eines Lysepuffers (Zusammensetzung siehe Abschnitt 0) und eine einstündige Inkubation auf Eis unter gelegentlichem Vortexen. Anschließend wird die Bakteriensuspension dreimal abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 40 °C aufgetaut. Das Lysat ist 10 min lang bei 10.000 g zu zentrifugieren, um den Überstand sammeln zu können und das Pellet zu verwerfen. Der Überstand wird durch einen Filter mit der Porengröße 0,46 µm gegeben. Die Reinigung des His-LgBiT-Proteins erfolgt über seinen His-Proteintag mit Hilfe einer ChroDrip-IMAC 1 mL Säule (DALEX biotech, Rheinbach, Deutschland) entsprechend des Herstellerprotokolls.⁸⁸ Um Imidazolrückstände der Aufreinigung über die ChroDrip-IMAC Säule aus der His-LgBiT-Lösung zu entfernen, findet eine zweifache Dialyse der 10 mL Proteinlösung mit Hilfe eines SERVAPOR[®] Dialyseschlauchs (SERVA Electrophoresis; MWCO 12000-14000) in jeweils 5 L PBS statt. Dann wird das Probenvolumen in einem Amicon[®] Ultra 15 MWCO 10.000 Röhrchen (Sigma-Aldrich) durch Zentrifugation auf ca. 4 mL Volumen eingengt. Mit einem Pierce[™] BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) erfolgt die Bestimmung der

Proteinkonzentration der His-LgBiT-Lösung. Zur Überprüfung des His-LgBiT Proteins dient das käuflich erworbene synthetischen HiBiT-Cys Peptid (peptides & elephants, Henningsdorf, Brandenburg; Aminosäuresequenz: VSGWRLFKKISGGSC), das mittels Proteinkomplementation und resultierender Chemilumineszenz die Funktionalität von His-LgBiT bestätigt.

4.4.5 Nachweis stabil transfizierter Rezeptoren

Die 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R auf der Oberfläche der im Abschnitt 4.4.3 transfiziert und stabil selektionierten Zelllinien sind anhand ihrer Protein-Tags nachzuweisen. Für den Nachweis des SNAP-5HT_{1a}-Rezeptors werden HEK SNAP-5HT1a, HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a und HEK Wildtyp Zellen in der Dichte 100.000 Zellen/Well auf PDL-beschichtete (1 mg/mL) Deckgläser in einer 12-Well Platte ausgesät. 24 h nach dem Aussäen erfolgt die Inkubation der Zellen mit jeweils 500 µL einer 2 µM SNAP-Surface[®] 488 Lösung in Medium bei 37 °C und 5 % CO₂. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wird das Deckglas in einen entsprechenden Halter eingespannt und die Bilder im Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) aufgenommen.

Für den Nachweis von HiBiT-5HT_{2a}R auf der Oberfläche von HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen werden die Zellen in einer Dichte von 15.000 Zellen/Well in eine 96-Well Platte ausgesät. Auf eine 24-stündige Inkubation folgt der Austausch des Mediums gegen eine Lösung aus 0,01 mg/mL His-LgBiT und 2,5 µM Coelenterazin h in HBSS/HEPES. Aufgrund ihrer hohen Affinität zueinander komplementieren die beiden Proteinfragmente HiBiT und LgBiT zu der funktionellen Einheit Nanoluciferase. Diese setzt in einer enzymatischen Reaktion Coelenterazin h zu Coelenteramid h um, wobei chemilumineszentes Licht freigesetzt wird. Der Tecan Spark[®] Reader misst die Lumineszenz in der Einheit „Relative Light Unit“ (RLU) über 28 min. Eine His-LgBiT freie Lösung auf den Zellen dient als Kontrollbedingung. Die Mittelwerte der Kontrollmessung sind zum jeweiligen Zeitpunkt t_x von den Lumineszenzwerten der Messbedingung abzuziehen.

4.4.6 Durchführung der SPT-Messungen

Die Probenvorbereitung und Durchführung der SPT-Messungen läuft in methodischer Anlehnung an Keksel et al. 2019⁸⁹, Bussmann et al. 2020 bzw. 2023^{87,90} ab.

4.4.6.1 Vorbereitung der Zellen

Mindestens vier Wochen lang sind die HEK SNAP-5HT1a und HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen vor der SPT-Messung in farblosem HEK Medium zu kultivieren. Für die Messung werden die Zellen in einer Dichte von 100.000 Zellen/Well auf PDL-beschichtete (1 mg/mL) Deckgläser in einer 12-Well Platte ausgesät. Die Zellen wachsen 24-48 h lang im Inkubator (37 °C, 5 % CO₂) an. 10 min vor Messbeginn erfolgt der Austausch des Mediums der Zellen durch frisches Medium, das den SNAP-Farbstoff BG-Dy549 in einer Konzentration von 10 nM enthält. Der Farbstoff ist von Hendrik Bußmann synthetisiert, gereinigt und getestet worden.^{87,90} Die Deckgläser sind dreimal mit PBS zu waschen, in einen entsprechenden Halter einzuspannen und für ca. 15 min bei Raumtemperatur mit 300 µL einer ligandhaltigen oder reinen phosphatgepufferten Lösung zu inkubieren.

4.4.6.2 Einstellungen des SPT-Messaufbaus

Als nächstes wird eine Zelle nach der anderen im Durchlicht eines inversen Weitfeld-Epifluoreszenzmikroskops (TE2000-S, Nikon) mit Wasser-Immersionsobjektiv (Plan APO VC, 60x, 1.2 NA, Nikon) und Objektivtubus mit 200 mm Brennweite fokussiert. Der spezialangefertigte Aufbau hat eine 240-fache Gesamtvergrößerung durch die vierfach vergrößernde Linse (VM Lens C-x, Nikon). Es resultiert eine Pixelbreite von 100 nm. Auf die Fokussierung der oberen Plasmamembran der Zelle folgt die Aufnahme des SPT-Videos mit einer EMCCD Kamera (iXon DV-860DCS-BV, Andor Technology). Der 5HT_{1a}R-gekoppelte Farbstoff BG-Dy549 wird mit Hilfe eines Continuous Wave Lasers der Wellenlänge $\lambda = 532$ nm (LasNova GLK 2350 T01, 532 nm, 50 mW, Lasos) angeregt. Durch einen akusto-optisch regulierbaren Filter (AA Opto-Electronic, Orsay, Frankreich) erfolgt die Einstellung einer Laserintensität von 0,733 kW/cm³ in der Objektebene der fokussierten Zelle. Die Aufnahme des Videos erfolgt über 100 s bei einer Bildfrequenz von 20 Hz. Für jede Messbedingung werden mindestens drei Deckgläser mit je zehn einzelnen Zellen vermessen.

4.4.7 Verarbeitung der SPT-Rohdaten

4.4.7.1 Detektion der Fluoreszenzsignale und Bewegungsmuster

Der Verarbeitung der in Abschnitt 4.4.6 aufgezeichneten Videos dient MATLAB in der Version R2016b (MathWorks, Natick, MA, USA). Es werden zwei-dimensionale Bewegungsmuster der Fluoreszenzsignale und weitere Diffusionsanalysen aus den Videos gewonnen. Dazu erfolgen

der direkte Import und die Verarbeitung der Videos mit Hilfe des „u-track“-Pakets⁹¹ nach folgenden Einstellungen:

Tabelle 12: Einstellungen „u-track“ SPT-Auswertung

Parameter	Eingestellter Wert
Punktradius	1,32 Pixel
Anzahl der Bilder, die für die Erkennung der lokalen Fluoreszenzmaxima im zeitlichen Mittel genutzt werden	3 Bilder
Mindestlänge einer Trajektorie	2 Bilder
Maximale Länge einer Lücke in der Trajektorie	1 Bild
Alle weiteren Einstellungen	Voreingestellter Standard

Für die weitere Diffusionsanalyse findet das Variational Bayes Single Particle Tracking Verwendung, das als vbSPT-Paket⁹² in MATLAB einzusetzen ist. Hiermit werden die unterschiedlichen Diffusionszustände anhand ihrer Diffusionsgeschwindigkeit aus den Bewegungsmustern identifiziert. Die vorgenommenen Einstellungen in der „runinput“-Datei sind wie folgt gewählt:

Tabelle 13: Einstellungen vbSPT-Auswertung

Parameter	Eingestellter Wert
<i>timestep</i>	0,05
<i>dim</i>	2
<i>triLmin</i>	2
<i>runs</i>	24
<i>maxHidden</i>	3
<i>bootstrapNum</i>	100
<i>fullBootstrap</i>	0

4.4.7.2 Analyse der räumlich begrenzten Diffusion

Es folgt die Analyse der räumlichen Begrenzung der Diffusion, die auf den zuvor identifizierten Rezeptorpfaden basiert und abhängig vom jeweiligen Rezeptorzustand und den entsprechenden Diffusionseigenschaften ist. Als Maß für die Stärke der räumlichen Begrenzung findet der Verdichtungsfaktor P_c Anwendung. Dieser wird, wie von Bussmann et al. 2023⁹⁰ beschrieben, anhand der folgenden Gleichung berechnet:

$$Pc_i = \sum_i^{i+n-1} \frac{(x_{i+1} - x_i)^2 + (y_{i+1} - y_i)^2}{S_i^2}$$

Formel 2: Formel zur Berechnung des Verdichtungsfaktors Pc

Die dargestellte Formel für Pc_i dient der Berechnung des Verdichtungsfaktors Pc . Die Berechnung von Pc erfolgt anhand der aufgenommenen Rezeptorpfade jedes Rezeptorzustands, jeder Stimulationsbedingung, in jeder Zelllinie und für jede Messwiederholung. Die Bedeutungen der Variablen sind nachfolgend aufgeführt. x_i und y_i : Koordinaten zum Zeitpunkt i ; x_{i+1} und y_{i+1} : Koordinaten zum Zeitpunkt $i + 1$; n : Länge des Zeitfensters; S_i : betrachtete Fläche der konvexen Zelloberfläche, wobei S_i mittels MATLAB-Funktion „convhull“ berechnet wird.

Im Rahmen der Datenanalyse werden dazu Pc -Werte für die aufgenommenen Pfade jedes Rezeptorzustands, jeder Stimulationsbedingung, in jeder Zelllinie und für jede Wiederholung bestimmt und mit einem zugehörigen Grenzwert verglichen. Der Grenzwert der jeweiligen Berechnung wird vom 95ten Perzentil der simulierten Pc -Analyse, ausgehend vom jeweiligen Diffusionskoeffizienten des Rezeptorzustands vorgegeben. Sobald der durchschnittliche Pc -Wert eines bestimmten Rezeptorpfads den Grenzwert überschreitet, wird eine räumliche Begrenzung der Diffusion angenommen. Unterschreitet der ausgegebene Pc -Wert den zugehörigen Grenzwert, ist davon auszugehen, dass die jeweiligen Bewegungspfade der freien Diffusion zuzuordnen sind. Die Pfade müssen, um in die Berechnung einfließen zu können, mindestens 10 Bilder lang andauern, das entspricht 0,5 s.

4.4.7.3 Analyse des 5HT_{1a}R-Oligomerisierungsgrads

Anhand der Fluoreszenzintensität der einzelnen Fluoreszenzsignale findet die Untersuchung des Oligomerisierungsgrads der 5HT_{1a}R statt. Dazu wird die in der vbSPT-Analyse bestimmte Helligkeitsverteilung mit einem MATLAB-Skript in einem Gauß'schen Mischungsmodell untersucht. Die Analyse ist in Abhängigkeit der Anzahl der Oligomerisierungszustände zu optimieren.

4.4.7.4 Statistische Analyse der Daten

Die mit MATLAB ausgewerteten Daten werden zusammengeführt und in GraphPad Prism importiert. Es werden Varianzanalysen (ANOVA) der Daten durchgeführt, wobei statistische Signifikanz bei einem p -Wert $< 0,05$ verglichen mit der jeweiligen Kontrollbedingung mit einem Stern (*) gekennzeichnet ist. Daten, die statistisch signifikant von der gleichen Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie (HEK SNAP-5HT_{1a} oder HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a}) abweichen, werden mit einer Raute (#) markiert.

5. Ergebnisse

5.1 Transfektion von HEK Zellen

5.1.1 Nachweis der transient transfizierten 5HT_{1a}-, 5HT_{2a}- und 5HT₇-Rezeptoren

Die in Abschnitt 4.3.3 beschriebenen transient transfizierten HEK Zellen dienen der Messung der β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-Assay. Die Expression der LgBiT- oder SmBiT-Fusionsproteine zeigt sich durch die im NanoBiT[®]-Assay komplementierte Nanoluciferase und die resultierende Chemilumineszenz. Je nach Transfektionsbedingung (siehe Tabelle 10) exprimieren die Zellen transient auch Rezeptoren ohne Proteintags. Die Expression dieser Rezeptoren wird mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, wobei die Behandlung der Zellen, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, abläuft. Der verwendete primäre Anti-5HT_{1a}R-Antikörper ist ein polyklonaler Kaninchen-Antikörper, der sekundäre Antikörper ist ein Pferd-Anti-Kaninchen-DyLight[®] 488-Antikörper. Um die Zellkerne der transient transfizierten HEK Zellen sichtbar zu machen, sind sie mit dem Hoechst 33258 DNA-Farbstoff gegen gefärbt. Abbildung 4 zeigt die Immunfluoreszenz zum Nachweis des 5HT_{1a}R in transient transfizierten HEK 5HT1a Zellen (A), in der stabil transfizierten Zelllinie HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a (B) und in HEK Wildtyp Zellen (C). In den HEK Wildtyp Zellen ist eine minimale Bindung des sekundären Antikörpers zu sehen. Die HEK 5HT1a und besonders die HEK SNAP-5HTa HiBiT-5HT2a Zellen grenzen sich davon deutlich ab. Die wesentlich häufigere Bindung des DyLight[®] 488 markierten Antikörpers weist hier auf ein hohes 5HT_{1a}R-Expressionslevel hin, in den Zellen der Positivkontrolle (B) ist dies in allen Zellen vergleichbar groß. In den transient transfizierten Zellen (A) ist zu erkennen, dass nicht jede Zelle den 5HT_{1a}R in gleichem Maße exprimiert, sodass sich die Fluoreszenzintensität der verschiedenen Zellen klar unterscheidet. Das Immunfluoreszenz-Experiment zeigt, dass die transiente Transfektion des Plasmids pcDNA5FRT_5HT1a, das für den 5HT_{1a}R ohne Proteintag kodiert, auf der Oberfläche von HEK Zellen zur Expression des Rezeptors führt.

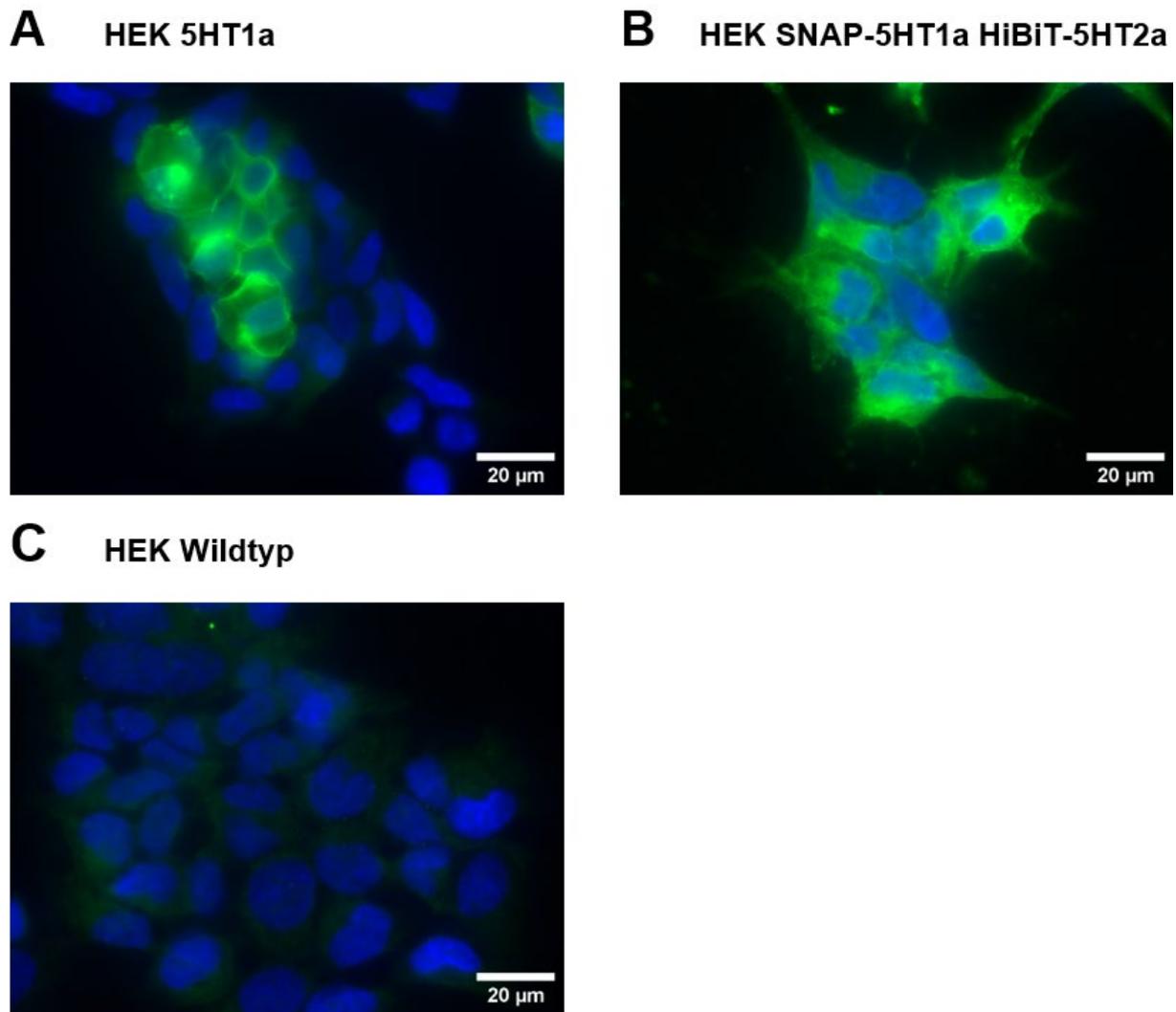


Abbildung 4: Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT_{1a}R

Transient mit dem 5HT_{1a}-Rezeptor transfizierte HEK Zellen (**A**), stabil transfizierte HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (**B**) und HEK Wildtyp Zellen (**C**) werden, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, behandelt. Dabei dienen die HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (**B**) als Positivkontrolle, HEK Wildtyp Zellen (**C**) sind als Negativkontrolle eingesetzt. Die Bilder werden im Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) aufgenommen.

Für den Nachweis des 5HT_{2a}R werden transient transfizierte HEK 5HT2a, stabil transfizierte HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen und HEK Wildtyp Zellen in einem weiteren Immunfluoreszenz-Experiment untersucht. Dazu finden ein primärer polyklonaler Kaninchen-Anti-5HT_{2a}R-Antikörper und der sekundäre Pferd-Anti-Kaninchen-DyLight® 488-Antikörper Anwendung (Vorgehen im Detail in Abschnitt 4.3.4 beschrieben). Für die Gegenfärbung der Zellkerne ist der DNA-Farbstoff Hoechst 33258 einzusetzen. Abbildung 5 zeigt die Färbung der drei Zelltypen. Ähnlich wie bei dem Nachweis des 5HT_{1a}R ist auch hier eine minimale Fluoreszenzfärbung der Negativkontrolle zu erkennen. Die transient transfizierten HEK 5HT2a (**A**) sowie die stabil transfizierten HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (**B**) zeigen deutlich

häufigere Antikörperbindung. Die stabile Zelllinie zeigt für 5HT_{2a}-Rezeptoren, wie auch für 5HT_{1a}-Rezeptoren, sehr homogene Expressionslevel in den abgebildeten Zellen. Die transienten HEK 5HT_{2a} Zellen zeigen, im Gegensatz zu den transienten HEK 5HT_{1a} Zellen (Abbildung 4 A), eine gleichmäßige Expression in allen abgebildeten Zellen. Die transiente Transfektion des pcDNA5FRT_5HT_{2a} Plasmids in HEK Zellen führt zur Expression des 5HT_{2a}R.

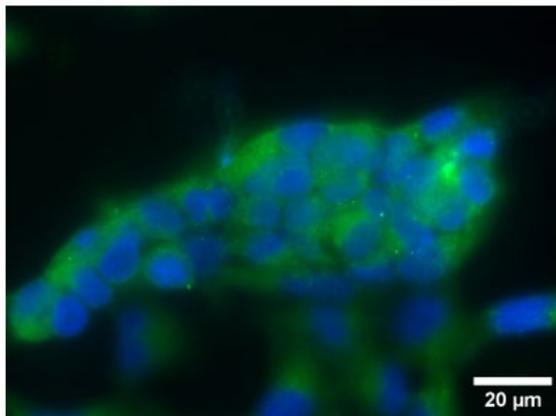
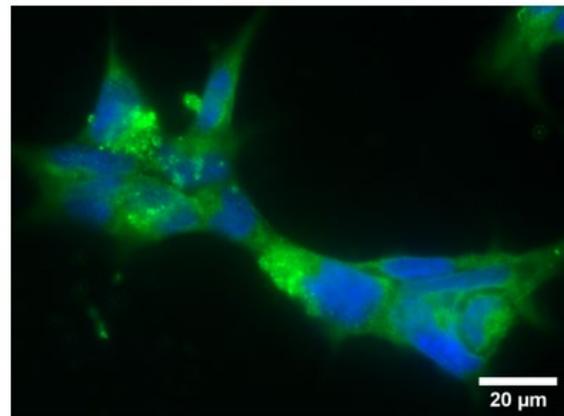
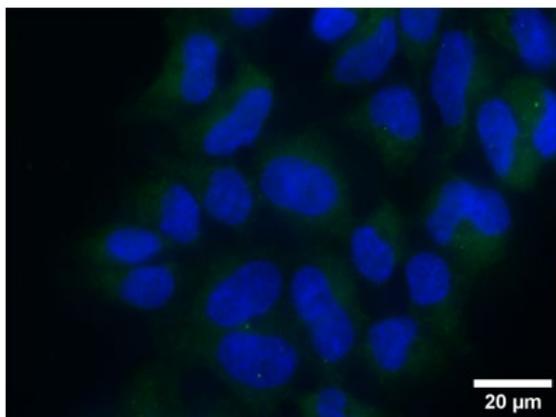
A HEK 5HT_{2a}**B** HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a}**C** HEK Wildtyp

Abbildung 5: Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT_{2a}R

Transient mit dem 5HT_{2a}R transfizierte HEK Zellen (A), stabil transfizierte HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen (B) und HEK Wildtyp Zellen (C) werden, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, behandelt. Dabei dienen die HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen (B) als Positivkontrolle, HEK Wildtyp Zellen (C) sind als Negativkontrolle eingesetzt. Die Bilder werden im Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) aufgenommen.

Für den Nachweis der Expression des 5HT₇R ohne Proteintag werden transient transfizierte HEK Zellen und HEK Wildtyp Zellen nach dem in Abschnitt 4.3.4 beschriebenen Protokoll

behandelt. Es kommen ein primärer polyklonaler Kaninchen-Anti-5HT₇-Rezeptor und der sekundäre Pferd-Anti-Kaninchen-DyLight® 488-Antikörper zum Einsatz. Der Färbung der Zellkerne dient der DNA-Farbstoff Hoechst 33258. Die HEK Wildtyp Zellen zeigen minimale Färbung durch den Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper, wie Abbildung 6 B zeigt. Die transient transfizierten Zellen sind hingegen deutlich intensiver immunfluoreszent gefärbt (Abbildung 6 A). Die transiente Transfektion mit dem Plasmid pcDNA5FRT_5HT7 führt auf der Oberfläche von HEK Zellen also zur Expression des 5HT₇R.

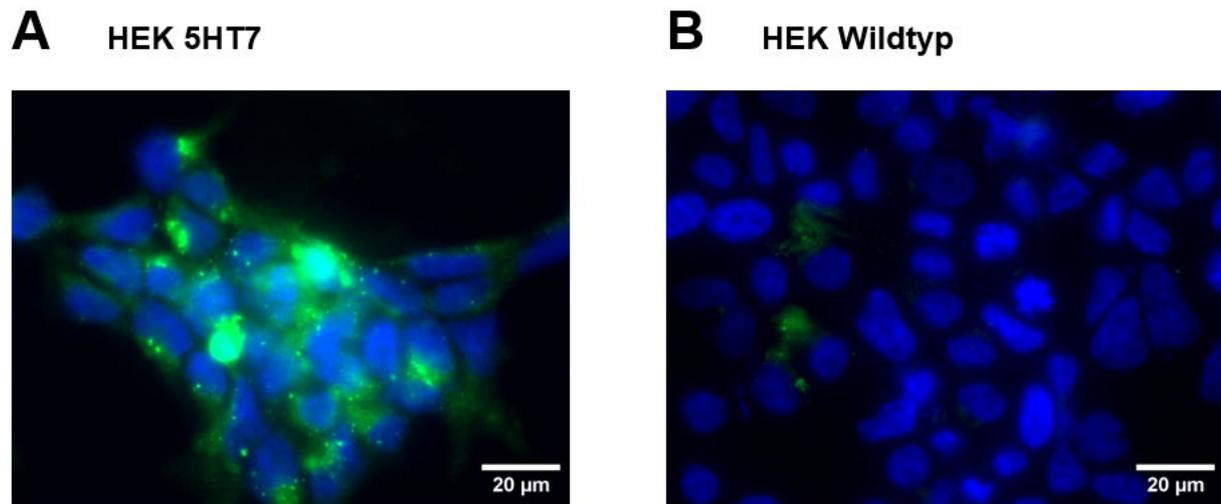


Abbildung 6: Immunfluoreszenz-Experiment zum Nachweis transient transfizierter 5HT₇R

Transient mit dem 5HT₇R transfizierte HEK Zellen (**A**) und HEK Wildtyp Zellen (**B**) werden, wie in Abschnitt 4.3.4 beschrieben, behandelt. Dabei dienen die HEK Wildtyp Zellen (**B**) als Negativkontrolle. Die Bilder werden im Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) aufgenommen.

5.1.2 Stabile Zelllinie HEK SNAP-5HT1a

Die Etablierung einer stabilen HEK SNAP-5HT1a Zelllinie (Abschnitt 4.4.3) dient der Untersuchung der lateralen Mobilität des 5HT_{1a}R. Um die Expression des SNAP-5HT_{1a}R zu überprüfen, erfolgt die SNAP-Färbung mit Hilfe des SNAP-Surface[®] 488 Farbstoffs, wie in Abschnitt 4.4.4 beschrieben. Die Gegenfärbung mit Hoechst 33258 dient der besseren Sichtbarkeit der DNA in den Zellkernen. Abbildung 7 zeigt, dass die stabil selektierten Zellen (A) den SNAP-5HT_{1a}-Rezeptor exprimieren. Die HEK Wildtyp Zellen (B) weisen bis auf wenige kleine Rückstände keine Färbung durch den SNAP-Surface[®] 488 Farbstoff auf. Dies deutet darauf hin, dass die Reaktion aus SNAP-Tag und SNAP-Surface[®] 488 sehr spezifisch ist und es kaum zur unspezifischen Bindung durch den Farbstoff kommt.

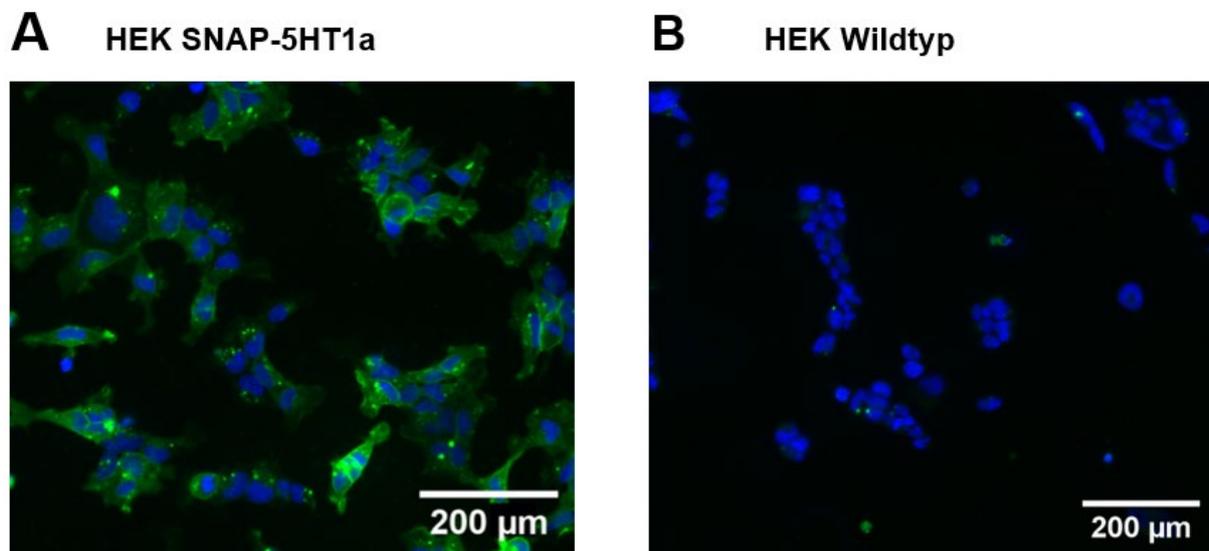


Abbildung 7: SNAP- Färbung stabil transfizierter SNAP-5HT_{1a}R in HEK SNAP-5HT1a Zellen

Stabil transfizierte HEK SNAP-5HT1a Zellen (A) sowie HEK Wildtyp Zellen werden mit SNAP-Surface[®] 488 Lösung (2 µM) entsprechend des Herstellerprotokolls (siehe <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/cellular-labeling-s9124>) gefärbt. Für die Aufnahme der Bilder in einem Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) sind die verwendeten Deckgläser in entsprechende Halter einzuspannen.

5.1.3 Stabile Zelllinie HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a}

Um den Einfluss des 5HT_{2a}R auf die laterale Mobilität des 5HT_{1a}R überprüfen zu können, wird eine stabile HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zelllinie etabliert (beschrieben in Abschnitt 4.4.3). Der Nachweis der beiden stabil exprimierten Rezeptoren erfolgt über den jeweiligen Proteintag.

Die Färbung der Zellen mit dem SNAP-Farbstoff SNAP-Surface[®] 488 dient dem Nachweis des SNAP-5HT_{1a}R. Die DNA in den Zellkernen ist durch Gegenfärbung mit Hoechst 33258 sichtbar gemacht. Die Beschreibung des genauen experimentellen Vorgehens ist in Abschnitt 4.4.4 zu finden. Abbildung 8 stellt das Ergebnis der Färbungsreaktionen dar. Teil A der Abbildung zeigt, dass die SNAP-5HT_{1a}R auf der Oberfläche der stabilen Zelllinie exprimiert werden. Abbildung 8 B zeigt das Ergebnis der SNAP-Färbung von HEK Wildtyp Zellen. Wie in Abbildung 7 B ist auch hier die Fluoreszenz des SNAP-Surface[®] 488 Farbstoffs nur in geringfügigen Rückständen zu erkennen.

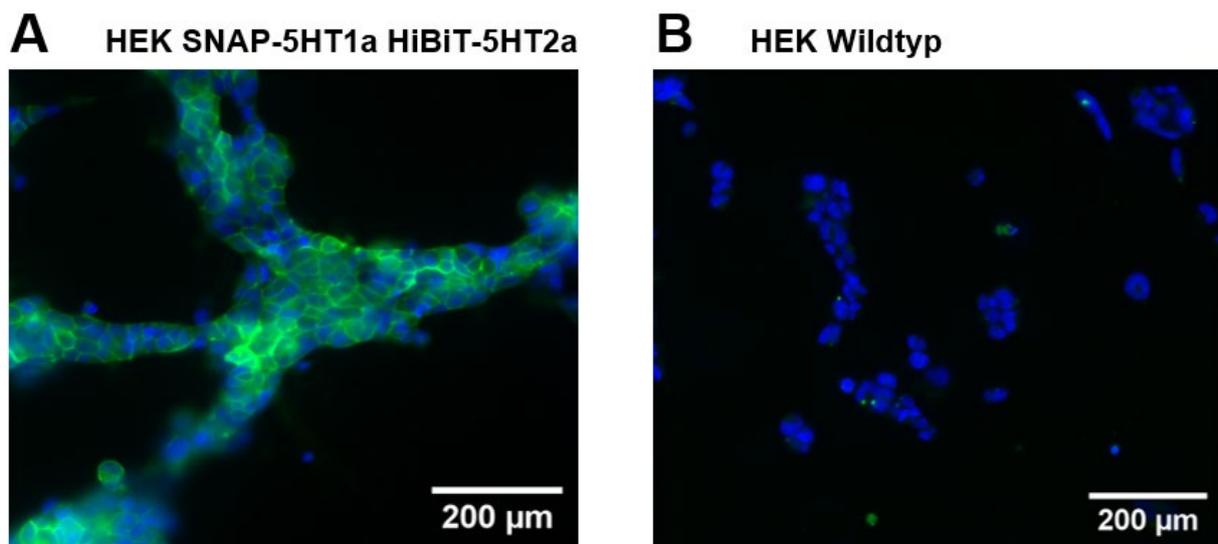


Abbildung 8: SNAP- Färbung stabil transfizierter SNAP-5HT_{1a}R in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen

Stabil transizierte HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen (A) sowie HEK Wildtyp Zellen werden mit SNAP-Surface[®] 488 Lösung (2 µM) entsprechend des Herstellerprotokolls (siehe <https://www.neb.com/en/protocols/0001/01/01/cellular-labeling-s9124>) gefärbt. Für die Aufnahme der Bilder in einem Zeiss Axio Observer Mikroskop im DAPI- und GFP-Kanal ($\lambda_1 = 365 \text{ nm}$, $\lambda_2 = 470 \text{ nm}$) sind die verwendeten Deckgläser in entsprechende Halter einzuspannen.

Im nächsten Schritt ist die Expression des HiBiT-5HT_{2a}R nachzuweisen. Zu diesem Zweck erfolgt die Zugabe von rekombinantem His-LgBiT-Protein und dem Nanoluciferase Substrat Coelenterazin h zu HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen, wobei die resultierende

Chemilumineszenz im Tecan Spark[®] Reader ausgelesen wird (genaues Vorgehen beschrieben in Abschnitt 4.4.5, Expression und Aufreinigung des His-LgBiT sind im Detail in Abschnitt 4.4.4 zu finden). Abbildung 9 zeigt die Chemilumineszenzmessung über 28 min, von der die Pufferkontrolle bereits abgezogen ist. Somit bestätigt die Messung die Expression des 5HT_{2a}-Rezeptors auf der Oberfläche der HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen.

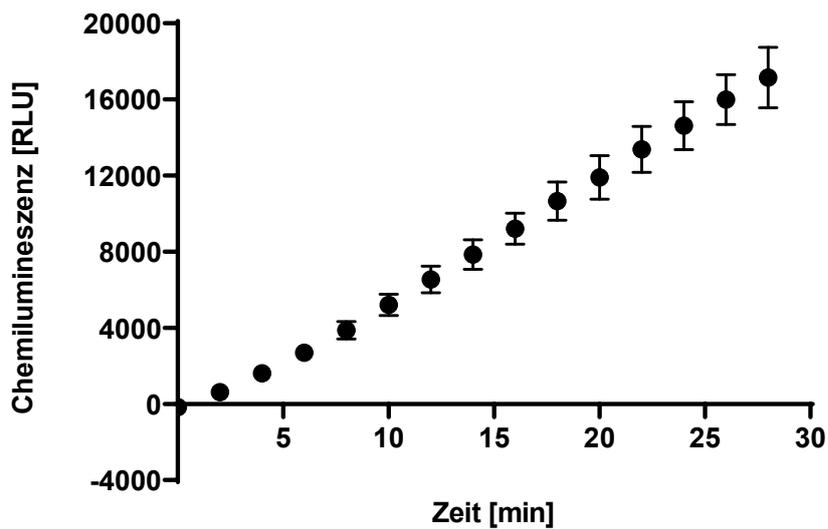


Abbildung 9: Komplementierungsassay in stabilen HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen

Zu den stabil selektierten HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen wird zum Zeitpunkt $t = 0$ min eine 0,01 mg/mL His-LgBiT Lösung pipettiert. Die Proteinfragmente HiBiT und LgBiT komplementieren aufgrund ihrer hohen Affinität zueinander zu der funktionellen Einheit Nanoluciferase. Diese setzt in einer enzymatischen Reaktion das in der Lösung vorhandene Coelenterazin h (2,5 μ M) zu Coelenteramid h um und emittiert dabei chemilumineszentes Licht. Die Messung der resultierenden Chemilumineszenz erfolgt über 28 min in der Einheit „Relative Light Unit“ (RLU). Als Kontrollbedingung dienen Zellen, denen eine His-LgBiT freie Lösung zugesetzt ist. Die Mittelwerte dieser Kontrolle werden zum jeweiligen Zeitpunkt t_x von den Chemilumineszenzwerten der Messbedingung subtrahiert. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardfehler und basieren auf einem in Triplikaten durchgeführten Experiment.

5.2 Charakterisierung der β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}-Rezeptor

Ziel ist es, den kinetischen Verlauf der β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R zu charakterisieren. Da Saecker et al. 2023⁸⁵ in der Vergangenheit gezeigt haben, dass sich der zellbasierte NanoBiT[®]-Assay sehr gut dazu eignet, die β -Arrestin 2 Rekrutierung an G-Proteingekoppelten Rezeptoren zu untersuchen, erfolgt die Etablierung eines 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Systems. Dafür werden HEK Zellen, wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, transient transfiziert, um die Fusionsproteine 5HT_{1a}R-LgBiT und SmBiT- β -Arrestin 2 zu exprimieren. Bei Stimulation des 5HT_{1a}R kommt es zur β -Arrestin 2 Rekrutierung an den Rezeptor, wodurch die beiden Proteinfragmente LgBiT und SmBiT einander komplementieren. Dies führt zur Bildung der funktionellen Nanoluciferase, die ihr Substrat Coelenterazin h in Coelenteramid h umsetzt unter Emission von chemilumineszentes Licht.

In einem ersten Schritt werden EC₅₀- und IC₅₀-Daten für die verwendeten 5HT_{1a}R-Liganden bestimmt. Die Verarbeitung der Rohdaten ist in Abschnitt 4.3.6 ausführlich beschrieben. Abbildung 10 zeigt, wie sich die einzelnen rechnerischen Schritte auf die Kurvenverläufe auswirken. Im Teil A der Abbildung sind die vom Tecan Spark[®] Reader aufgenommenen Rohdaten, angegeben in „Relative Light Unit“ (RLU), gegen die Zeit aufgetragen. Durch die Korrektur der Daten ergibt sich eine Normalisierung der Baselinewerte innerhalb der ersten 5 Messpunkte auf ca. 1, wie Abbildung 10 B zeigt. Als Nächstes werden die Messwerte von Baseline- und Puffereffekten bereinigt, wodurch eine mögliche Drift der Daten korrigiert wird. Die Baselinewerte verschieben sich aufgrund der Subtraktion der Pufferkontrolle auf ca. 0, sodass die Graphen in Teil C der Abbildung 10 die von allen experimentellen Variationen bereinigte β -Arrestin 2 Rekrutierung darstellen. Die Berechnung der Flächen unter den Graphen (AUC) der Abbildung 10 C dient der Darstellung als Dosis-Wirkungskurve gegen den dekadischen Logarithmus der Ligandkonzentration in Mol pro Liter (siehe Teil D der Abbildung 10). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Dosis-Wirkungskurven sind die AUC-Werte in einem weiteren Rechenschritt auf die maximale durch Serotonin zu rekrutierende β -Arrestin 2 Menge zu beziehen (das detaillierte Vorgehen wird in Abschnitt 4.3.6 beschrieben). Die sich ergebenden Kurven geben die prozentuale β -Arrestin 2 Rekrutierung – verglichen mit Serotonin – an und sind in Abbildung 11 dargestellt. Anhand dieser Kurven werden die EC₅₀- und IC₅₀-Werte der eingesetzten 5HT_{1a}R-Liganden berechnet, die in Tabelle 14 dargestellt sind.

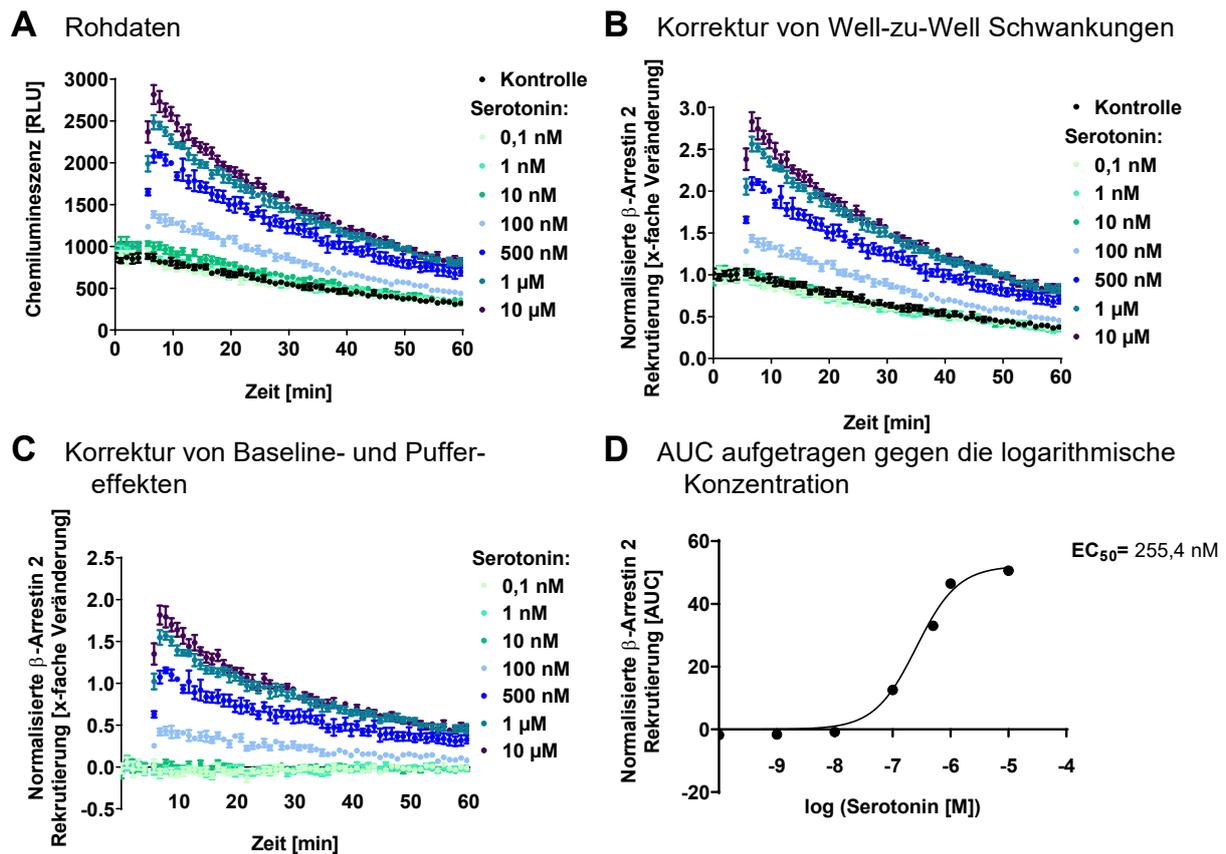


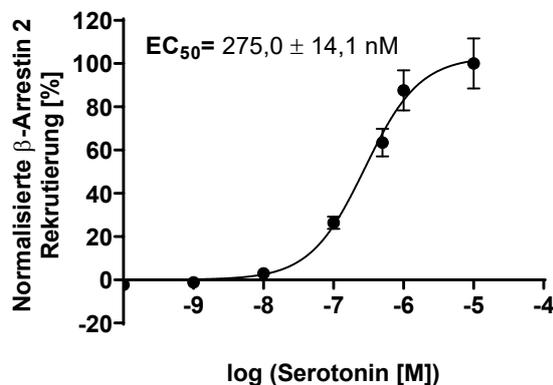
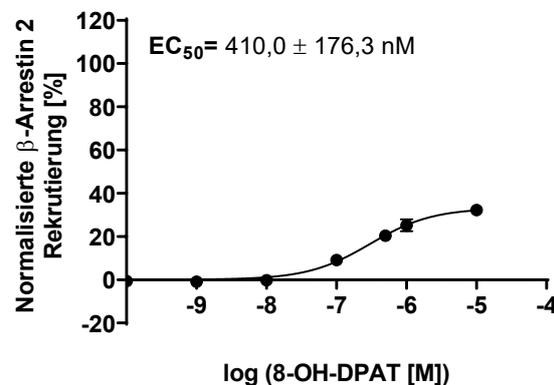
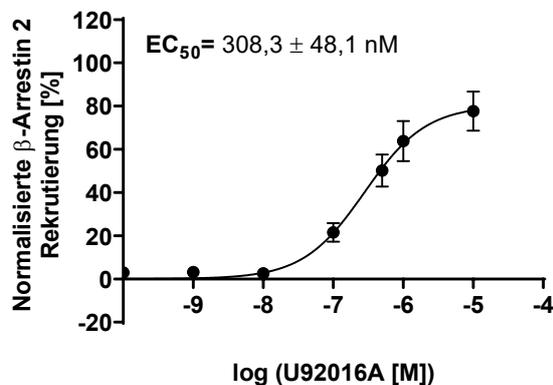
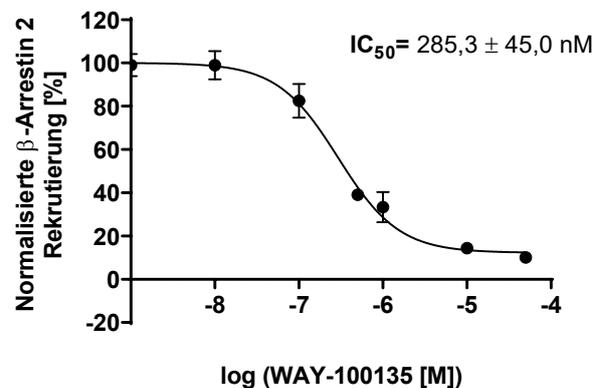
Abbildung 10: β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT®-Assay und Verarbeitung der Rohdaten

Zum Zeitpunkt $t = 5 \text{ min}$ werden verschiedene Konzentrationen Serotonin und eine Pufferkontrolle zu HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen pipettiert, die Messung der resultierenden Chemilumineszenz läuft über 60 min. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Verarbeitung der Rohdaten eines der vier Versuche. Teil (A) zeigt die Rohdaten als Chemilumineszenz als „Relative Light Unit“ gegen die Zeit (min). Teil (B) zeigt die um Well-zu-Well Variation bereinigten Daten. In Teil (C) sind die Messdaten um die Baselinedrift bereinigt und für Teil (D) sind die Flächen unter den Kurven aus (C) gegen den dekadischen Logarithmus der Serotoninkonzentration in Mol pro Liter aufgetragen. Alle Daten sind angegeben als Mittelwerte \pm Standardfehler, das rechnerische Vorgehen ist in Abschnitt 4.3.6 erläutert.

Tabelle 14: Kennzahlen der β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT®-Assay

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von vier voneinander unabhängigen 5HT_{1a}-NanoBiT®-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 11 dargestellten Dosis-Wirkungskurven der 5HT_{1a}R-Liganden.

5HT _{1a} R-Ligand	EC ₅₀ [nM]	% E _{max} [%]	IC ₅₀ [nM]	IR [%]
Serotonin	275,0 \pm 14,1	100,0 \pm 11,6	-	100,0
8-OH-DPAT	410,0 \pm 176,3	32,2 \pm 2,0	-	28,4 \pm 0,4
U92016A	308,3 \pm 48,1	77,7 \pm 9,1	-	108,1 \pm 3,4
WAY-100135	-	-	285,3 \pm 45,0	-

A Serotonin**B 8-OH-DPAT****C U92016A****D WAY-100135****Abbildung 11: β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT®-Assay**

HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen werden mit verschiedenen Agonisten Serotonin (**A**), 8-OH-DPAT (**B**) und U92016A stimuliert (**C**). Für die Dosis-Wirkungskurve von WAY-100135 (**D**) sind die Zellen vor Beginn der Chemilumineszenzmessung mit verschiedenen Konzentrationen des 5HT_{1a}R-Antagonisten für 30 min vorinkubiert. Während der Chemilumineszenzmessung wird allen WAY-100135 Konzentrationen 1 μ M Serotonin hinzu pipettiert. Alle Dosis-Wirkungskurven werden auf die maximale durch 10 μ M Serotonin zu rekrutierende β -Arrestin 2 Menge (AUC) bezogen und in Prozent gegen den dekadischen Logarithmus der Ligandkonzentration in Mol pro Liter aufgetragen. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler von vier unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind. Die Durchführung und Auswertung der Assays sind in den Abschnitten 4.3.5 und 4.3.6 erläutert.

Für den endogenen Agonisten Serotonin ergibt sich im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ein EC₅₀-Wert von 275,0 ± 14,1 nM. Für den 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT wird ein EC₅₀-Wert von 410,0 ± 176,3 nM bestimmt, der damit deutlich größer ist als der für Serotonin. Das agonistische U92016A zeigt mit 308,3 ± 48,1 nM einen ähnlichen EC₅₀-Wert wie Serotonin. Für WAY-100135, den verwendeten 5HT_{1a}R-Antagonist, wird ein IC₅₀-Wert von 285,3 ± 45,0 nM errechnet. Um zu überprüfen, ob 8-OH-DPAT und U92016A in diesem System als Voll- oder Partialagonisten wirken, erfolgt mit Hilfe der prozentualen Dosis-Wirkungskurven (Abbildung 11) die Berechnung der maximalen Signalantwort % E_{max}. Der % E_{max}-Wert eines 5HT_{1a}R-Liganden zeigt auf, wie viel β-Arrestin 2 er, bezogen auf die maximale Serotonin-vermittelte Rekrutierung, zu aktivieren vermag. Für 8-OH-DPAT ergibt sich eine β-Arrestin 2 Rekrutierung von 32,2 ± 2,0 %, für U92016A beträgt der % E_{max}-Wert 77,7 ± 9,1 % (vgl. Tabelle 14).

Da es in der Literatur teilweise konträre Hinweise darauf gibt, ob 8-OH-DPAT und U92016A Voll- oder Partialagonisten sind, soll ein weiterer Parameter, die Initiale Rate (IR), der Einordnung dienen. Die IR charakterisiert dabei die Wirksamkeit eines Liganden als Rate der Signalerzeugung, bevor es zur Gegenregulation des erzeugten Signals kommt.⁷ Für die Ermittlung der IR kommen 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays zum Einsatz, bei denen die drei 5HT_{1a}R-Agonisten in einer Konzentration eingesetzt sind, bei der sie die maximal mögliche Menge an β-Arrestin 2 rekrutieren (10 μM). Abbildung 12 A zeigt die um Well-zu-Well Variation, Baseline- und Puffereffekte bereinigte β-Arrestin 2 Rekrutierung über 60 min als farbige Messdaten. Die Kurvenverläufe werden mit Hilfe der von Hoare et al. 2020⁷ veröffentlichten Gleichungen modelliert und als schwarze durchgezogene Linien dargestellt (verwendete Gleichung: „Rise and Fall equation: Baseline then rise and fall to steady state“). Abbildung 12 B stellt die AUC dieser Rekrutierungsgraphen dar. Zwischen der β-Arrestin 2 Rekrutierung in AUC über 60 min von Serotonin und U92016A ist kein statistisch signifikanter Unterschied festzustellen. Die AUC der 8-OH-DPAT-vermittelten Rekrutierung ist signifikant kleiner als die von Serotonin (p < 0,01). Da die IR auch als Steigung der initialen Signalgeneration verstanden wird, zeigt Abbildung 12 C lediglich die ersten 9,5 min der Chemilumineszenzmessung dargestellt. Als gestrichelte Geraden sind die Steigungen der Graphen und somit die IR visualisiert. Auch die IR sind anhand der Gleichungen von Dr. Samuel Hoare berechnet worden. In Abbildung 12 D erfolgt die Darstellung der prozentualen IR von 8-OH-DPAT und U92016A bezogen auf die IR von Serotonin. Die IR von U92016A ist mit 108,1 ± 3,4 % signifikant größer (p < 0,05) als die von Serotonin. 8-OH-DPAT initiiert

lediglich $28,4 \pm 0,4$ % des anfänglichen Serotoninsignals am $5HT_{1a}$ -Rezeptor ($p < 0,0001$; vgl. Tabelle 14). 8-OH-DPAT ist somit eindeutig als Partialagonist am $5HT_{1a}R$ zu charakterisieren, für U92016A ergibt sich ein differenzierteres Bild. Zwar ist die Signalinitiation nach U92016A-Behandlung mit einer IR von $108,1 \pm 3,4$ % größer als die von Serotonin, was eine Klassifizierung als Vollagonist bedeuten würde, die über 55 min rekrutierte β -Arrestin 2 Menge ist mit $77,7 \pm 9,1$ % jedoch eher partialagonistischer Natur.

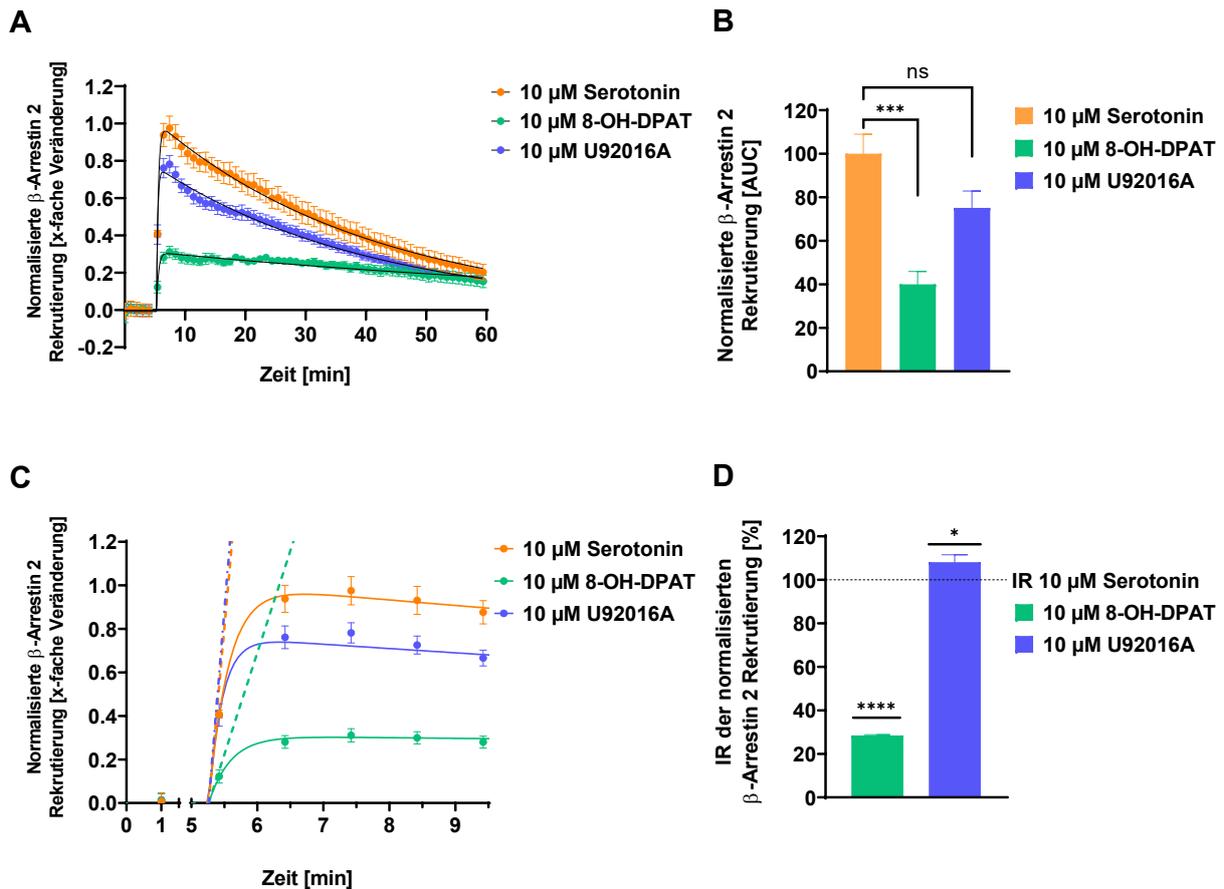


Abbildung 12: Vergleich der AUC- und IR-Auswertung des $5HT_{1a}$ -NanoBiT®-Assays

(A) Im $5HT_{1a}$ -NanoBiT®-Assay erfolgt die $5HT_{1a}R$ -Agonist-Zugabe zu HEK SNAP- $5HT_{1a}$ Zellen nach $t = 5$ min. Die resultierende Chemilumineszenz wird über 60 min gemessen. Die Abbildung zeigt exemplarisch Kinetik der um Well-, Puffer- und Baselineeffekte bereinigte β -Arrestin 2 Rekrutierung eines Experiments. Als schwarze Linien werden die nach Hoare et al. 2020⁷ modellierten Kurven dargestellt. Abbildung (B) stellt die Auswertung der Kinetik in AUC dar. Abbildung (C) zeigt die ersten 9,5 min der in (A) dargestellten Messung. Die durchgehenden Linien repräsentieren die Modellkurven der jeweiligen Kinetik, die gestrichelten Linien stellen die berechneten Initialen Raten (IR) dar. In (D) sind die IR der Agonisten bezogen auf die IR von Serotonin im jeweiligen Experiment in Prozent dargestellt. (A) und (C) zeigen exemplarisch die Daten eines der vier unabhängig in Triplikaten durchgeführten Experimente, Abbildung (B) und (D) zeigen die zusammengeführten Daten aller vier Experimente. Daten, die mit Sternen (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant voneinander ab.

5.3 Untersuchung des Einflusses von 5HT_{2a}-Rezeptoren auf 5HT_{1a}-Rezeptoren

5.3.1 Untersuchung des Einflusses des 5HT_{2a}-Rezeptors auf die 5HT_{1a}R-induzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung

Dieser Abschnitt konzentriert sich auf die Analyse des Einflusses, den die zusätzliche Expression von 5HT_{2a}R auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung hat. Die Etablierung von 5HT_{2a}-NanoBiT[®]-Assays zielt darauf ab, zunächst die Funktionalität der 5HT_{2a}R-LgBiT-Rezeptoren und -Agonisten zu überprüfen. Dazu werden, wie in Abschnitt 4.3.3 beschrieben, HEK Zellen transient transfiziert, um die Fusionsproteine 5HT_{2a}R-LgBiT und SmBiT- β -Arrestin 2 zu exprimieren. Die Durchführung der 5HT_{2a}-NanoBiT[®]-Assays läuft ab, wie sie in Abschnitt 4.3.5 beschrieben ist. Abbildung 13 zeigt die resultierenden Dosis-Wirkungskurven. Es ergeben sich hierbei EC₅₀-Daten von $15,5 \pm 5,3$ nM für Serotonin und von $13,3 \pm 2,7$ nM für TCB-2. TCB-2 ist dabei in der Lage, $86,0 \pm 5,2$ % der durch Serotonin-vermittelten β -Arrestin 2 Menge zu rekrutieren.

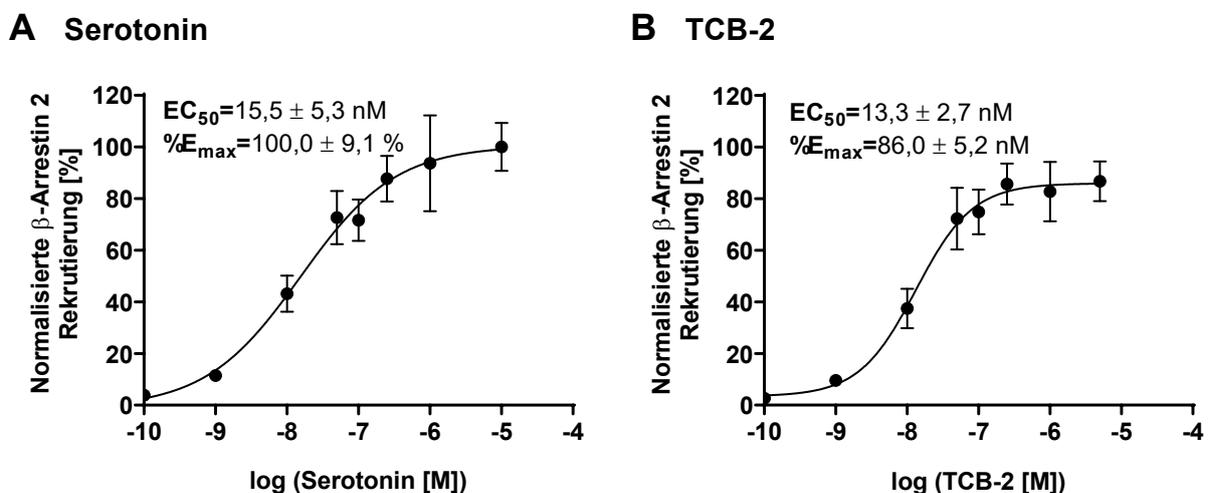


Abbildung 13: β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{2a}-NanoBiT[®]-Assay

5HT_{2a}-NanoBiT[®]-Assays werden in HEK 5HT_{2a}-NanoBiT[®] Zellen mit 5HT_{2a}R-Agonisten Serotonin (A) und TCB-2 (B) durchgeführt. Die Dosis-Wirkungskurven sind relativ zur maximalen durch 10 μ M Serotonin zu rekrutierenden β -Arrestin 2 Menge (AUC) angegeben und in Prozent gegen den dekadischen Logarithmus der Ligandkonzentration in Mol pro Liter aufgetragen. Die Abbildungen zeigen Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind.

Nachfolgend wird untersucht, welchen Einfluss die gleichzeitige Expression und Stimulation des 5HT_{2a}R auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung hat. Dazu dient die transiente Transfektion von HEK Zellen, die neben den Fusionsproteinen 5HT_{1a}R-LgBiT und SmBiT- β -

Arrestin 2 auch 5HT_{2a}-Rezeptoren exprimieren (HEK 5HT_{1a}-NanoBiT 5HT_{2a}). Es folgen 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays, bei denen die Zellen mit 5HT_{1a}R-Agonisten oder einer Kombination aus 5HT_{1a}R-Agonist und 1 μM TCB-2 stimuliert werden. In Abbildung 14 A bis C sind die über 60 min rekrutierten Mengen β-Arrestin 2 (in AUC) aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Abbildung 14 D zeigt die prozentuale Veränderung der β-Arrestin 2 Rekrutierung bei zusätzlicher TCB-2 Stimulation. Wenn die Zellen mit 500 nM U92016A und 1 μM TCB-2 behandelt werden, rekrutiert der Rezeptor 17,4 ± 2,7 % (p < 0,01) weniger β-Arrestin 2 als bei alleiniger Behandlung mit U92016A. Eine um 24,2 ± 7,6 % geringere β-Arrestin 2 Rekrutierung ist bei einer Kombination aus 1 μM 8-OH-DPAT und 1 μM TCB-2 festzustellen (vgl. mit 8-OH-DPAT alleine, p < 0,05). Die Kombination aus Serotonin und TCB-2 führt zu einer leichten Erhöhung der β-Arrestin 2 Rekrutierung um 12,2 ± 5,8 %.

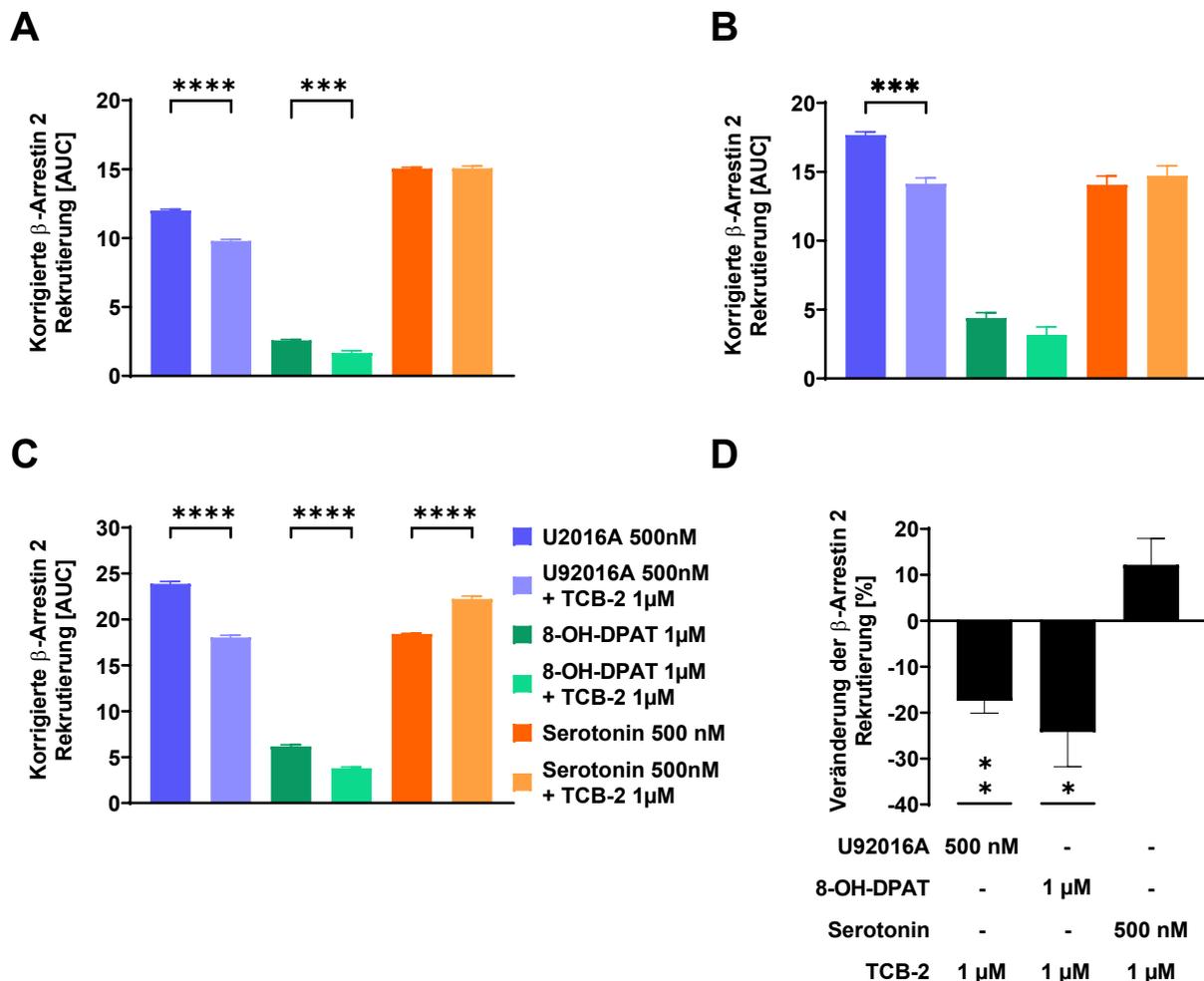


Abbildung 14: Einfluss gleichzeitiger 5HT_{2a}R-Stimulation auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]- Assay

Die Teile (A) bis (C) der Abbildung zeigen exemplarisch drei der mindestens vier durchgeführten unabhängigen 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Experimente. In (D) wird die Veränderung der β-Arrestin 2 Rekrutierung in Prozent angegeben,

die auftritt, wenn bei gleichbleibender 5HT_{1a}R-Agonist Zugabe mit 1 µM des 5HT_{2a}R-Agonisten TCB-2 stimuliert wird. Die relative Veränderung wird für jedes einzelne Experiment und den jeweiligen 5HT_{1a}R-Agonisten berechnet, **(D)** zeigt die Daten aller Experimente. Die gezeigten Daten sind dargestellt als Mittelwerte ± Standardfehler. Daten, die mit Sternen (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant voneinander ab.

5.3.2 Untersuchung des Einflusses des 5HT_{2a}-Rezeptors auf die laterale Mobilität des 5HT_{1a}-Rezeptors

Die Durchführung der folgenden SPT-Experimente dient der Untersuchung des Einflusses, den der 5HT_{2a}R auf die laterale Mobilität des 5HT_{1a}R auf der Oberfläche von HEK Zellen ausübt. Hierzu kommen die in Abschnitt 4.4.3 stabil transfizierten und selektionierten Zelllinien HEK SNAP-5HT_{1a} und HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} zum Einsatz. Um Rückschlüsse auf die Veränderung der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität ziehen zu können, werden beide Zelllinien mit 1 μ M des 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT, einer Kombination aus 1 μ M 8-OH-DPAT und 1 μ M des 5HT_{2a}R-Agonisten TCB-2 oder 1 μ M TCB-2 alleine für jeweils 15 min behandelt. Die Datenanalyse erfolgt, wie in Abschnitt 4.4.7 im Detail beschrieben, in Hinblick auf Parameter wie die Diffusionskoeffizienten der einzelnen Rezeptorzustände, die Verteilung der Zustände sowie die räumliche Begrenzung der Diffusion. Darüber hinaus wird untersucht, ob die Expression und Stimulation des 5HT_{2a}R einen Einfluss auf die Homooligomerisierung des 5HT_{1a}R haben.

5.3.2.1 5HT_{2a}R-Einfluss auf den Diffusionskoeffizient des 5HT_{1a}Rezeptors

Der 5HT_{1a}R ist auf der Oberfläche der HEK Zellen in drei Rezeptorzuständen zu finden: dem immobilen Zustand S1, dem langsam diffundierenden Zustand S2 und dem schnell diffundierenden Zustand S3. Zunächst werden die Diffusionskoeffizienten (D) der drei Zustände auf der Oberfläche der HEK SNAP-5HT_{1a} und HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen unter verschiedenen Stimulationsbedingungen (siehe Tabelle 15 und Abbildung 15) einander gegenüber gestellt. Sind die Zellen lediglich mit der Pufferkontrolle behandelt, ergeben sich in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen Diffusionskoeffizienten für S1 von $0,028 \pm 0,0004 \mu\text{m}^2/\text{s}$, für S2 von $0,055 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für S3 von $0,217 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$. In HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen zeigt der 5HT_{1a}R im unstimulierten Zustand Diffusionskoeffizienten für S1 (D_{S1}) von $0,023 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$, für S2 von $0,048 \pm 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für S3 von $0,197 \pm 0,026 \mu\text{m}^2/\text{s}$.

Die Stimulation mit 1 μ M 8-OH-DPAT ergibt in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen für die Diffusionskoeffizienten von S1 bis S3 keine signifikanten Veränderungen. Auch in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen erwirkt die Stimulation mit 8-OH-DPAT keine wesentlichen Veränderungen der Diffusionskoeffizienten, verglichen mit der Kontrollbedingung. Es ist jedoch festzuhalten, dass sich die Diffusionskoeffizienten D_{S1} und

D_{S2} der verschiedenen Zelllinien statistisch signifikant voneinander unterscheiden ($p(D_{S1}) = 0,0157$, $p(D_{S2}) = 0,0126$).

Die 15-minütige Inkubation der beiden Zelllinien mit einer Kombination aus $1 \mu\text{M}$ 8-OH-DPAT und $1 \mu\text{M}$ TCB-2 ergibt weder signifikante Veränderungen der Diffusionskoeffizienten zu den Kontrollbedingungen innerhalb der jeweiligen Zelllinie noch zwischen den beiden Zelllinien.

Werden die Zellen mit dem 5HT_{2a}R-Agonisten TCB-2 stimuliert, so erhöht sich der Diffusionskoeffizient im langsam diffundierenden Zustand S2 in HEK SNAP-5HT1a Zellen deutlich auf $0,061 \pm 0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ verglichen mit der Kontrollbedingung ($p = 0,0370$). In HEK Zellen, die auch den 5HT_{2a}R exprimieren, kommt es nicht zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Diffusionskoeffizienten für S1 bis S3. Es fällt lediglich auf, dass sich D_{S2} nach TCB-2 Stimulation zwischen den beiden Zelllinien signifikant voneinander unterscheidet ($p = 0,0122$).

Tabelle 15: Diffusionskoeffizienten (D) für die Rezeptorzustände S1 bis S3

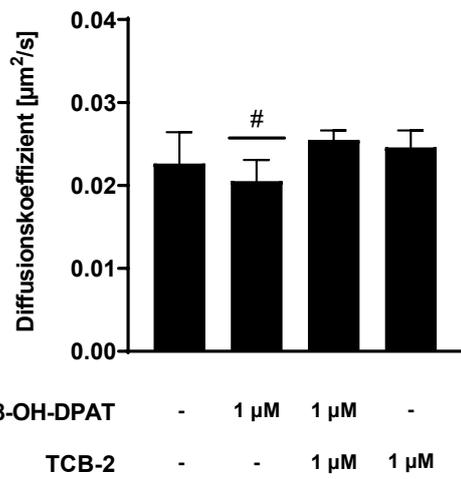
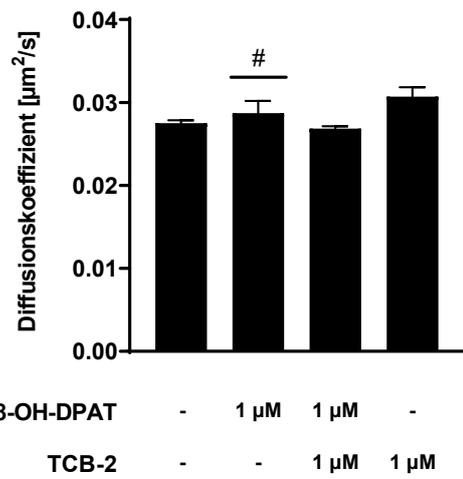
Die angegebenen Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten dargestellt. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 15 dargestellten Balkendiagrammen. Daten, die mit einem Stern markiert sind (*), weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

	HEK SNAP-5HT1a			HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a		
	D [$\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$]			D [$\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$]		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Kontrolle	0,028 \pm 0,0004	0,055 \pm 0,001	0,217 \pm 0,004	0,023 \pm 0,004	0,048 \pm 0,005	0,197 \pm 0,026
1 μM 8-OH-DPAT	0,029 \pm 0,001 #	0,056 \pm 0,001 #	0,222 \pm 0,004	0,022 \pm 0,003 #	0,048 \pm 0,001 #	0,207 \pm 0,004
1 μM 8-OH-DPAT + 1 μM TCB-2	0,027 \pm 0,000	0,057 \pm 0,001	0,215 \pm 0,002	0,025 \pm 0,001	0,052 \pm 0,001	0,223 \pm 0,007
1 μM TCB-2	0,031 \pm 0,001	0,061 \pm 0,002 *	0,215 \pm 0,004	0,025 \pm 0,002	0,051 \pm 0,002	0,213 \pm 0,006

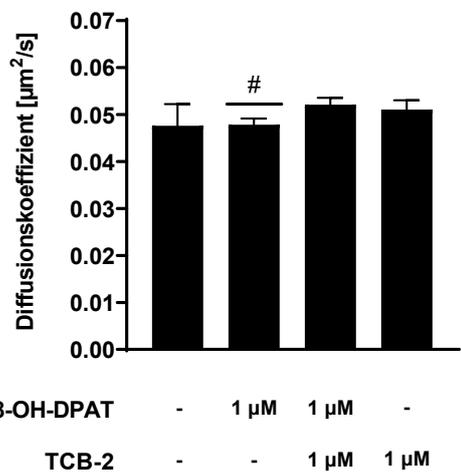
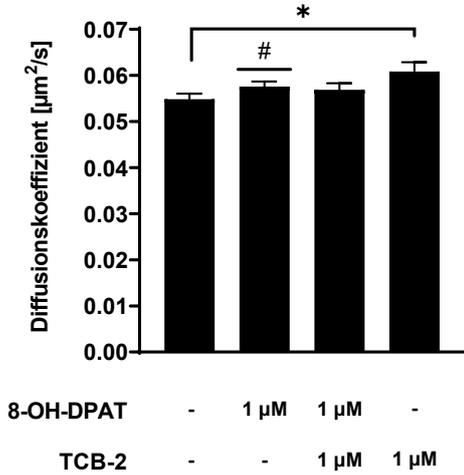
A HEK SNAP-5HT1a

B HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a

S1



S2



S3

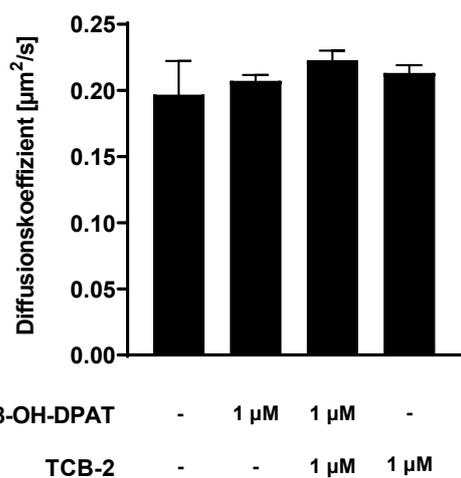
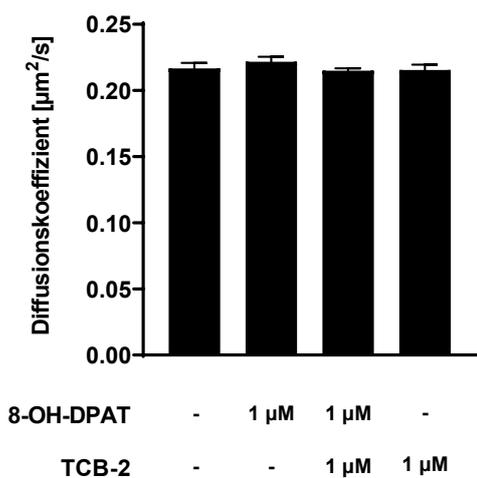


Abbildung 15: Diffusionsverhalten von SNAP-5HT_{1a}R

Das Diffusionsverhalten von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT1a (A) und HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (B) mittels SPT untersucht. Es sind die Diffusionskoeffizienten (in $\mu\text{m}^2/\text{s}$) für die jeweilige Zelllinie (A) oder (B) und für die Rezeptorzustände S1-S3 dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer-

bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 1 μM 8-OH-DPAT, 1 μM TCB-2 oder einer Kombination der beiden Liganden für ca. 15 min. Die Daten basieren auf mindestens drei unabhängigen Experimenten, die mit Hilfe der vbSPT-Analyse ausgewertet werden. Daten, die mit einem Stern (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

5.3.2.2 5HT_{2a}R-Einfluss auf die Verteilung der 5HT_{1a}-Rezeptorzustände

Mit Hilfe der MATLAB-basierten vbSPT-Analyse ist es möglich, neben den Diffusionskoeffizienten der einzelnen Rezeptorzustände auch die Verteilung der Rezeptoren auf die Zustände S1 bis S3 zu untersuchen. In Abbildung 16 ist die Zuordnung der Rezeptoren zu den Zuständen graphisch dargestellt, die korrespondierenden Daten sind in Tabelle 16 aufgelistet. Es werden auch bei der Verteilung der Zustände die Behandlung von HEK SNAP-5HT_{1a} und HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen mit einer Pufferkontrolle, 1 μM 8-OH-DPAT, 1 μM 8-OH-DPAT mit 1 μM TCB-2 oder 1 μM TCB-2 miteinander verglichen. Die Datenanalyse läuft dabei so ab, wie in Abschnitt 4.4.7 beschrieben.

Nach einer 15-minütigen Behandlung mit einer Pufferlösung ergibt sich in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen eine Verteilung auf die Zustände für S1 von $20,8 \pm 1,0$ %, für S2 von $58,1 \pm 0,4$ % und für S3 von $21,1 \pm 1,0$ %. In HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen gehören $22,4 \pm 3,2$ % der 5HT_{1a}R zu S1, $62,4 \pm 4,0$ % gehören zu S2 und $15,2 \pm 1,9$ % zu S3. Es fällt auf, dass der Anteil von 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand S3 in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} deutlich größer ist als in den Zellen ohne 5HT_{2a}R ($p = 0,0099$).

Werden die Zellen 15 min lang mit 1 μM 8-OH-DPAT behandelt, kommt es innerhalb der Zelllinien – verglichen mit der jeweiligen Kontrollbedingung – nicht zu signifikanten Veränderungen. In HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen sinkt der Anteil der 5HT_{1a}R in S1 im Vergleich zur Kontrollbedingung allerdings von $22,4 \pm 3,1$ % auf $14,5 \pm 2,9$ % ab. Dabei steigt der Anteil an 5HT_{1a}R, die dem Zustand S2 zuzuordnen sind, von $62,4 \pm 4,0$ auf $69,4 \pm 3,6$ % an. Der Anteil des 5HT_{1a}R in S2 ist in den HEK Zellen ohne 5HT_{2a}R wesentlich geringer als in den Zellen mit 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren ($p = 0,0088$). Dafür ist der Anteil von 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand S3 in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen deutlich größer als in den HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen ($p = 0,0242$).

Auch die Inkubation der Zellen mit 1 μM 8-OH-DPAT und 1 μM TCB-2 führt innerhalb der einzelnen Zelllinien nicht zu wesentlichen Veränderungen der Verteilung der 5HT_{1a}R auf die

Rezeptorzustände S1 bis S3. Der Anteil der 5HT_{1a}R in S3 ist in den HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen jedoch signifikant größer als in den HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen ($p = 0,0063$).

Nach 15-minütiger Stimulation mit 1 μ M TCB-2 verändern sich die Zustandsverteilungen in den beiden HEK Zelllinien nicht bedeutend von den jeweiligen Kontrollbedingungen. Der Anteil der 5HT_{1a}R im langsam diffundierenden Zustand S2 ist in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mit $51,4 \pm 2,4 \%$ wesentlich kleiner als in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen ($65,1 \pm 3,2 \%$, $p = 0,0058$). Gleichzeitig liegt der S3-Anteil der 5HT_{1a}R in den Zellen ohne 5HT_{2a}R mit $21,8 \pm 1,4 \%$ bedeutend höher als in den Zellen, die beide 5HT-Rezeptoren exprimieren ($p = 0,0064$). Hier beträgt der Anteil am schnell diffundierenden Zustand S3 $15,6 \pm 0,8 \%$.

Tabelle 16: Verteilung SNAP-5HT_{1a}R auf die Zustände S1 bis S3

Die angegebenen Daten werden als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen SPT-Experimenten dargestellt. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 16 dargestellten Balkendiagrammen. Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen laut der einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

	HEK SNAP-5HT _{1a}			HEK SNAP-5HT _{1a} HiBiT-5HT _{2a}		
	Verteilung der Zustände [%]			Verteilung der Zustände [%]		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Kontrolle	20,8 \pm 1,0	58,1 \pm 0,4	21,1 \pm 1,0 #	22,4 \pm 3,1	62,4 \pm 4,0	15,2 \pm 1,9 #
1 μM 8-OH-DPAT	22,3 \pm 2,7	56,4 \pm 2,5 #	21,3 \pm 1,0 #	14,5 \pm 2,9	69,4 \pm 3,6 #	16,1 \pm 1,1 #
1 μM 8-OH-DPAT + 1 μM TCB-2	21,5 \pm 1,4	56,5 \pm 2,1	22,0 \pm 1,0 #	22,9 \pm 1,7	61,8 \pm 2,4	15,3 \pm 1,0 #
1 μM TCB-2	26,8 \pm 2,5	51,4 \pm 2,4 #	21,8 \pm 1,4 #	19,3 \pm 2,5	65,1 \pm 3,2 #	15,6 \pm 0,8 #

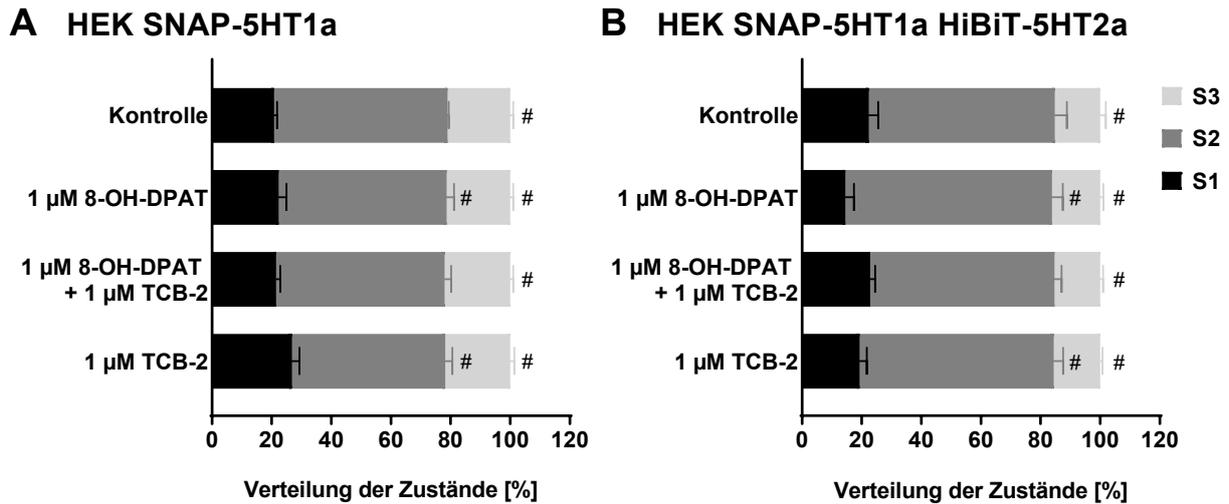


Abbildung 16: Verteilung der Rezeptorzustände S1-S3 von SNAP-5HT_{1a}R

Die Verteilung der Rezeptorzustände S1 bis S3 von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT1a (**A**) und HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (**B**) mittels SPT untersucht. Die Verteilung wird als Anteil (in Prozent) abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Zellen werden mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 1 µM 8-OH-DPAT, 1 µM TCB-2 oder einer Kombination der beiden Liganden für ca. 15 min inkubiert. Die Daten der mindestens drei unabhängigen Experimente werden mittels vbSPT-Analyse ausgewertet. Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen laut der einfachen Varianzanalyse (one-way ANOVA) statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

5.3.2.3 5HT_{2a}R-Einfluss auf die räumliche Begrenzung der 5HT_{1a}R-Diffusion

Ein weiterer sehr aussagekräftiger Parameter zur Charakterisierung der lateralen Mobilität von Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist das Maß der räumlichen Begrenzung der Diffusion. Die zuvor identifizierten Rezeptorpfade werden dazu, wie in Abschnitt 4.4.7.2 beschrieben, analysiert. Die resultierenden Daten zur Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt, die korrespondierenden numerischen Daten finden sich in Tabelle 17. Im unbehandelten Zustand ergibt sich in HEK SNAP-5HT1a Zellen ein Anteil räumlich begrenzt diffundierender 5HT_{1a}R im S1 Zustand von $20,3 \pm 2,0$ %, im Zustand S2 von $48,7 \pm 6,0$ % und im Zustand S3 von $95,3 \pm 1,3$ %. In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a sind 5HT_{1a}-Rezeptoren in S1 zu $32,8 \pm 2,8$ %, in S2 zu $59,1 \pm 9,7$ % und in S3 zu $97,2 \pm 2,0$ % in ihrer Diffusion begrenzt. Dabei fällt auf, dass das Maß der räumlichen Begrenzung im Zustand S1 in den HEK SNAP-5HT1a Zellen mit $20,3 \pm 2,0$ % wesentlich kleiner ist als in den Zellen, die auch 5HT_{2a}R exprimieren. Hier sind in S1 mit $32,8 \pm 2,8$ % wesentlich mehr Rezeptoren in ihrer Diffusion begrenzt ($p = 0,0031$).

Nach 15-minütiger Inkubation der Zellen mit 1 µM des 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT ergibt sich in keiner der beiden Zelllinien eine wesentliche Veränderung des Anteils räumlich begrenzt diffundierender Rezeptoren verglichen mit den jeweiligen Pufferkontrollen. Es ist allerdings

herauszustellen, dass 5HT_{1a}R im immobilen Zustand S1 in HEK SNAP-5HT1a Zellen ($18,8 \pm 0,3 \%$) wesentlich seltener der räumlichen Begrenzung unterliegen als in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen ($27,3 \pm 3,7 \%$, $p = 0,0365$). Auch im schnell diffundierenden Zustand S3 ist der Anteil begrenzter Rezeptoren in HEK SNAP-5HT1a Zellen mit $92,1 \pm 0,2 \%$ deutlich kleiner als in Zellen, die auch den 5HT_{2a}R exprimieren. Hier sind die 5HT_{1a}R in S3 zu $97,6 \pm 1,0 \%$ räumlich begrenzt ($p = 0,0110$).

Durch die Inkubation mit der Kombination aus $1 \mu\text{M}$ 8-OH-DPAT und $1 \mu\text{M}$ TCB-2 diffundieren 5HT_{1a}R in HEK SNAP-5HT1a Zellen nicht wesentlich mehr oder weniger beschränkt als in der Pufferkontrolle. In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen wird die räumliche Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R durch die Kombination der beiden 5HT-Agonisten im immobilen Zustand S1 jedoch signifikant auf $19,7 \pm 2,5 \%$ gesenkt (vgl. Pufferkontrolle: $32,8 \pm 2,8 \%$, $p = 0,0398$).

5HT_{1a}R in HEK SNAP-5HT1a Zellen, die 15 min lang mit $1 \mu\text{M}$ TCB-2 behandelt werden, sind im Zustand S3 mit $90,7 \pm 1,2 \%$ weniger räumlich begrenzt als in der Kontrollbedingung ($p = 0,0116$). Innerhalb der HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen treten keine deutlichen Veränderungen auf.

Tabelle 17: Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 17 dargestellten Balkendiagrammen. Daten, die mit einem Stern (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

	HEK SNAP-5HT1a			HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a		
	Anteil räumlich begrenzter Rezeptoren [%]			Anteil räumlich begrenzter Rezeptoren [%]		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Kontrolle	$20,3 \pm 2,0 \#$	$48,7 \pm 6,0$	$95,3 \pm 1,3$	$32,8 \pm 2,8 \#$	$59,1 \pm 9,7$	$97,2 \pm 2,0$
1 μM 8-OH-DPAT	$18,8 \pm 0,3 \#$	$44,8 \pm 0,9$	$92,1 \pm 0,2 \#$	$27,3 \pm 3,7 \#$	$60,3 \pm 7,0$	$97,6 \pm 1,0 \#$
1 μM 8-OH-DPAT + 1 μM TCB-2	$18,1 \pm 1,4$	$50,9 \pm 0,9$	$94,2 \pm 0,5$	$19,7 \pm 2,5 \#$	$49,6 \pm 3,0$	$95,6 \pm 1,0$
1 μM TCB-2	$16,3 \pm 0,4$	$43,1 \pm 0,9$	$90,7 \pm 1,2 \#$	$22,5 \pm 1,5$	$50,5 \pm 6,3$	$96,6 \pm 1,3$

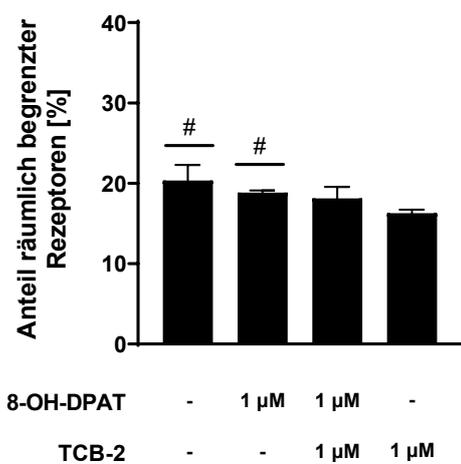
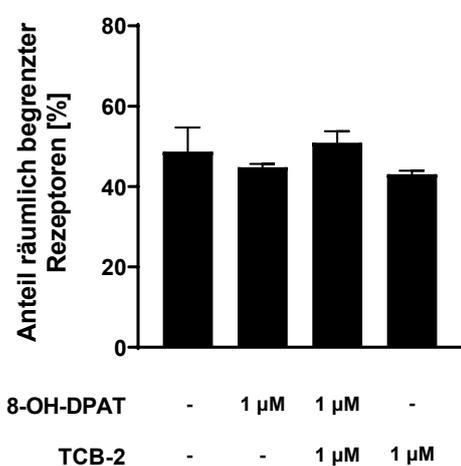
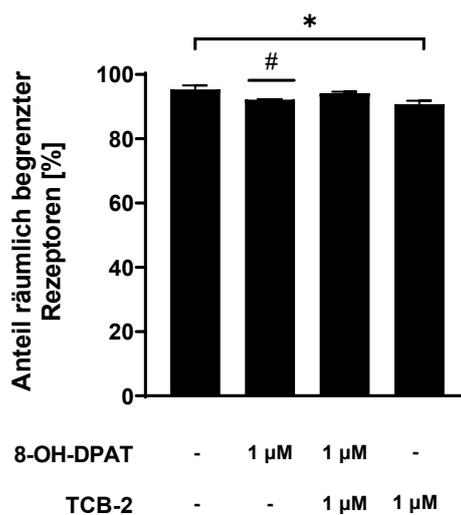
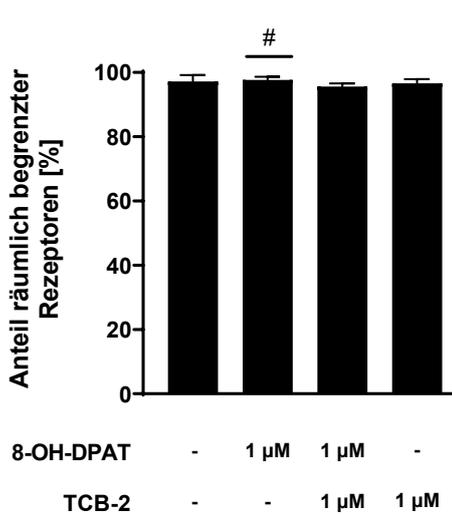
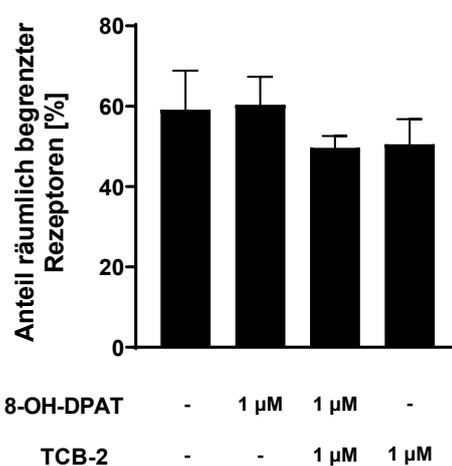
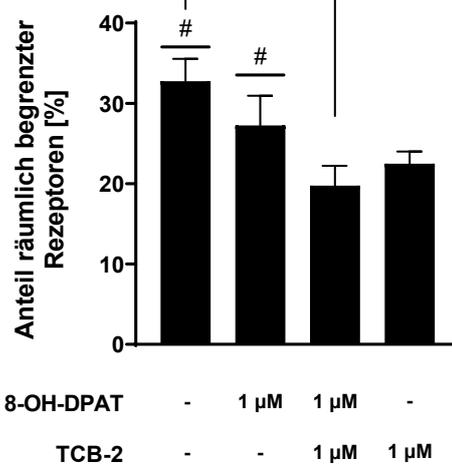
A HEK SNAP-5HT_{1a}**S1****S2****S3****B** HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a}

Abbildung 17: Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT_{1a}R

Der Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT_{1a}R wird auf der Oberfläche von HEK SNAP-5HT_{1a} (A) und HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen (B) untersucht. Die Anteile sind in Prozent abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Dazu erfolgt die Inkubation der Zellen entweder mit einer Puffer-

bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 1 μ M 8-OH-DPAT, 1 μ M TCB-2 oder einer Kombination der beiden Liganden für ca. 15 min. Für die Auswertung der Daten der mindestens drei unabhängigen Experimente findet die „State confinement analysis“ auf Basis der vbSPT-Daten Anwendung. Daten, die durch einen Stern (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

Im Rahmen der Analyse der räumlichen Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R wird auch untersucht, wie sich die mittlere Größe des Diffusionsbereichs unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen verändert. Zu diesem Zweck ist die mittlere Größe als Quadratwurzel der konvexen Zelloberfläche in nm angegeben. Graphisch sind die Ergebnisse in Abbildung 18 dargestellt, numerisch in Tabelle 18 aufgelistet. Unter Kontrollbedingungen ergeben sich in HEK SNAP-5HT1a Zellen für den immobilen S1 Zustand eine Größe des Diffusionsbereichs von $82,2 \pm 1,2$ nm, für den langsam diffundierenden Zustand S2 beträgt die Größe $100,1 \pm 0,9$ nm und für den schnell diffundierenden Zustand S3 $112,6 \pm 4,4$ nm. In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a sind es in S1 $77,2 \pm 5,0$ nm, in S2 $82,1 \pm 8,3$ nm und in S3 $115,3 \pm 7,0$ nm.

In HEK SNAP-5HT1a Zellen führt die Stimulation mit 1 μ M 8-OH-DPAT zu keiner wesentlichen Veränderung der Diffusionsfläche der 5HT_{1a}R. Die Fläche wird in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen im Zustand S3 deutlich auf $72,6 \pm 7,2$ nm reduziert ($p = 0,0115$). Somit ist der Diffusionsbereich in S3 in den HEK Zellen, die beide 5HT-Rezeptoren exprimieren, auch signifikant kleiner als in den HEK Zellen ohne 5HT_{2a}R ($p < 0,0001$).

Die Behandlung beider HEK Zelllinien mit der Kombination aus 1 μ M 8-OH-DPAT und 1 μ M TCB-2 führt nicht zu einer deutlichen Veränderung der mittleren Größe des Diffusionsbereichs der 5HT_{1a}R in einem der Zustände S1 bis S3. Auch zwischen den Zelllinien unterscheiden sich die Flächen nicht besonders stark voneinander.

Nach der Inkubation beider Zelllinien mit 1 μ M TCB-2 vergrößert sich die Diffusionsfläche im schnell diffundierenden Zustand S3 in HEK SNAP-5HT1a Zellen von $112,6 \pm 4,4$ nm in der Pufferkontrolle auf $124,3 \pm 2,2$ nm ($p = 0,0365$). In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen sinkt die Größe des Diffusionsbereichs in S3 nach TCB-2 Stimulation auf $88,9 \pm 7,6$ nm, sodass sich in S3 ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Zelllinien ergibt ($p = 0,0005$).

Tabelle 18: Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 18 dargestellten Balkendiagrammen. Daten, die mit einem Stern (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind,

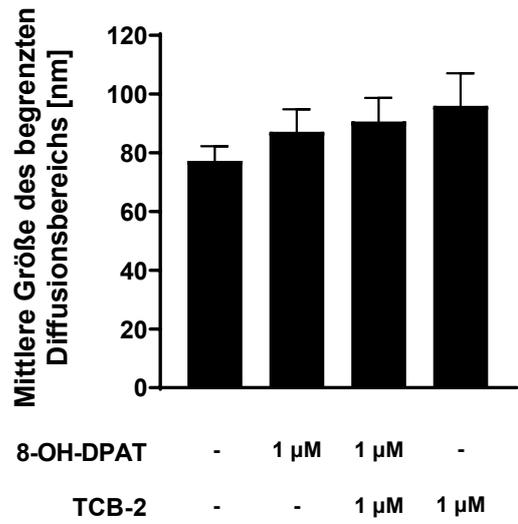
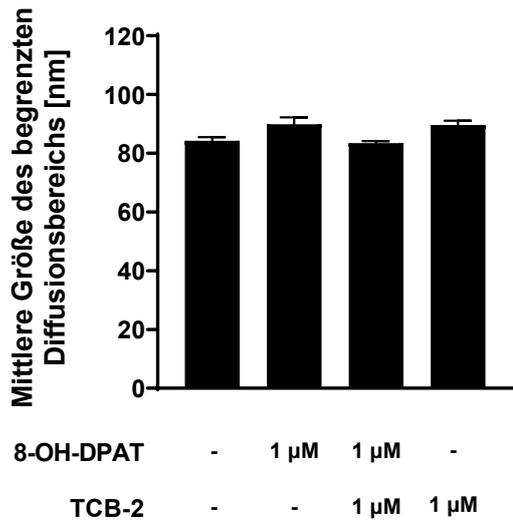
weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

	HEK SNAP-5HT1a			HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a		
	Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs [nm]			Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs [nm]		
	S1	S2	S3	S1	S2	S3
Kontrolle	82,2 ± 1,2	100,1 ± 0,9	112,6 ± 4,4	77,2 ± 5,0	82,1 ± 8,3	115,3 ± 7,0
1 µM 8-OH-DPAT	89,9 ± 2,4	99,8 ± 2,4	119,2 ± 2,4 #	87,2 ± 7,7	88,5 ± 10,9	72,6 ± 7,2 * #
1 µM 8-OH-DPAT + 1 µM TCB-2	83,4 ± 0,7	99,4 ± 0,5	115,9 ± 0,6	90,6 ± 8,1	97,6 ± 10,2	97,8 ± 9,0
1 µM TCB-2	89,6 ± 1,4	104,5 ± 1,7	124,3 ± 2,2 * #	95,9 ± 11,1	101,0 ± 9,9	88,9 ± 7,6 #

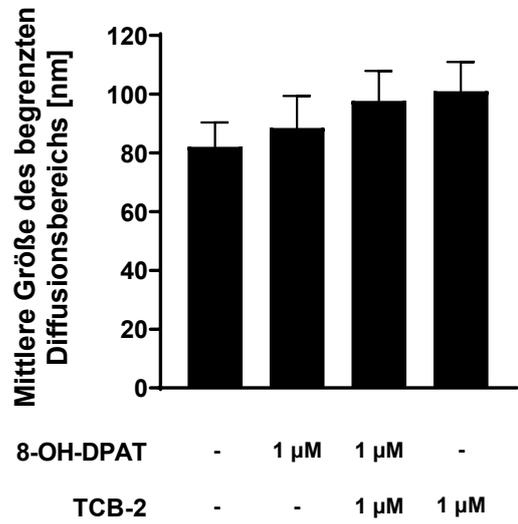
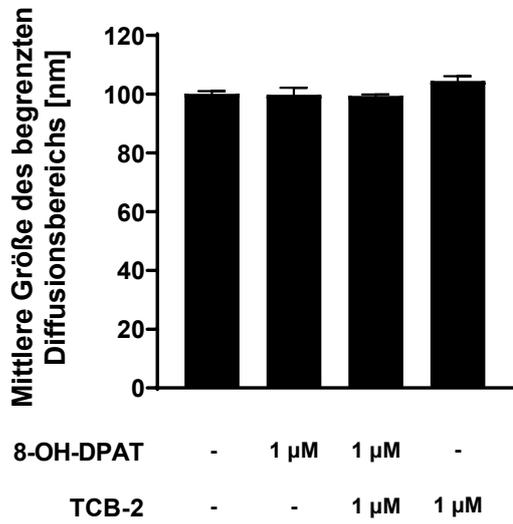
A HEK SNAP-5HT1a

B HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a

S1



S2



S3

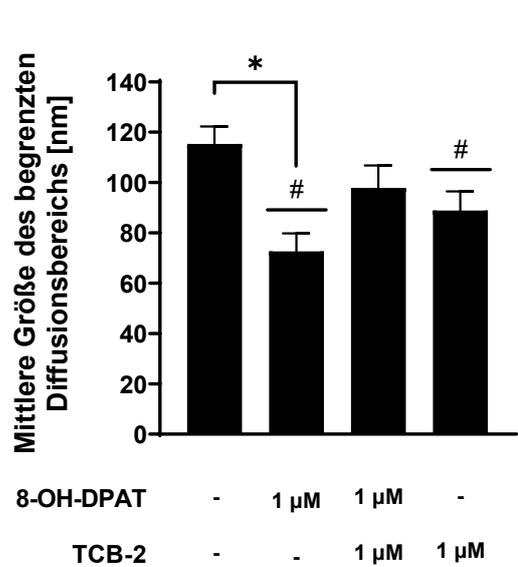
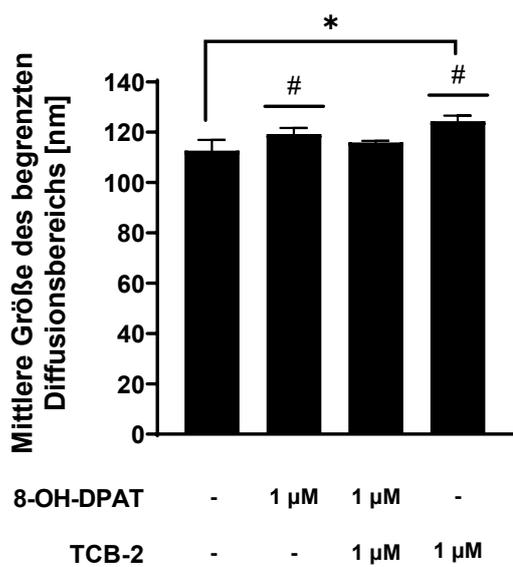


Abbildung 18: Mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT1aR

Die mittlere Größe des begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT1a (**A**) und HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen (**B**) untersucht. Die mittlere Größe (in nm) ist abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Dazu werden die Zellen mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 1 μ M 8-OH-DPAT, 1 μ M TCB-2 oder einer Kombination der beiden Liganden für ca. 15 min inkubiert. Die Daten der mindestens drei unabhängigen Experimente werden mittels „State confinement analysis“ auf Basis der vbSPT-Daten ausgewertet. Daten, die durch einen Stern (*) markiert sind, weichen laut einfacher Varianzanalyse (one-way ANOVA) signifikant von ihrer Kontrollbedingung ab ($p < 0,05$). Daten, die mit einer Raute (#) markiert sind, weichen entsprechend der einfachen Varianzanalyse statistisch signifikant ($p < 0,05$) von den Daten derselben Bedingung in der jeweils anderen Zelllinie ab.

5.3.2.4 5HT_{2a}R-Einfluss auf die Homooligomerisierung von 5HT_{1a}-Rezeptoren

Die Analyse der Fluoreszenzintensität der aufgezeichneten Signale ermöglicht die Kategorisierung der 5HT_{1a}R entsprechend ihres Homooligomerzustandes. Dabei erfolgt eine MATLAB-basierte Untersuchung der bei der vbSPT-Analyse ausgegebenen Helligkeitsverteilung der Fluoreszenzsignale in einem Gauß'schen Mischungsmodell. Die Ergebnisse der Analyse des Einflusses, den 5HT_{2a}R auf die Homooligomerisierung von 5HT_{1a}R haben, sind graphisch in Abbildung 19 und numerisch in

Tabelle 19 dargestellt. Die 5HT_{1a}R kommen auf der Oberfläche beider HEK Zelllinien als Monomere, Dimere und Trimere vor. Im nur mit Puffer vorbehandelten Zustand ergibt sich in HEK SNAP-5HT1a Zellen eine Verteilung der Oligomere von hauptsächlich Monomeren mit einem Anteil von $68,5 \pm 11,5$ %, dazu kommen $27,1 \pm 9,2$ % Dimere und $4,5 \pm 2,6$ % Trimere. In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen sind ebenfalls hauptsächlich Monomere mit einem Anteil von $84,0 \pm 13,6$ % zu finden, daneben $12,7 \pm 10,4$ % Dimere und $3,3 \pm 3,3$ 5 Trimere.

In den HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen ist dabei zu beachten, dass die als Monomere, Dimere und Trimere identifizierten Oligomere lediglich Hinweis auf den Homooligomerstatus geben. Ein über die Helligkeitsverteilung identifiziertes 5HT_{1a}R-Monomer kann in den 5HT_{2a}R-exprimierenden Zellen somit auch ein Dimer oder Trimer sein, das sich aus einem 5HT_{1a}R und einem oder zwei 5HT_{2a}R zusammensetzt. Gleiches gilt für die über die Helligkeitsverteilung identifizierte Dimere, bei denen zwei 5HT_{1a}R an der Oligomerbildung beteiligt sind.

Beim Vergleich der beiden Zelllinien im Kontrollzustand fällt auf, dass der Anteil gefundener Monomere in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a mit $84,0 \pm 13,6$ % deutlich größer ist als in HEK SNAP-5HT1a Zellen, bei denen $68,5 \pm 11,5$ % der Rezeptoren als Monomere vorliegen. Im Gegensatz dazu ist der Anteil gefundener Dimere mit $12,7 \pm 10,4$ % in den HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen kleiner als die in HEK SNAP-5HT1a Zellen vorkommenden $27,1 \pm 9,2$ % Dimere. Die Behandlung mit den 5HT_{1a}R- bzw. 5HT_{2a}R-

Agonisten oder der Kombination aus beiden führt innerhalb keiner der beiden Zelllinien zu einer statistisch signifikanten Veränderung der Homooligomerverteilungen. Werden beide Zelllinien mit 1 μM 8-OH-DPAT und 1 μM TCB-2 stimuliert, so sind in HEK SNAP-5HT1a Zellen mit $54,6 \pm 11,2$ % deutlich weniger Monomere als in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen zu finden. Hier werden $88,6 \pm 4,2$ % der Rezeptoren aufgrund ihrer Helligkeitsverteilung als Monomere identifiziert. Gleichzeitig sinkt unter 8-OH-DPAT und TCB-2 Behandlung die Anzahl der Trimere von $34,5 \pm 6,0$ % in HEK SNAP-5HT1a Zellen auf $11,3 \pm 4,1$ % gefundene Trimere in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen. Des Weiteren fällt auf, dass die Inkubation der Zellen mit 1 μM 8-OH-DPAT oder der Kombination mit 1 μM TCB-2 in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a dazu führt, dass keine der Rezeptoren mehr als Trimere identifiziert werden. Der Unterschied ist bei der Stimulation mit beiden Agonisten besonders auffällig, in HEK SNAP-5HT1a Zellen liegen hierbei $10,9 \pm 5,5$ % der Rezeptoren als Trimere vor.

Tabelle 19: Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 19 dargestellten Balkendiagrammen.

	HEK SNAP-5HT1a			HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a		
	Anteile der Homooligomere [%]			Anteile der Homooligomere [%]		
	Monomere	Dimere	Trimere	gefundene Monomere	gefundene Dimere	gefundene Trimere
Kontrolle	$68,5 \pm 11,5$	$27,1 \pm 9,2$	$4,5 \pm 2,6$	$84,0 \pm 13,6$	$12,7 \pm 10,4$	$3,3 \pm 3,3$
1 μM 8-OH-DPAT	$73,3 \pm 8,3$	$25,4 \pm 7,6$	$1,3 \pm 1,1$	$79,1 \pm 8,5$	$20,7 \pm 8,4$	$0,0 \pm 0,0$
1 μM 8-OH-DPAT + 1 μM TCB-2	$54,6 \pm 11,2$	$34,5 \pm 6,0$	$10,9 \pm 5,5$	$88,6 \pm 4,2$	$11,3 \pm 4,1$	$0,0 \pm 0,0$
1 μM TCB-2	$63,4 \pm 10,0$	$29,4 \pm 7,7$	$7,2 \pm 2,6$	$63,9 \pm 8,7$	$32,0 \pm 5,1$	$6,4 \pm 3,4$

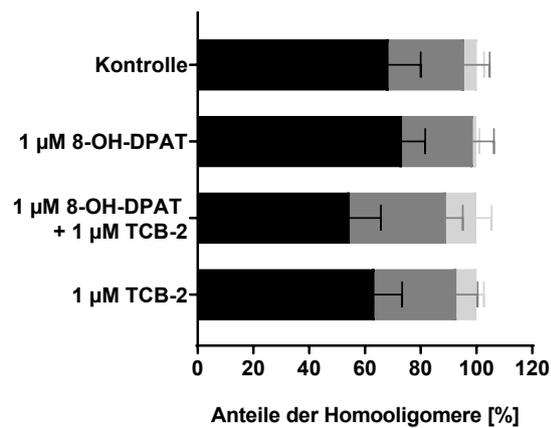
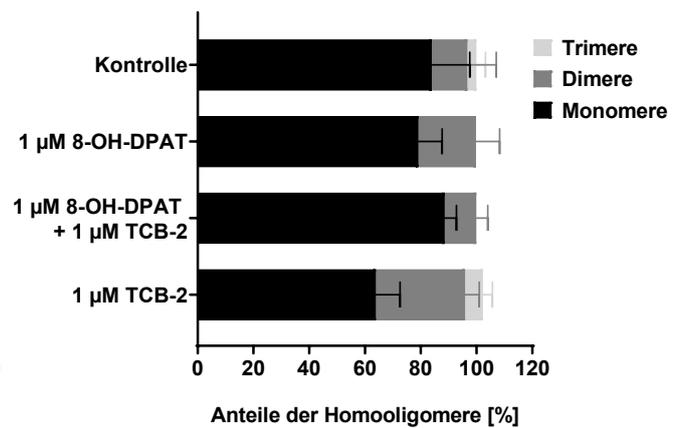
A HEK SNAP-5HT1a**B HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a**

Abbildung 19: Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT_{1a}R

In HEK SNAP-5HT_{1a} (**A**) wird die Verteilung der Homooligomere (Monomere, Dimere, Trimere) von SNAP-5HT_{1a}R untersucht, in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen (**B**) die Verteilung der gefundenen Homooligomere der SNAP-5HT_{1a}R. Die Verteilung ist als Anteil (in Prozent) abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 1 µM 8-OH-DPAT, 1 µM TCB-2 oder einer Kombination der beiden Liganden für ca. 15 min. Die Daten der mindestens drei unabhängigen Experimente werden auf Basis der Fluoreszenzintensitäten mit Hilfe eines Gauß'schen Mischungsmodells analysiert.

5.4 Untersuchung des Einflusses von 5HT₇-Rezeptoren auf 5HT_{1a}-Rezeptoren

5.4.1 Untersuchung des Einflusses des 5HT₇-Rezeptors auf die 5HT_{1a}R-induzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung

Dieser Abschnitt konzentriert sich auf die Analyse des Einflusses, den die gleichzeitige Expression des 5HT₇R auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung hat. Dabei zielt die Etablierung eines 5HT₇-NanoBiT[®]-Assays auf die Untersuchung der Funktionalität des 5HT₇R und des 5HT₇R-Agonisten AS-19 ab. Anhand der Dosis-Wirkungskurve, die auf den AUC der korrigierten β -Arrestin 2 Rekrutierung (Auswertung wie in Abbildung 10 dargestellt) beruht, ergibt sich für AS-19 am 5HT₇-Rezeptor ein EC₅₀-Wert von $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

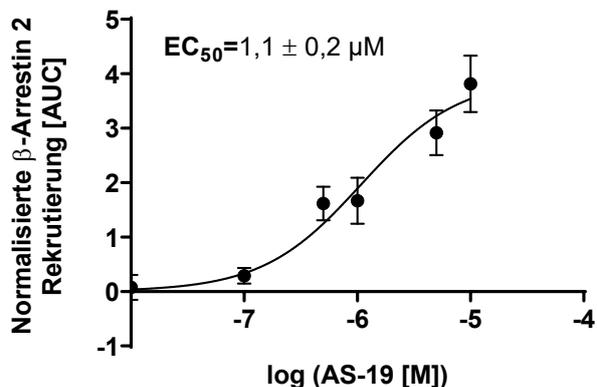


Abbildung 20: β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT₇-NanoBiT[®]-Assay

5HT₇-NanoBiT[®]-Assays werden in HEK 5HT₇-NanoBiT Zellen mit dem 5HT₇R-Agonisten AS-19 durchgeführt. Die Dosis-Wirkungskurve ist aufgetragen als AUC der rekrutierten β -Arrestin 2 Menge gegen den dekadischen Logarithmus der AS-19 Konzentration in Mol pro Liter. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind.

Atwood et al. 2011⁹³ haben die endogene Expression des 5HT₇R in HEK Zellen gezeigt. Aus diesem Grund erfolgt die Aufnahme von Konzentrationsreihen des 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT und einer Kombination aus 8-OH-DPAT und 1 μM AS-19 in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen (Abbildung 21 A). Obwohl die 5HT₇R aufgrund ihrer endogenen Expression gegenüber den überexprimierten 5HT_{1a}R unterrepräsentiert sind, verringert sich der EC₅₀-Wert der Dosis-Wirkungskurve, wenn die Zellen statt mit 8-OH-DPAT alleine auch mit AS-19 behandelt werden. Statistisch signifikant ist diese Veränderung jedoch nicht ($p = 0,2244$; siehe Tabelle 20). Die maximale Signalstärke der 5HT_{1a}R-induzierten β -Arrestin 2 Rekrutierung unterscheidet sich nicht abhängig davon, ob 1 μM AS-19 zugesetzt wird ($p = 0,5244$). Im

niedrigen Konzentrationsbereich von 8-OH-DPAT ist die rekrutierte β -Arrestin 2 Menge allerdings signifikant reduziert ($p = 0,0070$). Sie sinkt dabei auf ein Niveau, das deutlich unterhalb der Baseline und somit unterhalb der konstitutiven β -Arrestin 2 Aktivität des 5HT_{1a}R liegt ($AUC_{\min} = -5,9 \pm 1,2$).

Tabelle 20: Einfluss des 5HT₇R auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen

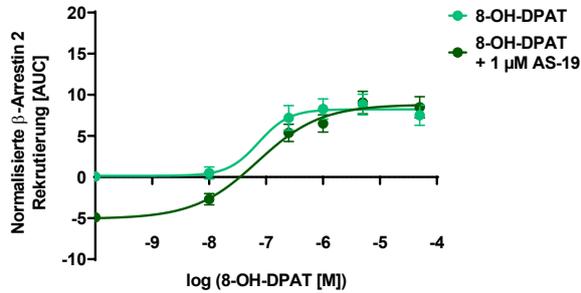
Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben und beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind. Die hier gezeigten Daten korrespondieren mit den in Abbildung 21 A graphisch aufbereiteten Daten.

HEK 5HT _{1a} -NanoBiT			
	8-OH-DPAT	8-OH-DPAT + AS-19	Welch-Test
Minimum der Kurve [AUC]	0,6 \pm 0,6	-5,9 \pm 1,2	p = 0,0070
Maximum der Kurve [AUC]	8,4 \pm 1,2	8,9 \pm 1,3	p = 0,5244
EC ₅₀ [nM]	151,2 \pm 39,6	81,9 \pm 34,4	p = 0,2244

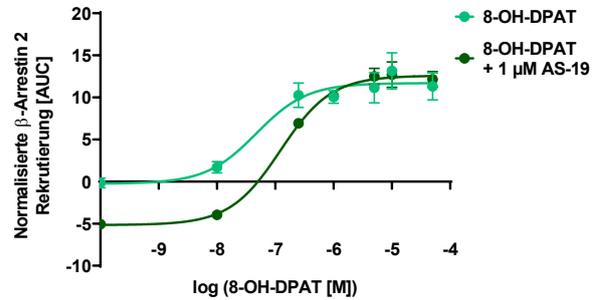
Um diesen Effekt deutlicher darstellen zu können, wird auch der 5HT₇R transient in HEK Zellen transfiziert, sodass er wie der 5HT_{1a}R überexprimiert wird. Es folgt der gleiche Versuch in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT 5HT₇ Zellen (Abbildung 21 B). Das Ergebnis ähnelt dem in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen. Die maximale Signalstärke verändert sich praktisch nicht ($p = 0,7164$), wobei der EC₅₀-Wert von 56,5 \pm 18,8 nM (8-OH-DPAT) in dieser Versuchsreihe auf 125,7 \pm 17,9 nM (8-OH-DPAT + AS-19) steigt. Vor allem unterscheidet sich auch in diesen Zellen die Rekrutierung bei niedrigen Konzentrationen, die β -Arrestin 2 Aktivität sinkt auf ein Niveau unterhalb der konstitutiven Aktivität ($AUC_{0,1 \text{ nM}} = -5,2 \pm 0,2 \text{ nM}$). Ein weiteres Experiment in den HEK 5HT_{1a}-NanoBiT 5HT₇ Zellen soll untersuchen, wie sich die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung verhält, wenn entweder beide 5HT-Rezeptoren mit dem natürlichen Agonisten Serotonin stimuliert werden oder der 5HT₇R durch 30-minütige Vorinkubation mit SB269970 (1 μ M) blockiert wird. In Abbildung 21 C wird deutlich, dass die beiden aufgenommenen Dosis-Wirkungskurven praktisch aufeinanderliegen. Keine der die Dosis-Wirkungskurven beschreibenden Parameter weichen statistisch signifikant voneinander ab (siehe

Tabelle 22). Lediglich der EC₅₀-Wert für die Kombination aus Serotonin und SB269970 ist etwas erhöht, verglichen mit dem Wert für Serotonin alleine.

A HEK 5HT1a-NanoBiT



B HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7



C HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7

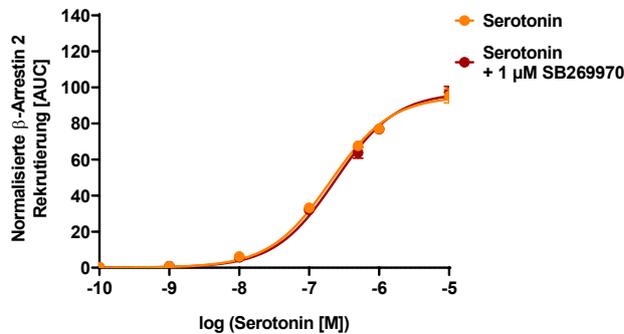


Abbildung 21: Einfluss von 5HT₇R auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung

Für Teil (A) werden 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Experimente in HEK 5HT1a-NanoBiT Zellen mit verschiedenen Konzentrationen 8-OH-DPAT oder einer Kombination mit 1 μM AS-19 aufgenommen. In Teil (B) wird die Konzentrationsreihe aus (A) in HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7 Zellen wiederholt. (C) zeigt Konzentrationsreihen von Serotonin und der Kombination mit 1 μM SB269970 in HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7 Zellen. Die Behandlung mit SB269970 erfolgt für 30 min vor dem Beginn der Chemilumineszenzmessung. Alle Dosis-Wirkungskurven sind als AUC der korrigierten Menge an rekrutiertem β-Arrestin 2 über 60 min gegen den dekadischen Logarithmus der 5HT_{1a}R-Agonistkonzentration in Mol pro Liter dargestellt. Alle Abbildungen zeigen die Daten als Mittelwerte ± Standardfehler und beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind.

Tabelle 21: Einfluss von 8-OH-DPAT und AS-19 auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β-Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7 Zellen

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben und beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind. Die hier gezeigten Daten korrespondieren mit den in Abbildung 21 B graphisch aufbereiteten Daten.

HEK 5HT1a-NanoBiT 5HT7			
	8-OH-DPAT	8-OH-DPAT + AS-19	Welch-Test
Minimum der Kurve [AUC]	-0,3 ± 0,4	-5,2 ± 0,2	p = 0,0022
Maximum der Kurve [AUC]	11,9 ± 1,7	12,7 ± 1,0	p = 0,7164
EC ₅₀ [nM]	56,5 ± 18,8	125,7 ± 17,9	p = 0,0560

Tabelle 22: Einfluss von Serotonin und SB267790 auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT 5HT7 Zellen

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben und beruhen auf mindestens drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind. Die hier gezeigten Daten korrespondieren mit den Abbildung 21 C graphisch aufbereiteten Daten.

HEK 5HT _{1a} -NanoBiT 5HT7			
	Serotonin	Serotonin + SB267790	Welch-Test
Minimum der Kurve [AUC]	0,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,8	p = 0,6983
Maximum der Kurve [AUC]	95,6 \pm 3,9	98,1 \pm 3,7	p = 0,6576
EC ₅₀ [nM]	207,1 \pm 17,7	256,2 \pm 36,5	p = 0,2877

Nachfolgend wird überprüft, ob die reduzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung bei niedrigen 8-OH-DPAT Konzentrationen in den Experimenten der Abbildung 21 A und B möglicherweise über den 5HT_{1a}R vermittelt wird. Zu diesem Zweck erfolgt die Behandlung von HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen mit AS-19, einer Kombination aus AS-19 und dem 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 oder einer Kombination mit dem 5HT₇R-Antagonisten SB269970 (Abbildung 22). Es fällt auf, dass nur der 5HT_{1a}R-Antagonist einen Teil der AS-19 vermittelten Reduktion der β -Arrestin 2 Rekrutierung blockiert. Die AUC-Daten verringern sich dabei von $AUC_{AS-19} = -4,6 \pm 0,4$ auf $AUC_{AS-19 + WAY-100135} = -1,7 \pm 0,1$ statistisch signifikant (p = 0,0016). Für Zellen, die mit SB269970 vorbehandelt sind, ergibt sich eine $AUC_{AS-19 + SB269970} = -5,4 \pm 0,4$, verglichen mit einer alleinigen AS-19 Behandlung ergibt sich damit keine statistisch signifikante Veränderung (p = 0,2534).

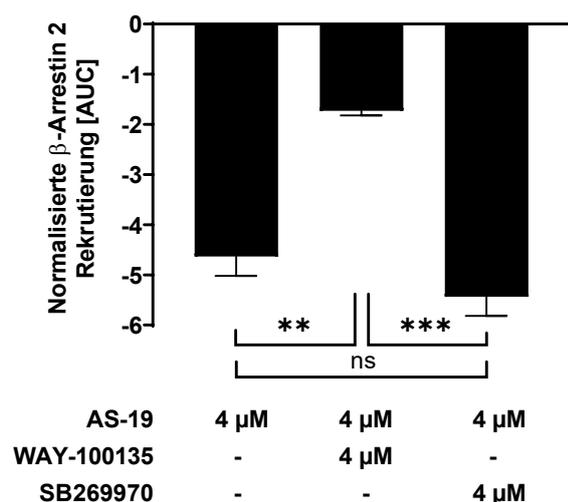


Abbildung 22: AS-19 vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay

Für 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen werden Teile der Zellen für 30 min mit WAY-100135 oder SB269970 vor Beginn der Chemilumineszenzmessung vorinkubiert, nach t = 5 min erfolgt die AS-19 Zugabe. Alle Daten sind als AUC der Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung als Mittelwerte \pm

Standardfehler dargestellt und beruhen auf drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind.

5.4.2 Identifizierung von AS-19 als inverser 5HT_{1a}R-Agonist

Die in Abschnitt 5.4.1 dargestellten Daten deuten darauf hin, dass der 5HT₇R-Agonist AS-19 die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R auf ein Niveau unterhalb der konstitutiven Aktivität des Rezeptors absenkt. Liganden, die einen solchen Effekt erzeugen, bezeichnet man als inverse Agonisten.^{94,95} Um dieser Hypothese nachzugehen, wird die Wirkung des bekannten inversen 5HT_{1a}R-Agonisten Spiperon auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung untersucht und mit AS-19 verglichen. Im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ergibt sich eine IC₅₀-Konzentration für Spiperon von $27,5 \pm 3,9$ nM und eine IC₅₀-Konzentration für AS-19 von $824,5 \pm 47,3$ nM. Die maximale Reduktion der konstitutiven 5HT_{1a}R-Aktivität von AS-19, bezogen auf die Reduktion durch Spiperon, beträgt $91,4 \pm 7,6$ % (% E_{max}).

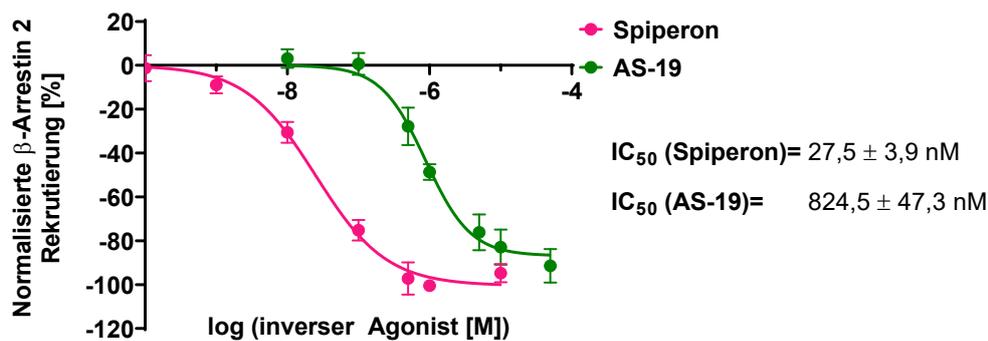


Abbildung 23: β -Arrestin 2 Rekrutierung inverser Agonisten im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay

Für 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Experimente in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen werden den Zellen nach $t = 5$ min verschiedene Konzentrationen AS-19 und Spiperon zugesetzt. Die Dosis-Wirkungskurven sind relativ zu der durch $10 \mu\text{M}$ Spiperon reduzierten Menge an rekrutiertem β -Arrestin 2 in Prozent gegen den dekadischen Logarithmus der Ligandkonzentration in Mol pro Liter dargestellt. Die Abbildung zeigt Mittelwerte \pm Standardfehler von drei unabhängigen Experimenten, die in Triplikaten durchgeführt worden sind.

5.4.3 Untersuchung des Einflusses von AS-19 auf die laterale Mobilität des 5HT_{1a}-Rezeptors

Die Durchführung der folgenden SPT-Experimente dient der Untersuchung des Einflusses verschiedener 5HT_{1a}R-Liganden auf die laterale Mobilität des Rezeptors auf der Oberfläche von HEK Zellen. Dazu werden der etablierte inverse 5HT_{1a}R-Agonist Spiperon, der in seiner Funktion als inverser 5HT_{1a}R-Agonist neu beschriebene Ligand AS-19 und jeweils Kombinationen mit dem 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen getestet. Die Durchführung der Experimente erfolgt, wie in Abschnitt 4.4.6 beschrieben. Die Datenanalyse ist in Abschnitt 4.4.7 im Detail ausgeführt und erfolgt in Hinblick auf Parameter wie die Diffusionskoeffizienten der einzelnen Rezeptorzustände, die Verteilung der Zustände sowie die räumliche Begrenzung der Diffusion.

5.4.3.1 Einfluss der 5HT_{1a}R-Liganden auf den Diffusionskoeffizienten

Der 5HT_{1a}R ist auf der Oberfläche der HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen im immobilen Rezeptorzustand S1, im langsam diffundierenden Zustand S2 und im schnell diffundierenden Zustand S3 zu finden. Im ersten Schritt der Analyse werden die Diffusionskoeffizienten (D) der verschiedenen Bedingungen ausgewertet und miteinander verglichen. Die Daten sind graphisch in Abbildung 24 dargestellt und numerisch in Tabelle 23 zu finden. Nach einer 15-minütigen Inkubation der Zellen mit einer Pufferlösung ergeben sich Diffusionskoeffizienten von $0,016 \pm 0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S1, von $0,044 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S2 und von $0,183 \pm 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S3. Keine der durchgeführten Behandlungen führt zu signifikanten Veränderungen der Diffusionskoeffizienten.

Tabelle 23: Diffusionsverhalten von SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Sie korrespondieren mit den in Abbildung 24 gezeigten Balkendiagrammen.

	D [$\frac{\mu\text{m}^2}{\text{s}}$]		
	S1	S2	S3
Kontrolle	0,016 ± 0,002	0,044 ± 0,004	0,183 ± 0,005
4 μM AS-19	0,022 ± 0,003	0,048 ± 0,005	0,202 ± 0,005
4 μM AS-19 + 4 μM WAY-100135	0,020 ± 0,003	0,045 ± 0,004	0,195 ± 0,013
4 μM Spiperon	0,021 ± 0,004	0,050 ± 0,005	0,205 ± 0,004
4 μM Spiperon + 4 μM WAY-100135	0,020 ± 0,004	0,049 ± 0,006	0,207 ± 0,005

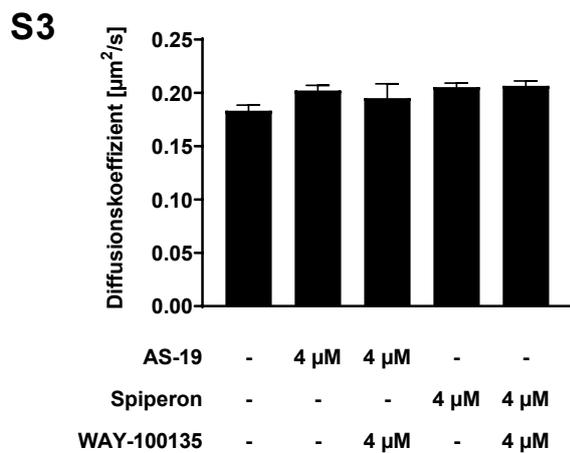
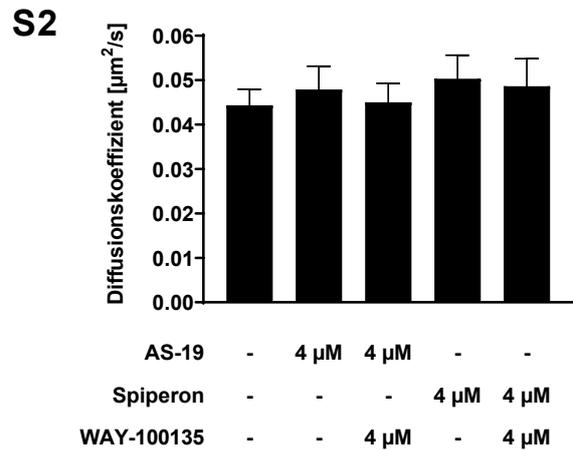
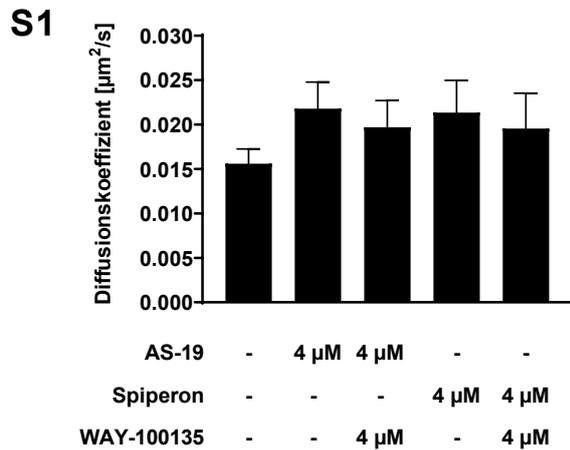


Abbildung 24: Diffusionsverhalten von SNAP-5HT_{1a}R

Das Diffusionsverhalten von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mittels SPT untersucht. Die Abbildungen zeigen die Diffusionskoeffizienten (in μm²/s) für die Rezeptorzustände **S1**, **S2** und **S3**. Die

Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 4 μM AS-19 oder 4 μM Spiperon für ca. 15 min. Des Weiteren werden Zellen mit WAY-100135 für 30 min vorinkubiert, bevor die inversen Agonisten zugegeben werden. Die gezeigten Daten basieren auf vier voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten und wurden mit Hilfe der vbSPT-Analyse ausgewertet.

5.4.3.2 Einfluss der 5HT_{1a}R-Liganden auf die Verteilung der Rezeptorzustände

Die in MATLAB durchzuführende vbSPT-Analyse ermöglicht die Auswertung der Rezeptorverteilung auf die Rezeptorzustände S1 bis S3. Die Ergebnisse der Auswertung sind in Abbildung 25 und Tabelle 24 dargestellt. Werden die HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mit einer Pufferlösung zur Kontrolle inkubiert, verteilen sich die 5HT_{1a}R zu $21,3 \pm 4,2$ % auf den immobilen Rezeptorzustand S1, zu $60,2 \pm 2,0$ % auf den langsam diffundierenden Zustand S2 und zu $18,5 \pm 2,9$ % auf den schnell diffundierenden Zustand S3. Die Behandlung der Zellen mit den inversen 5HT_{1a}R-Agonisten Spiperon und AS-19 sowie deren Kombinationen mit WAY-100135 führt nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Verteilung der Rezeptorzustände.

Tabelle 24: Verteilung von SNAP-5HT_{1a}R auf die Zustände S1 bis S3

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Sie korrespondieren mit den in Abbildung 25 gezeigten Balkendiagrammen.

	Verteilung der Zustände [%]		
	S1	S2	S3
Kontrolle	21,3 \pm 4,2	60,2 \pm 2,0	18,5 \pm 2,9
4 μM AS-19	24,4 \pm 4,2	57,1 \pm 3,1	18,6 \pm 1,5
4 μM AS-19 + 4 μM WAY-100135	24,5 \pm 6,4	56,9 \pm 3,9	18,5 \pm 3,2
4 μM Spiperon	21,6 \pm 3,1	60,7 \pm 3,8	17,7 \pm 2,2
4 μM Spiperon + 4 μM WAY-100135	23,4 \pm 4,3	58,4 \pm 2,3	18,2 \pm 2,6

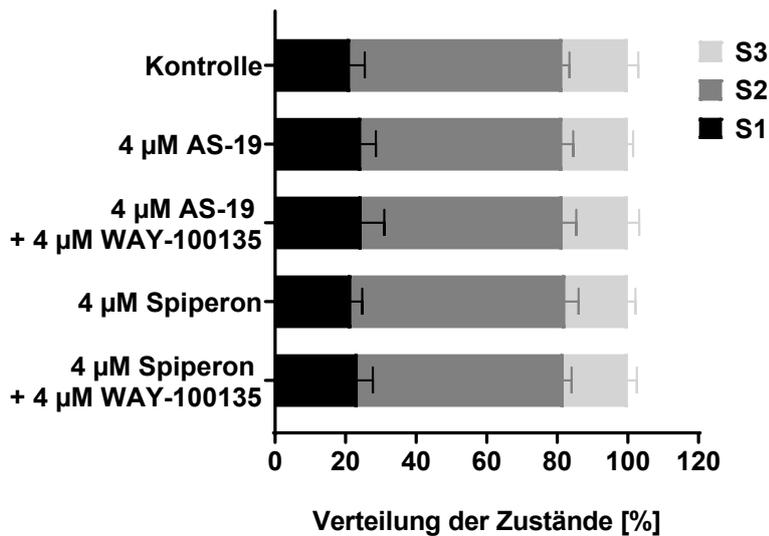


Abbildung 25: Verteilung der Rezeptorzustände S1-S3 von SNAP-5HT_{1a}R

Die Verteilung der Rezeptorzustände S1 bis S3 von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mittels SPT untersucht. Die Verteilung wird als Anteil (in Prozent) abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 4 μ M AS-19 oder 4 μ M Spiperon für ca. 15 min. Weitere Teile der Zellen werden für 30 min mit WAY-100135 vorinkubiert, anschließend ca. 15 min mit dem jeweiligen inversen Agonisten behandelt und schließlich im SPT vermessen. Die Daten der vier unabhängigen Experimente werden mittels vbSPT-Analyse ausgewertet.

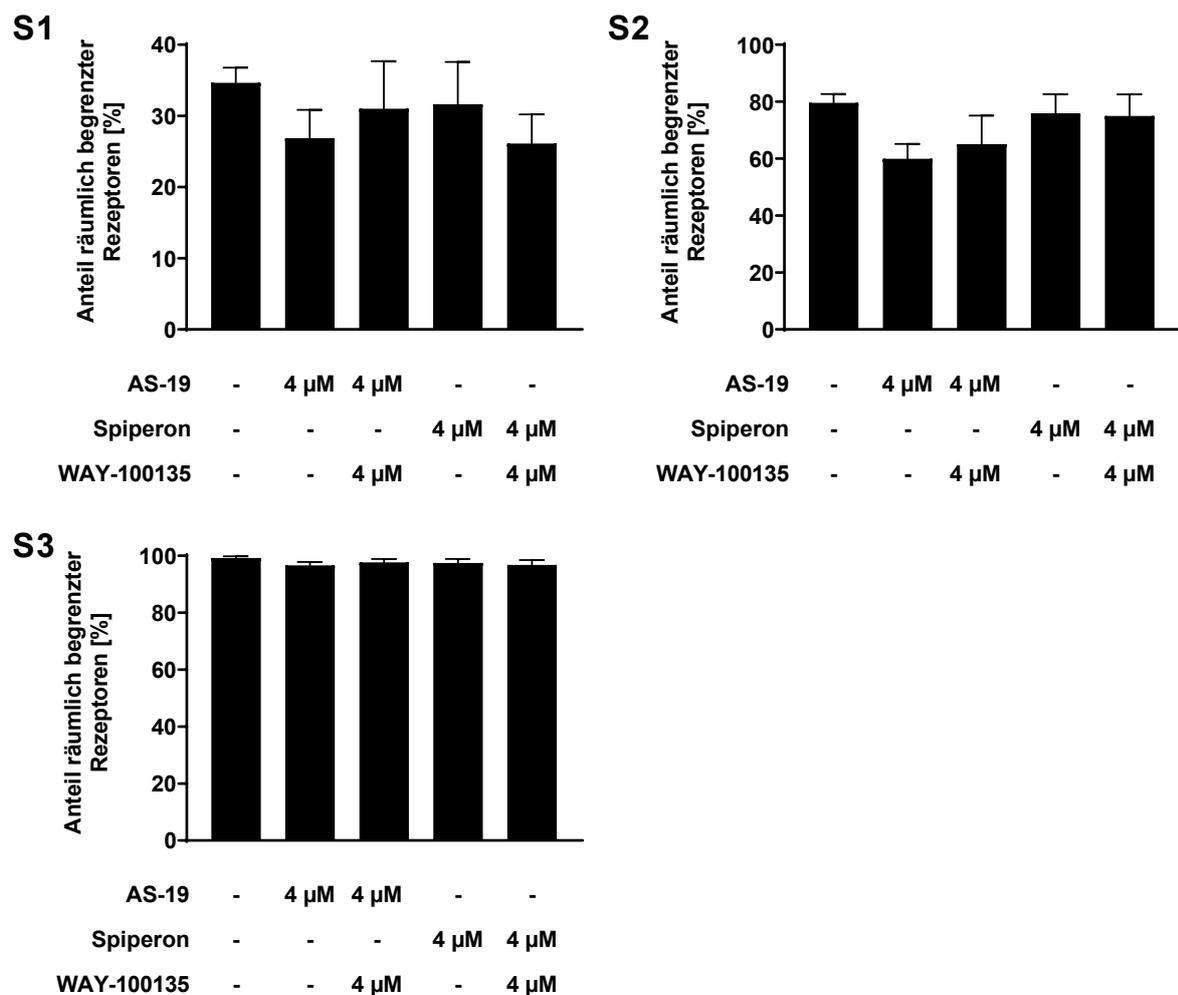
5.4.3.3 Einfluss der 5HT_{1a}R-Liganden auf die räumliche Begrenzung der 5HT_{1a}R-Diffusion

Als nächstes wird untersucht, welchen Einfluss die 5HT_{1a}R-Liganden auf die räumliche Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R haben. Das Vorgehen bei der Analyse der Daten ist im Abschnitt 4.4.7.2 im Detail aufgeführt. Die Ergebnisse der Analyse sind in Abbildung 26 und Tabelle 25 graphisch und numerisch dargestellt. Zellen, die mit lediglich einer Pufferlösung vorbehandelt sind, zeigen in S1 zu $34,6 \pm 2,1$ %, in S2 zu $79,5 \pm 3,1$ % und in S3 zu $99,2 \pm 0,7$ % eine räumliche Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R. Die Begrenzung der Diffusion sinkt in den Rezeptorzuständen S1 und S2 bei 4 μ M AS-19 Stimulation um 22,3 % (S1) bzw. 24,7 % (S2), bei gemeinsamer Behandlung mit 4 μ M WAY-100135 ist diese Tendenz etwas rückläufig. Diese Beobachtungen sind nicht statistisch signifikant.

Tabelle 25: Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 26 dargestellten Balkendiagrammen.

	Anteil der räumlich begrenzten Diffusion [%]		
	S1	S2	S3
Kontrolle	34,6 \pm 2,1	79,5 \pm 3,1	99,2 \pm 0,7
4 μM AS-19	26,9 \pm 4,0	59,9 \pm 5,2	96,6 \pm 1,3
4 μM AS-19 + 4 μM WAY-100135	31,0 \pm 6,7	65,0 \pm 10,1	97,7 \pm 1,2
4 μM Spiperon	31,6 \pm 6,0	75,9 \pm 6,7	97,4 \pm 1,4
4 μM Spiperon + 4 μM WAY-100135	26,1 \pm 4,1	74,9 \pm 7,6	96,8 \pm 1,7

**Abbildung 26: Anteil der in ihrer Diffusion räumlich begrenzten SNAP-5HT_{1a}R**

Der Anteil der in ihrer Diffusion eingeschränkten SNAP-5HT_{1a}-Rezeptoren wird in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen untersucht. Die Anteile werden in Prozent abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt entweder mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 4 µM AS-19 oder 4 µM Spiperon für ca. 15 min. Weitere Teile der Zellen werden 30 min lang mit WAY-100135 vorinkubiert, anschließend ca. 15 min mit dem jeweiligen inversen Agonisten behandelt und schließlich im SPT vermessen. Die „State confinement analysis“ der vbSPT-Daten dient der Auswertung der vier unabhängigen Experimente.

Im Zuge der Analyse der räumlichen Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R erfolgt auch die Analyse der mittleren Größe des begrenzten Diffusionsbereichs. Die Größe ist dabei als die Quadratwurzel der konvexen Zelloberfläche in nm angegeben. In der Kontrollbedingung der HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen ergibt sich für den Rezeptorzustand S1 der 5HT_{1a}R eine Größe von $62,6 \pm 3,9$ nm, für S2 eine Größe von $75,3 \pm 3,9$ nm und für S3 $82,1 \pm 4,8$ nm. Auch wenn die Behandlung mit AS-19 im Rezeptorzustand S3 zu einer Vergrößerung des Diffusionsbereichs der 5HT_{1a}R von $82,1 \pm 4,8$ nm auf $102,7 \pm 7,5$ nm führt (siehe Tabelle 26), ist diese, wie auch alle anderen Bedingungen, nicht statistisch signifikant (vgl. Abbildung 27).

Tabelle 26: Mittlere Größe des räumlich begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von mindestens drei voneinander unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 27 dargestellten Balkendiagrammen.

	Mittlere Größe des räumlich begrenzten Diffusionsbereichs [nm]		
	S1	S2	S3
Kontrolle	$62,6 \pm 3,9$	$75,3 \pm 3,9$	$82,1 \pm 4,8$
4 µM AS-19	$78,2 \pm 4,3$	$89,8 \pm 5,4$	$102,7 \pm 7,5$
4 µM AS-19 + 4 µM WAY-100135	$70,7 \pm 4,7$	$82,8 \pm 5,5$	$95,0 \pm 9,5$
4 µM Spiperon	$73,3 \pm 6,9$	$89,9 \pm 11,0$	$97,4 \pm 9,0$
4 µM Spiperon + 4 µM WAY-100135	$69,6 \pm 6,4$	$82,8 \pm 8,6$	$93,3 \pm 11,2$

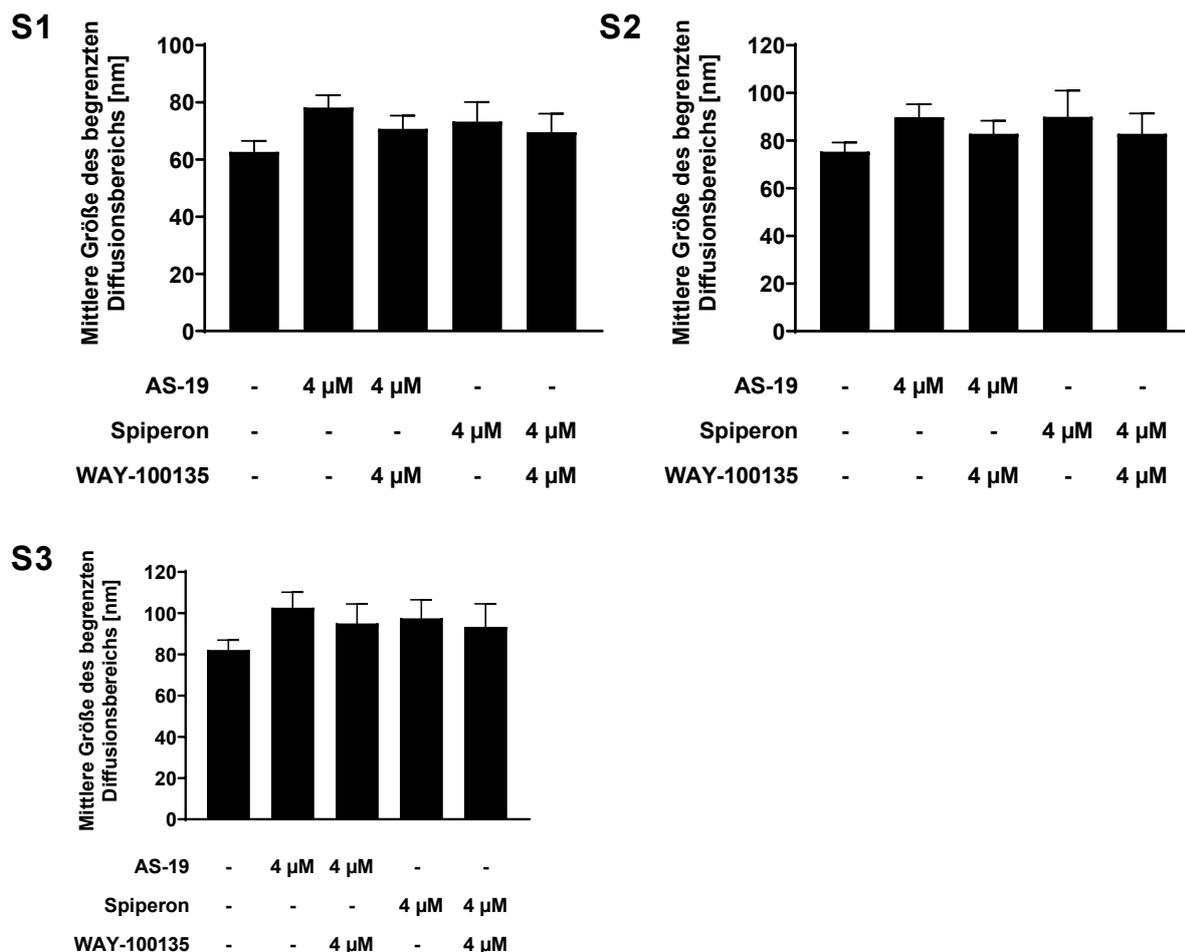


Abbildung 27: Mittlere Größe des räumlich begrenzten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT_{1a}R

Die mittlere Größe des beschränkten Diffusionsbereichs von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen untersucht. Die mittlere Größe (in nm) wird abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 4 μ M AS-19 oder 4 μ M Spiperon für ca. 15 min. Weitere Teile der Zellen werden 30 min lang mit WAY-100135 vorinkubiert, anschließend ca. 15 min mit dem jeweiligen inversen Agonisten behandelt und schließlich im SPT vermessen. Die „State confinement analysis“ der vbSPT-Daten dient der Auswertung der vier unabhängigen Experimente.

5.4.3.4 Einfluss der 5HT_{1a}R-Liganden auf die 5HT_{1a}R-Homooligomerisierung

In einem letzten Auswerteschritt wird untersucht, ob die Behandlung mit den verschiedenen 5HT_{1a}R-Liganden einen Einfluss auf die Homooligomerisierung des 5HT_{1a}R hat. Dazu erfolgt die Analyse der aus den vbSPT-Daten hervorgehenden Helligkeitsverteilungen der Fluoreszenzsignale anhand eines Gauß'schen Mischungsmodells. Die Ergebnisse dieser Analyse sind graphisch in Abbildung 28 und numerisch in Tabelle 27 zu finden. In der Puffer-behandelten Kontrollbedingung der HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen finden sich vor allem Monomere mit einem Anteil von $61,1 \pm 7,5$ %. Darüber hinaus liegen $34,6 \pm 7,4$ % der Rezeptoren als Dimere und $4,1 \pm 3,6$ % als Trimere vor. Keine der Stimulationsbedingungen erwirkt eine signifikante Veränderung des 5HT_{1a}R-Zustands der Homooligomerisierung.

Abbildung 28 stellt allerdings dar, dass der Anteil an 5HT_{1a}R-Monomeren leicht erhöht ist, wenn die Zellen mit AS-19 behandelt werden. Diese Tendenz ist unabhängig davon, ob bei der Behandlung der Zellen auch WAY-100135 zugesetzt ist. Zudem fällt auf, dass der Anteil der Dimere auf Kosten der Monomere etwas ansteigt, wenn die Zellen mit Spiperon inkubiert werden. Diese Tendenz ist aufgehoben, wenn auch WAY-100135 zugesetzt ist.

Tabelle 27: Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT_{1a}R

Die dargestellten Daten sind als Mittelwerte ± Standardfehler von mindestens drei unabhängigen SPT-Experimenten angegeben. Die Daten dieser Tabelle korrespondieren mit den in Abbildung 28 dargestellten Balkendiagrammen.

	Anteile der Homooligomere [%]		
	Monomere	Dimere	Trimere
Kontrolle	61,1 ± 7,5	34,6 ± 7,4	4,1 ± 3,6
AS-19	73,2 ± 14,4	23,0 ± 12,2	3,8 ± 3,0
AS-19 + WAY-100135	76,2 ± 14,8	19,7 ± 11,0	4,1 ± 4,1
Spiperon	45,7 ± 7,0	49,9 ± 7,6	4,2 ± 2,5
Spiperon + WAY-100135	65,6 ± 11,9	28,5 ± 9,6	5,7 ± 3,2

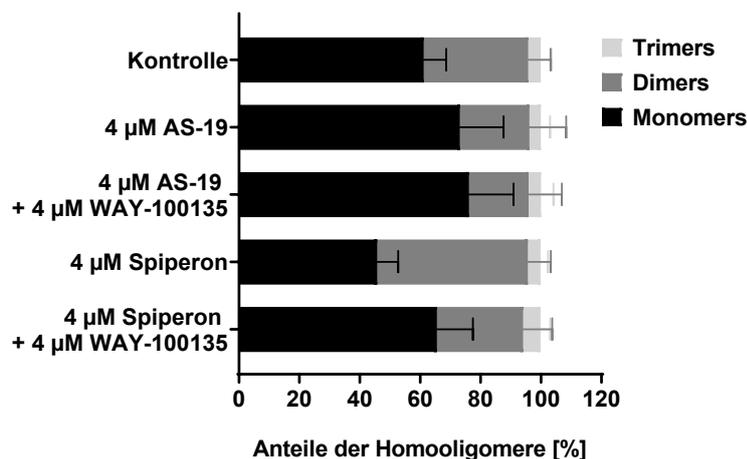


Abbildung 28: Analyse der Homooligomerzustände von SNAP-5HT_{1a}R

Die Verteilung der Homooligomere von SNAP-5HT_{1a}R wird in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen untersucht. Die Verteilung ist in Prozent abhängig von der jeweiligen Testbedingung dargestellt. Die Inkubation der Zellen erfolgt mit einer Puffer- bzw. Lösungsmittelkontrolle, mit 4 µM AS-19 oder 4 µM Spiperon für ca. 15 min. Weitere Teile der Zellen werden 30 min lang mit WAY-100135 vorinkubiert, anschließend ca. 15 min mit dem jeweiligen inversen Agonisten behandelt und schließlich im SPT vermessen. Ein Gauß'sches Mischungsmodell dient der Auswertung der Fluoreszenzintensitäten der vier unabhängigen Experimente.

6. Diskussion

Der 5HT_{1a}-Rezeptor (5HT_{1a}R) spielt aufgrund seiner regulatorischen Rolle in der prä- und postsynaptischen serotonergen Neurotransmission eine wichtige Rolle für physiologische Mechanismen wie Schlaf und Stressantwort, aber auch für depressive Erkrankungen und Angststörungen.¹⁻⁴ Um Pathomechanismen dieser Erkrankungen vollständig zu verstehen und damit besser behandeln zu können, ist es von essentieller Bedeutung, die Funktion der an der Pathogenese beteiligten Rezeptoren vollumfänglich zu kennen.

Nachdem für Rezeptoren wie den Angiotensin 1-Rezeptor und den μ -Opioidrezeptor gezeigt worden ist, dass essentielle physiologische Funktionen oder Arzneimittelwirkungen eng mit der Signaltransduktion von β -Arrestin 2 zusammenhängen,³⁴⁻³⁹ soll auch für den 5HT_{1a}R die β -Arrestin 2 Rekrutierung weiter charakterisiert werden. Da auch die Kinetik und Dynamik von GPCR-Signaltransduktionsmechanismen von immer größerem Interesse sind,⁴⁰⁻⁴² wird die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-System analysiert. In der Vergangenheit ist bereits gezeigt worden, dass sich das NanoBiT[®]-System hervorragend dazu eignet, die Dynamik und Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung von GPCR wie dem Adenosin-A1-Rezeptor oder dem 5HT_{2a}R u.a. in HEK Zellen zu messen.^{85,96-98}

In der vorliegenden Arbeit wird im ersten Schritt die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK Zellen charakterisiert und die Frage eruiert, ob die 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT und U92016A auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung als Voll- oder Partialagonisten wirken. In der Vergangenheit ist die β -Arrestin 2 Signaltransduktion an 5HT_{1a}R innerhalb verschiedener Studien mit Hilfe diverser Techniken untersucht worden. Die verwendeten Methoden haben dabei gemeinsam, dass es sich um Endpunktbestimmungen 120 bis 240 min nach Ligandzugabe handelt.^{3,23,48,99} Im Rahmen dieser Arbeit kommt für die Messung der 5HT_{1a}R-vermittelten β -Arrestin 2 Rekrutierung ein 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay zum Einsatz. Mit Hilfe dieses Assays ist es möglich, die Kinetik und Dynamik des 5HT_{1a}R nach der Stimulation etwa eine Stunde lang aufzunehmen.

Zunächst erfolgt die Bestimmung von herkömmlichen Parametern zur Wirksamkeit von Liganden. Für den endogenen 5HTR-Agonisten Serotonin ergibt sich im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ein EC₅₀-Wert von $275,0 \pm 14,1$ nM. In der Literatur sind EC₅₀-Werte für Serotonin am 5HT_{1a}R veröffentlicht, die von 45,3 bis 169 nM reichen.^{3,23,24,48,99} Für den Prototyp-5HT_{1a}R-

Agonist 8-OH-DPAT wird im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ein EC₅₀-Wert von 410,0 ± 176,3 nM bestimmt. Die Studien von Newman-Tancredi et al. 2022³, Stroth et al. 2015²³ und Sniecikowska et al. 2019⁴⁸ ergeben in Endpunktbestimmungen der β-Arrestin 2 Rekrutierung EC₅₀-Daten von 15 – 51 nM. Die Variabilität der Ergebnisse sind maßgeblich durch die verschiedenen Assaytypen und die unterschiedlichen Messzeitpunkte der Rekrutierung zu erklären. Im PathHunter[®]-Assay-Kit wird, wie im NanoBiT[®]-Assay, mit Proteinkomplementierung gearbeitet; in diesem Fall bedient man sich der Komplementierung einer β-Galactosidase.¹⁰⁰ Bei der β-Arrestin 2 Bestimmung mit Hilfe des Tango[™] HTR1A-bla U2OS Zell-Kits wird die Rezeptoraktivität indirekt über die Aktivität eines Reportergens gemessen, welches ein quantifizierbares Fluoreszenzsignal des Ausmaßes der Interaktion zwischen Rezeptor und β-Arrestin liefert.¹⁰¹ In beiden Messsystemen dauert die Behandlung der Zellen zunächst 90 min bis 3 h an, bevor 1 h lang mit dem entsprechenden Detektionsreagenz inkubiert wird.^{23,99} Erst dann erfolgt die Messung der β-Arrestin 2 Rekrutierung als Endpunktbestimmung. Die Kinetik des 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays zeigt jedoch, dass die β-Arrestin 2 Rekrutierung nach 55 min bereits deutlich zurückgegangen ist und sich die Kurvenverläufe der Signaltransduktion innerhalb dieser Zeit wesentlich voneinander unterscheiden (siehe Abbildung 10). Um den Unterschied zwischen der zeitabhängigen Auswertung als Fläche unter der Kurve der β-Arrestin 2 Rekrutierung und der Endpunktbestimmung zu verdeutlichen, sind die beiden Auswertungsmethoden einander in Abbildung 29 gegenübergestellt. Die Abbildung zeigt, dass die β-Arrestin 2 Rekrutierung durch die kinetische Analyse in einem deutlich größeren dynamischen Rahmen aufgezeichnet wird und dass die Endpunktanalyse Unterschiede in der Rekrutierung der verschiedenen Liganden wesentlich weniger klar darstellt.

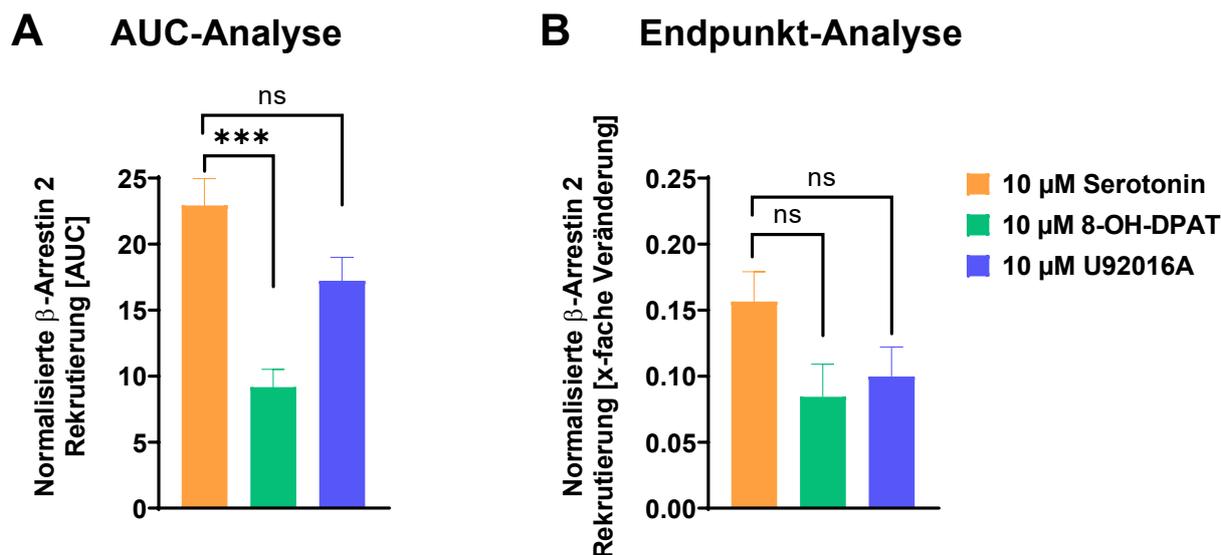


Abbildung 29: Vergleich der AUC- und Endpunktanalyse der β -Arrestin 2 Rekrutierung im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay

Die gezeigten Daten basieren auf den in Abbildung 12 gezeigten 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays. In Teil (A) ist die β -Arrestin 2 Menge als AUC der korrigierten Kinetik der Rekrutierung berechnet. In Teil (B) ist der Endpunkt der Messung nach 60 min als x-fache Veränderung der β -Arrestin 2 Rekrutierung dargestellt.

Für den 5HT_{1a}R-Agonisten U92016A ergibt sich im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ein EC₅₀-Wert von $308,3 \pm 48,1$ nM. McCall et al. 1994¹⁰² haben die Reduktion der Dopamin- und Serotonin-Akkumulation durch U92016A in Ratten gemessen. Dabei veröffentlichen sie EC₅₀-Daten für U92016A von $0,012$ μ mol/kg (vgl. 8-OH-DPAT: $0,048$ μ mol/kg). Auch in unserem NanoBiT[®]-Assay ist der EC₅₀-Wert von U92016A kleiner als der von 8-OH-DPAT, allerdings nicht in einem ähnlichen Verhältnis, wie im McCall et al. Experiment. Die Vergleichbarkeit der beiden Methoden ist aufgrund der unterschiedlichen Spezies und Messparameter stark kompromittiert.

Auch der Einfluss des 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung wird im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay untersucht. In der Literatur gibt es bisher keine IC₅₀-Daten, die die Wirkung des Liganden auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung charakterisieren. Clifflé et al. 1993¹⁰³ haben die Verdrängung von [³H]8-OH-DPAT an hippocampalem Rattengewebe gemessen und einen IC₅₀-Wert von 34 ± 3 nM erhalten. Soares-da-Silva et al. 1996¹⁰⁴ haben die 8-OH-DPAT-vermittelte Stimulation der Na⁺-K⁺-ATPase mit WAY-100135 blockiert und einen IC₅₀-Wert von 20 nM ermittelt. Im Rahmen dieser Arbeit wird mit Hilfe des 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assays ein IC₅₀-Wert für WAY-100135 von $285,3 \pm 45,0$ nM bestimmt. Die Variationen der aufgeführten IC₅₀-Daten lassen sich auf die verschiedenen Messmethoden sowie Signalwege und Ligandwirkungen zurückführen, die bei der jeweiligen Datenerhebung verwendet wurden. Clifflé et al. 1993¹⁰³ haben eine reine Bindungsstudie durchgeführt,

während Soares-da-Silva et al. 1996¹⁰⁴ die Blockade eines spezifischen 8-OH-DPAT-vermittelten Effekts untersucht haben. Dabei ist mittlerweile bekannt, dass ein Ligand unterschiedlichen Einfluss auf verschiedene Signalwege nehmen kann.^{36,105,106} Die bloße Bindung oder Nicht-Bindung eines Liganden an den Rezeptor hat nicht automatisch denselben Einfluss auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung wie auf andere Signalwege.

Ein weiteres Ziel im Rahmen dieser Dissertation ist es, anhand der gemessenen Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung zu zeigen, ob die 5HT_{1a}R-Agonisten auf diesem Signalweg als Voll- oder Partialagonist wirken. Um die Aktivität eines Liganden im Verhältnis zum endogenen 5HT-Rezeptorliganden Serotonin einordnen zu können, werden % E_{max}-Werte errechnet. Diese geben an, wie viel β -Arrestin 2 der Rezeptorligand im Vergleich zur maximalen durch Serotonin rekrutierten β -Arrestin 2 Menge zu aktivieren vermag. Der % E_{max}-Wert ist bisher das entscheidende Kriterium, Partial- und Vollagonisten voneinander zu unterscheiden.^{23,107}

Gemessen im Reporteragen-Assay sind für 8-OH-DPAT % E_{max}-Werte von 95 %³ und 101 %⁴⁸ veröffentlicht. Im β -Galactosidase Komplementierungsassay ist ein % E_{max}-Wert für 8-OH-DPAT von 44,5 % bestimmt worden.²³ Der für diese Arbeit im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay bestimmte % E_{max}-Wert beträgt $32,2 \pm 2,0$ %. Die Unterschiede bei den % E_{max}-Daten aus den verschiedenen Assay-Systemen sind auffällig groß und charakterisieren 8-OH-DPAT nicht eindeutig als Partial- oder Vollagonisten. Es stellt sich die Frage, ob bei einer hohen 8-OH-DPAT Konzentration im Reporteragen-System die maximale Aktivierung des Reporteragens bereits erreicht wird, sodass sich für 8-OH-DPAT eine mit Serotonin vergleichbare Menge an rekrutiertem β -Arrestin 2 ergibt. Auffällig ist nämlich, dass im Assay-System, das mit Proteinkomplementierung arbeitet, ein ähnlicher % E_{max}-Wert wie im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay erreicht wird.

Ein weiterer großer Vorteil des NanoBiT[®]-Assay-Systems liegt darin, dass durch die Aufzeichnung der Rezeptorkinetik ein weiterer Parameter zur Charakterisierung von Liganden ermittelt werden kann: die Initiale Rate (IR).⁷ Die IR gibt die Signalgenerierungsrate Agonist-besetzter Rezeptoren zu Beginn der β -Arrestin 2 Rekrutierung an, bevor es zur Gegenregulation des erzeugten Signals kommt. Für 8-OH-DPAT ergibt sich eine IR von $28,4 \pm 0,4$ %, bezogen auf die IR von Serotonin. Diese Daten stehen im Einklang mit dem für 8-OH-DPAT im NanoBiT[®]-Assay bestimmten % E_{max}-Wert ($32,2 \pm 2,0$ %) und sind qualitativ ähnlich groß wie die Endpunktdaten, die im Proteinkomplementierungssystem²³ bestimmt worden sind. Damit ist

deutlich gezeigt, dass der 5HT_{1a}R-Agonist 8-OH-DPAT als Partialagonist auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}-Rezeptor wirkt.

Auch für den 5HT_{1a}R-Agonist U92016A gilt es zu untersuchen, ob er als Partial- oder Vollagonist auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung wirkt. Für die maximale Rekrutierung, verglichen mit Serotonin, ergibt sich ein % E_{max}-Wert von $77,7 \pm 9,1$ %. McCall et al. 1994¹⁰² haben in CHO Zellen, die 5HT_{1a}R stabil exprimieren, die Blockade der Forskolin-induzierten cAMP-Akkumulation gemessen. Dabei haben sie für U92016A eine „Intrinsische Aktivität“ von 0,82 im Vergleich zu Serotonin bestimmt, die mit einem % E_{max}-Wert von 82 % vergleichbar ist. Die IR beträgt im Vergleich zu Serotonin allerdings $108,1 \pm 3,4$ %. Damit ist die Signalgenerierungsrate von U92016A größer als die von Serotonin. Das erzeugte Signal wird so viel stärker gegenreguliert,⁷ dass die in 55 min nach Stimulation rekrutierte β -Arrestin 2 Menge in Summe geringer ist als die durch Serotonin rekrutierte Menge. Basierend auf der bisherigen Klassifizierung von Liganden als Partial- oder Vollagonisten anhand von % E_{max}-Daten, ist U92016A als Partialagonist einzustufen. Aufgrund des hohen IR-Werts ist jedoch festzuhalten, dass die Initiation des U92016A-vermittelten Signals vollagonistisch vonstattengeht. Diese Daten unterstreichen die Tatsache, dass die Aktivierung der Signaltransduktion Ligand-spezifisch abläuft. Trotz der nicht statistisch signifikanten Unterschiede der β -Arrestin 2 Rekrutierung bei der Auswertung in AUC oder am Endpunkt (siehe Abbildung 29) zeigen die IR und der Kurvenverlauf bedeutsame Unterschiede, verglichen mit der Serotonin-vermittelten β -Arrestin 2 Rekrutierung. Diese Daten verdeutlichen, dass zur umfassenden Charakterisierung von Rezeptorliganden auch IR-Daten erforderlich sind, um ihr vollständiges Verständnis zu ermöglichen.

Im Laufe der letzten Jahrzehnte hat sich der wissenschaftliche Konsens immer weiter dahin entwickelt, GPCR nicht mehr als isolierte Proteine zu sehen, sondern sie als zusammenwirkende Einheit mit Signalproteinen und anderen GPCR zu verstehen.^{108,109}

Schon in den 1990-er Jahren haben Yates et al. 1990¹¹⁰ gezeigt, dass depressive Patienten post mortem eine erhöhte 5HT_{2a}-Rezeptordichte aufweisen, sodass sie 5HT_{2a}R eine Rolle bei der Entstehung von Depressionen zuschreiben. Zuvor hatten andere Gruppen bereits dargestellt, dass klassische Antidepressiva 5HT_{2a}R blockieren können.^{111,112} Eison und Mullis 1996⁶² postulieren, dass die akute Gabe von 5HT_{1a}R-Agonisten 5HT_{2a}R-vermittelte Effekte blockiert und dass die chronische Anwendung der Agonisten die Herunterregulation von 5HT_{2a}R bewirkt. Zhang et al. 2004¹¹³ zeigen an Ratten, dass eine 5HT_{2a}-Rezeptoraktivierung die

Desensitivierung der 5HT_{1a}R-vermittelten Freisetzung von Oxytocin und Adrenocorticotropin nach sich zieht. Borroto-Escuela et al. 2017⁸ weisen im rekombinanten Zellmodell, wie auch in Hirnzellen von Ratten, die Heteromerisierung von 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren erstmals direkt nach. Dabei zeigen sie auch, dass die Menge der 5HT_{1a}/5HT_{2a}-Rezeptorkomplexe in den Pyramidenzellen der Rattenhippocampi signifikant durch Stress herunter zu regulieren ist. Agonisten der beiden 5HT-Rezeptoren haben auf die BRET²-Ratio in HEK 293T Zellen keinen Einfluss und verändern die Menge der 5HT_{1a}/5HT_{2a}-Rezeptorkomplexe somit nicht. Die Zugabe von TCB-2 führt in Rattengehirnen (Hippocampus, Frontallappen) jedoch zu einer deutlich reduzierten Bindungsaffinität von Ipsapiron an der 8-OH-DPAT-Bindungsstelle der 5HT_{1a}R. Dieser Effekt ist durch 5HT_{2a}R-Antagonisten blockierbar. Borroto-Escuela et al. 2017⁸ schlagen vor, dass die agonistische Aktivierung des 5HT_{2a}R die Affinität und Erkennung am 5HT_{1a}R-Protomer durch eine hemmende allosterische Rezeptor-Rezeptor-Wechselwirkung herabsetzt. Sie gehen davon aus, dass ihre Ergebnisse Hinweis darauf geben, dass 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heterooligomere eine fein abgestimmte antagonistische Modulation der 5HT_{1a}R-Erkennung vermitteln.⁸ Die stöchiometrische Zusammensetzung der 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heterooligomere ist bisher jedoch unbekannt.

Aufgrund der deutlichen Hinweise auf eine Interaktion zwischen 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren, wird in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Expression und Stimulation des 5HT_{2a}R auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung und laterale Mobilität von 5HT_{1a}R untersucht. Dazu erfolgt in einem eigens zu diesem Zweck etablierten 5HT_{2a}-NanoBiT[®]-System in transient transfizierten HEK Zellen zunächst die Testung der 5HT_{2a}R-Agonisten Serotonin und TCB-2, wobei ihr Effekt auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{2a}R untersucht wird. Für Serotonin ergibt sich ein EC₅₀-Wert für die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{2a}R von $15,5 \pm 5,3$ nM, der Wert für TCB-2 entspricht $13,3 \pm 2,7$ nM. Für Serotonin sind in der Literatur in den unterschiedlichsten Studien EC₅₀-Werte am 5HT_{2a}-Rezeptor zwischen 5 ± 3 nM und 265 ± 55 nM zu finden.¹¹⁴⁻¹¹⁷ Pottie et al. 2023¹¹⁵ arbeiten in HEK 293T Zellen ebenfalls mit einem 5HT_{2a}-NanoBiT[®]-System und messen die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{2a}R. Sie ermitteln dabei einen EC₅₀-Wert für Serotonin von 9,4 nM und liegen dabei sehr nahe an dem in dieser Arbeit bestimmten Wert von 15,5 nM. McLean et al. 2009¹¹⁸ messen in NIH3T3-Zellen die IP₃-Akkumulation nach Stimulation des 5HT_{2a}-Rezeptors mit TCB-2. Dabei erhalten sie einen EC₅₀-Wert von $36 \pm 3,6$ nM. Dieser ist größer als der in dieser Arbeit für TCB-2 ermittelte EC₅₀-Wert von $13,3 \pm 2,7$ nM, was auf die verschiedenen Assay-Systeme zurückzuführen ist.

Als nächstes wird in transient transfizierten Zellen, die neben 5HT_{1a}-LgBiT und SmBiT- β -Arrestin 2 für das NanoBiT[®]-System auch den 5HT_{2a}R exprimieren, analysiert, welchen Einfluss die gleichzeitige Stimulation der Zellen mit TCB-2 hat (siehe Abbildung 14). Dabei zeigt sich, dass Zellen, die neben 8-OH-DPAT auch mit TCB-2 behandelt werden, $24,2 \pm 7,6$ % ($p < 0,05$) weniger β -Arrestin 2 rekrutieren im Vergleich zur Stimulation mit dem 5HT_{1a}R-Liganden alleine. Bei der Kombination aus U92016A und TCB-2 ist die β -Arrestin 2 Menge um $17,4 \pm 2,7$ % ($p < 0,01$) reduziert. Eine Verringerung der β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R durch die zusätzliche Stimulation des 5HT_{2a}R ist zum einen möglicherweise durch die von Borroto-Escuela et al. 2017⁸ gezeigte Tatsache zu erklären, dass die TCB-2 Stimulation des 5HT_{2a}R zu einer reduzierten Bindungsaffinität eines 5HT_{1a}R-Agonisten an der 8-OH-DPAT-Bindungsstelle führt. Zum anderen könnte aber auch die von Zhang et al. 2004¹¹³ gezeigte 5HT_{2a}R-vermittelte Rezeptordesensitivierung des 5HT_{1a}R die verringerte β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R erklären. Auch ein Zusammenspiel aus beiden Effekten ist denkbar.

Serotonin und TCB-2 rekrutieren in Kombination mehr β -Arrestin 2 an den 5HT_{1a}R als Serotonin alleine. Dieser Effekt ist möglicherweise damit zu erklären, dass TCB-2 aufgrund der höheren eingesetzten Konzentration und seiner hohen Affinität am 5HT_{2a}R ($K_i = 0,75 \pm 0,09$ nM)¹¹⁸ in der Lage ist, Serotonin ($K_i = 1,3$ nM)¹¹⁹ aus der Bindung zum 5HT_{2a}R zu verdrängen. Folglich steht eine erhöhte Menge Serotonin für die 5HT_{1a}R-Aktivierung zur Verfügung. Die Daten des NanoBiT[®]-Assays zeigen zusammenfassend, dass die Aktivität des koexprimierten 5HT_{2a}R die Signaltransduktion von 5HT_{1a}R in Bezug auf β -Arrestin 2 negativ beeinflusst.

Über GPCR ist bekannt, dass ihre Signaltransduktion maßgeblich von der lateralen Mobilität der beteiligten Proteine abhängt, was in der Hypothese der mobilen Rezeptoren zusammengefasst ist.¹⁰ Dabei wird die laterale Diffusion membranständiger Proteine von diversen Faktoren beeinflusst. Zum einen führt die Netzstruktur von Aktin-Filamenten unterhalb der Plasmamembran zu ihrer Kompartimentierung, die zusammen mit an den Filamenten assoziierten Transmembranproteinen kurzzeitige Diffusionsbarrieren erzeugen können.^{74,120} Zum anderen gibt es in Zellmembranen hochgradig geordnete Subdomänen, die eine erhöhte Cholesterin- und Glykosphingolipiddichte aufweisen und als Lipid-Rafts bezeichnet werden.¹²¹ Aufgrund der physikalischen Eigenschaften dieser Mikrodomänen sind Lipide und Signalproteine in Zellmembranen nicht homogen verteilt, sondern unterschiedlich ausgeprägt mit Lipid-Rafts assoziiert. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von Proteinen in den

Subdomänen ist neben ihrer Struktur u.a. auch von posttranslationalen Modifikationen abhängig.^{122,123} In den funktionellen Mikrodomänen können Protein-Protein-Interaktionen durch ihre vermehrte Ansammlung teilweise begünstigt vorkommen. So haben Sungkaworn et al. 2017¹²⁴ gezeigt, dass Diffusionsbarrieren, die zumindest teilweise durch Aktin-Filamente, Mikrotubuli und Clathrin-Coated Pits zustande kommen, zur Bildung von Hot Spots beitragen, in denen sowohl GPCR als auch G-Proteine vermehrt vorkommen. Die Kopplung von GPCR und G-Protein sowie die daraus resultierende Signaltransduktion finden hier somit vermehrt statt. Innerhalb der temporären Diffusionsbarrieren können GPCR diffundieren, sie können die Bereiche durch schnelle Hop-Diffusion allerdings auch verlassen. Dies ist von Suzuki et al. 2005¹²⁵ am Beispiel der μ -Opioid-Rezeptoren gezeigt worden. Folglich können Rezeptorpfade, die sog. Trajektorien, die die Diffusionswege von GPCR darstellen, in Abschnitte mit verschiedenen Diffusionseigenschaften aufgeteilt werden. Ein Teil der Diffusionspfade kann dabei die räumliche Begrenzung innerhalb von Mikrodomänen beschreiben, der andere Teil spiegelt die relativ ungehinderte Diffusion außerhalb der Mikrodomänen wider.

Mit Hilfe des Single Particle Trackings (SPT) soll nun untersucht werden, welchen Einfluss die Koexpression von 5HT_{2a}R auf die laterale Mobilität von 5HT_{1a}R hat und ob sich die im NanoBiT[®]-Assay gezeigte Reduktion der Signaltransduktion auch in der lateralen Diffusion niederschlägt. Zu diesem Zweck erfolgt der Vergleich zweier stabil transfizierter HEK Zelllinien (siehe Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9), wobei in einer der beiden Zelllinien lediglich SNAP-5HT_{1a}R überexprimiert werden. In der zweiten HEK Zelllinie sind neben diesen auch HiBiT-5HT_{2a}R überexprimiert. Die Verwendung SNAP-Tag markierter Rezeptoren, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt werden (siehe Abbildung 2), ist im SPT eine gut etablierte Methode, die die Messung der lateralen Diffusion von Rezeptoren auf der Zelloberfläche ermöglicht. Erstmals haben Calebiro et al. 2013¹²⁶ gezeigt, wie die SNAP-Markierung die Charakterisierung der Rezeptormobilität unter basalen Bedingungen unabhängig von der Zugabe fluoreszenzmarkierter Liganden ermöglicht. Ibach et al. 2015¹²⁷ analysieren auf diese Weise die laterale Mobilität von EGF-Rezeptoren in MCF-7 Zellen, Sungkaworn et al. 2017¹²⁴ nutzen die Methode, um die Mobilität von SNAP- α_{2A} -adrenergen Rezeptoren auf der Oberfläche von CHO Zellen im Verhältnis zu Zytoskelett und Clathrin-Coated Pits zu untersuchen. In der Studie von Keksel et al. 2019⁸⁹ wird die laterale Diffusion von β_1 -adrenergen Rezeptoren (β_1 AR) in C6 Zellen auf diese Weise untersucht. Wie in der vorliegenden Studie arbeiten auch Schwenzer et al. 2018¹²⁸ mit HEK Zellen, wobei sie

den Einfluss von β -Arrestin 2 auf die laterale Diffusion von SNAP-markierten β_2 -adrenergen Rezeptoren (β_2 AR) zeigen.

Für die Färbung der SNAP-5HT_{1a}R kommt in der vorliegenden Arbeit das von Hendrik Bußmann dargestellte BG-Dy549-Kopplungsprodukt zum Einsatz (siehe Abbildung 2). In Bussmann et al. 2023⁹⁰ untersucht die Arbeitsgruppe den Einfluss eines Johanniskraut-Extrakts auf die Rezeptormobilität von β_1 AR in C6 Zellen und weist dabei auch nach, dass die Markierung der β_1 AR mit BG-Dy549 die Funktionalität der Rezeptoren nicht beeinflusst.

Ausgehend von den im SPT-Setup registrierten Fluoreszenzsignalen werden mittels „u-track“-Analyse⁹¹ Trajektorien identifiziert. Die Diffusionseigenschaften einzelner Abschnitte dieser Trajektorien werden mit Hilfe der vbSPT-Analyse nach Persson et al. 2013⁹² untersucht. Diese Abschnitte werden entsprechend aufgeteilt und die Diffusionskoeffizienten sowie die Verteilung der Rezeptorzustände ermittelt. Verglichen mit dem Hidden Markov Model ergibt sich für die vbSPT-Analyse der Vorteil, dass diese in der Lage ist, die genannten Kennzahlen auch aus Datensätzen mit kurzen Trajektorien zu extrahieren. Dies ist besonders wichtig, da es bei der Laserbestrahlung von Fluoreszenzfarbstoffen zum Bleichen kommen kann, was statistisch gesehen einen höheren Anteil kurzer Trajektorien nach sich zieht.^{87,92,129,130}

Die vbSPT-Analyse zeigt, dass die SNAP-5HT_{1a}R auf der Oberfläche der HEK Zellen in drei verschiedenen Rezeptorzuständen vorliegen. Dabei handelt es sich um den immobilen Zustand S1, den langsam diffundierenden Zustand S2 und den schnell diffundierenden Zustand S3. Für die Pufferkontrolle ergeben sich in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen Diffusionskoeffizienten für S1 von $0,028 \pm 0,0004 \mu\text{m}^2/\text{s}$, für S2 von $0,055 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für S3 von $0,217 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$. In den HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen betragen die Diffusionskoeffizienten in der Pufferkontrolle für S1 $0,023 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$, für S2 $0,048 \pm 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für S3 $0,197 \pm 0,026 \mu\text{m}^2/\text{s}$ (siehe Abbildung 15 und Tabelle 15). Innerhalb der Pufferkontrolle unterscheiden sich die Diffusionskoeffizienten abhängig davon, ob 5HT_{2a}R koexprimiert wird, nicht signifikant voneinander. Auch Ibach et al. 2015¹²⁷, Aatz et al. 2022¹³¹ und Bussmann et al. 2023⁹⁰ finden für die von ihnen untersuchten EGF-, 5HT_{2a}- bzw. β_1 -adrenergen Rezeptoren mittels vbSPT-Analyse drei Rezeptorzustände. Bussmann et al. 2023⁹⁰ zeigen Diffusionskoeffizienten von $D_{S1} = 0,016 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$, $D_{S2} = 0,034 \pm 0,0002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und $D_{S3} = 0,166 \pm 0,013 \mu\text{m}^2/\text{s}$ in C6 Zellen. Die von Aatz et al. 2022¹³¹ bestimmten Diffusionskoeffizienten in SH-SY5Y Zellen liegen für S1 bei $0,001 \pm 0,000 \mu\text{m}^2/\text{s}$, für S2 bei $0,059 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ und für S3 bei $0,194 \pm 0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Werte der Diffusionskoeffizienten

der einzelnen Zustände weichen zwar in der jeweiligen Zelllinie voneinander ab, sie sind in ihrer Größenordnung jedoch miteinander vergleichbar. Schwenzer et al. 2018¹²⁸ geben für die von ihnen untersuchten SNAP- β_2 AR in HEK Zellen keine einzelnen Diffusionskoeffizienten für die Zustände S1 bis S3 an, sondern errechnen einen Median von $0,060 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Damit liegt die Arbeitsgruppe nahe an den D_{S2} -Werten der SNAP-5HT_{1a}R in den für diese Arbeit verwendeten Zelllinien.

Shrivastava et al. 2022⁷⁹ untersuchen ebenfalls 5HT_{1a}R auf der Oberfläche von HEK Zellen. Sie werten ihre Trajektorien mit Hilfe eines „Multiple Target Tracing“-Programms¹³² aus. Hier werden vier verschiedene Diffusionsmodi charakterisiert, die als zufällig, beschränkt, vorübergehend beschränkt und gerichtet beschrieben werden. Dazu bestimmen sie einen sog. kurzzeitigen Diffusionskoeffizienten D_{1-2} , basierend auf den Trajektorien, die eine begrenzte Diffusion zeigen. Der Koeffizient D_{1-2} für 5HT_{1a}R in ihrem Experiment beträgt $0,044 \pm 0,003 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Der D_{1-2} -Wert liegt somit etwa zwischen den in der vorliegenden Arbeit bestimmten Diffusionskoeffizienten für den immobilen Zustand S1 und den langsam diffundierenden Zustand S2.

Die Stimulation der Zellen mit $1 \mu\text{M}$ 8-OH-DPAT führt innerhalb der jeweiligen Zelllinien nur zu geringfügigen Veränderungen der Diffusionskoeffizienten. Die tendenziellen Veränderungen resultieren jedoch im immobilen und im langsam diffundierenden Zustand in einer signifikanten Unterscheidung der Diffusionskoeffizienten abhängig davon, ob die Zellen auch 5HT_{2a}R exprimieren. In HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen ergibt sich für D_{S1} ein Wert von $0,029 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$, in HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} Zellen ist der D_{S1} -Wert mit $0,022 \pm 0,003 \mu\text{m}^2/\text{s}$ signifikant kleiner. Ein ähnliches Bild zeichnet sich im langsam diffundierenden Zustand S2 ab, hier beträgt der Wert für D_{S2} in Zellen ohne 5HT_{2a}R $0,056 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Für die Zellen, die beide 5HT-Rezeptoren exprimieren, ergibt sich ein signifikant kleinerer D_{S2} -Wert von $0,048 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Im schnell diffundierenden Zustand S3 zeigt sich ein derartig signifikanter Effekt nicht. Die Expression des 5HT_{2a}R scheint in den beiden 5HT_{1a}-Rezeptorzuständen S1 und S2 dazu zu führen, dass die 5HT_{1a}R langsamer diffundieren. Schwenzer et al. 2018¹²⁸ sehen nach der agonistischen Stimulation von β_2 AR in HEK Zellen eine Verschiebung der Diffusionskoeffizienten zu einem verringerten Median. Sie gehen davon aus, dass dieser Effekt auf eine Desensitivierung der β_2 AR vor der Internalisierung zurückzuführen ist. Zhang et al. 2004¹¹³ zeigen, dass die Aktivierung von 5HT_{2a}R zur vermehrten Desensitivierung von 5HT_{1a}R führt. Die in der vorliegenden Studie gezeigte

Reduktion der Diffusionskoeffizienten (für S1 und S2) nach 5HT_{1a}R-Stimulation ist abhängig von der zusätzlichen 5HT_{2a}R-Expression. Eine denkbare Erklärung hierfür ist, dass 5HT_{2a}R die Desensitivierung von 5HT_{1a}R verstärken, sodass diese vermehrt mit Proteinen interagieren, die die 5HT_{1a}R-Internalisierung ermöglichen. Da 5HT_{1a}R bekanntermaßen Clathrin-, Dynamin- und β -Arrestin-abhängig erfolgen kann, könnten diese Komponenten an einem solchen Prozess grundsätzlich beteiligt sein.^{133–135} Auch eine verstärkte Bildung von 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heteromeren vermag die Reduktion der Diffusionskoeffizienten von S1 und S2 zu erklären. Einen solchen Effekt zeigen Váradi et al. 2019¹³⁶ für ErbB2- und ErbB3-Rezeptoren. Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten verdeutlichen, dass bereits die Expression von 5HT_{2a}R ausreicht, um bei 5HT_{1a}R-Aktivierung eine langsamere laterale Diffusion des 5HT_{1a}R zu bewirken.

Werden die Zellen mit einer Kombination aus 1 μ M 8-OH-DPAT und 1 μ M TCB-2 behandelt, so ergibt sich weder innerhalb einer noch zwischen den beiden Zelllinien ein signifikanter Unterschied der Diffusionskoeffizienten. Dass die Effekte, die bei 8-OH-DPAT Behandlung zwischen den beiden Zelllinien auftreten, bei zusätzlicher TCB-2 Stimulation ausbleiben, kann möglicherweise dadurch erklärt werden, dass die 5HT_{2a}R-Aktivierung die Bindungsaffinität von Liganden an der 8-OH-DPAT-Bindungsstelle von 5HT_{1a}R reduziert.⁸ Auch eine veränderte Heteromerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren durch 5HT_{2a}R-Aktivierung könnte die ausbleibende Veränderung der Diffusionskoeffizienten erklären.

Werden die Zellen mit 1 μ M TCB-2 behandelt, ergibt sich in der 5HT_{2a}R-exprimierenden Zelllinie keine Veränderung der Diffusionskoeffizienten. Auch im Vergleich zu HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen wird kein wesentlicher Effekt deutlich. Im Zustand S2 in HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen zeigt sich jedoch eine signifikante Vergrößerung des Diffusionskoeffizienten von $0,055 \pm 0,001 \mu\text{m}^2/\text{s}$ auf $0,061 \pm 0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Da für den spezifischen 5HT_{2a}R-Agonist TCB-2 keine Aktivität am 5HT_{1a}R bekannt ist, die HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen den 5HT_{2a}R nicht überexprimieren, in HEK Zellen die endogen exprimierten 5HT_{2a}R-Mengen minimal sind⁹³ und eine solche Veränderung in Zellen, die den 5HT_{2a}R überexprimieren, nicht erkennbar ist, wird diesem Effekt keine besondere Bedeutung zugemessen.

Die vbSPT-Analyse ermöglicht es, die Verteilung der 5HT_{1a}R auf die Rezeptorzustände S1 bis S3 zu untersuchen. In der Pufferkontrolle der HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen befinden sich die 5HT_{1a}R zu $20,8 \pm 1,0 \%$ in S1, zu $58,1 \pm 0,4 \%$ in S2 und zu $21,1 \pm 1,0 \%$ in S3. In HEK SNAP-5HT_{1a} HiBiT-5HT_{2a} sind es in der Kontrollbedingung in S1 $22,4 \pm 3,1 \%$, in S2

62,4 ± 4,0 % und in S3 15,2 ± 1,9 % (siehe Abbildung 16 und Tabelle 16). β_1 AR liegen in C6 Zellen ebenfalls zum größten Teil im langsam diffundierenden Zustand S2 vor.⁹⁰ Für β_2 AR in HEK Zellen ist gezeigt, dass der kleinste Anteil in S1 und etwa gleich große Anteile in S2 und S3 vorliegen.¹²⁸ In der Pufferkontrolle der in dieser Studie zum Einsatz kommenden Zellen fällt auf, dass der Anteil der 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand S3 in Zellen, die auch 5HT_{2a}R exprimieren, mit 15,2 ± 1,9 % signifikant kleiner ist als in den Zellen ohne 5HT_{2a}R (21,1 ± 1,0 %). Dieser Effekt zieht sich durch alle Stimulationsbedingungen; damit ist der Anteil schnell diffundierender 5HT_{1a}R unter 5HT_{2a}R-Expression grundsätzlich verringert. Dieser Aspekt lässt sich zum einen mit einer verstärkten 5HT_{1a}R-Internalisierung bei 5HT_{2a}R-Koexpression erklären, zum anderen kann er auf die Bildung von 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heteromeren zurückzuführen sein, da durch die langsamere Diffusion der Heteromere¹³⁶ der Anteil der Trajektorien in S3 zurückgehen kann.

Ferner erwirkt keine der Stimulationsbedingungen signifikante Veränderungen der Rezeptorverteilung (S1 bis S3) innerhalb einer Zelllinie. Werden die Zellen mit 1 μ M 8-OH-DPAT behandelt, so ist der Anteil der 5HT_{1a}R in S2 unter 5HT_{2a}R-Expression signifikant größer (69,4 ± 3,6 %) als in Zellen ohne 5HT_{2a}R (56,4 ± 2,5 %). Eine solche Tendenz ist auch bei der Behandlung mit 1 μ M 8-OH-DPAT und 1 μ M TCB-2 und mit 1 μ M TCB-2 zu sehen. Bei letzterer ist der Effekt statistisch signifikant (52,4 ± 2,4 % vs. 65,1 ± 3,2 %). Somit erfolgt die Umverteilung von 5HT_{1a}R aus S3 in erster Linie in den langsam diffundierenden Zustand S2. Bussmann et al. 2023⁹⁰ zeigen eine signifikante Veränderung der Rezeptoranteile in S1 und S2 bei Agonist-Stimulation, Schwenzer et al. 2018¹²⁸ in den Zuständen S1 und S3. In beiden Fällen werden jedoch β -adrenerge Rezeptoren untersucht.

Um die räumliche Begrenzung der Diffusion von 5HT_{1a}R auf der Oberfläche von HEK Zellen untersuchen zu können, werden die Trajektorien entsprechend ihres Rezeptorzustandes segmentiert und für die Analyse zusammengeführt. Abhängig von ihrem Verdichtungsfaktor P_c erfolgt die Charakterisierung als frei oder begrenzt diffundierend. Dazu wird der Grenzwert der jeweiligen Berechnung mit dem 95ten Perzentil der simulierten P_c -Analyse verglichen. Überschreitet der durchschnittliche P_c -Wert des Rezeptorpfades den Grenzwert, so ist die räumliche Begrenzung der Diffusion anzunehmen (siehe Abschnitt 4.4.7.2).

In HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen sind die 5HT_{1a}R im immobilen Zustand S1 zu 20,3 ± 2,0 % auf einer Fläche von 82,2 ± 1,2 nm (angegeben als Quadratwurzel der konvexen Zelloberfläche), im langsam diffundierenden Zustand S2 zu 48,7 ± 6,0 % mit einer Fläche von 100,0 ± 0,9 nm

und im schnell diffundierenden Zustand S3 zu $95,3 \pm 1,3$ % auf einer Fläche von $112,6 \pm 4,4$ nm in ihrer Diffusion räumlich begrenzt (siehe Abbildung 17 und Abbildung 18 sowie Tabelle 17 und Tabelle 18). Unter Koexpression des 5HT_{2a}R unterliegen die 5HT_{1a}R in S1 zu $32,8 \pm 2,8$ % bei $77,2 \pm 5,0$ nm, in S2 zu $59,1 \pm 9,7$ % auf $82,1 \pm 8,3$ nm und in S3 zu $97,2 \pm 2,0$ % auf $115,3 \pm 7,0$ nm der räumlichen Begrenzung. Im immobilen Zustand unterscheiden sich die räumlich begrenzten Rezeptoranteile statistisch signifikant voneinander, wobei die 5HT_{2a}R-Koexpression den Anteil deutlich erhöht. Die Größe des Diffusionsbereichs unterscheidet sich dabei nicht.

Auch β_2 AR in HEK Zellen unterliegen in den Rezeptorzuständen S1 bis S3 der räumlichen Begrenzung bei vergleichbaren Diffusionsflächen.¹²⁸ β_1 AR in C6 Zellen sind nur im immobilen und langsam diffundierenden Zustand räumlich begrenzt, auch hier zeigen sich vergleichbar große Diffusionsbereiche.⁸⁷ Die Berechnung erfolgt für β_1 AR allerdings auf Basis eines Grenzwerts des 80ten Perzentils der simulierten Pc-Analyse.

Die Theorie, 5HT_{1a}R könnten durch 5HT_{2a}R verstärkt desensitiviert werden, wird durch die erhöhte räumliche Begrenzung der Diffusion in S1 bei 5HT_{2a}R-Koexpression weiter verstärkt. Cézanne et al. 2004¹³⁷ zeigen im Einklang damit, dass aktivierte NK2-Rezeptoren sich zu 30 % immobilisiert in Clustern befinden und schlagen vor, dass diese Vorläufer von Clathrin-Coated Pits sind, die eine wichtige Rolle für die Rezeptorinternalisierung spielen.

Die Behandlung der Zellen mit 1 μ M 8-OH-DPAT verändert den Anteil räumlich begrenzt diffundierender 5HT_{1a}R innerhalb der jeweiligen Zelllinie nicht signifikant. Die räumliche Begrenzung der 5HT_{1a}R ist in Zellen, die 5HT_{2a}R koexprimieren, jedoch deutlich erhöht. So beläuft sich der Anteil räumlich begrenzt diffundierender Rezeptoren im immobilen Zustand S1 in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen auf $27,3 \pm 3,7$ % (vgl. $18,8 \pm 0,3$ %), im langsam diffundierenden Zustand S2 auf $60,3 \pm 7,0$ % (vgl. $44,8 \pm 0,9$ %) und im schnell diffundierenden Zustand S3 auf $97,6 \pm 1,0$ % (vgl. $92,1 \pm 0,2$ %). In den Zuständen S1 und S3 unterscheiden sich die Daten der beiden Zelllinien signifikant voneinander. Auch diese Ergebnisse fügen sich in die Theorie der 5HT_{2a}R-vermittelten 5HT_{1a}R-Desensitivierung ein. Diese scheint von der 5HT_{1a}R-Stimulation zwar nicht beeinflusst zu werden, gleichzeitig tritt jedoch ein weiterer Effekt auf: die verstärkte räumliche Begrenzung der schnell diffundierenden Rezeptoren. Auch die mittlere Größe des Diffusionsbereichs ist in 5HT_{2a}R-koexprimierenden Zellen in S3 signifikant verändert. Unter 8-OH-DPAT Behandlung ist der Bereich von $115,3 \pm 7,0$ nm auf $72,6 \pm 7,2$ nm reduziert. Da dies in HEK SNAP-5HT1a Zellen nicht der Fall ist ($119,2 \pm 2,4$ nm) und die Desensitivierungshypothese sich vor allem auf immobile und

langsam diffundierende Rezeptoren bezieht, stellt sich die Frage, ob eine Veränderung der Heteromerisierung die stärkere räumliche Begrenzung in S3 bedingt.

Die Behandlung der Zellen mit einer Kombination aus 1 μM 8-OH-DPAT und 1 μM TCB-2 reduziert in 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-koexprimierenden Zellen den Anteil räumlich begrenzt diffundierender Rezeptoren im immobilen Zustand deutlich auf etwa das Niveau der Zellen, die 5HT_{2a}R nicht überexprimieren. Dabei wächst die mittlere Diffusionsfläche von $77,2 \pm 5,0$ nm auf $90,6 \pm 8,1$ nm an (nicht signifikant). Auch die Behandlung der Zellen mit TCB-2 alleine reduziert den Anteil begrenzt diffundierender mobiler 5HT_{1a}R auf $22,5 \pm 1,5$ % (vgl. $32,8 \pm 2,8$ %, ns). Die Größe des Diffusionsbereichs steigt dabei von $77,2 \pm 5,0$ nm auf $95,9 \pm 11,1$ nm (ns).

Die Aktivierung von $\beta_2\text{AR}$ erhöht den Anteil begrenzt diffundierender Rezeptoren in S1 bis S3.¹²⁸ Sungkaworn et al. 2017¹²⁴ zeigen, dass die laterale Diffusion von α_{2A} -adrenergen Rezeptoren in Interaktion mit G_{ai}-Untereinheiten wesentlich stärker räumlich begrenzt ist. Die reduzierte räumliche Begrenzung der 5HT_{1a}R kann, wie von Sungkaworn et al. 2017¹²⁴ beschrieben, eine verminderte Signaltransduktion des Rezeptors darstellen. Dieser Effekt stimmt mit der in dieser Studie gezeigten verminderten β -Arrestin 2 Rekrutierung in kotransfizierten Zellen bei 8-OH-DPAT und TCB-2 Stimulation überein. Im Zusammenspiel mit der bisher aufgestellten Hypothese, die 5HT_{2a}R-Koexpression verstärkte die 5HT_{1a}R-Internalisierung im nicht stimulierten und mit 8-OH-DPAT behandelten Zustand, weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Behandlung mit TCB-2 die Internalisierung des 5HT_{1a}-Rezeptors reduzieren könnte. Zhang et al. 2004¹¹³ beschreiben jedoch eine 5HT_{1a}R-Desensitivierung nach 5HT_{2a}R-Aktivierung. Um den Mechanismus, der hinter den in diesem Absatz gezeigten Ergebnisse steht, genauer aufzuklären, sind weitere Experimente nötig, die in Abschnitt 7 erläutert werden.

In HEK SNAP-5HT1a Zellen führt die Behandlung mit 1 μM TCB-2 im schnell diffundierenden Zustand S3 zu einer Reduktion der räumlich begrenzt diffundierenden Rezeptoren auf $90,7 \pm 1,2$ % (vgl. $95,3 \pm 1,3$ %). Gleichzeitig steigt die Größe des mittleren Diffusionsbereichs auf $124,3 \pm 2,2$ nm (vgl. $112,6 \pm 4,4$ nm). In den Zellen, die 5HT_{2a}R überexprimieren, sind diese Effekte nicht zu erkennen. Die mittlere Größe des Diffusionsbereichs fällt unter TCB-2 Behandlung in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen sogar auf $88,9 \pm 7,6$ nm (vgl. $115,3 \pm 7,0$ nm). Da, wie oben erwähnt, für den spezifischen 5HT_{2a}R-Agonist TCB-2 keine Aktivität am 5HT_{1a}R gezeigt ist, die HEK SNAP-5HT1a Zellen

den 5HT_{2a}R nicht überexprimieren, in HEK Zellen die endogen exprimierten 5HT_{2a}R-Mengen minimal sind⁹³ und die genannten Veränderungen in Zellen, die den 5HT_{2a}R überexprimieren, nicht erkennbar sind, wird diesen Effekten keine besondere Bedeutung zugemessen.

In einem letzten Auswerteschritt soll der Homooligomerzustand von 5HT_{1a}R untersucht werden. Dazu erfolgt die Verarbeitung der aus der vbSPT-Analyse hervorgehenden Helligkeitsverteilung der detektierten Fluoreszenzsignale mit Hilfe eines Gauß'schen Mischungsmodells (siehe Abschnitt 4.4.7.3). Dabei werden 5HT_{1a}R als Homomomere, Homodimere und Homotrimere detektiert. In HEK SNAP-5HT1a Zellen liegt der Anteil der Monomere bei $68,5 \pm 11,5$ %, der der Dimere bei $27,1 \pm 9,2$ % und der der Trimere bei $4,5 \pm 2,6$ %. In Zellen, die den 5HT_{2a}R koexprimieren, werden die 5HT_{1a}R zu $84,0 \pm 13,6$ % als Monomere, zu $12,7 \pm 10,4$ % als Dimere und zu $3,3 \pm 3,3$ % als Trimere gefunden (siehe Abbildung 19 und Tabelle 19).

Hierbei ist zu bedenken, dass die in den HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen identifizierten Homooligomere lediglich ein Maß für die Anzahl der 5HT_{1a}R in den Oligomeren darstellen. Ein über die Helligkeitsverteilung als 5HT_{1a}R-Monomer identifizierter Rezeptor kann somit als echtes Monomer vorliegen, es kann sich aber auch um ein Heterodi- oder Heterotrimer handeln, in dem neben einem 5HT_{1a}R ein oder zwei 5HT_{2a}R enthalten sind. Das gleiche Schema gilt für Homooligomere höherer Ordnung, die in den 5HT_{1a}R- und 5HT_{2a}R-exprimierenden Zellen gefunden werden.

Im Kontrollzustand fällt auf, dass der Anteil als Monomere identifizierter Rezeptoren in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a mit $84,0 \pm 13,6$ % deutlich größer ist als in Zellen ohne 5HT_{2a}R ($68,5 \pm 11,5$ %). Im Gegensatz dazu ist der Anteil gefundener Dimere mit $12,7 \pm 10,4$ % in den HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen kleiner als in HEK SNAP-5HT1a Zellen ($27,1 \pm 9,2$ %). Die erhöhte Menge als Monomer identifizierter Rezeptoren in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen deutet darauf hin, dass es durch 5HT_{2a}R-Expression zu Heterooligomerisierung kommt, sodass die Wahrscheinlichkeit ansteigt, Oligomere zu finden, in denen nur ein 5HT_{1a}R enthalten ist.

Die Behandlung mit 8-OH-DPAT, TCB-2 oder einer Kombination der beiden ergibt innerhalb der jeweiligen Zelllinie keine statistisch signifikante Umverteilung der 5HT_{1a}R-Homooligomere. Werden beide 5HT-Rezeptoren durch ihre Agonisten 8-OH-DPAT und TCB-2 stimuliert, so fällt jedoch auf, dass der Anteil der Monomere in HEK SNAP-5HT1a

Zellen mit $54,6 \pm 11,2$ % deutlich kleiner ist als der Anteil als Monomere identifizierter Rezeptoren in zusätzlich 5HT_{2a}R-exprimierenden Zellen ($88,6 \pm 4,2$ %). Der Anteil der 5HT_{1a}R in Dimeren ist in den HEK SNAP-5HT1a Zellen gleichzeitig wesentlich größer ($34,5 \pm 6,0$ %) als in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen ($11,3 \pm 4,1$ %). Zudem sind statt $10,9 \pm 5,5$ % Trimere in den 5HT_{1a}R-exprimierenden Zellen in den 5HT_{2a}R-koexprimierenden Zellen keine Trimere zu finden.

Auffällig ist dabei, dass bei Stimulation beider Rezeptoren rechnerisch die gesamte Menge der Monomere ($54,6 \pm 11,2$ %) und Dimere ($34,5 \pm 6,0$ %) in HEK SNAP-5HT1a Zellen in 5HT_{2a}R-exprimierenden Zellen als Monomere ($88,6 \pm 4,2$ %) zu finden sind. Die Zahlen lassen sich möglicherweise dadurch erklären, dass die Stimulation beider Rezeptoren zu einer verstärkten Heteromerisierung von 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R führt, sodass der Anteil der Homodimere deutlich abnimmt. Gleichzeitig scheint auch der Anteil der Trimere in HEK SNAP-5HT1a Zellen in 5HT_{2a}R-exprimierenden Zellen durch Heterooligomere ersetzt zu werden, die sich aus maximal zwei 5HT_{1a}R und einem 5HT_{2a}R zusammensetzen. In HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen sind über die Helligkeitsverteilung nämlich keine Oligomere zu finden, die drei 5HT_{1a}R enthalten.

Schwenzer et al. 2018¹²⁸ weisen für β_2 AR in HEK Zellen 31 % Monomere, 42 % Dimere, 21 % Trimere und 6 % Tetramere nach. Die Arbeitsgruppe zeigt, dass die Homooligomerisierung nicht abhängig von der β -Arrestin Expression in den Zellen und auch nicht abhängig von der Rezeptoraktivierung ist. Möller et al. 2020¹³⁸ zeigen, dass μ -Opioid-Rezeptoren zu $91,9 \pm 1,1$ % als Monomere und zu $5,9 \pm 1,8$ % als Dimere vorkommen, wobei sie keine Trimere und Tetramere finden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Kotransfektion und Aktivierung von 5HT_{2a}R nicht nur einen hemmenden Einfluss auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung im NanoBiT[®]-Assay hat. Die Koexpression von 5HT_{2a}R hat darüber hinaus einen deutlichen Einfluss auf verschiedene Aspekte der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität. Die Diffusionskoeffizienten nehmen unter 5HT_{2a}R-Anwesenheit tendenziell ab, besonders aber bei den immobilen und langsam diffundierenden 5HT_{1a}R unter Puffer- und 8-OH-DPAT-Einfluss. Darüber hinaus ist der Anteil der 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand S3 bei 5HT_{2a}R-Koexpression grundsätzlich reduziert. Die räumliche Begrenzung der lateralen Diffusion nimmt unter 5HT_{2a}R-Anwesenheit im unstimulierten Zustand besonders bei immobilen Rezeptoren zu. Auch unter 8-OH-DPAT-Einfluss ist die räumliche Begrenzung der Rezeptoren im immobilen und schnell

diffundierenden Zustand bei 5HT_{2a}R-Koexpression erhöht. Diese Ergebnisse können, wie oben diskutiert, zum einen durch die Heteromerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren erklärt werden. Diese schlägt sich auch in der verstärkten Identifizierung von 5HT_{1a}R als Monomere in HEK SNAP-5HT1a HiBiT-5HT2a Zellen nieder. Hier werden verstärkt Heterooligomere mit einem 5HT_{1a}R aufgrund ihrer Helligkeitsverteilung als Monomere klassifiziert. Zum anderen lassen die Effekte den Schluss zu, dass die 5HT_{2a}R-Koexpression zu einer verstärkten 5HT_{1a}R-Internalisierung besonders unter Puffer- und 8-OH-DPAT-Behandlung führt.

Der Anteil räumlich begrenzt diffundierender 5HT_{1a}R in S3 nimmt bei der Behandlung mit beiden Agonisten ab und sinkt auf das Niveau der HEK SNAP-5HT1a Zellen. Eine verlangsamte und räumlich stärker begrenzte laterale Mobilität wird grundsätzlich mit erhöhter Interaktion von GPCR mit nachgeschalteten Signalproteinen wie G-Proteinen oder β -Arrestinen, sowie mit anderen GPCR assoziiert.^{124,128,136} Die veränderten Eigenschaften der lateralen Mobilität können hierbei auf Umverteilungen der Rezeptoren in Mikrodomänen wie z.B. Lipid-Rafts, aber auch Veränderungen in der Struktur des Aktin-Netzwerks unterhalb der Zellmembran zurückzuführen sein.^{122,124,133,139–141}

Zu welchem Maß die dargestellten Effekte auf die Heteromerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R zurückgeht, welche Rolle die 5HT_{1a}R-Internalisierung spielt oder welche Einflüsse aufgrund von nachgeschalteten Signalkaskaden vermittelt werden, wird im Rahmen dieser Studie nicht eindeutig geklärt. Zur weiteren Klärung dieser Frage wären im Rahmen weiterführender Studien Folgeexperimente nötig. Um zu untersuchen, für welche Veränderungen der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität die Heteromerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren verantwortlich ist und welche Effekte eher auf nachgeschaltete Veränderungen der Signalkaskade zurückzuführen sind, sind beispielsweise BRET-Experimente zu planen. Dazu können die 5HT-Rezeptoren in HEK Zellen als Fusionsproteine mit einer Renilla Luciferase (Rluc) oder dem gelb fluoreszierenden Protein EYFP exprimiert werden (z.B. 5HT_{1a}-Rluc und 5HT_{2a}-EYFP). Üblicherweise wird die Spezifität der Rezeptorinteraktion anhand einer BRET-Sättigungskurve gezeigt, wie die Arbeitsgruppen um Hinz et al. 2018¹⁴² und Raich et al. 2022¹⁴³ beschreiben. In einigen Fällen erfolgt der Nachweis zusätzlich durch die Verdrängung des EYFP-markierten Rezeptors (z.B. 5HT_{2a}-EYFP) aus den Heterooligomeren durch nicht markierten Rezeptor (z.B. 5HT_{2a}).¹⁴² Die Zugabe von 5HT-Rezeptor Agonisten und Antagonisten ermöglicht die Analyse des Einflusses dieser auf die Bildung von 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heterooligomeren.

Darüber hinaus könnte untersucht werden, welchen Einfluss ein intaktes Aktin-Netzwerk unterhalb der Zellmembran auf die laterale Mobilität der einzelnen Rezeptoren hat. Dazu sind SPT-Experimente mit doppelter Fluoreszenzfärbung zu planen. Hierzu bietet sich die Markierung des einen Rezeptors mittels SNAP-Tag¹²⁶ und des anderen Rezeptors mittels Halo-Tag^{144,145} an. Die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen, die bei verschiedenen Wellenlängen anzuregen sind, ermöglicht beim Einsatz zweier Laser die simultane Messung der lateralen Mobilität beider Rezeptoren. Die zeitliche Verschiebung der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit dem jeweiligen Laser ist abhängig von der Bildfrequenz zu wählen. In einem solchen Experiment kann auch die Homooligomerisierung der Rezeptoren analysiert werden. Der Einsatz von Substanzen, die die Depolymerisation von Aktin-Filamenten bewirken, wie z.B. Latrunculin B,¹³⁶ lassen einen Rückschluss auf den Einfluss des intakten Aktin-Netzwerkes auf die laterale Mobilität der 5HT-Rezeptoren zu. Hier ist auch eine Kombination von Latrunculin B mit 5HT-Rezeptor Agonisten und Antagonisten denkbar, um zu erkennen, ob sich der Einfluss des Aktin-Netzwerkes auf die laterale Mobilität bei Rezeptoraktivierung verändert.

Um zu überprüfen, ob sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 5HT_{1a}R in Lipid-Rafts verändert, kann die Wiederfindungsrate der Rezeptoren in Detergens-löslichen Membranbereichen in Abhängigkeit der 5HT_{2a}R-Koexpression analysiert werden.^{122,139} Auch die Assoziation von Proteinen verschiedener Signalkaskaden (Caveolin, G-Protein-Untereinheiten etc.) könnte wichtige Informationen über die 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Interaktion liefern.¹²²

Im Rahmen dieser Arbeit ist gezeigt, dass die β -Arrestin 2 Rekrutierung abnimmt, wenn 5HT_{2a}R kotransfiziert und stimuliert werden. Gleichzeitig deuten einige der 5HT_{2a}R-vermittelten Veränderungen der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität, wie oben erläutert, auf eine verstärkte 5HT_{1a}R-Internalisierung hin, wie sie auch Zhang et al. 2004¹¹³ aufzeigen. Um zu überprüfen, ob die reduzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung auf eine verringerte 5HT_{1a}-Rezeptordichte zurückzuführen ist, kann die 5HT_{1a}R-Internalisierung 5HT_{2a}R-abhängig analysiert werden. Es ist bekannt, dass 5HT_{1a}R Clathrin-, Dynamin- und β -Arrestin-abhängig internalisiert werden können.¹³³⁻¹³⁵ Durch die Blockade einzelner Internalisierungswege kann der Einfluss des 5HT_{2a}R mechanistisch weiter eingegrenzt werden.

In der Literatur wird nicht nur auf eine Wechselwirkung zwischen 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren hingewiesen. Diverse Studien liefern auch Hinweise auf die Wechselwirkung des 5HT_{1a}R mit dem zuletzt beschriebenen Serotoninrezeptor 5HT₇.^{9,146,147} Dabei ist gezeigt, dass das Zusammenspiel der Rezeptoren einen Einfluss auf die 5HT_{1a}R-vermittelte Signaltransduktion hat. So nimmt zum Beispiel die G_i-Kopplung des 5HT_{1a}-Rezeptors bei Koexpression von 5HT₇-Rezeptoren deutlich ab.^{9,147} Darüber hinaus führt die gleichzeitige Expression von 5HT₇-Rezeptoren zu einer erheblichen Reduktion der Aktivierung der G-Protein-aktivierten Kaliumkanäle GIRK-1 und GIRK-2. Zusätzlich wird der 5HT_{1a}R proportional zu einer steigenden Koexpression von 5HT₇R vermehrt internalisiert.⁹ In Anlehnung an die Hypothese von Renner et al. 2012⁹, dass die von 5HT₇R initiierte Kointernalisierung des 5HT_{1a}R für die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin-abhängige Erk-Phosphorylierung verantwortlich ist, soll im Rahmen dieser Dissertation herausgefunden werden, ob die Koexpression von 5HT₇R die β -Arrestin 2 Signaltransduktion des 5HT_{1a}R verändert.

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden konnte, dass sich das 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-System ausgezeichnet dazu eignet, die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung in HEK Zellen zu charakterisieren, wird nun der Einfluss des 5HT₇R auf dieselbige untersucht. Zu diesem Zweck erfolgt zunächst die Etablierung eines 5HT₇-NanoBiT[®]-Systems, um die Funktionalität des 5HT₇R-Agonisten AS-19 zu überprüfen. Hierbei ergibt sich ein EC₅₀-Wert für AS-19 am 5HT₇R von $1,1 \pm 0,2 \mu\text{M}$.

HEK Zellen exprimieren 5HT₇R laut Atwood et al. 2011⁹³ endogen. Aus diesem Grund erfolgt die erste Testung des Einflusses der zusätzlichen 5HT₇R-Stimulation anhand einer 8-OH-DPAT Konzentrationsreihe mit und ohne $1 \mu\text{M}$ AS-19 in Zellen, die lediglich 5HT_{1a} und β -Arrestin 2 für das NanoBiT[®]-System überexprimieren. Obwohl die 5HT₇R aufgrund ihrer endogenen Expression den überexprimierten 5HT_{1a}R zahlenmäßig deutlich unterlegen sind, zeigt sich in Abbildung 21 A, dass die β -Arrestin 2 Rekrutierung bei niedrigen 8-OH-DPAT-Konzentrationen auf ein Niveau unterhalb der konstitutiven 5HT_{1a}R-Aktivität reduziert wird (Reduktion von $\text{AUC}_{\min}(8\text{-OH-DPAT}) = 0,6 \pm 0,6$ auf $\text{AUC}_{\min}(8\text{-OH-DPAT} + \text{AS-19}) = -5,9 \pm 1,2$; $p = 0,0070$). Die maximale Menge β -Arrestin 2 sowie der EC₅₀-Wert zeigen keine signifikante Veränderung. Anhand der Überexpression von 5HT₇R soll dieser Effekt verstärkt werden (siehe Abbildung 21 B). Entgegen der Erwartungen ergibt sich in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT 5HT₇ Zellen ein ähnliches Ergebnis wie zuvor: im niedrigen Konzentrationsbereich

des 5HT_{1a}R-Agonisten ist die Rekrutierung auf ein Niveau unterhalb der konstitutiven Aktivität gesenkt ($AUC_{\min}(8\text{-OH-DPAT} + \text{AS-19}) = -5,2 \pm 0,2$; $p = 0,0022$). Die maximal rekrutierte β -Arrestin 2 Menge bleibt gleich, der EC₅₀-Wert steigt nicht signifikant von $56,5 \pm 18,8$ nM (8-OH-DPAT) auf $125,7 \pm 17,9$ nM (8-OH-DPAT + AS-19). Daraufhin wird in denselben Zellen eine Konzentrationsreihe von Serotonin aufgenommen, bei der ein Teil der Zellen mit 1 μ M des 5HT₇R-Antagonisten SB269970 vorinkubiert wird (siehe Abbildung 21 C). Hier kommt es nicht zu einer wesentlichen Veränderung der Kurvenparameter (siehe Tabelle 22) abhängig davon, ob mit SB269970 vorinkubiert wird, vielmehr weisen die Kurven optisch keine Unterschiede auf. Die Ergebnisse der Abbildung 21 deuten zusammen genommen darauf hin, dass die Absenkung der β -Arrestin 2 Rekrutierung bei niedrigen 8-OH-DPAT Konzentrationen in Kombination mit 1 μ M AS-19 möglicherweise durch eine Wirkung von AS-19 am 5HT_{1a}R vermittelt sein könnte. Um diese Hypothese zu untersuchen, werden HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen, die zum Teil mit 5HT_{1a}R- oder 5HT₇R-Antagonisten vorinkubiert sind, mit AS-19 behandelt (siehe Abbildung 22). Es fällt auf, dass die AS-19 vermittelte Reduktion der β -Arrestin 2 Rekrutierung nur durch den 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 statistisch signifikant blockiert werden kann ($AUC_{\text{AS-19}} = -4,6 \pm 0,4$ vgl. $AUC_{\text{AS-19} + \text{WAY-100135}} = -1,7 \pm 0,1$; $p = 0,0016$). Für Zellen, die mit SB269970 vorbehandelt sind, ergibt sich eine AUC von $-5,4 \pm 0,4$, die sich kaum von der $AUC_{\text{AS-19}}$ unterscheidet ($p = 0,2534$).

Rezeptorliganden, die die Aktivität eines Rezeptors auf ein Niveau unterhalb der konstitutiven Aktivität absenken, bezeichnet man als inverse Agonisten.^{94,148} Zwar ist gezeigt, dass der als 5HT₇R-Agonist bekannte Ligand AS-19 eine gewisse Affinität am 5HT_{1a}R hat ($K_i = 44$ nM und 110 nM),¹⁴⁹ dass er an diesem jedoch als inverser Agonist wirkt, ist bisher nicht beschrieben. Um diese Hypothese weiter zu stützen, wird AS-19 in HEK 5HT_{1a}-NanoBiT Zellen im Vergleich zu dem bekannten inversen 5HT_{1a}R-Agonisten Spiperon getestet. Es ergeben sich IC₅₀-Daten für Spiperon von $27,5 \pm 3,9$ nM und für AS-19 von $824,5 \pm 47,3$ nM. Die maximale Reduktion der konstitutiven 5HT_{1a}R-Aktivität von AS-19, bezogen auf die Reduktion durch Spiperon, beträgt $91,4 \pm 7,6$ % (% E_{max}).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Expression und gleichzeitige Stimulation des 5HT₇R keinen Einfluss auf die 5HT_{1a}R-vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung hat. Stattdessen ist es gelungen, den 5HT₇R-Agonisten AS-19 als inversen Agonisten der β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R zu identifizieren.

Die konstitutive Aktivität des 5HT_{1a}R ist mit Hilfe von inversen Agonisten in diversen Studien, sowohl in rekombinanten Zellsystemen^{150–152} als auch in nativen Geweben¹⁵³ gezeigt worden. Martel et al. 2007¹⁵³ weisen dabei in Rattenhippocampi nach, dass die Behandlung mit inversen Agonisten eine verminderte G_{αo}-Kopplung an 5HT_{1a}R zur Folge hat.

Kim und Leem¹⁵⁴ induzieren durch Immobilisation von Ratten angstgestörtes und depressives Verhalten, wobei sie bei diesen Tieren eine signifikant verminderte Expression von postsynaptischen 5HT_{1a}R im Hippocampus feststellen. Auch depressive Patientinnen¹⁵⁵ oder Ratten im Tiermodell für Depressionen¹⁵⁶ weisen eine deutlich reduzierte Expression der 5HT_{1a}R-Heterorezeptoren in den untersuchten Hippocampi auf. Darüber hinaus zeigen Kim und Leem,¹⁵⁴ dass in den von ihnen untersuchten Hippocampi auch die cAMP- und phosphoPKA-Mengen in viel geringerem Maße gefunden werden als in den Kontrolltieren. Andere Studien zeigen, dass antidepressive Behandlung eine Aktivierung der postsynaptischen 5HT_{1a}R nach sich zieht.¹⁵⁶ Zudem gelten 5HT_{1a}R-Knock Out Mäuse, die typischerweise angstgestörtes Verhalten zeigen, als nützliches Modell für angstbedingte Störungen.¹⁵⁷

Im Gegensatz zum 5HT_{1a}-Rezeptor wird 5HT₇-Rezeptoraktivität mit affektivem sowie depressivem Verhalten assoziiert.^{4,158} Im Forced Swimming Test führen 5HT₇R-Antagonisten beispielsweise zu antidepressivem Verhalten, 5HT₇R-Antagonismus scheint notwendig für die antidepressive Wirkung von Amisulprid zu sein und chronische Therapie mit Antidepressiva führt zu einer verringerten 5HT₇-Rezeptorbindung, wie Popova et al. 2022⁴ diskutieren.

Die in verschiedenen Studien nachgewiesenen 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heteromere sind in der Literatur besonders in Bezug auf eine gesteuerte Desensitivierung von 5HT_{1a}R diskutiert. So haben Renner et al. 2012⁹ eine deutlich verstärkte Internalisierung der 5HT_{1a}R unter Koexpression von 5HT₇R gezeigt. Naumenko et al. 2014⁷² diskutieren daher, dass das Gleichgewicht aus 5HT_{1a}R-Homooligomeren und 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heterooligomeren die unterschiedliche Desensitivierung von 5HT_{1a}-Rezeptoren in verschiedenen Hirnstrukturen reguliert. Popova et al. 2022⁴ schlagen vor, dass prä- und postsynaptische 5HT_{1a}R aufgrund ihrer variierenden Oligomerisierungsstatus verschieden sensitiv auf anhaltende Serotoninstimulation reagieren. Sie postulieren eine erhöhte 5HT_{1a}R/5HT₇R-Heteromerdichte unter den 5HT_{1a}-Autorezeptoren, was zu einer erhöhten Internalisierung dieser und folglich zu einem abnehmenden negativen Feedback Mechanismus führt. Es resultiert eine gesteigerte Aktivität des nachgeschalteten 5HT-Systems.¹⁴⁶

Angesichts der beschriebenen Einflüsse der 5HT_{1a}- und 5HT₇-Rezeptoren auf Erkrankungen wie Depressionen stellt sich die Frage, ob die Verabreichung von AS-19 in Tierstudien, vermittelt durch seine Wirkung als 5HT₇R-Agonist und inverser 5HT_{1a}R-Agonist, depressives und affektives Verhalten induzieren kann. Dies könnte insbesondere im Rahmen eines induzierten Tiermodells für Depressionen, das auf Veränderungen des Serotoninsystems im Gehirn basiert, relevant sein.

Die Abhängigkeit der GPCR-Signaltransduktion von der lateralen Mobilität in Zellmembranen ist im Rahmen der Interaktion von 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren bereits erläutert worden. Im Rahmen weiterer SPT-Experimente soll nun der Zusammenhang zwischen der lateralen Mobilität von 5HT_{1a}R und ihrer Behandlung mit inversen Agonisten und dem 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 untersucht werden. Wie bereits erläutert, reduzieren der bekannte inverse 5HT_{1a}R-Agonist Spiperon und der in dieser Studie als solcher charakterisierte Ligand AS-19 die konstitutiv an 5HT_{1a}R rekrutierte β -Arrestin 2 Menge (siehe Abschnitt 5.4.2 und Abbildung 23). Für die Bindung von G_{oi}-Untereinheiten an α_{2A} -adrenerge Rezeptoren ist gezeigt, dass sich die laterale Rezeptordiffusion deutlich verlangsamt und sie wesentlich stärker räumlich begrenzt ist.¹²⁴ GABA_A-Rezeptoren diffundieren lateral nach Behandlung mit einem inversen Agonisten wesentlich schneller und neigen weniger dazu, Rezeptor-Cluster zu bilden.¹⁵⁹

Für die Untersuchung der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität nach Behandlung mit Spiperon und AS-19 kommt die stabil transfizierte HEK SNAP-5HT1a Zelllinie zum Einsatz (siehe Abbildung 7). Die Durchführung und technische Datenverarbeitung der Experimente laufen dabei so ab, wie sie für die Interaktion von 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren erläutert worden ist.

Die vbSPT-Analyse der aus den registrierten Fluoreszenzsignalen abgeleiteten Trajektorien zeigt für die 5HT_{1a}R auch in diesem Experiment immobile, langsam und schnell diffundierende Rezeptoren. Dabei ergeben sich Diffusionskoeffizienten von $0,016 \pm 0,002 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S1, von $0,044 \pm 0,004 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S2 und von $0,183 \pm 0,005 \mu\text{m}^2/\text{s}$ für S3 (siehe Abbildung 24 und Tabelle 23).

Die Behandlung mit den beiden inversen 5HT_{1a}R-Agonisten oder ihren Kombinationen mit dem 5HT_{1a}R-Antagonisten WAY-100135 führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der Diffusionskoeffizienten für D_{S1} bis D_{S3} (siehe Abbildung 24 und Tabelle 23). Auch die Inkubation mit 8-OH-DPAT führt in den HEK SNAP-5HT1a Zellen nicht zu einer

signifikanten Veränderung der Rezeptordiffusion (siehe Abbildung 15 und Tabelle 15). Wie bereits erwähnt, zeigen Lévi et al. 2015¹⁵⁹ für GABA_A-Rezeptoren eine schnellere Diffusion nach Behandlung mit einem inversen Agonisten. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Arbeitsgruppe bei Stimulation der Rezeptoren mit dem allosterischen Modulator Diazepam eine signifikante Verlangsamung der lateralen Mobilität sieht.

Wie in Abschnitt 4.4.7.1 beschrieben und in der Diskussion zur 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Interaktion erläutert, ermöglicht die vbSPT-Analyse die Zuordnung der Rezeptoren zu den Zuständen S1 bis S3. Die 5HT_{1a}R liegen in der Kontrollbedingung zu $21,3 \pm 4,2$ % im immobilen Zustand S1, zu $60,2 \pm 2,0$ % im langsam diffundierenden Zustand S2 und zu $18,5 \pm 2,9$ % im schnell diffundierenden Zustand S3 vor (siehe Abbildung 25 und Tabelle 24). Die Verteilung stimmt mit den im Abschnitt 5.3.2.2 erhobenen Daten in HEK SNAP-5HT1a Zellen überein. Auch Bussmann et al. 2023⁹⁰ und Schwenzer et al. 2018¹²⁸ finden den größten Anteil der Rezeptoren im langsam diffundierenden Zustand S2. Die Behandlung der HEK SNAP-5HT1a Zellen mit Spiperon, AS-19 oder einer Kombination einer der beiden Liganden mit WAY-100135 erwirkt keine deutliche Umverteilung der 5HT_{1a}R auf die Zustände S1 bis S3. Auch die Stimulation der 5HT_{1a}R in HEK SNAP-5HT1a Zellen mit 8-OH-DPAT erzeugt, wie in Abschnitt 5.3.2.2 gezeigt, keine Umverteilung der Rezeptorzustände. Für β AR ist eine Agonist-abhängige Veränderung der Verteilung der Rezeptoren auf die Rezeptorzustände bekannt.^{90,128}

Auch der Zusammenhang zwischen der räumlichen Begrenzung der 5HT_{1a}-Rezeptordiffusion und der Behandlung mit inversen Agonisten soll untersucht werden. Dazu werden, wie in Abschnitt 4.4.7.2 beschrieben, die Trajektorien segmentiert, entsprechend ihres Rezeptorzustands zusammengeführt und abhängig von ihrem Verdichtungsfaktor P_c als frei oder begrenzt diffundierend eingestuft. Dabei zeigt sich, dass die 5HT_{1a}R im immobilen Zustand zu $34,6 \pm 2,1$ %, im langsam diffundierenden Zustand zu $79,5 \pm 3,1$ % und im schnell diffundierenden Zustand zu $99,2 \pm 0,7$ % räumlicher Begrenzung unterliegen (siehe Abbildung 26 und Tabelle 25). Die mittlere Größe des Diffusionsbereichs (dargestellt als Quadratwurzel der Fläche der konvexen Zelloberfläche) beträgt für S1 dabei $62,6 \pm 3,9$ nm, für S2 $75,3 \pm 3,9$ nm und für S3 $82,1 \pm 4,8$ nm (siehe Abbildung 27 und Tabelle 26).

Die Behandlung der HEK SNAP-5HT1a Zellen mit 4 μ M AS-19 resultiert in einer stärkeren Begrenzung der Diffusion im immobilen und langsam diffundierenden Zustand um 22,3 % (S1) bzw. um 24,7 % (S2, siehe Abbildung 26 und Tabelle 25). Bei vorheriger Inkubation mit 4 μ M WAY-100135 heben sich diese Tendenzen teilweise wieder auf. Die mittlere Größe des

Diffusionsbereichs nimmt bei AS-19 Behandlung etwas zu, besonders deutlich zeigt sich diese Zunahme im Rezeptorzustand S3 ($82,1 \pm 4,8$ nm vs. $102,7 \pm 7,5$ nm), bei dem sich der Anteil der beschränkt diffundierenden Rezeptoren praktisch nicht verändert. Die Relevanz dieser Tendenzen ist somit durchaus in Frage zu stellen.

Die Stimulation der HEK SNAP-5HT_{1a} Zellen mit 4 μ M Spiperon hat auf den Anteil begrenzt diffundierender 5HT_{1a}R sowie die Größe des Diffusionsbereichs keinen Einfluss (in S1 bis S3). Lediglich durch die Vorinkubation mit 4 μ M WAY-100135 ist der Anteil begrenzt diffundierender 5HT_{1a}R im immobilen Rezeptorzustand S1 etwas reduziert. Dass WAY-100135 sich in Kombination mit Spiperon anders auswirkt als in Kombination mit AS-19 (Gegenregulation des durch AS-19 reduzierten begrenzt diffundierenden Rezeptoranteils) ist damit zu erklären, dass AS-19 kein selektiver inverser 5HT_{1a}R-Agonist ist, sondern durch seine Eigenschaft als 5HT₇R-Agonist auf zellulärer Ebene eine Reihe komplexer Einflüsse vermitteln kann.

Sungkaworn et al. 2017¹²⁴ zeigen, wie oben bereits erwähnt, ein verlangsamtes und stärker begrenztes Diffusionsverhalten aufgrund der Interaktion eines GPCR mit einer G α -Untereinheit. Es ist denkbar, dass sich die Behandlung mit AS-19 und Spiperon unterschiedlich auf die verschiedenen 5HT_{1a}R-vermittelten Signalwege auswirkt. Dies kann erklären, weshalb sich die reduzierte Interaktion mit Signalproteinen, vermittelt durch die beiden inversen Agonisten, unterschiedlich in der Begrenzung der lateralen Mobilität von 5HT_{1a}R niederschlägt.

In einem letzten Schritt erfolgt die Untersuchung des Homooligomerzustands der 5HT_{1a}R. Dazu wird die aus der vbSPT-Analyse hervorgehende Helligkeitsverteilung in einem Gauß'schen Mischungsmodells analysiert. Auch hier sind für den 5HT_{1a}R Mono-, Di- und Trimere zu finden. Die Rezeptoren kommen dabei zu $61,1 \pm 7,5$ % als Monomere, zu $34,6 \pm 7,4$ % als Dimere und zu $4,1 \pm 3,6$ % als Trimere vor (siehe Abbildung 28 und Tabelle 27). β_2 AR werden in SPT-Experimenten auch als Mono-, Di- und Trimere gefunden,¹²⁸ μ -Opioid-Rezeptoren nur als Mono- und Dimere. Keine der Ligandzugaben verändert den Homooligomerzustand der 5HT_{1a}-Rezeptoren signifikant. Es fällt allerdings auf, dass bei der Gabe von 4 μ M Spiperon der Anteil der Rezeptormonomere zu Gunsten der Dimere zurückgeht (Monomere: $61,1 \pm 7,5$ % vs. $45,7 \pm 7,0$ %. Dimere $34,6 \pm 7,4$ % vs. $49,9 \pm 7,6$ %). Diese Tendenzen scheinen durch die Zugabe von WAY-100135 teilweise aufgehoben zu werden

(Monomere $65,6 \pm 11,9$ %, Dimere: $28, \pm 9,6$ %). Auch Möller et al. 2020¹³⁸ zeigen bei ihrer Analyse von μ -Opioid-Rezeptoren eine Ligand-abhängige Verstärkung der Dimerisierung.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Behandlung mit den inversen Agonisten AS-19 und Spiperon keine signifikante Auswirkung auf die laterale Mobilität von $5HT_{1a}R$ hat. Die Behandlung mit AS-19 scheint die räumliche Begrenzung der Diffusion tendenziell etwas zu verringern und den Diffusionsbereich dabei zu vergrößern. Zu gewissen Teilen ist WAY-100135 in der Lage, diese Effekte aufzuheben. Zudem scheint Spiperon die Dimerisierung von $5HT_{1a}$ -Rezeptoren etwas zu verstärken, auch dieser Tendenz ist mit WAY-100135 gegenzusteuern. Wie oben beschrieben, ist die Abnahme der räumlichen Begrenzung der Diffusion bei AS-19 Zugabe grundsätzlich durch eine reduzierte Interaktion mit Signalproteinen zu erklären. Da dieser Effekt für Spiperon nicht gezeigt wird und beide Liganden eine ähnlich starke maximale Reduktion der β -Arrestin 2 Rekrutierung erzeugen, ist der Effekt eher nicht über die β -Arrestin 2-abhängige Signaltransduktion zu erklären.

7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation wird die Kinetik der β -Arrestin 2 Rekrutierung an 5HT_{1a}R charakterisiert. Diese Bestimmung verfolgt das Ziel, die bekannten 5HT_{1a}R-Agonisten 8-OH-DPAT und U92016A basierend auf anhand der Kinetik bestimmten Kennzahlen als Partial- oder Vollagonisten zu identifizieren.

Für den prototypischen 5HT_{1a}R-Agonist 8-OH-DPAT zeigt sich im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay, dass er $32,2 \pm 2,0$ % (% E_{max}) der durch Serotonin rekrutierten β -Arrestin 2 Menge zu aktivieren vermag. Nach Zugabe von 10 μ M 8-OH-DPAT wird die Signaltransduktion am 5HT_{1a}R mit $28,4 \pm 0,4$ % (IR) der durch Serotonin erzeugten Rate initiiert. Im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay ergibt sich für 8-OH-DPAT somit eine eindeutige Klassifizierung als Partialagonist.

Die durch U92016A vermittelte β -Arrestin 2 Rekrutierung an den 5HT_{1a}R zeichnet ein etwas differenzierteres Bild. U92016A ist in der Lage, im Vergleich zu Serotonin $77,7 \pm 9,1$ % (% E_{max}) β -Arrestin 2 zu aktivieren. Die Signalerzeugung nach Stimulation mit 10 μ M U92016A beträgt allerdings $108,1 \pm 3,4$ % der durch Serotonin vermittelten Signaltransduktion. Es zeigt sich, dass U92016A die β -Arrestin 2 Rekrutierung zwar vollagonistisch aktiviert, sie verglichen mit Serotonin allerdings stärker gegenreguliert wird, sodass die Gesamtmenge an β -Arrestin 2 über 60 min der einer durch einen Partialagonisten rekrutierten Menge gleicht. Somit wird deutlich, dass für eine vollumfängliche Charakterisierung von Rezeptorliganden auch ihre Kinetik und die Initiale Rate zu analysieren ist.

Da in der Vergangenheit gezeigt worden ist, dass der 5HT_{1a}R in der Lage ist, mit 5HT_{2a}R und 5HT₇R zu heteromerisieren, wird nachfolgend untersucht, welchen Einfluss die Koexpression und Aktivierung der beiden Rezeptoren auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R hat. Auch die laterale Mobilität von GPCR in der Zellmembran hat einen maßgeblichen Effekt auf ihre Signaltransduktion. Aus diesem Grund wird die Interaktion der Rezeptoren auch in SPT Experimenten analysiert.

Für das Zusammenspiel aus 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren ist im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay zu sehen, dass die β -Arrestin 2 Rekrutierung nach 8-OH-DPAT Zugabe um $24,2 \pm 7,6$ % reduziert ist, wenn zusätzlich mit TCB-2 stimuliert wird. Für U92016A ergibt sich in Kombination mit

TCB-2 eine Reduktion um $17,4 \pm 2,7$ %. Die Koexpression und Aktivierung des 5HT_{2a}R hat somit eine hemmende Wirkung auf die β -Arrestin 2 Signaltransduktion am 5HT_{1a}R.

Um die Interaktion von 5HT_{1a}- und 5HT_{2a}-Rezeptoren auf der Ebene der Signaltransduktion besser verstehen zu können, bietet es sich an, weiterführende Studien zu anderen Signalwegen durchzuführen. So könnte eine ähnliche Studie, wie die hier dargestellte, in Bezug auf die 5HT_{1a}R vermittelte Hemmung der Adenylatzyklase durchgeführt werden. In späteren Analysen ist dann zu untersuchen, welchen Einfluss in der Arzneimitteltherapie eingesetzte antidepressive, antipsychotische oder anxiolytische Wirkstoffe, die ihre Wirkung bekanntermaßen auch über 5HT_{1a}- oder 5HT_{2a}-Rezeptoren entfalten, auf die Interaktion von 5HT_{1a}/5HT_{2a} haben.

Die SPT-Experimente in HEK Zellen, die 5HT_{1a}R oder 5HT_{1a}R und 5HT_{2a}R überexprimieren, zeigt, dass sich die Koexpression des 5HT_{2a}R auch auf die laterale Mobilität des 5HT_{1a}R auswirkt. So nehmen die Diffusionskoeffizienten unter 5HT_{2a}R-Expression tendenziell ab, besonders aber bei den immobilen und langsam diffundierenden 5HT_{1a}R unter Puffer- und 8-OH-DPAT-Einfluss. Darüber hinaus ist der Anteil der 5HT_{1a}R im schnell diffundierenden Zustand S3 bei 5HT_{2a}R-Koexpression grundsätzlich reduziert. Die räumliche Begrenzung der lateralen Diffusion nimmt unter 5HT_{2a}R-Anwesenheit im unstimulierten Zustand besonders bei immobilen Rezeptoren zu. Auch unter 8-OH-DPAT-Einfluss ist die räumliche Begrenzung der Rezeptoren im immobilen und schnell diffundierenden Zustand bei 5HT_{2a}R-Koexpression erhöht.

Zu welchem Maß die dargestellten Effekte auf die Heterodimerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren zurückgeht, welche Rolle die 5HT_{1a}R-Internalisierung spielt oder welche Einflüsse aufgrund von nachgeschalteten Signalkaskaden vermittelt werden, wird im Rahmen dieser Studie nicht eindeutig geklärt. Um dieser Frage weiter nachzugehen, sind im Rahmen weiterführender Studien Folgeexperimente nötig. Um zu untersuchen, für welche Veränderungen der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität die Heteromerisierung der beiden 5HT-Rezeptoren verantwortlich ist und welche Effekte eher auf nachgeschaltete Veränderungen der Signalkaskade zurückzuführen sind, sind beispielsweise BRET-Experimente zu planen. Dazu können die 5HT-Rezeptoren in HEK Zellen als Fusionsproteine mit einer Renilla Luciferase (Rluc) oder dem gelb fluoreszierenden Protein EYFP exprimiert werden (z.B. 5HT_{1a}-Rluc und 5HT_{2a}-EYFP).^{142,143} Die Zugabe von 5HT-Rezeptor Agonisten und Antagonisten ermöglicht die Analyse des Einflusses dieser auf die Bildung von 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Heterooligomeren.

Darüber hinaus könnte untersucht werden, welchen Einfluss ein intaktes Aktin-Netzwerk unterhalb der Zellmembran auf die laterale Mobilität der einzelnen Rezeptoren hat. Dazu sind SPT-Experimente mit doppelter Fluoreszenzfärbung zu planen. Hierzu bietet sich die Markierung des einen Rezeptors mittels SNAP-Tag¹²⁶ und des anderen Rezeptors mittels Halo-Tag^{144,145} an. Die Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen, die bei verschiedenen Wellenlängen anzuregen sind, ermöglicht beim Einsatz zweier Laser die simultane Messung der lateralen Mobilität beider Rezeptoren. Die zeitliche Verschiebung der Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit dem jeweiligen Laser ist abhängig von der Bildfrequenz zu wählen. In einem solchen Experiment kann auch die Homooligomerisierung der Rezeptoren analysiert werden. Der Einsatz von Substanzen, die die Depolymerisation von Aktin-Filamenten bewirken, wie z.B. Latrunculin B,¹³⁶ lassen einen Rückschluss auf den Einfluss des intakten Aktin-Netzwerkes auf die laterale Mobilität der 5HT-Rezeptoren zu. Hier ist auch eine Kombination von Latrunculin B mit 5HT-Rezeptor Agonisten und Antagonisten denkbar, um zu erkennen, ob sich der Einfluss des Aktin-Netzwerkes auf die laterale Mobilität bei Rezeptoraktivierung verändert.

Um zu überprüfen, ob sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeit von 5HT_{1a}R in Lipid-Rafts verändert, kann die Wiederfindungsrate der Rezeptoren in Detergens-löslichen Membranbereichen in Abhängigkeit der 5HT_{2a}R-Koexpression analysiert werden.^{122,139} Auch die Assoziation von Proteinen verschiedener Signalkaskaden (Caveolin, G-Protein-Untereinheiten etc.) könnte wichtige Informationen über die 5HT_{1a}R/5HT_{2a}R-Interaktion liefern.

Wie bereits beschrieben, ist im Rahmen dieser Dissertation gezeigt, dass die β -Arrestin 2 Rekrutierung abnimmt, wenn 5HT_{2a}-Rezeptoren kotransfiziert und stimuliert werden. Gleichzeitig deuten einige der 5HT_{2a}R-vermittelten Veränderungen der lateralen 5HT_{1a}R-Mobilität, wie oben erläutert, auf eine verstärkte 5HT_{1a}R-Internalisierung hin, wie sie auch Zhang et al. 2004¹¹³ zeigen. Um zu überprüfen, ob die reduzierte β -Arrestin 2 Rekrutierung auf eine verringerte 5HT_{1a}-Rezeptordichte zurückzuführen ist, kann die 5HT_{1a}R-Internalisierung 5HT_{2a}R-abhängig analysiert werden. Es ist bekannt, dass 5HT_{1a}-Rezeptoren Clathrin-, Dynamin- und β -Arrestin-abhängig internalisiert werden können.¹³³⁻¹³⁵ Durch die Blockade einzelner Internalisierungswege kann der Einfluss des 5HT_{2a}-Rezeptors mechanistisch weiter eingegrenzt werden.

Auch für die Interaktion mit 5HT₇R wird im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay untersucht, welchen Einfluss die Koexpression und Aktivierung hat. Dabei zeigt sich, dass nicht der 5HT₇R einen Einfluss auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R hat, sondern dass der eingesetzte 5HT₇R-Agonist AS-19 auch als inverser Agonist am 5HT_{1a}R wirkt. In über diese Dissertation hinausgehenden Studien ist zu untersuchen, wie AS-19 sich auf andere 5HT_{1a}R-vermittelten Signalwege auswirkt. Angesichts der in Abschnitt 1 und Abschnitt 6 erläuterten Einflüsse der 5HT_{1a}- und 5HT₇-Rezeptoren auf Erkrankungen wie Depressionen stellt sich die Frage, ob die Verabreichung von AS-19 in Tierstudien, vermittelt durch seine Wirkung als 5HT₇R-Agonist und inverser 5HT_{1a}R-Agonist, depressives und affektives Verhalten induzieren kann. Dies könnte insbesondere im Rahmen eines induzierten Tiermodells für Depressionen, das auf Veränderungen des Serotoninsystems im Gehirn basiert, relevant sein. Auch hierzu sind weiterführende Studien denkbar.

Da im 5HT_{1a}-NanoBiT[®]-Assay gezeigt worden ist, dass die Koexpression und Aktivierung des 5HT₇R keinen Einfluss auf die β -Arrestin 2 Rekrutierung am 5HT_{1a}R hat, wird in SPT Experimenten der Einfluss der inversen Agonisten AS-19 und Spiperon auf die laterale 5HT_{1a}R-Mobilität untersucht. Hierbei ist festzustellen, dass die konstitutive Aktivität und ihre Veränderung durch inverse Agonisten nicht signifikant mit der lateralen Diffusion von 5HT_{1a}R zusammenhängt.

8. Literaturverzeichnis

- (1) Innis, R. B.; Aghajanian, G. K. Pertussis toxin blocks 5-HT_{1A} and GABAB receptor-mediated inhibition of serotonergic neurons. *European journal of pharmacology* **1987**, *143* (2), 195–204. DOI: 10.1016/0014-2999(87)90533-4.
- (2) Liu, R.-J.; Lambe, E. K.; Aghajanian, G. K. Somatodendritic autoreceptor regulation of serotonergic neurons: dependence on l-tryptophan and tryptophan hydroxylase-activating kinases. *Eur J of Neuroscience* **2005**, *21* (4), 945–958. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03930.x.
- (3) Newman-Tancredi, A.; Depoortère, R. Y.; Kleven, M. S.; Kołaczkowski, M.; Zimmer, L. Translating biased agonists from molecules to medications: Serotonin 5-HT_{1A} receptor functional selectivity for CNS disorders. *Pharmacology & therapeutics* **2022**, *229*, 107937. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2021.107937. Published Online: Jun. 24, 2021.
- (4) Popova, N. K.; Tsybko, A. S.; Naumenko, V. S. The Implication of 5-HT Receptor Family Members in Aggression, Depression and Suicide: Similarity and Difference. *International journal of molecular sciences* **2022**, *23* (15). DOI: 10.3390/ijms23158814. Published Online: Aug. 8, 2022.
- (5) Robert Koch-Institut. *Depressive Symptomatik im europäischen Vergleich – Ergebnisse des European Health Interview Survey (EHIS) 2* (accessed 2023-11-16).
- (6) Domschke, K. Update Angsterkrankungen – aktueller Stand und neue Entwicklungen. *Der Nervenarzt* **2021**, *92* (5), 415–416. DOI: 10.1007/s00115-020-01042-4. Published Online: Apr. 30, 2021.
- (7) Hoare, S. R. J.; Tewson, P. H.; Quinn, A. M.; Hughes, T. E.; Bridge, L. J. Analyzing kinetic signaling data for G-protein-coupled receptors. *Scientific reports* **2020**, *10* (1), 12263. DOI: 10.1038/s41598-020-67844-3. Published Online: Jul. 23, 2020.
- (8) Borroto-Escuela, D. O.; Li, X.; Tarakanov, A. O.; Savelli, D.; Narváez, M.; Shumilov, K.; Andrade-Talavera, Y.; Jimenez-Beristain, A.; Pomierny, B.; Díaz-Cabiale, Z.; Cuppini, R.; Ambrogini, P.; Lindskog, M.; Fuxe, K. Existence of Brain 5-HT_{1A}-5-HT_{2A} Isoreceptor Complexes with Antagonistic Allosteric Receptor-Receptor Interactions Regulating 5-HT_{1A} Receptor Recognition. *ACS omega* **2017**, *2* (8), 4779–4789. DOI: 10.1021/acsomega.7b00629. Published Online: Aug. 22, 2017.
- (9) Renner, U.; Zeug, A.; Woehler, A.; Niebert, M.; Dityatev, A.; Dityateva, G.; Gorinski, N.; Guseva, D.; Abdel-Galil, D.; Fröhlich, M.; Döring, F.; Wischmeyer, E.; Richter, D. W.; Neher, E.; Ponimaskin, E. G. Heterodimerization of serotonin receptors 5-HT_{1A} and 5-HT₇ differentially regulates receptor signalling and trafficking. *Journal of cell science* **2012**, *125* (Pt 10), 2486–2499. DOI: 10.1242/jcs.101337. Published Online: Feb. 22, 2012.
- (10) Jacobs, S.; Cuatrecasas, P. The mobile receptor hypothesis for cell membrane receptor action. *Trends in Biochemical Sciences* **1977**, *2* (12), 280–282. DOI: 10.1016/0968-0004(77)90281-x.

- (11) Kusumi, A.; Fujiwara, T. K.; Chadda, R.; Xie, M.; Tsunoyama, T. A.; Kalay, Z.; Kasai, R. S.; Suzuki, K. G. N. Dynamic organizing principles of the plasma membrane that regulate signal transduction: commemorating the fortieth anniversary of Singer and Nicolson's fluid-mosaic model. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **2012**, *28* (Volume 28, 2012), 215–250. DOI: 10.1146/annurev-cellbio-100809-151736. Published Online: Aug. 16, 2012.
- (12) Hauser, A. S.; Attwood, M. M.; Rask-Andersen, M.; Schiöth, H. B.; Gloriam, D. E. Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nat Rev Drug Discov* **2017**, *16* (12), 829–842. DOI: 10.1038/nrd.2017.178. Published Online: Oct. 27, 2017.
- (13) Hannon, J.; Hoyer, D. Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural brain research* **2008**, *195* (1), 198–213. DOI: 10.1016/j.bbr.2008.03.020. Published Online: Mar. 25, 2008.
- (14) Banerjee, P.; Mehta, M.; Kanjilal, B., Eds. *Serotonin Receptors in Neurobiology*; CRC Press/Taylor & Francis, 2007.
- (15) Sprouse, J. S.; Aghajanian, G. K. Electrophysiological responses of serotonergic dorsal raphe neurons to 5-HT_{1A} and 5-HT_{1B} agonists. *Synapse (New York, N.Y.)* **1987**, *1* (1), 3–9. DOI: 10.1002/syn.890010103.
- (16) Barnes, N. M.; Sharp, T. A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology* **1999**, *38* (8), 1083–1152. DOI: 10.1016/s0028-3908(99)00010-6.
- (17) La Mannoury Cour, C.; El Mestikawy, S.; Hanoun, N.; Hamon, M.; Lanfumey, L. Regional differences in the coupling of 5-hydroxytryptamine-1A receptors to G proteins in the rat brain. *Molecular pharmacology* **2006**, *70* (3), 1013–1021. DOI: 10.1124/mol.106.022756. Published Online: Jun. 13, 2006.
- (18) Fargin, A.; Raymond, J. R.; Regan, J. W.; Cotecchia, S.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. Effector Coupling Mechanisms of the Cloned 5-HT_{1A} Receptor. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (25), 14848–14852. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)63778-0.
- (19) Albert, P. R.; Sajedi, N.; Lemonde, S.; Ghahremani, M. H. Constitutive G(i₂)-dependent activation of adenylyl cyclase type II by the 5-HT_{1A} receptor. Inhibition by anxiolytic partial agonists. *The Journal of biological chemistry* **1999**, *274* (50), 35469–35474. DOI: 10.1074/jbc.274.50.35469.
- (20) Lin, S. L.; Setya, S.; Johnson-Farley, N. N.; Cowen, D. S. Differential coupling of 5-HT(1) receptors to G proteins of the G(i) family. *British Journal of Pharmacology* **2002**, *136* (7), 1072–1078. DOI: 10.1038/sj.bjp.0704809.
- (21) Kushwaha, N.; Albert, P. R. Coupling of 5-HT_{1A} autoreceptors to inhibition of mitogen-activated protein kinase activation via G beta gamma subunit signaling. *The European journal of neuroscience* **2005**, *21* (3), 721–732. DOI: 10.1111/j.1460-9568.2005.03904.x.
- (22) Cadogan, A. K.; Kendall, D. A.; Marsden, C. A. Serotonin 5-HT_{1A} receptor activation increases cyclic AMP formation in the rat hippocampus in vivo. *Journal of neurochemistry* **1994**, *62* (5), 1816–1821. DOI: 10.1046/j.1471-4159.1994.62051816.x.

- (23) Stroth, N.; Niso, M.; Colabufo, N. A.; Perrone, R.; Svenningsson, P.; Lacivita, E.; Leopoldo, M. Arylpiperazine agonists of the serotonin 5-HT_{1A} receptor preferentially activate cAMP signaling versus recruitment of β -arrestin-2. *Bioorganic & medicinal chemistry* **2015**, *23* (15), 4824–4830. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.05.042. Published Online: Jun. 1, 2015.
- (24) Newman-Tancredi, A. Biased agonism at serotonin 5-HT_{1A} receptors: preferential postsynaptic activity for improved therapy of CNS disorders. *Neuropsychiatry* **2011**, *1* (2), 149–164. DOI: 10.2217/npv.11.12.
- (25) Hausdorff, W. P.; Bouvier, M.; O'Dowd, B. F.; Irons, G. P.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Phosphorylation Sites on Two Domains of the β ₂-Adrenergic Receptor Are Involved in Distinct Pathways of Receptor Desensitization. *Journal of Biological Chemistry* **1989**, *264* (21), 12657–12665. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)63907-9.
- (26) Benovic, J. L.; Strasser, R. H.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1986**, *83* (9), 2797–2801. DOI: 10.1073/pnas.83.9.2797.
- (27) Lohse, M. J.; Andexinger, S.; Pitcher, J.; Trukawinski, S.; Codina, J.; Faure, J. P.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta₂-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *Journal of Biological Chemistry* **1992**, *267* (12), 8558–8564. DOI: 10.1016/S0021-9258(18)42479-9.
- (28) Benovic, J. L.; Kühn, H.; Weyand, I.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1987**, *84* (24), 8879–8882. DOI: 10.1073/pnas.84.24.8879.
- (29) Pippig, S.; Andexinger, S.; Daniel, K.; Puzicha, M.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J.; Lohse, M. J. Overexpression of beta-arrestin and beta-adrenergic receptor kinase augment desensitization of beta₂-adrenergic receptors. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (5), 3201–3208.
- (30) Lohse, M. J.; Benovic, J. L.; Codina, J.; Caron, M. G.; Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science (New York, N.Y.)* **1990**, *248* (4962), 1547–1550. DOI: 10.1126/science.2163110.
- (31) Perry, S. J.; Baillie, G. S.; Kohout, T. A.; McPhee, I.; Magiera, M. M.; Ang, K. L.; Miller, W. E.; McLean, A. J.; Conti, M.; Houslay, M. D.; Lefkowitz, R. J. Targeting of cyclic AMP degradation to beta₂-adrenergic receptors by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)* **2002**, *298* (5594), 834–836. DOI: 10.1126/science.1074683.

- (32) Nelson, C. D.; Perry, S. J.; Regier, D. S.; Prescott, S. M.; Topham, M. K.; Lefkowitz, R. J. Targeting of diacylglycerol degradation to M1 muscarinic receptors by beta-arrestins. *Science (New York, N.Y.)* **2007**, *315* (5812), 663–666. DOI: 10.1126/science.1134562.
- (33) Jean-Charles, P.-Y.; Freedman, N. J.; Shenoy, S. K. Chapter Nine - Cellular Roles of Beta-Arrestins as Substrates and Adaptors of Ubiquitination and Deubiquitination. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science : Ubiquitination and Transmembrane Signaling*; Shenoy, S. K., Ed.; Academic Press, 2016; pp 339–369. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2016.04.003.
- (34) Abraham, D. M.; Davis, R. T.; Warren, C. M.; Mao, L.; Wolska, B. M.; Solaro, R. J.; Rockman, H. A. β -Arrestin mediates the Frank-Starling mechanism of cardiac contractility. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2016**, *113* (50), 14426–14431. DOI: 10.1073/pnas.1609308113. Published Online: Nov. 28, 2016.
- (35) Rajagopal, K.; Whalen, E. J.; Violin, J. D.; Stiber, J. A.; Rosenberg, P. B.; Premont, R. T.; Coffman, T. M.; Rockman, H. A.; Lefkowitz, R. J. Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2006**, *103* (44), 16284–16289. DOI: 10.1073/pnas.0607583103. Published Online: Oct. 23, 2006.
- (36) Violin, J. D.; Crombie, A. L.; Soergel, D. G.; Lark, M. W. Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress. *Trends in Pharmacological Sciences* **2014**, *35* (7), 308–316. DOI: 10.1016/j.tips.2014.04.007. Published Online: May. 28, 2014.
- (37) Raehal, K. M.; Walker, J. K. L.; Bohn, L. M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2005**, *314* (3), 1195–1201. DOI: 10.1124/jpet.105.087254. Published Online: May. 25, 2005.
- (38) Bohn, L. M.; Gainetdinov, R. R.; Lin, F. T.; Lefkowitz, R. J.; Caron, M. G. Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* **2000**, *408* (6813), 720–723. DOI: 10.1038/35047086.
- (39) Bu, H.; Liu, X.; Tian, X.; Yang, H.; Gao, F. Enhancement of morphine analgesia and prevention of morphine tolerance by downregulation of β -arrestin 2 with antigene RNAs in mice. *The International journal of neuroscience* **2015**, *125* (1), 56–65. DOI: 10.3109/00207454.2014.896913. Published Online: Mar. 25, 2014.
- (40) Hothersall, J. D.; Brown, A. J.; Dale, I.; Rawlins, P. Can residence time offer a useful strategy to target agonist drugs for sustained GPCR responses? *Drug discovery today* **2016**, *21* (1), 90–96. DOI: 10.1016/j.drudis.2015.07.015. Published Online: Jul. 28, 2015.
- (41) Grundmann, M.; Kostenis, E. Temporal Bias: Time-Encoded Dynamic GPCR Signaling. *Trends in Pharmacological Sciences* **2017**, *38* (12), 1110–1124. DOI: 10.1016/j.tips.2017.09.004. Published Online: Oct. 23, 2017.

(42) Lane, J. R.; May, L. T.; Parton, R. G.; Sexton, P. M.; Christopoulos, A. A kinetic view of GPCR allosterity and biased agonism. *Nature chemical biology* **2017**, *13* (9), 929–937. DOI: 10.1038/nchembio.2431.

(43) Hoare, S. R. J.; Tewson, P. H.; Quinn, A. M.; Hughes, T. E. A kinetic method for measuring agonist efficacy and ligand bias using high resolution biosensors and a kinetic data analysis framework. *Scientific reports* **2020**, *10* (1), 1766. DOI: 10.1038/s41598-020-58421-9. Published Online: Feb. 4, 2020.

(44) Middlemiss, D. N.; Fozard, J. R. 8-Hydroxy-2-(di-n-propylamino)-tetralin discriminates between subtypes of the 5-HT₁ recognition site. *European journal of pharmacology* **1983**, *90* (1), 151–153. DOI: 10.1016/0014-2999(83)90230-3.

(45) Borroto-Escuela, D. O.; Corrales, F.; Narvaez, M.; Oflijan, J.; Agnati, L. F.; Palkovits, M.; Fuxe, K. Dynamic modulation of FGFR1-5-HT_{1A} heteroreceptor complexes. Agonist treatment enhances participation of FGFR1 and 5-HT_{1A} homodimers and recruitment of β -arrestin2. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2013**, *441* (2), 387–392. DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.067. Published Online: Oct. 21, 2013.

(46) Heusler, P.; Newman-Tancredi, A.; Looock, T.; Cussac, D. Antipsychotics differ in their ability to internalise human dopamine D_{2S} and human serotonin 5-HT_{1A} receptors in HEK293 cells. *European journal of pharmacology* **2008**, *581* (1-2), 37–46. DOI: 10.1016/j.ejphar.2007.11.046. Published Online: Nov. 28, 2007.

(47) Sniecikowska, J.; Gluch-Lutwin, M.; Bucki, A.; Więckowska, A.; Siwek, A.; Jastrzebska-Wiesek, M.; Partyka, A.; Wilczyńska, D.; Pytka, K.; Latacz, G.; Przejczowska-Pomierny, K.; Wyska, E.; Wesółowska, A.; Pawłowski, M.; Newman-Tancredi, A.; Kolaczkowski, M. Discovery of Novel pERK1/2- or β -Arrestin-Preferring 5-HT_{1A} Receptor-Biased Agonists: Diversified Therapeutic-like versus Side Effect Profile. *Journal of medicinal chemistry* **2020**, *63* (19), 10946–10971. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.0c00814. Published Online: Sep. 23, 2020.

(48) Sniecikowska, J.; Gluch-Lutwin, M.; Bucki, A.; Więckowska, A.; Siwek, A.; Jastrzebska-Wiesek, M.; Partyka, A.; Wilczyńska, D.; Pytka, K.; Pocięcha, K.; Cios, A.; Wyska, E.; Wesółowska, A.; Pawłowski, M.; Varney, M. A.; Newman-Tancredi, A.; Kolaczkowski, M. Novel Aryloxyethyl Derivatives of 1-(1-Benzoylpiperidin-4-yl)methanamine as the Extracellular Regulated Kinases 1/2 (ERK1/2) Phosphorylation-Preferring Serotonin 5-HT_{1A} Receptor-Biased Agonists with Robust Antidepressant-like Activity. *Journal of medicinal chemistry* **2019**, *62* (5), 2750–2771. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.9b00062. Published Online: Mar. 2, 2019.

(49) Paila, Y. D.; Kombrabail, M.; Krishnamoorthy, G.; Chattopadhyay, A. Oligomerization of the serotonin(1A) receptor in live cells: a time-resolved fluorescence anisotropy approach. *The journal of physical chemistry. B* **2011**, *115* (39), 11439–11447. DOI: 10.1021/jp201458h. Published Online: Sep. 13, 2011.

- (50) Ganguly, S.; Clayton, A. H. A.; Chattopadhyay, A. Organization of higher-order oligomers of the serotonin_{1A} receptor explored utilizing homo-FRET in live cells. *Biophysical journal* **2011**, *100* (2), 361–368. DOI: 10.1016/j.bpj.2010.12.3692.
- (51) Borroto-Escuela, D. O.; Narvaez, M.; Marcellino, D.; Parrado, C.; Narvaez, J. A.; Tarakanov, A. O.; Agnati, L. F.; Díaz-Cabiale, Z.; Fuxe, K. Galanin receptor-1 modulates 5-hydroxytryptamine-1A signaling via heterodimerization. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2010**, *393* (4), 767–772. DOI: 10.1016/j.bbrc.2010.02.078. Published Online: Feb. 18, 2010.
- (52) Lillo, J.; Lillo, A.; Zafra, D. A.; Miralpeix, C.; Rivas-Santisteban, R.; Casals, N.; Navarro, G.; Franco, R. Identification of the Ghrelin and Cannabinoid CB2 Receptor Heteromer Functionality and Marked Upregulation in Striatal Neurons from Offspring of Mice under a High-Fat Diet. *International journal of molecular sciences* **2021**, *22* (16). DOI: 10.3390/ijms22168928. Published Online: Aug. 19, 2021.
- (53) Martínez-Pinilla, E.; Rico, A. J.; Rivas-Santisteban, R.; Lillo, J.; Roda, E.; Navarro, G.; Lanciego, J. L.; Franco, R. Expression of GPR55 and either cannabinoid CB1 or CB2 heteroreceptor complexes in the caudate, putamen, and accumbens nuclei of control, parkinsonian, and dyskinetic non-human primates. *Brain structure & function* **2020**, *225* (7), 2153–2164. DOI: 10.1007/s00429-020-02116-4. Published Online: Jul. 20, 2020.
- (54) Beliveau, V.; Ganz, M.; Feng, L.; Ozenne, B.; Højgaard, L.; Fisher, P. M.; Svarer, C.; Greve, D. N.; Knudsen, G. M. A High-Resolution In Vivo Atlas of the Human Brain's Serotonin System. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2017**, *37* (1), 120–128. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2830-16.2016.
- (55) Gross-Isseroff, R.; Salama, D.; Israeli, M.; Biegon, A. Autoradiographic analysis of age-dependent changes in serotonin 5-HT₂ receptors of the human brain postmortem. *Brain research* **1990**, *519* (1-2), 223–227. DOI: 10.1016/0006-8993(90)90081-L.
- (56) Hall, H.; Farde, L.; Halldin, C.; Lundkvist, C.; Sedvall, G. Autoradiographic localization of 5-HT_{2A} receptors in the human brain using [³H]M100907 and [¹¹C]M100907. *Synapse (New York, N.Y.)* **2000**, *38* (4), 421–431. DOI: 10.1002/1098-2396(20001215)38:4<421:AID-SYN7>3.0.CO;2-X.
- (57) Araneda, R.; Andrade, R. 5-Hydroxytryptamine₂ and 5-hydroxytryptamine 1A receptors mediate opposing responses on membrane excitability in rat association cortex. *Neuroscience* **1991**, *40* (2), 399–412. DOI: 10.1016/0306-4522(91)90128-B.
- (58) Andrade, R. Serotonergic regulation of neuronal excitability in the prefrontal cortex. *Neuropharmacology* **2011**, *61* (3), 382–386. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.015. Published Online: Jan. 18, 2011.
- (59) Carhart-Harris, R. L.; Nutt, D. J. Serotonin and brain function: a tale of two receptors. *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)* **2017**, *31* (9), 1091–1120. DOI: 10.1177/0269881117725915. Published Online: Aug. 31, 2017.

- (60) Day, M.; Olson, P. A.; Platzer, J.; Striessnig, J.; Surmeier, D. J. Stimulation of 5-HT(2) receptors in prefrontal pyramidal neurons inhibits Ca(v)1.2 L type Ca(2+) currents via a PLCbeta/IP3/calcineurin signaling cascade. *Journal of neurophysiology* **2002**, *87* (5), 2490–2504. DOI: 10.1152/jn.00843.2001.
- (61) Teitler, M.; Leonhardt, S.; Weisberg, E. L.; Hoffman, B. J. 4-125Iiodo-(2,5-dimethoxy)phenylisopropylamine and 3Hketanserin labeling of 5-hydroxytryptamine2 (5HT2) receptors in mammalian cells transfected with a rat 5HT2 cDNA: evidence for multiple states and not multiple 5HT2 receptor subtypes. *Molecular pharmacology* **1990**, *38* (5), 594–598.
- (62) Eison, A. S.; Mullins, U. L. Regulation of central 5-HT2A receptors: a review of in vivo studies. *Behavioural brain research* **1996**, *73* (1-2), 177–181. DOI: 10.1016/0166-4328(96)00092-7.
- (63) Shen, Y.; Monsma, F. J.; Metcalf, M. A.; Jose, P. A.; Hamblin, M. W.; Sibley, D. R. Molecular cloning and expression of a 5-hydroxytryptamine7 serotonin receptor subtype. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (24), 18200–18204.
- (64) Martín-Cora, F. J.; Pazos, A. Autoradiographic distribution of 5-HT7 receptors in the human brain using 3Hmesulergine: comparison to other mammalian species. *British Journal of Pharmacology* **2004**, *141* (1), 92–104. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705576. Published Online: Dec. 1, 2003.
- (65) Varnäs, K.; Thomas, D. R.; Tupala, E.; Tiihonen, J.; Hall, H. Distribution of 5-HT7 receptors in the human brain: a preliminary autoradiographic study using 3HSB-269970. *Neuroscience letters* **2004**, *367* (3), 313–316. DOI: 10.1016/j.neulet.2004.06.025.
- (66) Bard, J. A.; Zgombick, J.; Adham, N.; Vaysse, P.; Branchek, T. A.; Weinshank, R. L. Cloning of a novel human serotonin receptor (5-HT7) positively linked to adenylate cyclase. *Journal of Biological Chemistry* **1993**, *268* (31), 23422–23426.
- (67) Lovenberg, T. W.; Baron, B. M.; Lecea, L. de; Miller, J. D.; Prosser, R. A.; Rea, M. A.; Foye, P. E.; Racke, M.; Slone, A. L.; Siegel, B. W. A novel adenylyl cyclase-activating serotonin receptor (5-HT7) implicated in the regulation of mammalian circadian rhythms. *Neuron* **1993**, *11* (3), 449–458. DOI: 10.1016/0896-6273(93)90149-1.
- (68) Errico, M.; Crozier, R. A.; Plummer, M. R.; Cowen, D. S. 5-HT(7) receptors activate the mitogen activated protein kinase extracellular signal related kinase in cultured rat hippocampal neurons. *Neuroscience* **2001**, *102* (2), 361–367. DOI: 10.1016/s0306-4522(00)00460-7.
- (69) Duncan, M. J.; Short, J.; Wheeler, D. L. Comparison of the effects of aging on 5-HT7 and 5-HT1A receptors in discrete regions of the circadian timing system in hamsters. *Brain research* **1999**, *829* (1-2), 39–45. DOI: 10.1016/S0006-8993(99)01311-6.
- (70) Hedlund, P. B. The 5-HT7 receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology* **2009**, *206* (3), 345–354. DOI: 10.1007/s00213-009-1626-0. Published Online: Aug. 1, 2009.

- (71) Papoucheva, E.; Dumuis, A.; Sebben, M.; Richter, D. W.; Ponimaskin, E. G. The 5-hydroxytryptamine(1A) receptor is stably palmitoylated, and acylation is critical for communication of receptor with Gi protein. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (5), 3280–3291. DOI: 10.1074/jbc.M308177200. Published Online: Nov. 6, 2003.
- (72) Naumenko, V. S.; Popova, N. K.; Lacivita, E.; Leopoldo, M.; Ponimaskin, E. G. Interplay between serotonin 5-HT1A and 5-HT7 receptors in depressive disorders. *CNS Neuroscience & Therapeutics* **2014**, *20* (7), 582–590. DOI: 10.1111/cns.12247.
- (73) Jacobson, K.; Liu, P.; Lagerholm, B. C. The Lateral Organization and Mobility of Plasma Membrane Components. *Cell* **2019**, *177* (4), 806–819. DOI: 10.1016/j.cell.2019.04.018.
- (74) Kusumi, A.; Sako, Y. Cell surface organization by the membrane skeleton. *Current opinion in cell biology* **1996**, *8* (4), 566–574. DOI: 10.1016/s0955-0674(96)80036-6.
- (75) Fujiwara, T.; Ritchie, K.; Murakoshi, H.; Jacobson, K.; Kusumi, A. Phospholipids undergo hop diffusion in compartmentalized cell membrane. *The Journal of cell biology* **2002**, *157* (6), 1071–1081. DOI: 10.1083/jcb.200202050. Published Online: Jun. 10, 2002.
- (76) Lingwood, D.; Simons, K. Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science (New York, N.Y.)* **2010**, *327* (5961), 46–50. DOI: 10.1126/science.1174621.
- (77) Eggeling, C.; Ringemann, C.; Medda, R.; Schwarzmann, G.; Sandhoff, K.; Polyakova, S.; Belov, V. N.; Hein, B.; Middendorff, C. von; Schönle, A.; Hell, S. W. Direct observation of the nanoscale dynamics of membrane lipids in a living cell. *Nature* **2009**, *457* (7233), 1159–1162. DOI: 10.1038/nature07596. Published Online: Dec. 21, 2008.
- (78) Takayama, M.; Maeda, S.; Watanabe, D.; Takebayashi, K.; Hiroshima, M.; Ueda, M. Cholesterol suppresses spontaneous activation of EGFR-mediated signal transduction. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **2024**, *704*, 149673. DOI: 10.1016/j.bbrc.2024.149673. Published Online: Feb. 12, 2024.
- (79) Shrivastava, S.; Sarkar, P.; Preira, P.; Salomé, L.; Chattopadhyay, A. Cholesterol-Dependent Dynamics of the Serotonin1A Receptor Utilizing Single Particle Tracking: Analysis of Diffusion Modes. *The journal of physical chemistry. B* **2022**, *126* (35), 6682–6690. DOI: 10.1021/acs.jpcc.2c03941. Published Online: Aug. 16, 2022.
- (80) Sarkar, P.; Chattopadhyay, A. Insights into cellular signaling from membrane dynamics. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2021**, *701*, 108794. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108794. Published Online: Feb. 9, 2021.
- (81) Yanagawa, M.; Hiroshima, M.; Togashi, Y.; Abe, M.; Yamashita, T.; Shichida, Y.; Murata, M.; Ueda, M.; Sako, Y. Single-molecule diffusion-based estimation of ligand effects on G protein-coupled receptors. *Science signaling* **2018**, *11* (548). DOI: 10.1126/scisignal.aao1917. Published Online: Sep. 18, 2018.

- (82) Metz, M. J.; Pennock, R. L.; Krapf, D.; Hentges, S. T. Temporal dependence of shifts in mu opioid receptor mobility at the cell surface after agonist binding observed by single-particle tracking. *Sci Rep* **2019**, *9* (1), 7297. DOI: 10.1038/s41598-019-43657-x. Published Online: May. 13, 2019.
- (83) Zhao, R.; Yuan, J.; Li, N.; Sun, Y.; Xia, T.; Fang, X. Analysis of the Diffusivity Change from Single-Molecule Trajectories on Living Cells. *Analytical Chemistry* **2019**, *91* (21), 13390–13397. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b01005. Published Online: Oct. 17, 2019.
- (84) Promega Corporation. NanoBiT® Protein:Protein Interaction System Technical Manual TM461 **2021**.
- (85) Saecker, L.; Häberlein, H.; Franken, S. Investigation of adenosine A1 receptor-mediated β -arrestin 2 recruitment using a split-luciferase assay. *Front. Pharmacol.* **2023**, *14*, 1172551. DOI: 10.3389/fphar.2023.1172551. Published Online: May. 30, 2023.
- (86) Kroeze, W. K.; Sassano, M. F.; Huang, X.-P.; Lansu, K.; McCorvy, J. D.; Giguère, P. M.; Sciaky, N.; Roth, B. L. PRESTO-Tango as an open-source resource for interrogation of the druggable human GPCRome. *Nature structural & molecular biology* **2015**, *22* (5), 362–369. DOI: 10.1038/nsmb.3014. Published Online: Apr. 20, 2015.
- (87) Bussmann, H. Influence of the St. John's Wort Extract Ze117 on the Lipidome of PBMC and on the Lateral Diffusion of β 1-Adrenergic Receptors in C6 Cells, Universitäts- und Landesbibliothek Bonn, 2020. <https://bonndoc.ulb.uni-bonn.de/xmlui/handle/20.500.11811/8985>.
- (88) Frommholz, D.; Stefanczyk, N.; Ehl, A. *ChroDrip - IMAC v1*, 2018. DOI: 10.17504/protocols.io.uvvev66.
- (89) Keksel, N.; Bussmann, H.; Unger, M.; Drewe, J.; Boonen, G.; Häberlein, H.; Franken, S. St John's wort extract influences membrane fluidity and composition of phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine in rat C6 glioblastoma cells. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* **2019**, *54*, 66–76. DOI: 10.1016/j.phymed.2018.06.013. Published Online: Jun. 28, 2018.
- (90) Bussmann, H.; Häberlein, H.; Boonen, G.; Drewe, J.; Butterweck, V.; Franken, S. Effect of St. John's wort extract Ze 117 on the lateral mobility of β 1-adrenergic receptors in C6 cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **2023**, *157*, 114006. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.114006. Published Online: Nov. 14, 2022.
- (91) Jaqaman, K.; Loerke, D.; Mettlen, M.; Kuwata, H.; Grinstein, S.; Schmid, S. L.; Danuser, G. Robust single-particle tracking in live-cell time-lapse sequences. *Nat Methods* **2008**, *5* (8), 695–702. DOI: 10.1038/nmeth.1237. Published Online: Jul. 20, 2008.
- (92) Persson, F.; Lindén, M.; Unoson, C.; Elf, J. Extracting intracellular diffusive states and transition rates from single-molecule tracking data. *Nat Methods* **2013**, *10* (3), 265–269. DOI: 10.1038/nmeth.2367. Published Online: Feb. 10, 2013.

- (93) Atwood, B. K.; Lopez, J.; Wager-Miller, J.; Mackie, K.; Straiker, A. Expression of G protein-coupled receptors and related proteins in HEK293, AtT20, BV2, and N18 cell lines as revealed by microarray analysis. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 14. DOI: 10.1186/1471-2164-12-14. Published Online: Jan. 7, 2011.
- (94) Costa, T.; Herz, A. Antagonists with negative intrinsic activity at delta opioid receptors coupled to GTP-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **1989**, *86* (19), 7321–7325. DOI: 10.1073/pnas.86.19.7321.
- (95) Kenakin, T. Drug efficacy at G protein-coupled receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **2002**, *42*, 349–379. DOI: 10.1146/annurev.pharmtox.42.091401.113012.
- (96) Pottie, E.; Kupriyanova, O. V.; Shevyrin, V. A.; Stove, C. P. Synthesis and Functional Characterization of 2-(2,5-Dimethoxyphenyl)-N-(2-fluorobenzyl)ethanamine (25H-NBF) Positional Isomers. *ACS Chemical Neuroscience* **2021**, *12* (9), 1667–1673. DOI: 10.1021/acschemneuro.1c00124. Published Online: Apr. 28, 2021.
- (97) Yamamoto, I.; Kawasumi, K.; Ohkusu-Tsukada, K.; Arai, T. Molecular characterization of free fatty acid receptors FFAR2 and FFAR3 in the domestic cat. *Veterinary Medicine and Science* **2021**, *7* (1), 77–85. DOI: 10.1002/vms3.356. Published Online: Sep. 15, 2020.
- (98) Spillmann, M.; Thurner, L.; Romantini, N.; Zimmermann, M.; Meger, B.; Behe, M.; Waldhoer, M.; Schertler, G. F. X.; Berger, P. New Insights into Arrestin Recruitment to GPCRs. *International journal of molecular sciences* **2020**, *21* (14). DOI: 10.3390/ijms21144949. Published Online: Jul. 13, 2020.
- (99) Evans, C. A.; Zuluaga, A.; Vasquez Matute, D.; Baradaran-Noviri, S.; Perez-Cervantes, N.; Siegler, M. A. Synthesis and biological evaluation of thioadatanserin and its dialkylated products as partial 5-HTR1A agonists and 5-HTR2A antagonists for potential use in depression and anxiety disorders. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **2020**, *30* (16), 127358. DOI: 10.1016/j.bmcl.2020.127358. Published Online: Jun. 17, 2020.
- (100) DiscoverRx Corporation. PathHunter® β -Arrestin GPCR Assays: For Chemiluminescent Detection of Activated GPCRs **2012**.
- (101) Thermo Fisher Scientific. Tango HTR1A-bla U2OS Cell-Based Assay User Guide (Pub.No. MAN0003023 2.0) **2020**.
- (102) McCall, R. B.; Romero, A. G.; Bienkowski, M. J.; Harris, D. W.; McGuire, J. C.; Piercey, M. F.; Shuck, M. E.; Smith, M. W.; Svensson, K. A.; Schreur, P. J. Characterization of U-92016A as a selective, orally active, high intrinsic activity 5-hydroxytryptamine1A agonist. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **1994**, *271* (2), 875–883.
- (103) Cliffe, I. A.; Brightwell, C. I.; Fletcher, A.; Forster, E. A.; Mansell, H. L.; Reilly, Y.; Routledge, C.; White, A. C. (S)-N-tert-butyl-3-(4-(2-methoxyphenyl)-piperazin-1-yl)-2-

- phenylpropanamide (S)-WAY-100135: a selective antagonist at presynaptic and postsynaptic 5-HT_{1A} receptors. *Journal of medicinal chemistry* **1993**, *36* (10), 1509–1510. DOI: 10.1021/jm00062a028.
- (104) Soares-da-Silva, P.; Pinto-do-O, P. C.; Bertorello, A. M. Antagonistic actions of renal dopamine and 5-hydroxytryptamine: increase in Na⁺, K⁽⁺⁾-ATPase activity in renal proximal tubules via activation of 5-HT_{1A} receptors. *British Journal of Pharmacology* **1996**, *117* (6), 1199–1203. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb16716.x.
- (105) Smith, J. S.; Lefkowitz, R. J.; Rajagopal, S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* **2018**, *17* (4), 243–260. DOI: 10.1038/nrd.2017.229. Published Online: Jan. 5, 2018.
- (106) Slosky, L. M.; Caron, M. G.; Barak, L. S. Biased Allosteric Modulators: New Frontiers in GPCR Drug Discovery. *Trends in Pharmacological Sciences* **2021**, *42* (4), 283–299. DOI: 10.1016/j.tips.2020.12.005. Published Online: Feb. 10, 2021.
- (107) Jackson, A. Partial Agonist. In *Encyclopedia of psychopharmacology*; Stolerman, I. P., Ed.; Springer reference; Springer, 2010; pp 959–960.
- (108) Bouvier, M. Oligomerization of G-protein-coupled transmitter receptors. *Nat Rev Neurosci* **2001**, *2* (4), 274–286. DOI: 10.1038/35067575.
- (109) Rivero-Müller, A.; Chou, Y.-Y.; Ji, I.; Lajic, S.; Hanyaloglu, A. C.; Jonas, K.; Rahman, N.; Ji, T. H.; Huhtaniemi, I. Rescue of defective G protein-coupled receptor function in vivo by intermolecular cooperation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2010**, *107* (5), 2319–2324. DOI: 10.1073/pnas.0906695106. Published Online: Jan. 11, 2010.
- (110) Yates, M.; Leake, A.; Candy, J. M.; Fairbairn, A. F.; McKeith, I. G.; Ferrier, I. N. 5HT₂ receptor changes in major depression. *Biological psychiatry* **1990**, *27* (5), 489–496. DOI: 10.1016/0006-3223(90)90440-d.
- (111) Ogren, S. O.; Fuxe, K.; Agnati, L. F.; Gustafsson, J. A.; Jonsson, G.; Holm, A. C. Reevaluation of the indoleamine hypothesis of depression. Evidence for a reduction of functional activity of central 5-HT systems by antidepressant drugs. *Journal of Neural Transmission* **1979**, *46* (2), 85–103. DOI: 10.1007/BF01250331.
- (112) Fuxe, K.; Ogren, S. O.; Agnati, L.; Gustafsson, J. A.; Jonsson, G. On the mechanism of action of the antidepressant drugs amitriptyline and nortriptyline. Evidence for 5-hydroxytryptamine receptor blocking activity. *Neuroscience letters* **1977**, *6* (4), 339–343. DOI: 10.1016/0304-3940(77)90095-7.
- (113) Zhang, Y.; Gray, T. S.; D'Souza, D. N.; Carrasco, G. A.; Damjanoska, K. J.; Dudas, B.; Garcia, F.; Zainelli, G. M.; Sullivan Hanley, N. R.; Battaglia, G.; Muma, N. A.; van de Kar, L. D. Desensitization of 5-HT_{1A} receptors by 5-HT_{2A} receptors in neuroendocrine neurons in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **2004**, *310* (1), 59–66. DOI: 10.1124/jpet.103.062224. Published Online: Apr. 2, 2004.

- (114) Garnovskaya, M. N.; Nebigil, C. G.; Arthur, J. M.; Spurney, R. F.; Raymond, J. R. 5-Hydroxytryptamine_{2A} receptors expressed in rat renal mesangial cells inhibit cyclic AMP accumulation. *Molecular pharmacology* **1995**, *48* (2), 230–237.
- (115) Pottie, E.; Poulie, C. B. M.; Simon, I. A.; Harpsøe, K.; D'Andrea, L.; Komarov, I. V.; Gloriam, D. E.; Jensen, A. A.; Kristensen, J. L.; Stove, C. P. Structure-Activity Assessment and In-Depth Analysis of Biased Agonism in a Set of Phenylalkylamine 5-HT_{2A} Receptor Agonists. *ACS Chemical Neuroscience* **2023**, *14* (15), 2727–2742. DOI: 10.1021/acschemneuro.3c00267. Published Online: Jul. 20, 2023.
- (116) Odagaki, Y.; Kinoshita, M.; Ota, T.; Javier Meana, J.; Callado, L. F.; García-Sevilla, J. A. Functional activation of G α_q coupled to 5-HT_{2A} receptor and M1 muscarinic acetylcholine receptor in postmortem human cortical membranes. *Journal of Neural Transmission* **2017**, *124* (9), 1123–1133. DOI: 10.1007/s00702-017-1749-0. Published Online: Jul. 7, 2017.
- (117) Egan, C. T.; Herrick-Davis, K.; Miller, K.; Glennon, R. A.; Teitler, M. Agonist activity of LSD and lisuride at cloned 5HT_{2A} and 5HT_{2C} receptors. *Psychopharmacology* **1998**, *136* (4), 409–414. DOI: 10.1007/s002130050585.
- (118) McLean, T. H.; Parrish, J. C.; Braden, M. R.; Marona-Lewicka, D.; Gallardo-Godoy, A.; Nichols, D. E. 1-Aminomethylbenzocycloalkanes: conformationally restricted hallucinogenic phenethylamine analogues as functionally selective 5-HT_{2A} receptor agonists. *Journal of medicinal chemistry* **2006**, *49* (19), 5794–5803. DOI: 10.1021/jm060656o.
- (119) Sleight, A. J.; Stam, N. J.; Mutel, V.; Vanderheyden, P. M. Radiolabelling of the human 5-HT_{2A} receptor with an agonist, a partial agonist and an antagonist: effects on apparent agonist affinities. *Biochemical Pharmacology* **1996**, *51* (1), 71–76. DOI: 10.1016/0006-2952(95)02122-1.
- (120) Sako, Y.; Kusumi, A. Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *The Journal of cell biology* **1994**, *125* (6), 1251–1264. DOI: 10.1083/jcb.125.6.1251.
- (121) Simons, K.; Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **1997**, *387* (6633), 569–572. DOI: 10.1038/42408.
- (122) Renner, U.; Glebov, K.; Lang, T.; Papusheva, E.; Balakrishnan, S.; Keller, B.; Richter, D. W.; Jahn, R.; Ponimaskin, E. Localization of the mouse 5-hydroxytryptamine(1A) receptor in lipid microdomains depends on its palmitoylation and is involved in receptor-mediated signaling. *Molecular pharmacology* **2007**, *72* (3), 502–513. DOI: 10.1124/mol.107.037085. Published Online: May. 31, 2007.
- (123) Li, Q.; Muma, N. A. Estradiol potentiates 8-OH-DPAT-induced sumoylation of 5-HT_{1A} receptor: characterization and subcellular distribution of sumoylated 5-HT_{1A} receptors. *Psychoneuroendocrinology* **2013**, *38* (11), 2542–2553. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2013.05.016. Published Online: Jun. 18, 2013.

- (124) Sungkaworn, T.; Jobin, M.-L.; Burnecki, K.; Weron, A.; Lohse, M. J.; Calebiro, D. Single-molecule imaging reveals receptor-G protein interactions at cell surface hot spots. *Nature* **2017**, *550* (7677), 543–547. DOI: 10.1038/nature24264. Published Online: Oct. 18, 2017.
- (125) 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. *Biophysical journal* **2005**, *88* (5), 3659–3680. DOI: 10.1529/biophysj.104.048538. Published Online: Jan. 28, 2005.
- (126) Calebiro, D.; Rieken, F.; Wagner, J.; Sungkaworn, T.; Zabel, U.; Borzi, A.; Cocucci, E.; Zürn, A.; Lohse, M. J. Single-molecule analysis of fluorescently labeled G-protein-coupled receptors reveals complexes with distinct dynamics and organization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2013**, *110* (2), 743–748. DOI: 10.1073/pnas.1205798110. Published Online: Dec. 24, 2012.
- (127) Ibach, J.; Radon, Y.; Gelléri, M.; Sonntag, M. H.; Brunsveld, L.; Bastiaens, P. I. H.; Verveer, P. J. Single Particle Tracking Reveals that EGFR Signaling Activity Is Amplified in Clathrin-Coated Pits. *PLOS ONE* **2015**, *10* (11), e0143162. DOI: 10.1371/journal.pone.0143162. Published Online: Nov. 17, 2015.
- (128) Schwenzer, N.; Bussmann, H.; Franken, S.; Häberlein, H. Live-cell single-molecule analysis of β 2 -adrenergic receptor diffusion dynamics and confinement. *bioRxiv* **2018**, 406488. DOI: 10.1101/406488.
- (129) Chung, I.; Akita, R.; Vandlen, R.; Toomre, D.; Schlessinger, J.; Mellman, I. Spatial control of EGF receptor activation by reversible dimerization on living cells. *Nature* **2010**, *464* (7289), 783–787. DOI: 10.1038/nature08827. Published Online: Mar. 7, 2010.
- (130) Das, R.; Cairo, C. W.; Coombs, D. A hidden Markov model for single particle tracks quantifies dynamic interactions between LFA-1 and the actin cytoskeleton. *PLOS Computational Biology* **2009**, *5* (11), e1000556. DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000556. Published Online: Nov. 6, 2009.
- (131) Aatz, S.; Franken, S.; Kolb, C.; Häberlein, H. St. John's wort extract STW3-VI affects the binding behaviour, signal transduction and lateral mobility of 5-HT_{2A} receptors observed by single molecule detection and the use of a novel fluorescence-labeled ligand. *Phytomedicine Plus* **2022**, *2* (3), 100320. DOI: 10.1016/j.phyplu.2022.100320.
- (132) Sergé, A.; Bertaux, N.; Rigneault, H.; Marguet, D. Dynamic multiple-target tracing to probe spatiotemporal cartography of cell membranes. *Nat Methods* **2008**, *5* (8), 687–694. DOI: 10.1038/nmeth.1233. Published Online: Jul. 6, 2008.
- (133) Wang, S.; Liu, H.; Roberts, J. B.; Wiley, A. P.; Marayati, B. F.; Adams, K. L.; Luessen, D. J.; Eldeeb, K.; Sun, H.; Zhang, K.; Chen, R. Prolonged ethanol exposure modulates constitutive internalization and recycling of 5-HT_{1A} receptors. *Journal of neurochemistry* **2022**, *160* (4), 469–481. DOI: 10.1111/jnc.15564. Published Online: Dec. 29, 2021.

- (134) Bouaziz, E.; Emerit, M. B.; Vodjdani, G.; Gautheron, V.; Hamon, M.; Darmon, M.; Masson, J. Neuronal phenotype dependency of agonist-induced internalization of the 5-HT(1A) serotonin receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **2014**, *34* (1), 282–294. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0186-13.2014.
- (135) Luessen, D. J.; Sun, H.; McGinnis, M. M.; Hagstrom, M.; Marrs, G.; McCool, B. A.; Chen, R. Acute ethanol exposure reduces serotonin receptor 1A internalization by increasing ubiquitination and degradation of β -arrestin2. *The Journal of biological chemistry* **2019**, *294* (38), 14068–14080. DOI: 10.1074/jbc.RA118.006583. Published Online: Jul. 31, 2019.
- (136) Váradi, T.; Schneider, M.; Sevcsik, E.; Kiesenhofer, D.; Baumgart, F.; Batta, G.; Kovács, T.; Platzer, R.; Huppa, J. B.; Szöllősi, J.; Schütz, G. J.; Brameshuber, M.; Nagy, P. Homo- and Heteroassociations Drive Activation of ErbB3. *Biophysical journal* **2019**, *117* (10), 1935–1947. DOI: 10.1016/j.bpj.2019.10.001. Published Online: Oct. 9, 2019.
- (137) Cézanne, L.; Lecat, S.; Lagane, B.; Millot, C.; Vollmer, J.-Y.; Matthes, H.; Galzi, J.-L.; Lopez, A. Dynamic confinement of NK2 receptors in the plasma membrane. Improved FRAP analysis and biological relevance. *Journal of Biological Chemistry* **2004**, *279* (43), 45057–45067. DOI: 10.1074/jbc.M404811200. Published Online: Aug. 3, 2004.
- (138) Möller, J.; Isbilir, A.; Sungkaworn, T.; Osberg, B.; Karathanasis, C.; Sunkara, V.; Grushevskiy, E. O.; Bock, A.; Annibale, P.; Heilemann, M.; Schütte, C.; Lohse, M. J. Single-molecule analysis reveals agonist-specific dimer formation of μ -opioid receptors. *Nat Chem Biol* **2020**, *16* (9), 946–954. DOI: 10.1038/s41589-020-0566-1. Published Online: Jun. 15, 2020.
- (139) Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. Cholesterol depletion induces dynamic confinement of the G-protein coupled serotonin(1A) receptor in the plasma membrane of living cells. *Biochimica et biophysica acta* **2007**, *1768* (3), 655–668. DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.01.002. Published Online: Jan. 12, 2007.
- (140) Ganguly, S.; Pucadyil, T. J.; Chattopadhyay, A. Actin cytoskeleton-dependent dynamics of the human serotonin1A receptor correlates with receptor signaling. *Biophysical journal* **2008**, *95* (1), 451–463. DOI: 10.1529/biophysj.107.125732. Published Online: Mar. 13, 2008.
- (141) Azzaz, F.; Yahi, N.; Di Scala, C.; Chahinian, H.; Fantini, J. Ganglioside binding domains in proteins: Physiological and pathological mechanisms. *Advances in protein chemistry and structural biology* **2022**, *128*, 289–324. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2021.08.003. Published Online: Oct. 11, 2021.
- (142) Hinz, S.; Navarro, G.; Borroto-Escuela, D.; Seibt, B. F.; Ammon, Y.-C.; Filippo, E. de; Danish, A.; Lacher, S. K.; Červinková, B.; Rafehi, M.; Fuxe, K.; Schiedel, A. C.; Franco, R.; Müller, C. E. Adenosine A2A receptor ligand recognition and signaling is blocked by A2B receptors. *Oncotarget* **2018**, *9* (17), 13593–13611. DOI: 10.18632/oncotarget.24423. Published Online: Feb. 6, 2018.
- (143) Raïch, I.; Rebassa, J. B.; Lillo, J.; Cordomi, A.; Rivas-Santisteban, R.; Lillo, A.; Reyes-Resina, I.; Franco, R.; Navarro, G. Antagonization of OX1 Receptor Potentiates CB2 Receptor Function in

Microglia from APPSw/Ind Mice Model. *International journal of molecular sciences* **2022**, *23* (21). DOI: 10.3390/ijms232112801. Published Online: Oct. 24, 2022.

(144) Kuchler, O.; Gerlach, J.; Vomhof, T.; Hettich, J.; Steinmetz, J.; Gebhardt, J. C. M.; Michaelis, J.; Knöll, B. Single-molecule tracking (SMT) and localization of SRF and MRTF transcription factors during neuronal stimulation and differentiation. *Open biology* **2022**, *12* (5), 210383. DOI: 10.1098/rsob.210383. Published Online: May. 11, 2022.

(145) Serebryanny, L. A.; Ball, D. A.; Karpova, T. S.; Misteli, T. Single molecule analysis of lamin dynamics. *Methods (San Diego, Calif.)* **2019**, *157*, 56–65. DOI: 10.1016/j.ymeth.2018.08.009. Published Online: Aug. 24, 2018.

(146) Kondaurova, E. M.; Bazovkina, D. V.; Naumenko, V. S. 5-HT_{1A}/5-HT₇ receptor interplay: Chronic activation of 5-HT₇ receptors decreases the functional activity of 5-HT_{1A} receptor and its content in the mouse brain. *Mol Biol* **2017**, *51* (1), 136–142. DOI: 10.1134/S0026893316060108.

(147) Prasad, S.; Ponimaskin, E.; Zeug, A. Serotonin receptor oligomerization regulates cAMP-based signaling. *Journal of cell science* **2019**, *132* (16). DOI: 10.1242/jcs.230334. Published Online: Aug. 23, 2019.

(148) Kenakin, T. Agonists, partial agonists, antagonists, inverse agonists and agonist/antagonists? *Trends in Pharmacological Sciences* **1987**, *8* (11), 423–426. DOI: 10.1016/0165-6147(87)90229-x.

(149) Bosker, F. J.; Folgering, J. H. A.; Gladkevich, A. V.; Schmidt, A.; van der Hart, M. C. G.; Sprouse, J.; Boer, J. A. den; Westerink, B. H. C.; Cremers, T. I. F. H. Antagonism of 5-HT_{1A} receptors uncovers an excitatory effect of SSRIs on 5-HT neuronal activity, an action probably mediated by 5-HT₇ receptors. *Journal of neurochemistry* **2009**, *108* (5), 1126–1135. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2008.05850.x. Published Online: Jan. 23, 2009.

(150) Newman-Tancredi, A.; Conte, C.; Chaput, C.; Spedding, M.; Millan, M. J. Inhibition of the constitutive activity of human 5-HT_{1A} receptors by the inverse agonist, spiperone but not the neutral antagonist, WAY 100,635. *British Journal of Pharmacology* **1997**, *120* (5), 737–739. DOI: 10.1038/sj.bjp.0701025.

(151) Cosi, C.; Koek, W. The putative silent 5-HT_{1A} receptor antagonist, WAY 100635, has inverse agonist properties at cloned human 5-HT_{1A} receptors. *European journal of pharmacology* **2000**, *401* (1), 9–15. DOI: 10.1016/s0014-2999(00)00410-6.

(152) Dupuis, D. S.; Wurch, T.; Tardif, S.; Colpaert, F. C.; Pauwels, P. J. Modulation of 5-HT_{1A} receptor activation by its interaction with wild-type and mutant g(α₃) proteins. *Neuropharmacology* **2001**, *40* (1), 36–47. DOI: 10.1016/s0028-3908(00)00098-8.

(153) 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. *Molecular pharmacology* **2007**, *71* (3), 638–643. DOI: 10.1124/mol.106.029769. Published Online: Dec. 13, 2006.

- (154) Kim, M. H.; Leem, Y. H. Chronic exercise improves repeated restraint stress-induced anxiety and depression through 5HT1A receptor and cAMP signaling in hippocampus. *Journal of exercise nutrition & biochemistry* **2014**, *18* (1), 97–104. DOI: 10.5717/jenb.2014.18.1.97. Published Online: Feb. 26, 2014.
- (155) Moses-Kolko, E. L.; Wisner, K. L.; Price, J. C.; Berga, S. L.; Drevets, W. C.; Hanusa, B. H.; Loucks, T. L.; Meltzer, C. C. Serotonin 1A receptor reductions in postpartum depression: a positron emission tomography study. *Fertility and sterility* **2008**, *89* (3), 685–692. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2007.03.059. Published Online: Jun. 4, 2007.
- (156) Haddjeri, N.; BLIER, P.; MONTIGNY, C. de. Long-term antidepressant treatments result in a tonic activation of forebrain 5-HT1A receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **1998**, *18* (23), 10150–10156. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.18-23-10150.1998.
- (157) Freeman-Daniels, E.; Beck, S. G.; Kirby, L. G. Cellular correlates of anxiety in CA1 hippocampal pyramidal cells of 5-HT1A receptor knockout mice. *Psychopharmacology* **2011**, *213* (2-3), 453–463. DOI: 10.1007/s00213-010-2030-5. Published Online: Oct. 28, 2010.
- (158) Vanhoenacker, P.; Haegeman, G.; Leysen, J. E. 5-HT7 receptors: current knowledge and future prospects. *Trends in Pharmacological Sciences* **2000**, *21* (2), 70–77. DOI: 10.1016/s0165-6147(99)01432-7.
- (159) Lévi, S.; Le Roux, N.; Eugène, E.; Poncer, J. C. Benzodiazepine ligands rapidly influence GABAA receptor diffusion and clustering at hippocampal inhibitory synapses. *Neuropharmacology* **2015**, *88*, 199–208. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2014.06.002. Published Online: Jun. 12, 2014.

9. Anhang

	Midi		Maxi	
1–3 Cultivation and harvest	4,500–6,000 x g 4 °C, 15 min			
4–5 Cell lysis <i>(Important: Check Buffer LYS for precipitated SDS)</i>	High-copy/low-copy 8 mL/16 mL Buffer RES 8 mL/16 mL Buffer LYS RT, 5 min		High-copy/low-copy 12 mL/24 mL Buffer RES 12 mL/24 mL Buffer LYS RT, 5 min	
6 Equilibration of the column and filter	12 mL Buffer EQU		25 mL Buffer EQU	
7 Neutralization	8 mL/16 mL Buffer NEU Mix thoroughly until colorless		12 mL/24 mL Buffer NEU Mix thoroughly until colorless	
8 Clarification and loading of the lysate	Invert the tube 3 times Load lysate on NucleoBond® Xtra Column Filter			
9 1 st Wash	5 mL Buffer EQU !		15 mL Buffer EQU !	
10 Filter removal	Discard NucleoBond® Xtra Column Filter		Discard NucleoBond® Xtra Column Filter	
11 2 nd Wash	8 mL Buffer WASH !		25 mL Buffer WASH !	
12 Elution	5 mL Buffer ELU		15 mL Buffer ELU	
13 Precipitation	NucleoBond® Xtra Midi	NucleoBond® Xtra Midi Plus	NucleoBond® Xtra Maxi	NucleoBond® Xtra Maxi Plus
	3.5 mL Isopropanol Vortex 4,5–15,000 x g 4 °C, 30 min	3.5 mL Isopropanol Vortex RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer	10.5 mL Isopropanol Vortex 4,5–15,000 x g 4 °C, 30 min	10.5 mL Isopropanol Vortex RT, 2 min Load NucleoBond® Finalizer Large
14 Washing and drying	2 mL 70% ethanol 4,5–15,000 x g RT, 5 min 10–15 min	2 mL 70% ethanol ≥ 6 x air until dry	4 mL 70% ethanol 4,5–15,000 x g RT, 5 min 15–30 min	4 mL 70% ethanol ≥ 6 x air until dry
15 Reconstitution	Appropriate volume of TE buffer	200–800 µL Buffer TRIS	Appropriate volume of TE buffer	400–1000 µL Buffer TRIS

Abbildung A 1: Protokoll des NucleoBond® Xtra Midi Kits

Weitere Informationen zum NucleoBond® Xtra Midi Kit können auf der Website des Unternehmens unter <https://www.mn-net.com/de/nucleobond-xtra-midi-kit-for-transfection-grade-plasmid-dna-740410.50> gefunden werden.

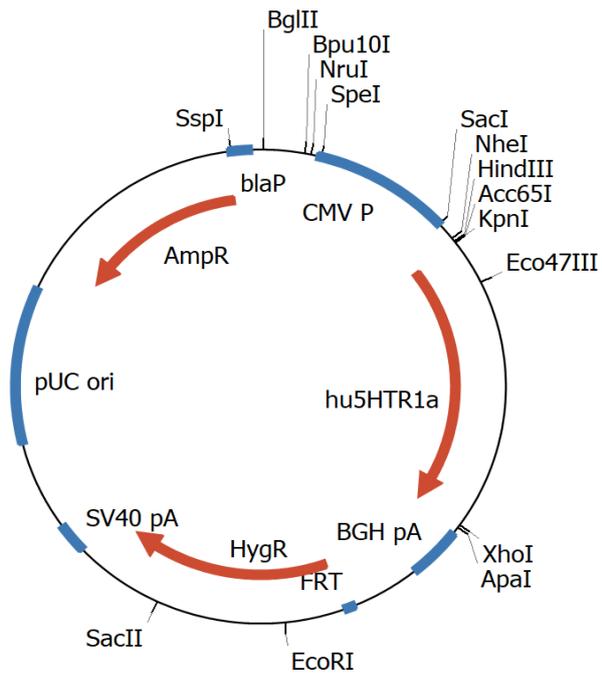


Abbildung A 2: Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT1a

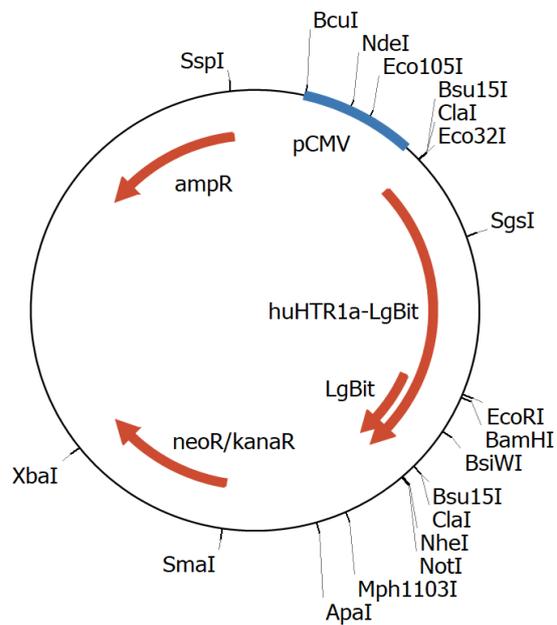


Abbildung A 3: Plasmidkarte pcDNA3_5HT1a-LgBiT

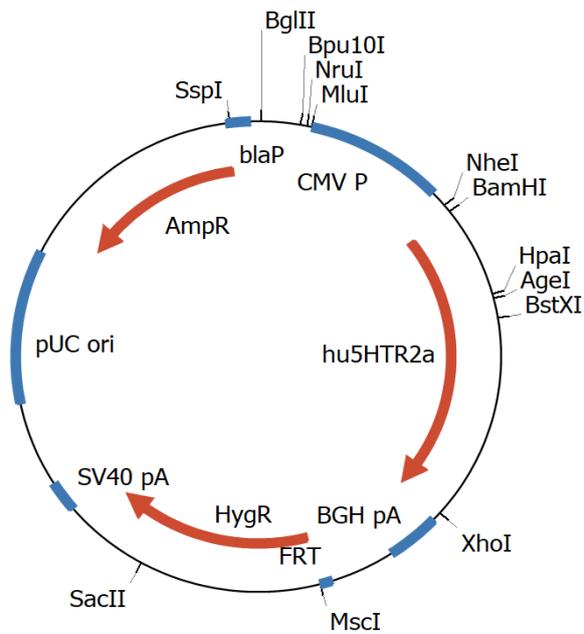


Abbildung A 4: Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT2a

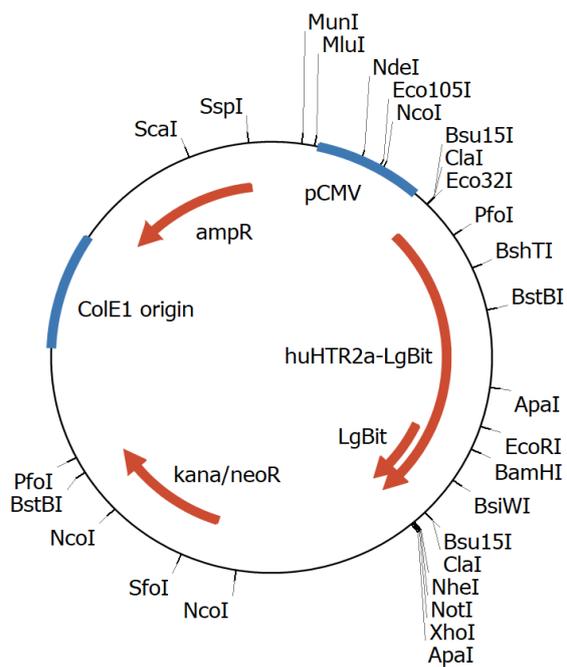


Abbildung A 5: Plasmidkarte pcDNA3_5HT2a-LgBiT

	PCR clean-up	Gel extraction	DNA clean-up (with SDS)	Single stranded DNA clean-up
1 PCR clean-up, DNA clean-up, or single stranded DNA clean-up: Adjust binding condition Gel extraction: Excise DNA fragment/ solubilize gel slice		 		
	200 µL NT1/ 100 µL PCR	200 µL NT1/ 100 mg gel 50 °C 5–10 min	500 µL NTB/ 100 µL sample	200 µL NTC/ 100 µL sample
2 Bind DNA		 	11,000 x g 30 s	
3 Wash silica membrane		 	700 µL NT3 11,000 x g 30 s <u>Recommended:</u> 2 nd wash 700 µL NT3 11,000 x g 30 s	
4 Dry silica membrane		 	11,000 x g 1 min	
5 Elute DNA		 	15–30 µL NE RT 1 min 11,000 x g 1 min	

Abbildung A 6: Protokoll des NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kits

Weitere Informationen zum NucleoSpin® Gel und PCR Clean-up Kit können auf der Website des Unternehmens unter <https://www.mn-net.com/de/nucleospin-gel-and-pcr-clean-up-mini-kit-for-gel-extraction-and-pcr-clean-up-740609.50> gefunden werden.

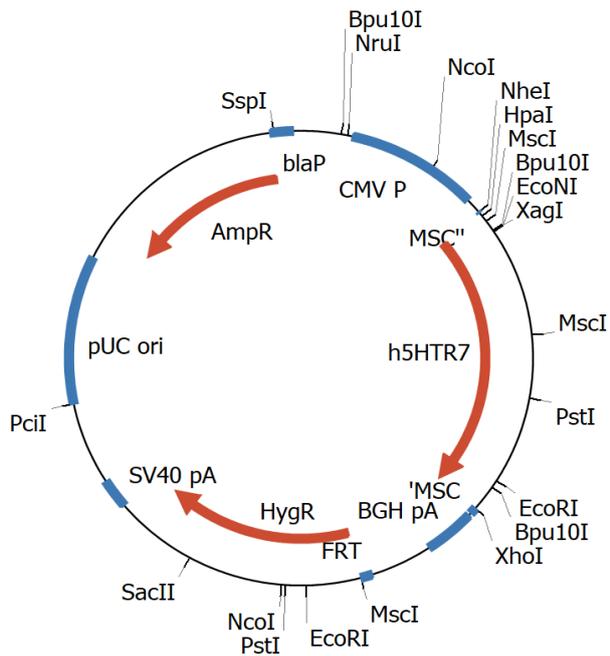


Abbildung A 7: Plasmidkarte pcDNA5FRT_5HT7

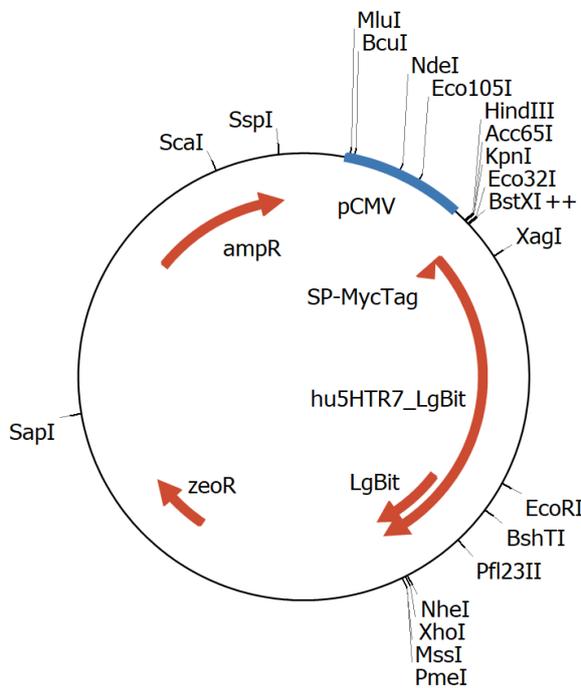


Abbildung A 8: Plasmidkarte pcDNA3_5HT7-LgBiT

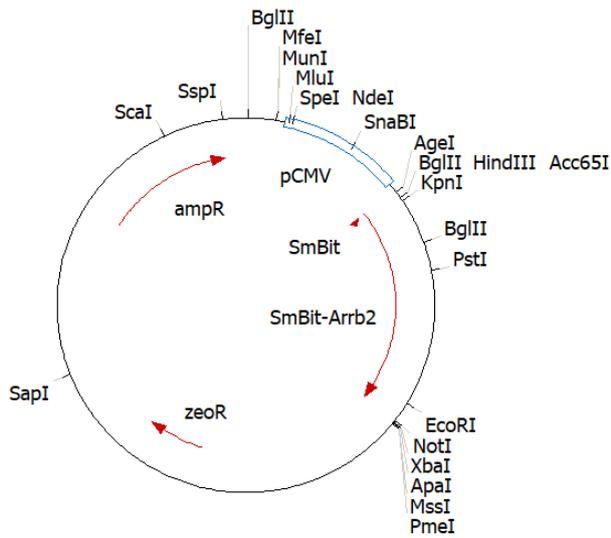


Abbildung A 9: Plasmidkarte pcDNA3.1Zeo_SmBiT-ARRB2

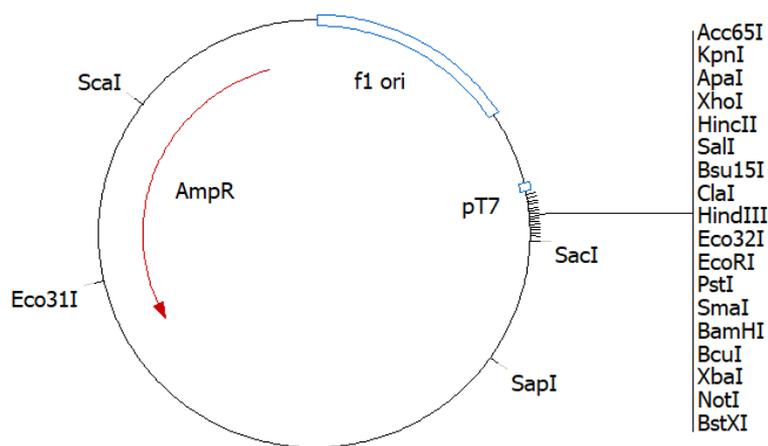


Abbildung A 10: Plasmidkarte pBlueskript SK (-)

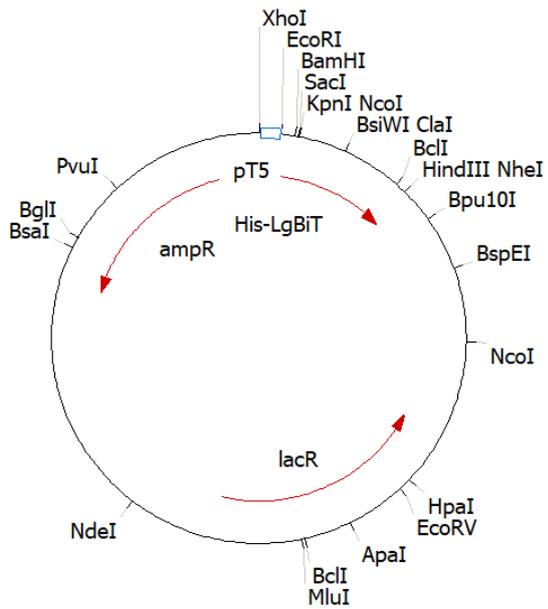


Abbildung A 13: Plasmidkarte pQE80L_His-LgBiT

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denjenigen danken, die mich während meiner Promotionszeit unterstützt haben und immer für mich da waren.

Ich bedanke mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Häberlein, dafür, dass ich meine Dissertation unter seiner Leitung anfertigen durfte. Hanns, vielen Dank, dass der Weg zu Dir immer kurz war, unsere Absprachen immer unkompliziert und Du mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hast.

Frau Prof. Müller danke ich ganz herzlich für die Übernahme meines Koreferats. Ihr ist es auch zu verdanken, dass ich als Masterstudentin eine so tolle und eindrucksvolle Zeit an der Universität Barcelona verbringen konnte. Diese Erfahrung hat mich maßgeblich darin bestärkt, im Bereich der Molekularen Wirkstoffforschung zu promovieren.

Großer Dank gilt auch PD Dr. Sebastian Franken für die intensive Zusammenarbeit. Danke Sebastian für die vielen kostbaren Ratschläge, für die zahlreichen Denkanstöße, die Du eingebracht hast, und Deinen Erfahrungsschatz, von dem Du uns immer hast profitieren lassen.

Ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen KollegInnen der AG Häberlein Fabio, Luisa und Swen sowie Alma und Emily. Ohne Euch wären diese letzten Jahre nicht dieselben gewesen. Ihr seid mir ans Herz gewachsen, wichtige FreundInnen geworden. Danke für euren Rat und eure unermüdliche Unterstützung.

Ich möchte mich auch bei meiner Familie und meinen FreundInnen für ihr offenes Ohr, ihr Verständnis, die gemeinsame Zeit – manchmal auch Ablenkung – und die viele positive Energie bedanken. Opa, Dir gilt selbstverständlich besonderer Dank für Dein tapferes Korrekturlesen in einem Themenfeld, das Dir ferner kaum hätte liegen können.

Zu guter Letzt danke ich Dir, Patrick, für alles. Ohne Dich wäre zwar alles möglich, aber nichts auch nur halb so schön.

11. Publikation

Bremer, Swen; Weitkemper, Eva; Häberlein, Hanns; Franken, Sebastian (2024): St. John's wort extract Ze 117 alters the membrane fluidity of C6 glioma cells by influencing cellular cholesterol metabolism. In: *Sci Rep* 14 (1), S. 9878. DOI: 10.1038/s41598-024-60562-0.