

**Untersuchungen zum Einfluss von Inhaltsstoffen  
aus *Hypericum perforatum* L. auf das  $\beta$ -adrenerge  
Rezeptorsystem am postsynaptischen Modell  
lebender Zellen**

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

**Lars-Norbert Prenner**

aus

Bremen-Vegesack

**Bonn 2006**

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

1. Referent: Prof. Dr. H. Häberlein  
2. Referent: Prof. Dr. G. König

Tag der Promotion: 04.07.2006

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn  
[http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2006

Laty  
und meiner Familie

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 <i>Hypericum perforatum</i> L.</b>	<b>2</b>
1.1.1 Systematik	2
1.1.2 Botanik	2
1.1.3 Inhaltsstoffe	3
1.1.3.1 Naphthodianthrone	3
1.1.3.2 Flavonoide	4
1.1.3.3 Phloroglucinderivate	5
1.1.4 Hyperici herba	6
1.1.4.1 Pharmakologie	7
1.1.4.2 Klinische Studien	12
1.1.4.3 Nebenwirkungen / Wechselwirkungen	14
<b>1.2 <math>\beta</math>-Adrenerge Rezeptoren</b>	<b>16</b>
1.2.1 Klassifizierung	16
1.2.2 Struktur und Signaltransduktion	20
1.2.3 Neurotransmitter und abgeleitete Strukturen	22
1.2.4 Regulation	23
1.2.5 Mobilität von Rezeptorproteinen in der Biomembran	25
1.2.6 Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien	27
<b>1.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie</b>	<b>28</b>
1.3.1 Theoretischer Hintergrund	28
1.3.2 Mathematischer Hintergrund	30
1.3.3 Geräte-Setup	33
1.3.4 Voraussetzungen für FCS-Messungen	34
1.3.4.1 Fluorophore	34
1.3.4.2 Hintergrundsignal	35
1.3.5 FCS-Messungen an lebenden Zellen	35
<b>1.4 Grün Fluoreszierendes Protein (GFP)</b>	<b>38</b>
1.4.1 Wildtyp-GFP und Varianten	38
1.4.2 GFP-Fusionsproteine und Anwendungen	40
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>41</b>

<b>3. Experimenteller Teil</b>	<b>43</b>
<b>3.1 Synthese von Alexa532-Noradrenalin</b>	<b>43</b>
3.1.1 Noradrenalin	43
3.1.2 Synthese	44
3.1.3 Reinigung und Analytik von Alexa532-NA	46
<b>3.2 Zellen für Bindungsstudien am <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptor mit Alexa532-NA</b>	<b>48</b>
<b>3.3 Bindungsstudien mit Alexa532-NA am <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptor</b>	<b>51</b>
3.3.1 Bindung von Alexa532-NA an C6-Zellen	51
3.3.2 FCS-Bindungsstudien	52
3.3.3 Agonistisches Profil und Funktionalität von Alexa532-NA	57
<b>3.4 Untersuchungen zum Einfluß von Inhaltsstoffen aus <i>Hypericum perforatum</i> auf die Regulation <math>\beta_2</math>-adrenerger Rezeptoren</b>	<b>60</b>
3.4.1 Einsatz von Testsubstanzen und Kontrollen	60
3.4.2 Subchronische Inkubationen von C6-Zellen für 72 h	62
3.4.3 Akute Gabe von Testsubstanzen für 24 h	67
3.4.4 Einfluss von Flavonoiden auf die Alexa532-NA Bindung an C6-Zellen	68
3.4.5 Hypericin und Pseudohypericin im FCS-Bindungsassay	70
3.4.6 Einfluss von Testsubstanzen auf stimulierbares, intrazelluläres cAMP	70
<b>3.5 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen mit <math>\beta</math>-AR-GFP Fusionsproteinen</b>	<b>73</b>
3.5.1 $\beta$ -AR-GFP Fusionsproteine	73
3.5.2 Technische Voraussetzungen	74
3.5.3 Rezeptormobilitäten und Verteilungsmuster	76
3.5.4 Regulation der $\beta$ -AR-GFP Fusionsproteine	78
3.5.5 Einfluss von Hyperforin und Hyperosid auf die Regulation und Mobilität des $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors	81
3.5.6 Vorinkubationen von HEK293 $\beta_2$ AR-GFP	86
<b>4. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick</b>	<b>87</b>
<b>5. Material und Methoden</b>	<b>98</b>
<b>5.1 Geräte</b>	<b>98</b>
5.1.1 FCS	98
5.1.2 HPLC-Ausstattung	98
5.1.3 Fluoreszenzmikroskop	99
5.1.4 Massenspektrometer	99

<b>5.2 Zellkulturen</b>	<b>99</b>
5.2.1 Pränatale hippocampale Neurone	99
5.2.2 N2a-Zellen	100
5.2.3 C6-Zellen	100
5.2.4 C6 $\beta_1$ AR-GFP Zellen	100
5.2.5 HEK293 $\beta_2$ AR-GFP Zellen	101
<b>5.3 Synthese und Analytik des fluoreszenzmarkierten Alexa532-Noradrenalin</b>	<b>102</b>
<b>5.4 Lebendzellmessungen</b>	<b>102</b>
<b>5.5 Bindungsstudien am <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptor</b>	<b>103</b>
<b>5.6 Datenauswertung</b>	<b>105</b>
5.6.1 FCS-Messungen	105
5.6.2 Statistische Auswertung	105
<b>5.7 cAMP-Messungen</b>	<b>106</b>
<b>5.8 Substanzen</b>	<b>106</b>
5.8.1 Inhaltsstoffe aus <i>Hypericum perforatum</i> L.	106
5.8.1.1 Kontrolle der Stabilität von Hyperforin-haltigen Proben	107
5.8.2 Substanzen für Kontrollmessungen	107
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>7. Poster, Publikationen und Vorträge</b>	<b>125</b>
7.1 Publikationen	125
7.2 Poster	125
7.3 Vorträge	126
<b>Danksagung</b>	<b>127</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>129</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

5-HT	5-Hydroxytryptamin, Serotonin
Abb.	Abbildung
AC	Adenylatzyklase
AR	adrenerger Rezeptor
ber.	berechnet
$\beta$ -AR	$\beta$ -adrenerger Rezeptor
bzw.	beziehungsweise
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
ca.	circa
cm	Zentimeter
cpm	counts per molecule
D	Diffusionskoeffizient
DA	Dopamin
DAC	Deutscher Arzneimittelkodex
d.h.	das heißt
EEG	Elektro-Enzephalographie
engl.	englisch
FCS	Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie
fl	Femtoliter
FM	Fluoreszenzmikroskopie
g	Gramm
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GDP	Guanidindiphosphat
GTP	Guanidintriphosphat
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptorkinase
h	Stunde(n)
HPLC	High Performance Liquid Chromatographie
IL	Interleukin
IC <sub>50</sub>	halbmaximale Hemmkonzentration
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kHz	Kilohertz
kW	Kilowatt
l	Liter

---

L.	Linné
MAO	Monoaminoxidase
min	Minute(n)
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
ms	Millisekunde(n)
n	Anzahl
N	Partikelzahl
NA	Noradrenalin
nm	Nanometer
nM	nanomolar
ns	Nanosekunde(n)
PLC	Phospholipase C
REM	Rapid Eye Movement
RP	Reversed Phase
RRA	Radio-Rezeptor-Assay
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	siehe
SSRI	Selektiver-Serotonin-Reuptake-Hemmer
Tab.	Tabelle
TCA	Trizyklisches Antidepressivum
$\tau_{\text{Diff}}$	Diffusionszeitkonstante
TM	Transmembrandomäne
U	Unit
u.a.	unter anderem
UV/VIS	Ultraviolett-Visible
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{M}$	mikromolar
$\mu\text{s}$	Mikrosekunde(n)
$\mu\text{m}$	Mikrometer
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel



## 1. Einleitung

„Johanniskraut: So gut oder schlecht wie konventionelle Antidepressiva?“, und „Antidepressiva: Lebensgefährliche Placebos?“ lauteten die Schlagzeilen zweier Artikel im *arznei-telegramm* vom Mai 2005 [170,171]. In diesen wird die seit mehreren Jahren in unabhängigen Fachkreisen international geführte Diskussion aufgegriffen, inwieweit alle zugelassenen synthetischen sowie pflanzlichen Antidepressiva überhaupt eine Placebo-überlegene therapeutische Wirkung haben. Eine breite praktische Anwendung von Antidepressiva mit jährlich steigenden Verordnungszahlen sei, so die Autoren, bei einer kritischen Nutzen-Risiko-Bewertung aufgrund der vorhandenen, aber augenscheinlich wenig bekannten schlechten Datenlage, nicht vertretbar. Auf der anderen Seite gehören Depressionen und Angststörungen zu den häufigsten psychischen Erkrankungen überhaupt, mit einer Prävalenz von über 15 % in der Bevölkerung. Die Komplexität depressiver Krankheitsbilder, deren Ursachen zudem durch ein hohes Maß an Individualität geprägt sind, und der hohe Leidensdruck der Patienten, lassen jedoch die Pharmakotherapie im Rahmen eines dualen Behandlungsprinzips mit Antidepressiva und psychotherapeutischen Maßnahmen nach wie vor als gerechtfertigt erscheinen [217]. Der Aufklärungsbedarf über den Nutzen und die Risiken von Antidepressiva ist daher heute größer denn je, zumal hier eine seit Jahrzehnten angewandte ganze Arzneimittelgruppe in der Kritik steht.

Die in der Volksmedizin schon seit Jahrtausenden eingesetzte Heilpflanze *Hypericum perforatum* L. (Johanniskraut) wird in Form von arzneimittelrechtlich zugelassenen Fertigarzneimitteln auf der Basis von hydroalkoholischen Trockenextrakten seit Anfang der 1990er Jahre verstärkt für die Therapie von leichten bis mittelschweren Depressionen eingesetzt und stellt gerade aufgrund ihres günstigen Nebenwirkungsprofils eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva, auch in der Selbstmedikation, dar. Der antidepressive Wirkmechanismus von *Hypericum*-Extrakten ist jedoch nicht vollständig geklärt und die Anwendung eines Vielstoffgemisches bietet in diesem Zusammenhang immer wieder Anlass zur Kritik, zumal es bei der Verabreichung von *Hypericum*-Präparaten eine Reihe von Wechselwirkungen mit anderen Arzneistoffen zu beachten gilt, welche zu nicht unerheblichen Komplikationen führen können. Mittlerweile sind verschiedene Inhaltsstoffe aus *Hypericum perforatum* auf ihre antidepressive Wirksamkeit und ihr Nebenwirkungspotential in einer Reihe von Untersuchungen getestet worden. Das Naphthodianthron Hypericin und seine Derivate wurden lange Zeit als antidepressiv wirksamkeitsbestimmende Substanzen betrachtet [203,222]. Dieses Wissen gilt heute jedoch als überholt, und das Phloroglucinolderivat Hyperforin und bestimmte Flavonoide sind zunehmend in den Mittelpunkt der Forschungen zum antidepressiven Wirkmechanismus von *Hypericum*-Zubereitungen gerückt [39,158].

## 1.1 *Hypericum perforatum* L.

### 1.1.1 Systematik

*Hypericum perforatum* LINNÉ (Synonyme: *Hypericum officinarum* CRANTZ; *Hypericum officinale* GATER ex STEUD; *Hypericum vulgare* Lam.) ist eine in ganz Europa, Westasien, auf den Kanarischen Inseln und in Nordafrika heimische, ausdauernde Pflanze.

Die Gattung *Hypericum* L. gehört zur Familie der Hypericaceae (syn. Guttiferae), Ordnung Theales (Guttiferales) und umfasst weltweit 370 Arten [192], von denen ca. 20 in Mitteleuropa und ca. 60 in ganz Europa heimisch sind.

### 1.1.2 Botanik

Die laut Deutschem Arzneimittelcodex (DAC 1986) offizielle Art *Hypericum perforatum* L., das Tüpfel-Johanniskraut, ist eine ausdauernde, bis ein Meter hohe aufrechte Pflanze. Charakteristika der Spezies sind goldgelbe, fünfzählige, in Trugdolden angeordnete Blüten, schmale, fein zugespitzte Kelchblätter sowie stielrunde, kahle, mit zwei Längskanten besetzte Stengel [56]. Die länglich elliptischen Blätter weisen eine durchscheinende Punktierung (Namensgebung *perforatum*) auf und sind mit schwarzen Drüsen am Rand und teilweise auch auf der Fläche besetzt [97]. Die Blütezeit ist von Juni bis September [197].



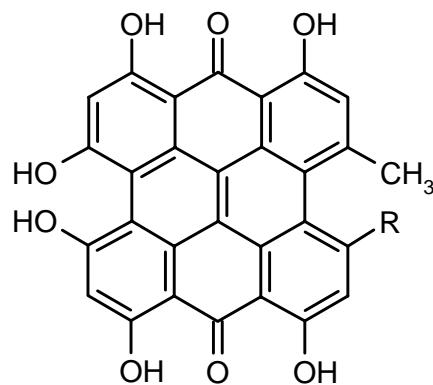
Abbildung 1.1-1 : *Hypericum perforatum* L.

### 1.1.3 Inhaltsstoffe

Hauptinhaltsstoffe von *Hypericum perforatum* sind Naphthodianthrone, Flavonoide und Phloroglucine. Daneben wurde aus der Gruppe der Xanthonderivate 1,3,6,7-Tetrahydroxyxanthon isoliert sowie Catechingerbstoffe, Procyanidine, Anthrachinone, Blütenfarbstoffe und Pflanzensäuren wie z.B. Chlorogen- und Kaffeesäure nachgewiesen.

#### 1.1.3.1 Naphthodianthrone

Von zehn bisher isolierten Naphthodianthronstrukturen sind Hypericin [7,28,172] und Pseudohypericin [29,30,43] (Abb. 1.1-2) sowie deren Biosynthesevorstufen Protohypericin und Protopseudohypericin mengenmäßig von Bedeutung. Der Gehalt von Hypericin und hypericinähnlichen Substanzen liegt im getrockneten Kraut bei durchschnittlich 0,1 bis 0,15 % und ist in Blüten und Knospen mit 0,2 bis 0,3 % am höchsten.



R= CH<sub>3</sub>      Hypericin

R= CH<sub>2</sub>OH    Pseudohypericin

Abbildung 1.1-2 : Naphthodianthrone aus *Hypericum perforatum*

### 1.1.3.2 Flavonoide

Johanniskraut enthält ein breites Spektrum an Flavonoiden (2 bis 4 %), von denen die Quercetinglykoside Hyperosid (0,7 %), Rutosid (Rutin) (0,3 %), Quercitrin (0,3 %) und Isoquercitrin (0,3 %) die Hauptkomponenten sind (Abb. 1.1-3). Als Aglyka kommen Quercetin, Dihydroquercetin, Kämpferol, Luteolin und Myricetin vor. Charakteristisch für diese Art ist das Vorkommen der sonst in der Natur eher selten anzutreffenden Biflavonoide I3, II8-Biapigenin (0,1 bis 0,5 %) und I3', II8-Biapigenin (Amentoflavon) (0,01 - 0,05 %) (Abb. 1.1-3) in geringen Mengen. Diese sind nur in den Blüten von *Hypericum perforatum* lokalisiert [98].

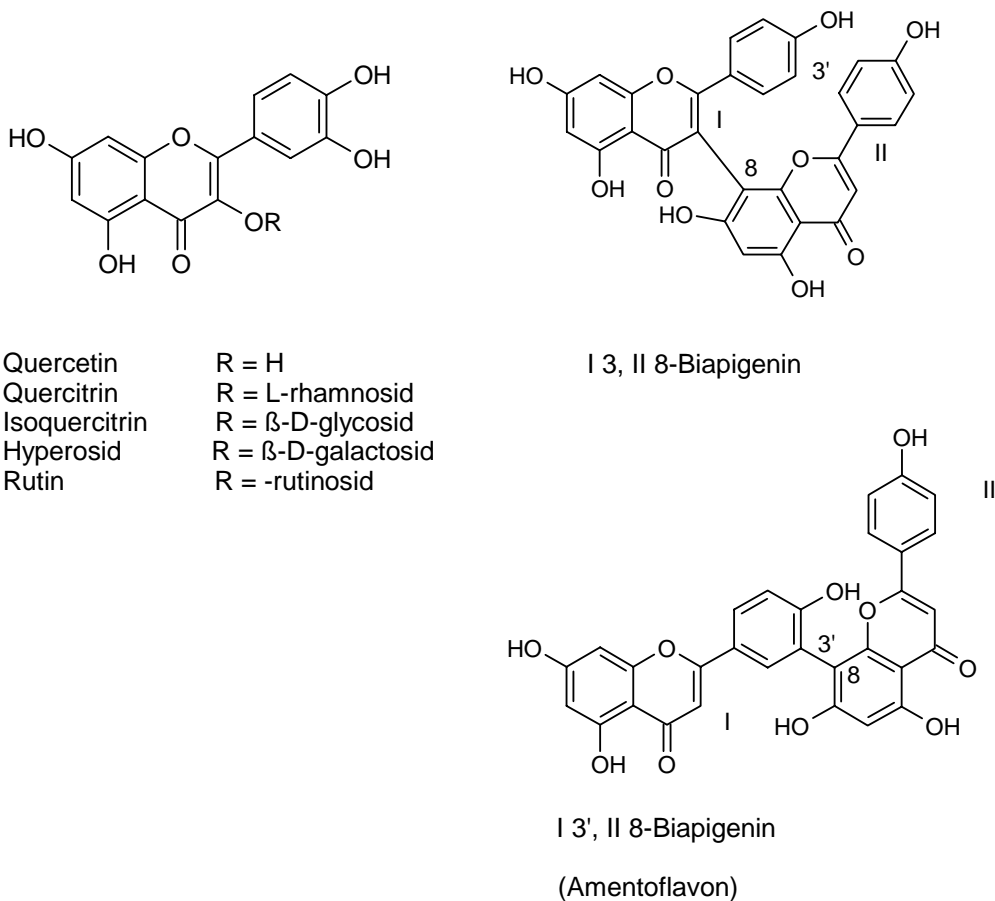


Abbildung 1.1-3 : Flavonoide aus *Hypericum perforatum*

### 1.1.3.3 Phloroglucinderivate

Typisch für *Hypericum perforatum* ist das Vorkommen des mengenmäßigen Hauptinhaltsstoffes Hyperforin (2 bis 4 %) sowie geringer Mengen Adhyperforin (0,2 -1,9 %) (Abb. 1.1-4), wobei der Gehalt in reifen Früchten (4,4 %) besonders hoch ist. Aufgrund des isoprenylierten Grundgerüsts zeigt Hyperforin ein gewisse Instabilität und Oxidationsempfindlichkeit. Eines der Abbauprodukte ist 2-Methyl-3-buten-2-ol, das durch die oxidative Abspaltung der Isoprenylseitenkette des Hyperforin und Adhyperforin entsteht [98] (Abb. 1.1-4). 2-Methyl-3-buten-2-ol ist auch bekannt als Abbauprodukt der Hopfenbitterstoffe Lupulon und Humulon [141].

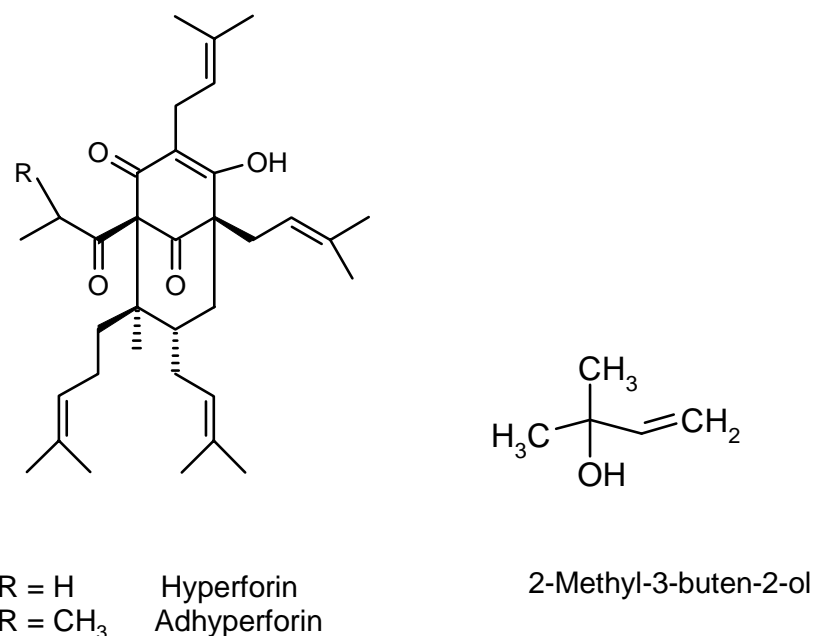


Abbildung 1.1-4: Phloroglucine und Abbauprodukt aus *Hypericum perforatum*

### 1.1.4 Hyperici herba

Fertigarzneimittel auf der Basis von Johanniskrauttrockenextrakten enthalten Auszüge der Arzneidroge *Hyperici herba* [56]. Diese besteht aus den getrockneten, kurz vor oder während der Blütezeit gesammelten, oberirdischen Teilen von *Hypericum perforatum* L.

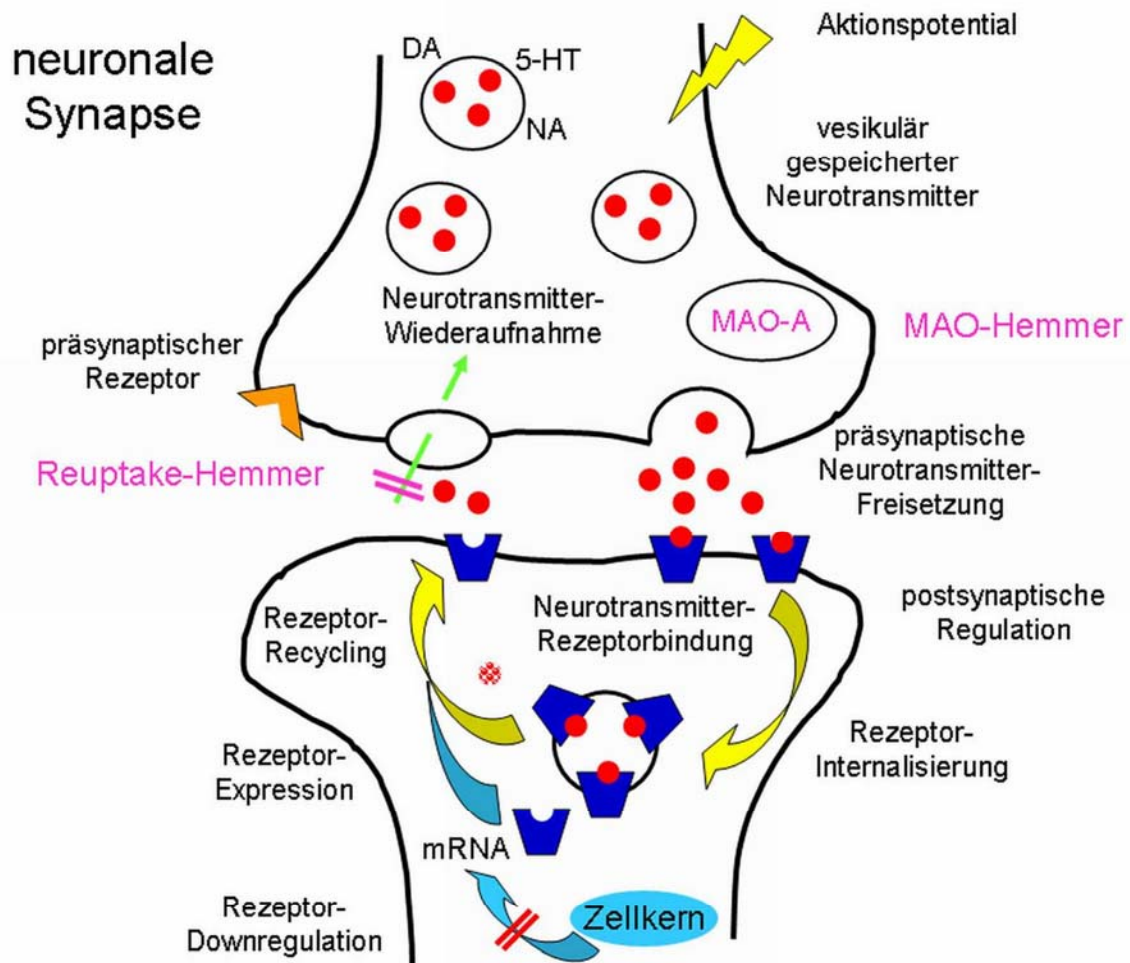
Gefordert wird ein Mindestgehalt von 0,04 % Dianthron der Hypericingruppe, berechnet als Hypericin ( $C_{30}H_{16}O_8$ ;  $M_r$  504,5). Die Aufbereitungskommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (BGA) bewertete Johanniskraut positiv und erstellte eine Monographie „*Hyperici herba* (Johanniskraut)“, in der als Anwendungsgebiete für Hypericum-Präparate „Psychovegetative Störungen, depressive Verstimmungszustände, Angst und / oder Unruhe“ genannt werden [35]. Nach heutigem Stand des Wissens müssen Johanniskraut-Präparate in geeigneter Zubereitung und Dosierung als Antidepressiva klassifiziert werden. Besserungen depressiver Symptomatiken sind, ähnlich wie bei synthetischen Antidepressiva, in der Regel erst nach mehrwöchiger Therapie zu erwarten [243,256]. Johanniskraut-Präparate zeigen keine Akutwirkungen und sind weder als Tagessedativa noch als Schlafmittel geeignet. Abweichend von der Indikation gemäß Monographie der Kommission E erteilt daher das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) seit 1999 bei Neuzulassungen die Indikation „leichte (und mittelschwere) depressive Episode“. Für die Gebrauchsinformation der Fertigarzneimittel muss die Formulierung „leichte (bis mittelschwere) vorübergehende depressive Störung“ verwendet werden. Die Wirksamkeit von Hypericum-Präparaten bei leichten bis mittelschweren Depressionen sowie die gute Verträglichkeit bei empfohlener Dosierung konnte durch zahlreiche klinisch kontrollierte Studien belegt werden. Die Monographie der Kommission E zu Johanniskraut sieht als mittlere Tagesdosis für die innerliche Anwendung „2 bis 4 g Droge oder 0,2 bis 1,0 mg Gesamthypericin in anderen Darreichungsformen“ vor. Bezogen auf methanolische oder ethanolische Extrakte in festen oder flüssigen Zubereitungen wird ein Droge : Extrakt-Verhältnis von 4 – 7 : 1 gefordert. Der Mindestgehalt an Hypericin nach DAC 1986 soll 0,1% betragen und die Präparate sollen in einer Dosierung von 500 bis 1000 mg nativem Extrakt pro Tag über 4 bis 6 Wochen eingenommen werden. Die Qualitätskontrolle der Droge Johanniskraut und daraus gefertigter Arzneimittel richtet sich nach DAC 1986. Fast alle Hypericum-Präparate werden auf den Gehalt von Naphthodianthronen, ber. als Hypericin, standardisiert. Auch wenn die pharmakologisch antidepressive Wirkung von Hypericin umstritten ist, so ist dieses als pharmazeutische Leitsubstanz dennoch gut zur Standardisierung von Johanniskraut-Präparaten geeignet, weil eine hohe Extraktionsrate für Hypericin auch die Extraktion anderer besser löslicher Inhaltsstoffe, z.B. Hyperforin, garantiert.

### 1.1.4.1 Pharmakologie

Die Mehrzahl der heute bekannten Antidepressiva hemmt den aktiven, energieabhängigen Rücktransport von Monoaminen (Noradrenalin, Serotonin, Dopamin) aus dem synaptischen Spalt zurück in das Neuron. Ein Mangel an Katecholaminen oder Serotonin im zentralen Nervensystem (ZNS) wird als Ursache einer Depression angesehen.

Die ersten klinisch genutzten Antidepressiva hemmten akut den Abbau von Noradrenalin oder Serotonin (MAO-Hemmstoffe) oder deren Wiederaufnahme in den präsynaptischen Neuronen (trizyklische Antidepressiva, TCA) (Abb. 1.1-5). Beide Mechanismen führen zu einem Anstieg der Monoaminkonzentration im ZNS, wodurch ein Mangel ausgeglichen werden kann. Diese Hypothese ist jedoch nicht geeignet, die Wirkung aller, vor allem der neueren atypischen Antidepressiva zu erklären. So ist z.B. Mianserin über einen Antagonismus an zentralen  $\alpha_2$ -adrenergen Auto- sowie Heterorezeptoren und an 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>3</sub>- Rezeptoren als Noradrenalin-Selektives-Serotonin-Antidepressivum (NaSSA) klinisch wirksam, ohne dass eine Beeinflussung von Wiederaufnahme bzw. Abbau von Serotonin oder Noradrenalin nachweisbar ist [115]. Darüber hinaus sind bisher andere Neurotransmitter, z.B. Dopamin,  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) und L-Glutamin [257] noch wenig berücksichtigt worden, obwohl neuere klinisch wirksame Antidepressiva u.a. einen Anstieg des Dopamin-Spiegels bewirken [162].

Eine Beeinflussung des Regelkreislaufs der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)-Achse auf der Ebene der Genexpression von Hypothalamus-Hormonen, Neurotransmitterrezeptoren und Neurotransmitterbiosynthese-enzymen durch trizyklische Antidepressiva, Selektive-Serotonin-Reuptake-Inhibitoren (SSRI) und einen Hypericum-Extrakt, ist ebenfalls berichtet worden [40,263]. Zusätzlich wird, ausgehend von der Tatsache, dass zwischen Immun- und Nervensystem ein Signalaustausch durch Zytokine stattfindet, ein weiterer Weg zur Aufklärung möglicher Wirkmechanismen von Antidepressiva untersucht [3,166]. Die Einflussnahme antidepressiv wirksamer Substanzen auf das Immunsystem zeigte sich u.a. in einer Senkung von IL6-Plasmaspiegeln in Patienten nach Gabe von SSRI [10].



**Abbildung 1.1-5: Schematische Darstellung einer zentralen neuronalen Synapse und Angriffspunkte von Antidepressiva. (MAO = Monoaminooxidase, DA = Dopamin, 5-HT = 5 Hydroxytryptamin (Serotonin), NA = Noradrenalin)**

Die Hemmung der Monoaminwiederaufnahme bildet nach wie vor die Grundlage der Hypothese zum Wirkmechanismus von Antidepressiva. Dies trifft sowohl für die als klassische Antidepressiva bezeichneten Substanzen wie die trizyklischen Antidepressiva (TAD, engl.: TCA) zu, als auch für die neueren Substanzklassen der Selektiven-Serotonin-Reuptake-Hemmer (SSRI), Serotonin-Noradrenalin-Reuptake-Hemmer (SNaRI), und Selektive-Noradrenalin-Reuptake-Hemmer (NaRI) [115,173]. In unterschiedlichem Ausmaß wird von diesen Substanzen die Wiederaufnahme der synaptisch freigesetzten zentralen Neurotransmitter Noradrenalin (NA), Serotonin (5-HT) und Dopamin (DA) aus dem synaptischen Spalt in das Axoplasma durch Angriff an präsynaptischen Transportern gehemmt [154]. Dies führt zu vermehrter Verfügbarkeit dieser Stoffe an ihren



postsynaptischen Rezeptoren. So soll z.B. eine NA-Aufnahmehemmung zu einer Antriebssteigerung, eine 5HT-Aufnahmehemmung zu einer Angstminderung führen.

Auch die pharmakologische Wirkung der Monoaminoxidase (MAO)-Hemmer kann über einen ähnlichen Mechanismus erklärt werden, da das Enzym MAO wesentlich für den Abbau monoaminerger Neurotransmitter verantwortlich ist. Nach mehrtägiger bis mehrwöchiger Zufuhr von Antidepressiva kommt es außerdem zu adaptiven Veränderungen an bestimmten Rezeptorsystemen wobei sich längerfristig die Dichte  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und serotonerger 5HT<sub>2</sub>-Rezeptoren verringert [220]. Als experimenteller Ansatz in biochemischen Modellen zur Aufklärung der Wirkmechanismen dienen entweder isolierte Synaptosomen, isolierte Neurone oder Gliazellen [34,48,70] sowie Fütterungsversuche am Tier mit nachträglicher Untersuchung der entsprechenden Rezeptorsysteme der aufbereiteten Gehirne [156,188]. Hydroalkoholische Hypericum-Extrakte, hergestellt mit Methanol (80 % v/v) oder Ethanol (50 % v/v, 60% v/v), wurden mit diesen biochemischen Modellen bereits auf mögliche Wirkmechanismen untersucht [47,52,118,156,178,230]. Die in früheren Arbeiten beschriebene MAO-Hemmung [203,222] ließ sich in nachfolgenden Untersuchungen, vor allem für die Leitsubstanz Hypericin, nicht bestätigen [18,52,229]. Eine Hemmung der synaptosomalen Aufnahme von Serotonin, Dopamin und Noradrenalin ist für Hypericum-Extrakte beschrieben worden (Tab. 1.1-1). Die halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC<sub>50</sub>) lag dort jeweils bei ca. 2  $\mu$ g Trockenextrakt / ml. Diese geringe Konzentration kann für den Menschen unter dem Gesichtspunkt der Bioverfügbarkeit als therapeutisch relevant angesehen werden [156,159,164]. Darüber hinaus führte die 14-tägige Behandlung von Ratten zu adaptativen Veränderungen im ZNS, insbesondere zu einer signifikanten Abnahme der Dichte kortikaler  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren und einer, im Gegensatz zu synthetischen Antidepressiva, signifikanten Zunahme der Dichte kortikaler 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren [228,156] (Tab. 1.1-2). Als ein wichtiger Inhaltsstoff für diese Effekte wurde Hyperforin identifiziert [157].

Neben den in-vitro Assays und Untersuchungen an Zellen existieren auf dem Gebiet der tierexperimentellen Pharmakologie verschiedene validierte Verhaltensmodelle mit Mäusen und Ratten. Diese basieren zum einen auf dem Prinzip der pharmakologischen Interaktion, z. B. mit Reserpin, Apomorphin oder Ketamin, zum anderen auf dem Prinzip der induzierten Verhaltensänderung, z. B. im Sinne der „erlernten Hilflosigkeit“ oder des „Despair-Verhaltens“ von Ratten im Forced Swimming Test (FST) nach Porsolt [181,182]. An diesen Modellen durchgeführte Untersuchungen mit isolierten Hypericum-Inhaltsstoffen und Extraktfraktionen ergaben, dass an der Wirkung mehrere Stoffgruppen, darunter Hypericine und Flavonoide, synergistisch beteiligt sind. Löslichkeitsvermittelnde Stoffe, wie z.B. Procyanidine (Procyanidin B2), können als Co-Effektoren einer gesteigerten Bioverfügbarkeit indirekt wirksam werden [37,38,39]. Eine weitere Methode zur Untersuchung der

Wirkmechanismen von Antidepressiva stellt die Elektrophysiologie bei Probanden dar. Elektrophysiologische Verfahren wie abhängige negative Variation (CNV) und Elektroenzephalographie (EEG), bei denen Potentiale des Gehirns entweder als evozierte, neu aufgenommene oder als stetige Reize aufgezeichnet werden, ergaben Aufschluss über Reaktionszeiten und Schlafverhalten von Probanden im Rahmen klinischer Studien mit einem Hypericum-Extrakt. Dieser zeigte in kontrollierten Doppelblindstudien im EEG-Verfahren Einflüsse auf die Reizverarbeitung [107,108] und das Schlafverhalten von Probanden, welche eher für einen aktivierenden, auf den Vigilanz-Tonus einwirkenden Effekt, nicht für einen sedierenden Effekt sprechen. Im Gegensatz zu trizyklischen Antidepressiva verringerte der Hypericum-Extrakt den Anteil der REM-Phase am Gesamtschlaf nicht. Außerdem wurde eine Zunahme der langwelligen Aktivität in der automatischen Analyse der Schlaf-EEGs von Probanden festgestellt. Dieser Befund könnte im Zusammenhang mit der klinisch beobachteten antidepressiven Wirkung stehen, da ein Defizit am langwelligen Schlaf als wichtiger neurobiologischer Indikator bei affektiven Erkrankungen gilt [204].

**Tabelle 1.1-1: Wirkungen von Hypericum-Extrakten und Wirkstoffen auf synaptosomale Aufnahmesysteme**

Extrakte / Substanzen	Modelle	IC <sub>50</sub> der NA-Aufnahmehemmung	IC <sub>50</sub> der 5-HT-Aufnahmehemmung	IC <sub>50</sub> der DA-Aufnahmehemmung	IC <sub>50</sub> der GABA / L-Glutamat Aufnahme	Literatur
Hypericum-Extrakt (1,5 % Hyperforin)	Maushirn oder Rattenhirn-Synaptosomen (MRS)	5 µg/ml (123)*	2,5 µg/ml (67)* 6,2 µg/ml	0,9 µg/ml (24)*	1,1 µg/ml (31)* bzw. 21,25 µg/ml (586)*	[156,158, 178,155] [52]
Hypericum-Extrakt (38,8 % Hyperforin)	MRS	0,25 µg/ml (181)*	0,26 µg/ml (188)*	0,06 µg/ml (41)*	0,12 µg/ml (87)*, bzw. 2,83 µg/ml (2045)*	[156,158]
Hypericin	MRS	>10000nM	>10000nM	>10000nM	-	[154, 158]
Hyperforin	MRS	0,04 µg/ml (80)*	0,11 µg/ml (205)*	0,06 µg/ml (102)*	0,099 µg/ml (184)*, bzw. 0,445 µg/ml (830)*	[45,158]
Imipramin	MRS	21 nmol/ml	21 nmol/ml	-	-	[156,158]
Clomipramin	MRS	14 nmol/ml	0,9 nmol/ml	-	-	[156,158]
Nomifensin	MRS	2 nmol/ml	-	37 nmol/ml	-	[156,158]
Amineptin	MRS	16 nmol/ml	-	355 nmol/ml	-	[156,158]

\* nmol / l (nM) berechnet für Hyperforin

**Tabelle 1.1-2: Wirkungen von Hypericum-Extrakten und Wirkstoffen auf die Rezeptordichte und Rezeptorbindung; ↑ Zunahme; ↓ Abnahme / Hemmung**

Extrakte / Substanzen	Modelle	β-Rezeptordichte	5-HT <sub>1A</sub> <sup>-</sup> , bzw. 5HT <sub>2A</sub> <sup>-</sup> Rezeptordichte	GABA <sub>A</sub> <sup>-</sup> , bzw. GABA <sub>B</sub> <sup>-</sup> Rezeptorbindung	Literatur
Hypericum-Extrakt (1,5 % Hyperforin)	Maushirn oder Rattenhirn-Synaptosomen (MRS)		↑leichte Zunahme	3 µg/ml  0,06 µg/ml** bzw. 0,009 µg/ml**	[156,158, 178,155]  [52]
Hypericum-Extrakt 240 mg/kg KG oral für 2 Wochen	Frontale Cortex der Ratte	↓16%			[156,158]
Imipramin (zum Vergleich) 20 mg/kg KG oral: 2 Wochen	Frontale Cortex der Ratte	↓25%			[156,158]
Hypericum-Extrakt 2700 mg/kg KG oral für 26 Wochen	Rattenhirn-Synaptosomen		↑50% bzw. ↑52%		[228]
Hypericum-Extrakt (0,5% Hyperforin)	Rattenhirn			6,83 µg/ml***	[11]
Amentoflavon	Rattenhirn			15 nM***	[11]

\*\* Hemmkonstanten Ki

\*\*\* Hemmung (IC<sub>50</sub>) der Bindung von Flumazenil zu kooperativen Benzodiazepinbindungsstellen der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren

### 1.1.4.2 Klinische Studien

Bis zum Frühjahr 2001 lagen Ergebnisse von 32 publizierten, kontrollierten Studien an insgesamt etwa 3000 Patienten mit Depressionen vor. Die Prüfpräparate enthielten als arzneilich wirksame Bestandteile entweder methanolische Extrakte (Methanol 80 % v/v) oder ethanolische Extrakte (Ethanol 50 % oder 60 % V/V) aus *Hyperici herba* (Tab. 1.1-3). Als Vergleichstherapie der doppelblind durchgeführten Studien dienten Placebo, synthetische Antidepressiva oder in einem Falle Lichttherapie.

Zur Beurteilung der Prüfkriterien wurden neben anderen validierten psychometrischen Skalen bei der Mehrzahl der Studien die Score-Werte bzw. Response-Quoten der Hamilton-Depressions-Skala (HAMD) herangezogen [87]. Dabei schätzt ein Arzt auf der Basis eines Gespräches bei 17 bzw. 21 Symptomen den Schweregrad nach einer Score-Bewertung ein. Als Therapieerfolg gilt eine Abnahme des HAMD-Gesamtscores um mindestens 50 %. Die HAMD-Skala wird seit 1960 bei der klinischen Prüfung fast aller Antidepressiva angewendet.

**Tabelle 1.1-3 : Kontrollierte, doppelblinde, klinische Studien seit 1990**

Erstautor, Jahr	Extrakt	Fallzahl	Tagesdosis (Extrakt) / Dauer (Tage)	Vergleichstherapie	Responder nach HAMD (Hypericum vs. Vergleichstherapie)
Kugler, 1990 [124]	ethanolisch	80	4,5 ml (450 mg) / 28	Bromazepam	nicht angegeben
Harrer, 1991 [92]	ethanolisch	116	3 ml (300 mg) / 42	Placebo	66 % vs. 25 %
Bergmann, 1993 [15]	ethanolisch	80	nicht angegeben / 42	Amitriptylin	nicht angegeben
Quandt, 1993 [186]	ethanolisch	88	4,5 ml (450 mg) / 28	Placebo	71 % vs. 7 %
Lehrl, 1993 [133]	methanolisch	50	450 – 900 mg / 28	Placebo	42 % vs. 25 %
Sommer, 1994 [215]	methanolisch	105	450 – 900 mg / 28	Placebo	67 % vs. 28 %
Harrer, 1994 [93]	methanolisch	102	900 mg / 28	Maprotilin	61 % vs. 67 %
Hübner, 1994 [99]	methanolisch	39	900 mg / 28	Placebo	70 % vs. 47 %

## Fortsetzung Tabelle 1.1-3

Martinez, 1994 [147]	methanolisch	20	900 mg / 35	Lichttherapie	nicht angegeben
Vorbach, 1994 [245]	methanolisch	135	900 mg / 42	Imipramin	64 % vs. 58 %
Hänsgen, 1996 [88]	methanolisch	102	900 mg / 42	Placebo	70 % vs. 24 %
Wheatley, 1997 [255]	methanolisch	165	900 mg / 42	Amitriptylin	60 % vs. 78 %
Vorbach, 1997 [246]	methanolisch	209	1800 mg / 42	Imipramin	35 % vs. 41 %
Schrader, 1998 [201]	ethanolisch	159	500 mg / 42	Placebo	56 % vs. 15 %
Laakmann, 1998 [126]	ethanolisch	147	900 mg / 42	Extr. 0,5 % Hyperforin, Placebo	49 % vs. 39 % vs. 33 %
Philipp, 1999 [178]	ethanolisch	263	1050 mg / 56	Imipramin, Placebo	76 % vs. 67 % vs. 63 %
Harrer, 1999 [94]	ethanolisch	149	800 mg / 42	Fluoxetin	71 % vs. 72 %
Schrader, 2000 [202]	ethanolisch	240	500 mg / 42	Fluoxetin	60 % vs. 40 %
Woelk, 2000 [258]	ethanolisch	324	500 mg / 42	Imipramin	43 % vs. 40 %
Brenner, 2000 [25]	methanolisch	30	900 mg / 42	Sertralin	47 % vs. 40 %
Shelton, 2001 [207]	methanolisch	200	900 – 1200 mg / 56	Placebo	33 % vs. 21 %

Die statistische Auswertung der Hamilton-Gesamtscores zeigte bei 3 von 5 placebokontrollierten Studien für einen methanolischen Hypericum-Extrakt signifikante Unterschiede zwischen Verum und Placebo. Bei 5 Vergleichsstudien gegen insgesamt 4 synthetische Antidepressiva ergab sich nur für Amitriptylin nach 6 Wochen Therapie eine signifikante Überlegenheit gegenüber dem Hypericum-Extrakt. In den anderen Studien wurden keine signifikanten Unterschiede im Behandlungserfolg, verglichen mit Hypericum, festgestellt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studien zeigen keine wesentlichen Unterschiede in der Wirksamkeit von ethanolischen und methanolischen Extrakten. Ausgehend von den vorliegenden Daten ist die Wirkung von 500 – 1000 mg Hypericum-

Extrakt pro Tag bei leichten bis mittelschweren Depressionen vergleichbar mit synthetischen Antidepressiva [136,160] in den praxisüblichen Dosierungen [19,137,161]. Die Datenlage zur Behandlung schwerer Depressionen (engl.: major depression) mit Hypericum-Extrakten ist widersprüchlich. In einer multizentrischen, doppelblinden, placebokontrollierten Studie mit 200 Patienten war ein Hypericum-Extrakt dem Placebo signifikant überlegen, allerdings lag die Gesamtremissionsrate sehr niedrig (14,3 bzw. 4,9 %) [207]. Die Autoren einer früheren, multizentrischen, doppelblinden Studie mit 209 Patienten kamen zu dem Schluss, dass ein Hypericum-Extrakt bei schwerer Depression gleich wirksam war wie Imipramin [246]. Eine andere multizentrische, doppelblinde, randomisierte Studie mit 340 Patienten konnte keinen Unterschied zwischen einem Hypericum-Extrakt, Sertralin und Placebo in der Behandlung der schweren Depression zeigen [100].

#### **1.1.4.3 Nebenwirkungen / Wechselwirkungen**

Hypericum-Präparate sind im allgemeinen gut verträglich. Als Nebenwirkungen können selten allergische Reaktionen, insbesondere bei hellhäutigen Personen Photosensibilisierung, Müdigkeit und Unruhe, sowie gastrointestinale Beschwerden auftreten. Für Hypericum sind eine Reihe von Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln und einige dadurch bedingte Kontraindikationen bekannt.

Die Rote Liste (2006) [195] nennt als Gegenanzeigen für Hypericum-Präparate: Bekannte Lichtüberempfindlichkeit der Haut, gleichzeitige Gabe von Ciclosporin, Indinavir und anderen Proteaseinhibitoren in der Anti-HIV-Behandlung, und schwere depressive Störungen. Während einer Behandlung mit Hypericum ist intensive UV-Bestrahlung (lange Sonnenbäder, Höhensonne, Solarien) zu vermeiden.

Wechselwirkungen treten mit Arzneimitteln unterschiedlichster Indikationen auf. Bei Antikoagulanzen vom Cumarin-Typ, z.B. Phenprocoumon und Warfarin, führt die gleichzeitige Einnahme von Hypericum zu einer Wirkungsabschwächung bzw. Abnahme der Serumspiegel mit notwendiger Dosisanpassung u. –überwachung. Der gleiche Effekt zeigt sich für das Immunsuppressivum Ciclosporin, ebenso werden die Serumspiegel für das Herz-Kreislauf-Medikament Digoxin, für Indinavir und andere Proteaseinhibitoren in der Anti-HIV-Behandlung, für die trizyklischen Antidepressiva Amitriptylin und Nortriptylin, sowie für das Atemwegstherapeutikum Theophyllin herabgesetzt. Die gleichzeitige Einnahme von Hypericum und oralen Kontrazeptiva kann zum Auftreten von Zwischenblutungen führen.

Die Ursache für die genannten Interaktionen liegt wahrscheinlich in einer Stimulation der unspezifischen Abwehr- und Ausscheidungssysteme des Körpers gegen Fremd- und Giftstoffe wie dem P-Glycoprotein der Dünndarmmukosa [60,104] und den Cytochrom P 450

abhängigen Monooxygenasen 3A4 (CYP 3A4) [116,157, 253] und 1A2 (CYP1A2) [163] in der Leber. Eine Induktion der CYP 3A4 erfolgt möglicherweise über eine Bindung von Hyperforin an den „Steroid X Rezeptor“ [151,251,253].

Die Ergebnisse experimenteller Untersuchungen zur Aufklärung dieser Mechanismen unter Beteiligung von CYP 3A4, CYP 1A2, sowie P-Glycoprotein sind allerdings zum Teil noch widersprüchlich [4,144,249]. Die gleichzeitige Einnahme von Hypericum mit den SSRI Nefazodon, Paroxetin oder Sertralin kann zum sogenannten Serotonin-Syndrom im Sinne von vermehrten vegetativen Störungen, motorischer Unruhe mit Tremor und gastrointestinalen Beschwerden führen, bedingt durch eine Potenzierung der Serotoninverfügbarkeit im ZNS.

Über akute Vergiftungen durch Johanniskraut-Präparate ist bisher nicht berichtet worden.

Bei Überdosierungen sollen Patienten vor Sonnenlicht, bzw. UV-Strahlung geschützt werden.

**Tabelle 1.1-4: Spontan gemeldete unerwünschte Arzneimittelwirkungen (UAW) während der Therapie mit einem Hypericum-Präparat auf der Basis von methanolischem Trockenextrakt im Zeitraum zwischen 1991-1999 (nach [205]).**

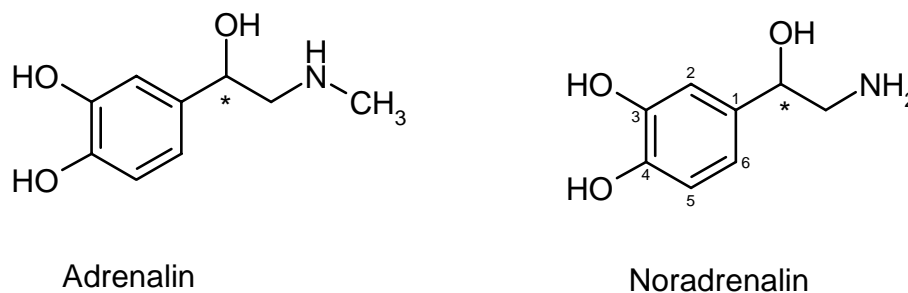
<b>Unerwünschte Ereignisse</b>	<b>Meldungen</b>	<b>Meldungen pro 100.000 Patienten</b>
Alle Ereignisse	95	1,10
Hautreaktionen	27	0,31
Quickwert ↑	16	0,19
Gastrointestinale Beschwerden	9	0,10
Zwischenblutungen (Pille)	8	0,09
Plasma-Ciclosporin ↓	7	0,08
Kribbel-Parästhesien	4	0,05
Herz-Kreislauf-Beschwerden	3	0,04
Sehstörungen / Augenschmerzen, erhöhte Schmerzempfindlichkeit der Haut, Schlafstörungen	Je 2	Je 0,02
Schwindel, Haarausfall, Müdigkeit, Unruhe / Euphorie, Fieber, Dyspnoe, Tinnitus-Verstärkung, Kopfschmerzen, erhöhte Schilddrüsen-Hormonwerte, akute Konjunktivitis, vermehrte Melaninflecken, cutaner Lupus erythematodes, Schmerzen unter der Kopfhaut, metallischer Geschmack, Galaktorrhoe	Je 1	Je 0,01

## 1.2 $\beta$ -Adrenerge Rezeptoren

### 1.2.1 Klassifizierung

$\beta$ -Adrenerge Rezeptoren ( $\beta$ -AR) spielen eine bedeutende Rolle bei der Regulation zahlreicher Körperfunktionen durch das sympathische Nervensystem. Sie sind Mitglieder der Gruppe der adrenergen Rezeptoren (Adrenozeptoren, AR) innerhalb der Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR).

Die physiologischen katecholineren Neurotransmitter Adrenalin und Noradrenalin (Abb. 1.2-1) vermitteln als Agonisten an den Adrenozeptoren die Signaltransduktion auf der Ebene der postganglionären Fasern des vegetativen Nervensystems (VNS).

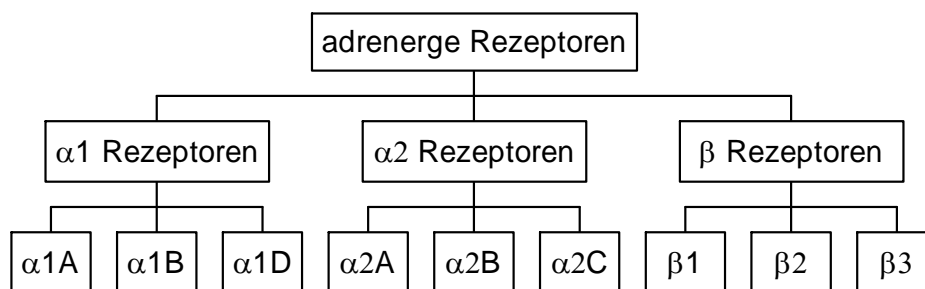


**Abbildung 1.2-1: Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin**

Dabei wird in noradrenergen Synapsen Noradrenalin aus Speichervesikeln im Axoplasma nach Eintreffen von Aktionspotenzialen in den synaptischen Spalt freigesetzt. Adrenalin und in geringerem Umfang auch Noradrenalin werden im Nebennierenmark gebildet und über die Blutbahn zu den Erfolgsorganen transportiert. In den peripheren sympathischen Nervenendigungen fehlt das Enzym N-Methyl-Transferase, welches Noradrenalin in Adrenalin überführt [162]. Demgegenüber findet man im Zentralnervensystem (ZNS) Adrenalin auch als Neurotransmitter in adrenergen Synapsen. Noradrenerge Neurone finden sich im ZNS vor allem in der Pons und der Medulla oblongata, von wo aus sie aufsteigend weitverzweigte Verknüpfungen mit der Großhirnrinde, dem Hypothalamus, dem Thalamus und dem Limbischen System aufnehmen, sowie absteigend zu den Vorder- und



Hinterhörnern des Rückenmarks reichen. Adrenerge Neurone sind in der Medulla oblongata zu finden [67]. Die zentral vorkommenden Katecholamine, denen eine Überträgerfunktion zukommt, werden nicht aus der Blutbahn aufgenommen, da sie die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden können. Sie werden im Gehirn selbst synthetisiert. Die nach Adrenalingabe beobachteten zentralen Wirkungen (z.B. Angstzustände) sind daher rein reflektorisch bedingt [162]. Bislang wurden die adrenergen Rezeptoren  $\alpha_{1A, 1B, 1D, 2A, 2B, 2C}$  und  $\beta_{1, 2, 3}$  charakterisiert [31] (Abb. 1.2-2).



**Abbildung 1.2-2: Einteilung adrenerger Rezeptoren**

Innerhalb der adrenergen Rezeptoren lassen sich zwei Untergruppen unterscheiden, die  $\alpha$ - und  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren (Abb. 1.2-2). Ihr jeweiliger Einfluss auf das Zielgewebe wird durch ihr unterschiedliches Verteilungsmuster auf den jeweiligen Zielorganen und die unterschiedliche Affinität von natürlichen und synthetischen Katecholaminen an die Rezeptortypen bestimmt (Tab. 1.2-1). Durch Bindungsexperimente im Rahmen von klassischen pharmakologischen Untersuchungen an verschiedenen isolierten Organen wurden unterschiedliche Bindungsaffinitäten von natürlichen und synthetischen Agonisten wie Adrenalin, Noradrenalin,  $\alpha$ -Methylnoradrenalin,  $\alpha$ -Methyladrenalin und Isoprenalin an die verschiedenen Rezeptortypen beobachtet [2]. Für  $\alpha$ -Adrenozeptoren, welche u. a. die Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur (Vasokonstriktion) vermitteln, wurde eine Wirkungsreihenfolge für die Agonisten wie folgt gefunden: Adrenalin  $\geq$  Noradrenalin  $\gg$  Isoprenalin. Auch für  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren, die vasodilatatorisch und am Herzen positiv inotrop und chronotrop wirken, ergeben sich unterschiedliche Bindungsaffinitäten: Isoprenalin  $>$  Adrenalin  $\geq$  Noradrenalin.  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren steuern u. a. glatte Muskulatur, Organfunktionen, sezernierende Drüsen und sind an der Kontrolle des Herz-Kreislauf-Systems beteiligt [162].

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren Unterschiede in der Wirkstärke der Agonisten für deren  $\beta$ -adrenergen Effekt zeigten, was zur Unterteilung in zwei Subtypen,  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren, führte [73,128].

$\beta_1$ -Rezeptoren sind u.a. verantwortlich für die Zunahme der Herzfrequenz und Kontraktilität der Herzmuskulatur sowie der Lipolyse des Fettgewebes. Sie werden durch Katecholamine in der Reihenfolge: Isoprenalin > Adrenalin = Noradrenalin stimuliert.

$\beta_2$ -Rezeptoren zeigen die Agonistenreihenfolge: Isoprenalin > Adrenalin >> Noradrenalin, und bewirken vorwiegend eine Vaso- und Bronchodilatation sowie Relaxation der Uterusmuskulatur. Der Unterschied zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren besteht im wesentlichen in ihrer Empfindlichkeit für Noradrenalin.  $\beta_1$ -Rezeptoren zeigen in etwa die gleiche Affinität für Adrenalin und Noradrenalin,  $\beta_2$ -Rezeptoren werden deutlich stärker durch Adrenalin stimuliert. Ein weiterer, als  $\beta_3$ -adrenerger Rezeptor identifizierter Subtyp, weist eine 10-fach stärkere Bindungsaffinität zu Noradrenalin als zu Adrenalin auf, die sich mit Antagonisten wie dem  $\beta_1 / \beta_2$ -unspezifischen Propranolol kaum inhibieren lässt. Dieser Subtyp scheint vornehmlich auf Geweben mit ‚atypischen‘ pharmakologischen Eigenschaften, wie adipösem Gewebe, vorzukommen, jedoch sind seine physiologischen Funktionen weiterhin unklar [66,83,122,138,193].

Adrenerge Rezeptoren kommen praktisch in jedem Gewebe des menschlichen Körpers vor, wobei meist eine Untergruppe organdominierend ist. Innerhalb der Rezeptoruntergruppen können die jeweiligen Subtypen (z.B.  $\beta_1 / \beta_2$ ) in ein und demselben Gewebe vorhanden sein [55,129,221], wobei wiederum jeweils ein Subtyp dominiert. Auf den einzelnen Organen finden sich so spezifische Verteilungsmuster von Rezeptoruntergruppen und deren Subtypen, über deren unterschiedliche Affinität zu Adrenalin und Noradrenalin eine gewebespezifische Steuerung der Organfunktion ermöglicht wird (Tab.1.2-1).

**Tabelle 1.2-1: Vorkommen und Eigenschaften der adrenergen Rezeptoren (Iso = Isoprenalin; A = Adrenalin; NA = Noradrenalin; PL = Phospholipase) (nach [91])**

Rezeptor	Agonist	Antagonist	Gewebe	Effekt	G Protein	Biochemische Effektoren
$\alpha_1$ Subtypen (A,B,D)	A $\geq$ NA $\gg$ Iso Phenylephrin	Prazosin	Glatte Gefäßmuskulatur Glatte Uterusmuskulatur Leber  Glatte Darmmuskulatur  Herz	Kontraktion  Kontraktion Glykogenolyse; Glukoneogenese Hyperpolarisation und Relaxierung  Höhere Kontraktilität; Arrhythmien	G <sub>q</sub> G <sub>q</sub> G <sub>q</sub> , G <sub>i</sub> /G <sub>0</sub> G <sub>q</sub>	↑ Phospholipase C ↑ Phospholipase D ↑ Phospholipase A2 ?↑ Ca <sup>2+</sup> -Kanäle
$\alpha_2$ Subtypen (A,B,C)	A $\geq$ NA $\gg$ Iso Clonidin	Yohimbin	Inselzellen des Pankreas ( $\beta$ Zellen) Thrombozyten Nervendigungen  Glatte Gefäßmuskulatur	Verminderte Insulinsekretion Aggregation Verminderte NA-Ausschüttung  Kontraktion	G <sub>i</sub> 1,2 oder 3 G <sub>i</sub> ( $\beta\gamma$ Untereinheit)  G <sub>0</sub>  (?) G <sub>i</sub> /0	↓ Adenylatzyklase  ↑ K <sup>+</sup> -Kanäle  ↓ Ca <sup>2+</sup> -Kanäle (L- und N-Typ) ↑ PLC, PLA2
$\beta_1$	Iso > A = NA Dobutamin	Metoprolol CGP 20712A	Herz  Juxtaglomeruläre Zellen	Erhöhte Kontraktilität und Schlagfrequenz; Erhöhte AV-Knoten Weiterleitungsgeschwindigkeit Erhöhte Reninsekretion	G <sub>s</sub>	↑ Adenylatzyklase ↑ L-Typ Ca <sup>2+</sup> -Kanäle
$\beta_2$	Iso > A $\gg$ NA Terbutalin	ICI 118551	Glatte Muskelzellen (Gefäße, Bronchien, Magen-Darm-Trakt; Uterus) Skelettmuskulatur  Leber	Relaxation  Glykogenolyse; Aufnahme von K <sup>+</sup> Glykogenolyse; Glukoneogenese	G <sub>s</sub>	↑ Adenylatzyklase
$\beta_3$	Iso = NA > A BRL 37344	ICI 118551 CGP 20712A	Adipöses Gewebe	Lipolyse	G <sub>s</sub>	↑ Adenylatzyklase

## 1.2.2 Struktur und Signaltransduktion

Die Gruppe der membranständigen adrenergen Rezeptoren zeichnet sich, wie alle G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR), strukturell durch sieben  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen (TM) aus, die den lipophilen Membranbilayer durchspannen und durch variable Schleifen miteinander verbunden sind. Am extrazellulären N-Terminus der 45 – 50 kD schweren Rezeptoren befinden sich N-glykosidisch gebundene Zuckerreste, die zusammen mit der Kernzone des heptahelikalen Bündels der Signaldifferenzierung und Ligandenerkennung dienen (Abb.1.2-3).

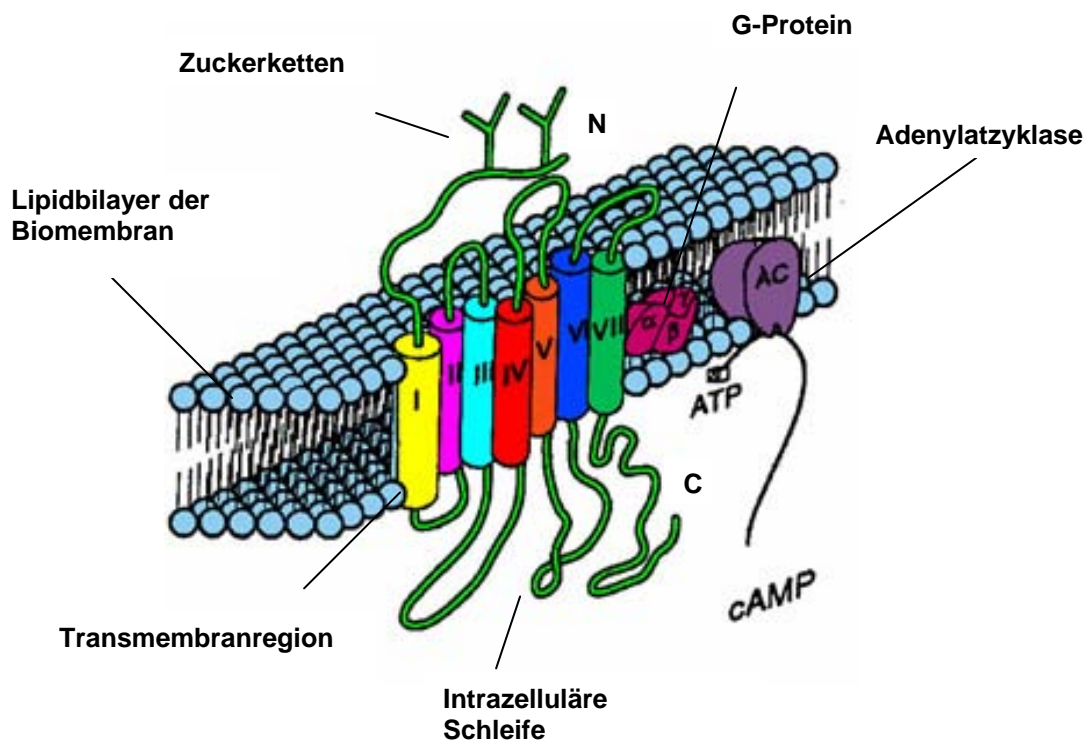


Abbildung 1.2-3: Schematische Darstellung der Organisation eines G-Protein gekoppelten Rezeptors mit Adenylatzyklase (AC) als Effektorprotein (ATP = Adenosin-3'5'-Monophosphat; cAMP = zyklisches Adenosin-3'5'-Monophosphat)

Die TM VII mit dem C-Terminus ist für die Signalübertragung auf die heterotrimeren membranständigen G-Proteine zuständig und dient gleichzeitig als Substrat für die Phosphorylierung durch unterschiedliche Kinasen (z.B.  $\beta$ -adrenerge Rezeptorkinase,  $\beta$ ARK) im Rahmen von regulatorischen Prozessen [153]. Nach Bindung eines Liganden an einen AR erfährt dieser eine Konformationsänderung, die das jeweilige G-Protein aktiviert und die weitere Signalkaskade auslöst. Mittlerweile wurden mehr als 20 G-Proteine charakterisiert [78,153], welche jeweils mit der dritten intrazellulären Schleife zwischen TM V und VI von unterschiedlichen GPCRs interagieren können. Diese Schleife bestimmt auch über die Art des gebundenen G-Proteins. G-Proteine liegen als Heterotrimere vor, bestehend aus einer  $\alpha$ ,  $\beta$ , und  $\gamma$ - Untereinheit. Sie sind auf der zytosolischen Seite der Biomembran verankert und haben im inaktiven Zustand ein GDP an der  $\alpha$ -Untereinheit gebunden. Durch Bindung eines Agonisten an den adrenergen Rezeptor kommt es zu einer Konformationsänderung der TM III und TM IV [76] und in der Folge zu einer Aktivierung der Guaninnucleotid-Bindungsstelle der  $\alpha$ -Untereinheit, was zu einem Austausch von GDP gegen das aktivierende GTP führt [23,77,101]. Darauf trennt sich die  $\alpha$ - von der  $\beta$ ,  $\gamma$ -Untereinheit und die GTP-tragende  $\alpha$ -Untereinheit aktiviert letztlich ein Zielprotein (z.B. Adenylatzyklase, AC). Auch das  $\beta$ ,  $\gamma$ -Dimere kann Effektoren aktivieren wie z.B. die Phospholipase C (PLC). Die  $\alpha$ -Untereinheit erlangt nach Bindung von GTP die Eigenschaften einer GTPase, welche durch Hydrolyse das angelagerte GTP in GDP und anorganisches Phosphat spaltet und so den aktivierenden Einfluss auf die AC aufhebt. Die Untereinheiten des G-Proteins ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) lagern sich wieder zusammen und stehen für eine erneute Interaktion mit dem Rezeptor-G-Protein-Adenylatzyklase-System zur Verfügung [162]. Da auf der zytosolischen Seite der Biomembran deutlich mehr G-Proteine als Rezeptoren in der Membran vorhanden sind, kann auf eine Mehrfachaktivierung der G-Proteine durch den mit einem Liganden besetzten Rezeptor geschlossen werden. Adrenerge Rezeptoren vermitteln die Signalübertragung ins Zellinnere hauptsächlich über die Enzyme AC und PLC.  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren aktivieren die AC durch ein stimulierendes Guaninnucleotidbindendes Protein ( $G_s$ ), was zur Bildung des ‚second messengers‘ zyklisches Adenosin-3’5’-monophosphat (cAMP) und anschließender Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) führt (Abb. 1.2-4). Eine Hemmung der AC erfolgt über ein inhibierendes G-Protein ( $G_i$ ) nach Aktivierung von  $\alpha_2$ -Adrenozeptoren. Die Aktivierung der PLC über das Pertussistoxin (PTX)-unempfindliche G-Protein ( $G_q$ ) via  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren führt zur Bildung von Inositol-1,4,5-triphosphat ( $IP_3$ ) und 1,2-Diacylglycerol (DAG) [31,58,78,89,121,131,194,218]. cAMP,  $IP_3$  und DAG lösen nicht nur Folgeaktionen wie die Aktivierung von Proteinkinasen und nachfolgende Phosphorylierung von Proteinen aus, sondern beeinflussen z.B. auch die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration. Derartige Prozesse sind maßgeblich an der Regulierung verschiedenster zellulärer Funktionen beteiligt (Tab. 1.2-1). Weitere Befunde haben zudem gezeigt, dass für 7-Transmembrandomänen-Rezeptoren vom G-Protein unabhängige Signalwege über verschiedene andere

intrazelluläre Proteine, wie z.B. GRKs und SH2 / SH3 –Domänen-Proteine und nachgeschaltete Effektoren, existieren [33,224].

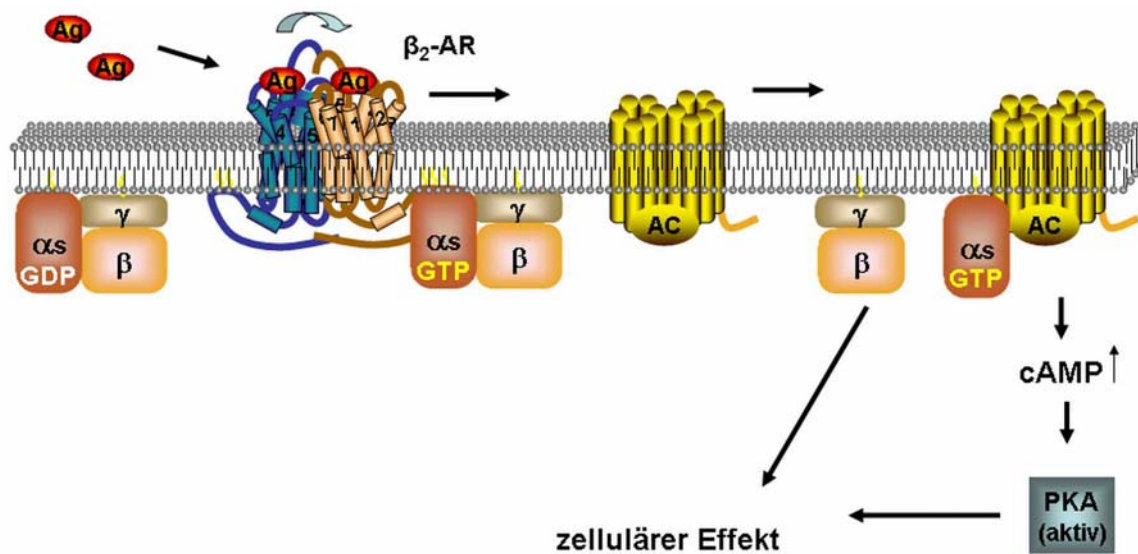


Abbildung 1.2-4: Signalweg G-Protein gekoppelter Rezeptoren am Beispiel des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors (Ag = Agonist; AC = Adenylatzyklase; PKA = Proteinkinase A)

### 1.2.3 Neurotransmitter und abgeleitete Strukturen

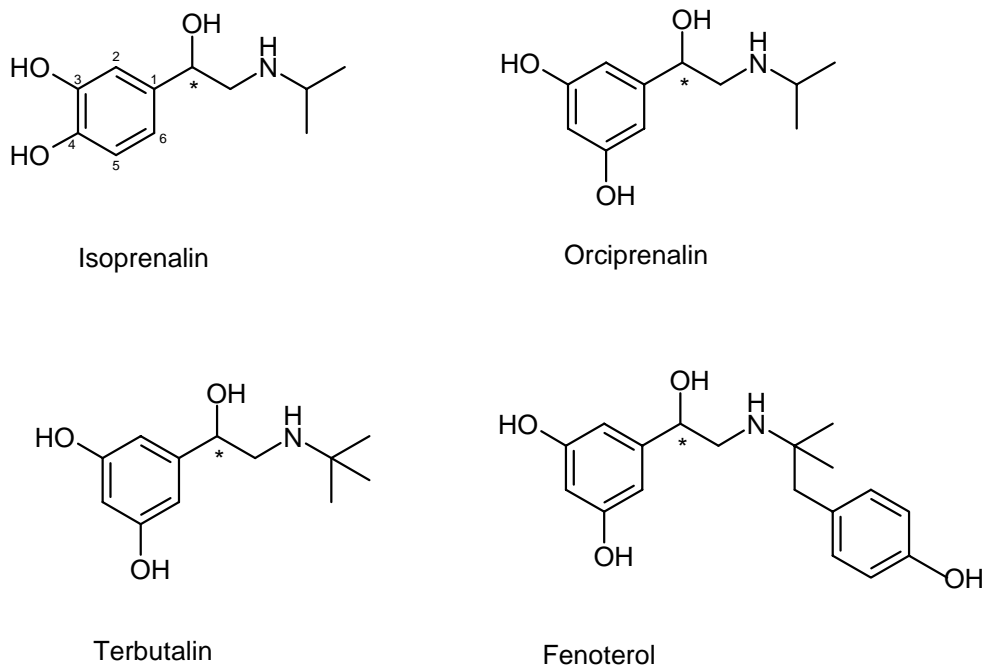
Die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin als körpereigene Neurotransmitter zeichnen sich durch ihre gemeinsame Brenzkatechinstruktur aus (Abb. 1.2-1). Durch das asymmetrische  $\beta$ -C-Atom sind zwei optisch aktive Enantiomere möglich, von denen das D- bzw. (-) Enantiomer die natürliche und 20-50 mal affinere Form für die adrenergen Rezeptoren darstellt [67].

Die Bindungstasche für diese beiden Neurotransmitter ist tief im Bündel der sieben Transmembrandomänen der AR lokalisiert. Ihre exakte räumliche Anordnung ist bisher nur theoretisch erfasst, da Kristallstrukturen für die nativen AR noch nicht zugänglich sind. Alle bisher beschriebenen räumlichen Modelle basieren auf der einzigen Kristallstruktur eines GPCR, des Rhodopsins [174,237]. Durch Mutagenesestudien konnte am  $\beta_2$ -AR gezeigt werden, dass die Aminosäuren Asp 113 in TM III und die beiden Serine Ser 204 / 207 in TM IV für eine effektive Bindung der Liganden von Bedeutung sind [109,153].

Für die Bindung an AR lassen sich durch gezielte Strukturvariationen der Katecholamine subtypspezifische Rezeptor-Affinitäten erzeugen.

So zeigt das an der Aminfunktion methylierte Adrenalin, wie schon erwähnt, eine deutlich erhöhte Affinität an  $\alpha$ -AR und eine noch höhere Affinität an  $\beta$ -AR (Tab. 1.2-1).

Mit voluminöseren Substituenten an der Aminfunktion lässt sich die Spezifität weiter zugunsten der  $\beta$ -AR beeinflussen und es ergibt sich ein  $\beta$ -spezifisches Bindungsverhalten (z.B. Isoprenalin ( $\beta_1 = \beta_2$ ), Orciprenalin ( $\beta_2 \geq \beta_1$ )). Das selektive Bindungsverhalten innerhalb der  $\beta$ -AR lässt sich durch Variationen der Hydroxylfunktionen am Benzolring beeinflussen [105]. Eine Anordnung der phenolischen OH-Gruppen in 3,5-Stellung, im Gegensatz zu der 3,4-Stellung der natürlichen Katecholamine, führt zu einer deutlichen Steigerung der Affinität an  $\beta_2$ -AR (z.B. Orciprenalin ( $\beta_2 \geq \beta_1$ ), Terbutalin ( $\beta_2$ ), Fenoterol ( $\beta_2$ )) (Abb. 1.2-5). Auf diese Weise lassen sich selektive Bindungseigenschaften erzeugen, die für den gezielten Einsatz spezifischer Strukturen als Pharmaka und für Analysenmethoden nützlich sind.

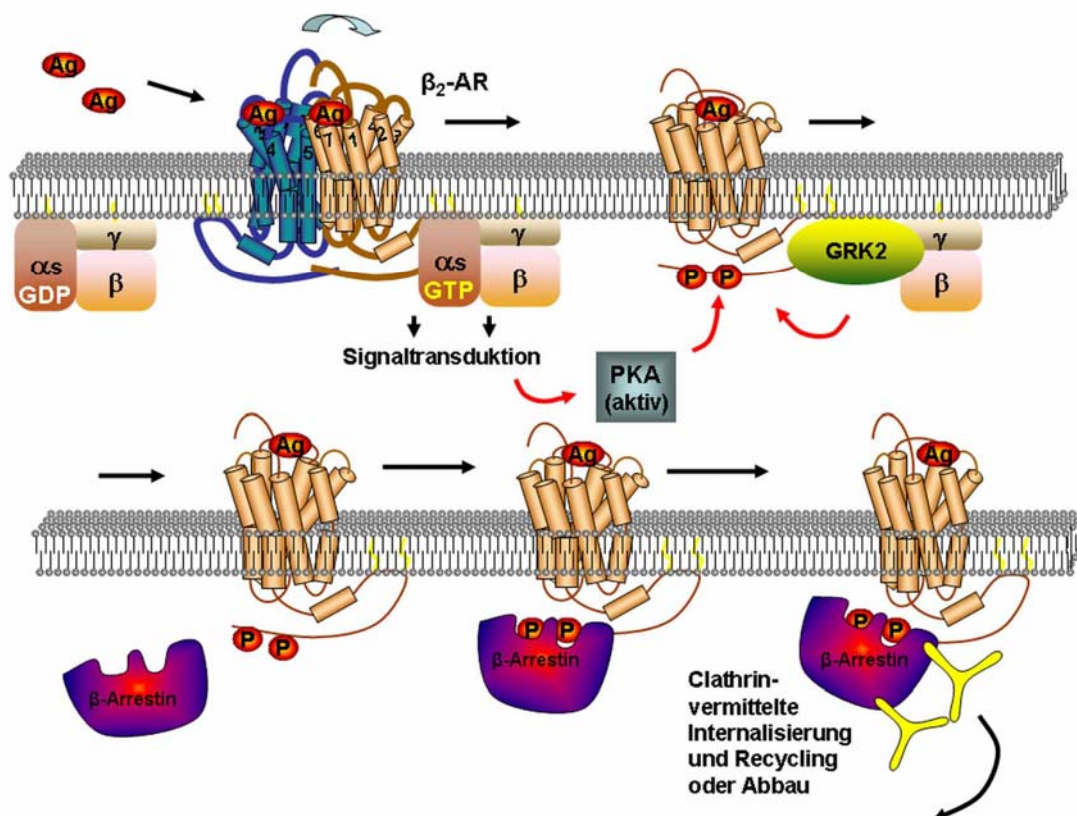


**Abbildung 1.2-5: Spezifische  $\beta$ -adrenerge Agonisten**

### 1.2.4 Regulation

$\beta$ -Adrenerge Rezeptoren gehören durch ihre Bedeutung für die Regulation zahlreicher Körperfunktionen und ihr Vorkommen in allen Organen der Peripherie und im ZNS zu den wichtigsten Rezeptoren im menschlichen Körper. Durch diese Stellung zählen sie zu den bestuntersuchten Rezeptoren aus der Gruppe der sieben Transmembrandomänen-Rezeptoren (7-TMR) [180]. Die weite Verbreitung und die vielfältige regulative Einflussnahme auf eine Reihe von lebenswichtigen physiologischen Prozessen im

menschlichen Körper setzen voraus, dass eine gezielte Kontrolle dieses Signalweges möglich ist. So unterliegen alle 7-TM G-Protein gekoppelten Rezeptoren nach Interaktion mit einem spezifischen Agonisten einer Reduktion der Rezeptorempfindlichkeit, welche als Desensitivierung bezeichnet wird [69,132,233]. Dabei führt die Aktivierung durch einen Agonisten zu einer Dissoziation der  $\alpha$  und  $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins. Freie  $\beta\gamma$ -Dimere aktivieren G-Protein-Rezeptorkinasen (z.B. GRK2, GRK3), welche spezifisch Agonist-besetzte Rezeptoren phosphorylieren. Dieser Vorgang führt zur Bindung von  $\beta$ -Arrestin an den Rezeptor, worauf der  $\beta$ -Arrestin-Rezeptor-Komplex in sogenannte Clathrin-coated-pits eingebaut werden kann. Der Rezeptor wird dann in saure endosomale Kompartimente internalisiert und entweder dephosphoryliert und zur Zelloberfläche zurückgeführt (engl.: recycled) oder abgebaut (Abb. 1.2-6) [180].



**Abbildung 1.2-6: Schematische Darstellung der Internalisierung von G-Protein gekoppelten Rezeptoren am Beispiel des  $\beta_2$ -AR (Ag = Agonist; AC = Adenylatzyklase; PKA = Proteinkinase A; GRK2 = G-Protein-Rezeptorkinase 2; P = Phosphat)**

Werden die Rezeptoren einem dauerhaften äußeren Reiz ausgesetzt, kommt es zu einer verstärkten kompensatorischen Reduktion der Rezeptorzahl in der Membran durch eine endosomatische Internalisierung der Rezeptoren. Mittels dieses Effektes, der als



Downregulation bezeichnet wird, kann die Zelle mittel- bis langfristig auf sich ändernde äußere Parameter reagieren. Dieser Prozess ist durch eine Anzahl von Faktoren fein regulierbar und hat eine entscheidende Bedeutung für eine Reihe von physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen [9]. So ist im Allgemeinen die Downregulation ein limitierender Faktor für die Dauermedikation chronisch obstruktiver Erkrankungen der Atemwege, hat Relevanz für die Abhängigkeitsentwicklung gegenüber Alkohol und anderen Suchtstoffen und ist im Fall einer Störung dieses Prozesses im Bereich des zentralen Nervensystems verantwortlich für neuropsychologische Erkrankungen [196]. Im Gegenzug kann eine gezielte Einflussnahme auf diese Prozesse auch einen geeigneten Ansatzpunkt für die Behandlung pathophysiologischer Zustände darstellen. Nach Gabe von Antidepressiva lassen sich adaptive Veränderungen im Vorkommen einer Reihe von GPCRs in verschiedenen Hirnregionen beobachten, u.a. eine Downregulation von  $\beta$ -AR, die zeitlich mit dem Einsetzen der klinischen Wirksamkeit einhergeht [220]. Die Untersuchung der möglichen Einflussnahme von Pharmaka auf die Mechanismen dieser Regulation, d.h. die Vorgänge von der Ligand-Rezeptor-Interaktion bis hin zur Internalisierung der Rezeptoren und deren weiteren Weg in der Zelle zu verfolgen, ist von großem pharmakologischen Interesse.

### **1.2.5 Mobilität von Rezeptorproteinen in der Biomembran**

Die Interaktion von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren mit G-Proteinen und die sich anschließende Reaktion mit Effektorproteinen finden im Lipidbilayer der zellulären Biomembran statt. Das ‚Fluid Mosaic‘-Modell [213] der Zellmembran bildet die Grundlage für eine laterale Mobilität von eingelagerten, bzw. die Membran durchspannenden Rezeptorproteinen. Die Beweglichkeit von Membranproteinen ist allerdings nicht völlig frei, sondern wird von bestimmten membraneigenen Faktoren bestimmt [259]. Die unterschiedliche Lipidzusammensetzung der von Phospholipiden dominierten Biomembran aus Cholesterol, Sphingolipiden und Glycerolfettsäureestern ist an Prozessen wie einer strukturierten Proteinverteilung, Signaltransduktion, Zell- Zellerkennung und Zellorientierung beteiligt. Lipide erfüllen diese Aufgaben durch unterschiedliche Einflüsse auf die Fluidität der Membranstruktur, und erzeugen so eine Ordnung der Proteine innerhalb dieses kontrolliert mobilen Systems [90]. So bewirkt beispielsweise eine zusätzliche Einlagerung von Cholesterol im Membranbilayer eine Abnahme der Fluidität und dadurch eine Reduktion der Mobilität von Proteinen. Um die Organisation bestimmter Membranbereiche zu beschreiben, wurden die Termini „lipid rafts“ und „caveolae“ in der Zellbiologie geprägt. Dabei werden in Lipid-Mikrodomänen unterschiedlicher Zusammensetzung mit einem ungefähren Durchmesser von 100 nm Proteine lokal konzentriert und zu größeren Funktionseinheiten

zusammengeführt [61,168,211,240]. Diese werden durch Interaktion mit dem Zytoskelett in einer freien lateralen Bewegung eingeschränkt, um eine Positionierung in bestimmten Bereichen der Biomembran zu ermöglichen. Die so erzeugte mechanische oder durch Proteinanker hervorgerufene Diffusionsbarriere wird als „fence“ oder „microcoral“ bezeichnet [123,125]. Derartige Mechanismen ermöglichen der Zelle eine übergeordnete Organisation der Biomembran, wodurch die Interaktion mehrerer beteiligter Proteine an einer komplexen Signalübertragung durch eine räumliche Zusammenfassung effizienter wird [212]. Proteine bzw. Rezeptoren sind in diesen Domänen in ihrer lateralen Mobilität stark eingeschränkt, jedoch nicht völlig unbeweglich [123]. Bindet ein Rezeptor innerhalb eines „rafts“ einen Liganden, kann es zu einer Mobilitätsänderung des Rezeptorproteins durch proteineigene Konformationsänderungen oder Vorgänge wie Dimerisierung oder Phosphorylierung kommen. Ein großer Anteil der Rezeptorproteine einer Zelle befindet sich jedoch außerhalb von „lipid-raft“-Bereichen und ist daher in der Membranebene relativ frei lateral beweglich. Da eine Funktionalität nicht zwingend an „lipid-rafts“ gekoppelt ist, können auch Rezeptoren außerhalb dieser Domänen Liganden binden und Signale in die Zelle weiterleiten. Die Verteilung der Rezeptoren einer Population zwischen diesen beiden Membrandomänen ist für jedes Rezeptorsystem unterschiedlich und abhängig vom jeweiligen Zelltyp. Eine weitere Fraktion von Rezeptoren befindet sich ständig im intrazellulären Kreislauf von Endozytose, Recycling oder lysosomalem Abbau sowie Synthese und Transport über das Transgolginetzwerk, welcher über Exozytose in die Membran mündet. Für funktionelle Proteine finden sich somit zahlreiche Mobilitätszustände in der Zellmembran, die sich deutlich von einer theoretischen freien, uneingeschränkten Diffusion in einem homogenen Lipidbilayer unterscheiden. Isolierte Membranen oder artifizielle Membranmodelle wie z.B. GUVs (Giant Unilammellar Vesicles) werden häufig für Untersuchungen zur Mobilität und Funktionalität von Membranbestandteilen wie Lipiden oder Rezeptorproteinen herangezogen. Zwar lassen sich aus diesen Modellen Teilaspekte der physiko-chemischen Abläufe und Regulationsmechanismen innerhalb von Biomembranen bestimmen. Für umfassende und den physiologischen Gegebenheiten angepasste Aussagen sind jedoch weiterführende Messungen am intakten System lebender Zellen zu fordern, da nur dort alle zellregulatorischen Einflüsse auf die Funktionalität von Membranbestandteilen gegeben sind [53]. Zur Untersuchung der Mobilitätszustände von Rezeptoren an intakten, lebenden Zellen haben sich nicht-invasive Fluoreszenz-Techniken, wie FRAP (fluorescence recovery after photobleaching), FRET (fluorescence resonance energy transfer), CLSM (confocal laser scanning microscopy) und FCS (fluorescence correlation spectroscopy) durchgesetzt. Die FCS-Technik ermöglicht zusätzlich eine Quantifizierung von Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen auf molekularer Ebene im homogenen Assay in Echtzeit.

### 1.2.6 Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien

Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien am  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystem werden nach wie vor hauptsächlich mittels Radio-Rezeptor-Assay (RRA) durchgeführt, wobei die antagonistischen Radioliganden [ $^{125}\text{I}$ ]Iodocyanopindolol (ICYP), [ $^3\text{H}$ ]Dihydroalprenolol und der Antagonist [ $^3\text{H}$ ]CGP-12177 zum Einsatz kommen [70,264]. Um die Bindungsaffinität von pharmakologisch aktiven Substanzen mittels RRA zu untersuchen, muss der freie Radioligand vom gebundenen mittels Filtration oder Zentrifugation möglichst schnell getrennt werden. Liganden mit schneller Bindungskinetik können aus dem Rezeptor-Ligand-Komplex entfernt werden, wenn die Halbwertszeit des Rezeptor-Ligand-Komplexes kleiner oder gleich der Zeit für den Trennschritt ist. Beim RRA werden Zellmembran-Präparationen verwendet, in denen sich der Rezeptor in artifiziellen Membranfragmenten befindet. Dies kann zu Veränderungen der Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen führen, weil der Rezeptor sich nicht mehr in der Biomembran einer intakten Zelle befindet und daher keinen zellregulatorischen Einflüssen unterliegt. Letztendlich ist der Umgang mit radioaktiven Substanzen hinsichtlich gesundheitlicher Risiken und der Entsorgung radioaktiven Materials nicht unproblematisch. Um die Nachteile des konventionellen Radio-Rezeptor-Assays zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit mit der Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) eine Methode angewandt, mit der molekulare Wechselwirkungen sowie kinetische Parameter in intakten biologischen Systemen in Echtzeit bestimmt werden können, ohne in das Gleichgewicht der Interaktion eingreifen zu müssen.

## 1.3 Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie

### 1.3.1 Theoretischer Hintergrund

Die Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) ist eine hochempfindliche biophysikalische Analyseverfahren, die es ermöglicht Molekülinteraktionen in Lösung, aber auch in lebenden Zellen auf molekularer Ebene, zu beobachten. [65,96,139].

Erste theoretische Arbeiten zu dieser Thematik stammen aus den 1970er Jahren [63,139,140], doch haben erst Entwicklungen auf den Gebieten der Mikroskopie, der Lasertechnologie, der Photodetektoren und der Datenverarbeitung zu Beginn der 1990er Jahre zu einer technisch adäquaten Umsetzung und Anwendbarkeit der FCS für kurze Messzeiträume und größere Datenmengen für z.B. High-Throughput-Screenings in kleinsten Volumina, u.a. in biologischen Proben, geführt [64,189].

Die FCS-Technik basiert auf der Anregung fluoreszierender oder fluoreszenzmarkierter Moleküle (Fluorophore) mittels einer stabilen Laser-Lichtquelle in einem definierten, durch eine konfokale Optik erzeugten, sehr kleinen Volumenelement (Laserfokus, 0,1 – 1 fl) (Abb. 1.3-1.1) [64]. Bei einer Größenordnung des Beobachtungsvolumens im Bereich von einem Femtoliter ( $10^{-15}$  l) befindet sich in einer 1,5 nanomolaren Lösung im Zeitmittel nur ein Probemolekül im Detektionsvolumen, was den Begriff der Einzelmoleküldetektion im Zusammenhang mit FCS veranschaulicht. Dies erlaubt die Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen unterschiedlichen Strukturen wie z.B. Antigen und Antikörper [227] oder Oligonukleotiden und polykationischen Polymeren [239] in Lösung sowie Messungen von Diffusionsprozessen von z.B. fluoreszenzmarkierten Proteinen oder Rezeptor-Ligand-Komplexen in subzellulären Kompartimenten wie der Biomembran, dem Zellkern oder in Mitochondrien, ohne in regulatorische Gleichgewichte einzugreifen [20,27,95,96,120,150,184,206,238]. Die FCS basiert auf Fluktuationen in der Fluoreszenzintensität, welche durch die Diffusion von Fluorophoren durch das Volumenelement und gleichzeitige Abgabe von Fluoreszenzlicht in Form von Photonen entstehen. Diese Fluktuationen werden zeitabhängig über einen Avalanche-Photodioden-Detektor aufgezeichnet und mittels eines Hardwarekorrelators mathematisch analysiert (Abb. 1.3-1.2-4). Anhand der Fluoreszenzintensitätsverteilung über die Zeit kann die mittlere Diffusionsgeschwindigkeit des Fluorophors im Volumenelement bestimmt werden, welche sich aus dem Wendepunkt der generierten Autokorrelationskurve ergibt (Abb. 1.3- 1.3). Form, Größe und Masse des beobachteten Fluorophors beeinflussen die Diffusionszeit durch das Beobachtungsvolumen. Geht ein Fluorophor eine Wechselwirkung mit einem Target (z.B. Rezeptorprotein, Enzym, Antikörper, DNA, Zellkompartiment) ein, kann dieses direkt durch eine verminderte Diffusionsgeschwindigkeit, bedingt durch den vergrößerten hydrodynamischen Radius und die größere Masse des entstandenen Fluorophor-Target-

Komplexes beobachtet werden. Die Autokorrelationskurve zeigt dann einen weiteren Wendepunkt im Bereich größerer Diffusionszeitkonstanten im rechten Achsenabschnitt. (Abb.1.3-1. 4). Die Amplitude der Autokorrelationsfunktion ist umgekehrt proportional zur Anzahl der sich zeitgleich im Laser-Fokus befindenden Moleküle. Die Höhe der einzelnen durch die Wendepunkte definierten Stufen stellt den Anteil der jeweils freien oder gebundenen Komponente dar.

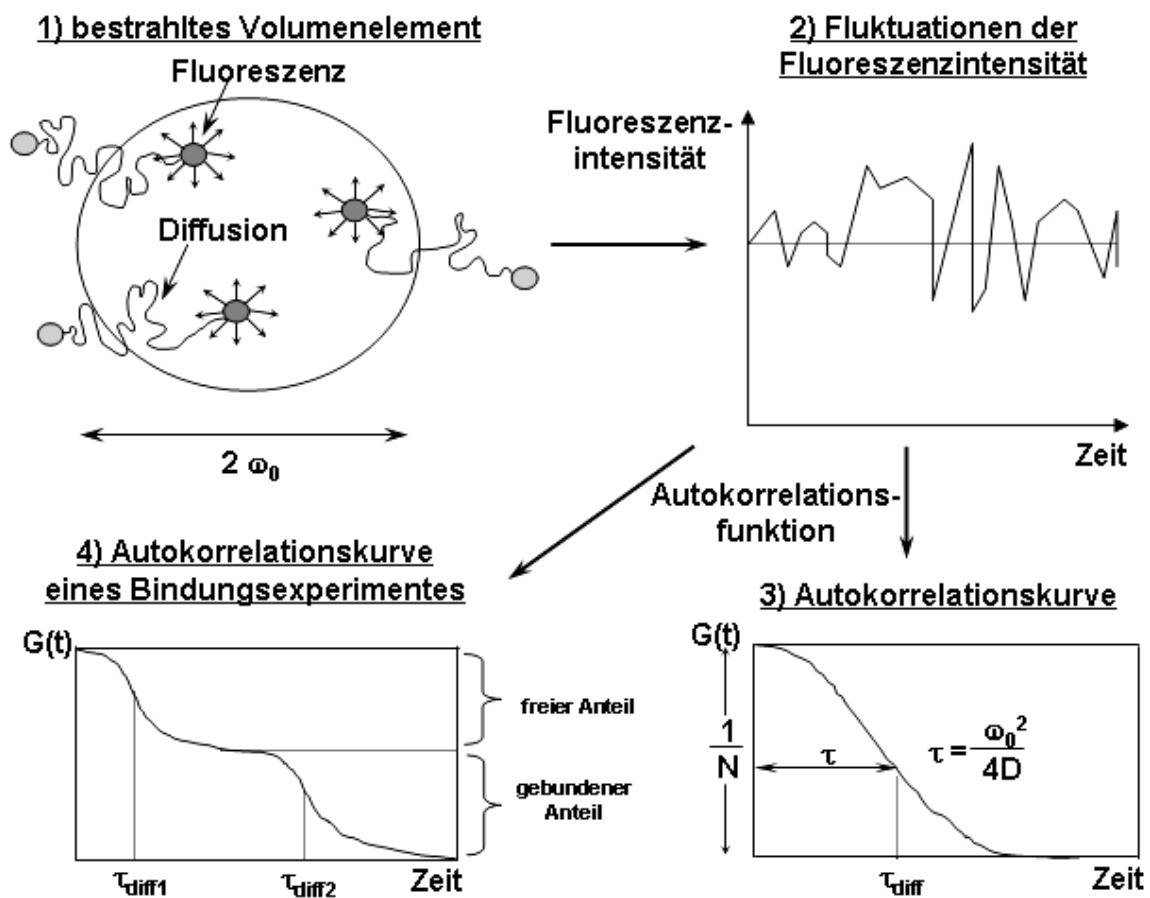
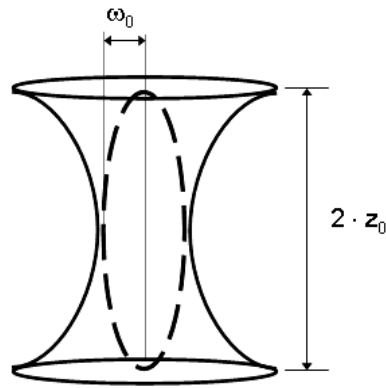


Abbildung 1.3-1.1-4: Prinzip der FCS

Die Fluoreszenz-Fluktuation eines Probenmoleküls wird als Funktion der Zeit  $t$  registriert. Das bestrahlte Volumenelement ist in Abbildung 1.3-2 schematisch dargestellt.



**Abbildung 1.3-2: Schematische Darstellung des konfokalen Volumenelementes (gestrichelt) mit  $\omega_0$  = Radius der fokalen Ebene sowie  $z_0$  = Hälfte der z-Ebene [254]**

### 1.3.2 Mathematischer Hintergrund

Bewegen sich die angeregten Probenmoleküle im dreidimensionalen Volumenelement frei und ohne Wechselwirkungen (translative Diffusion), können mittels der Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$  für ein Mehrkomponentenmodell die Fluoreszenzschwankungen mathematisch erfasst werden [190]:

$$G(\tau) = 1 + \frac{\sum_{j=1}^n Q_j^2 N_j}{\left[ \sum_{j=1}^n Q_j N_j \right]^2} \frac{1}{1 + \tau / \tau_{D_j}} \sqrt{\frac{1}{1 + (w_0 / z_0)^2 \tau / \tau_{D_j}}} \quad (1)$$

und  $Q_j = \sigma_j \eta_j g_j$  (2)

Dabei ist  $\omega_0$  der Radius des Detektionsvolumens in der fokalen Ebene,  $z_0$  ist der Radius des Detektionsvolumens in axialer Richtung (Abb. 1.3-2),  $D_j$  ist der Diffusionskoeffizient,  $N$  symbolisiert die mittlere Anzahl an Teilchen im Detektionsvolumen und  $\tau_{D_j}$  ist die mittlere Passagezeit des Fluorophors durch das Beobachtungsvolumen der Komponente  $j$ , in der Folge Diffusionszeitkonstante genannt.

$Q_j$  ist der Quantenausbeutekorrekturfaktor der Komponente  $j$  und  $\sigma_j$  der

Absorptionskoeffizient.  $\eta_j$  beschreibt die Fluoreszenzquantenausbeute und  $g_j$  die Fluoreszenzdetektionseffizienz der Komponente  $j$ .

Der Zusammenhang zwischen Diffusionskoeffizient  $D_j$  und Diffusionszeitkonstante  $\tau_{D_j}$  im Fokus stellt sich nach Gleichung (3) dar.

$$\tau_{D_j} = \frac{\omega_0^2}{4D_j} \quad (3)$$

Geht ein fluoreszierender Ligand Wechselwirkungen mit größeren Molekülen, z. B. Rezeptoren ein, nehmen die resultierenden Rezeptor-Ligand-Komplexe aufgrund der größeren Masse einen größeren hydrodynamischen Radius ein, was eine verlangsamte Diffusion zur Folge hat. Neben der Größe des untersuchten Komplexes hat auch die Viskosität des umgebenden Mediums einen Einfluss auf das Diffusionsverhalten. Die folgende Formel nach Stokes-Einstein beschreibt den Diffusionskoeffizienten ( $D$ ) für sphärische Moleküle:

$$D = \frac{k \cdot T}{6\pi \cdot \eta \cdot r} \quad (4)$$

Hierbei ist  $k$  die Boltzmann-Konstante mit  $1,38 \cdot 10^{-23}$  J/K und  $T$  die absolute Temperatur (293 K),  $\eta$  ist die Viskosität und  $r$  der hydrodynamische Radius des betreffenden Moleküls.

Setzt man unter bestimmten Bedingungen, z.B. Messungen von Molekülen in der Biomembran, eine zweidimensionale freie Diffusion ( $z_0 \rightarrow \infty$ ) der Probenmoleküle voraus, vereinfacht sich die Gleichung wie folgt:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^n \frac{y_j}{1 + \tau/\tau_{D_j}} \quad (5)$$

In den oben genannten Systemen ist es erforderlich, dass sich die Einzelkomponenten in ihrem Diffusionsverhalten ausreichend unterscheiden. Unterschiede im Diffusionsverhalten sind bedingt durch Unterschiede im hydrodynamischen Radius ( $r$ ), der sich in einem physikalisch inerten Molekül direkt aus dessen Masse ( $m$ ) nach Gleichung (6) ableiten lässt.

$$r = \sqrt[3]{\frac{3m/N_A}{4\pi\rho}} \quad (6)$$

$N_A$  steht dabei für die Avogadro-Konstante ( $6,023 \times 10^{23}$ ) und  $\rho$  für die mittlere Dichte des Probenmoleküls.

Gleichung (3) und (6) zeigen die Abhängigkeit von  $\tau_{Diff}$  zu einer Massenveränderung nach Gleichung (7).

$$\tau_{Diff} \sim \sqrt[3]{m} \quad (7)$$

Eine Verachtfachung der Molekülmasse ist also notwendig um eine Verdoppelung der Diffusionszeitkonstante zu erreichen.



### 1.3.3 Geräte-Setup

Auf der Basis eines konfokalen Mikroskops wird ein Laserstrahl über eine optische Einkopplung mittels eines Lichtleiters durch einen Bandpass-Filter für die jeweilige Anregungswellenlänge eingestrahlt und über einen dichroitischen Spiegel durch ein Objektiv mit hoher numerischer Apertur in die Probe fokussiert (Abb. 1.3-3). Emittiertes Fluoreszenzlicht wird über das gleiche Objektiv gesammelt und nach Passage des dichroitischen Spiegels vom Anregungslicht des Lasers mit Hilfe eines Emissionsfilters getrennt. Der Strahlengang verläuft weiter durch eine variable Lochblende (Pinhole), welche das Beobachtungsvolumen festlegt, und wird auf einem Avalanche-Photodioden-Detektor registriert. Das Detektorsignal wird anschließend über einen Hardwarekorrelator in die Autokorrelationsdaten umgewandelt.

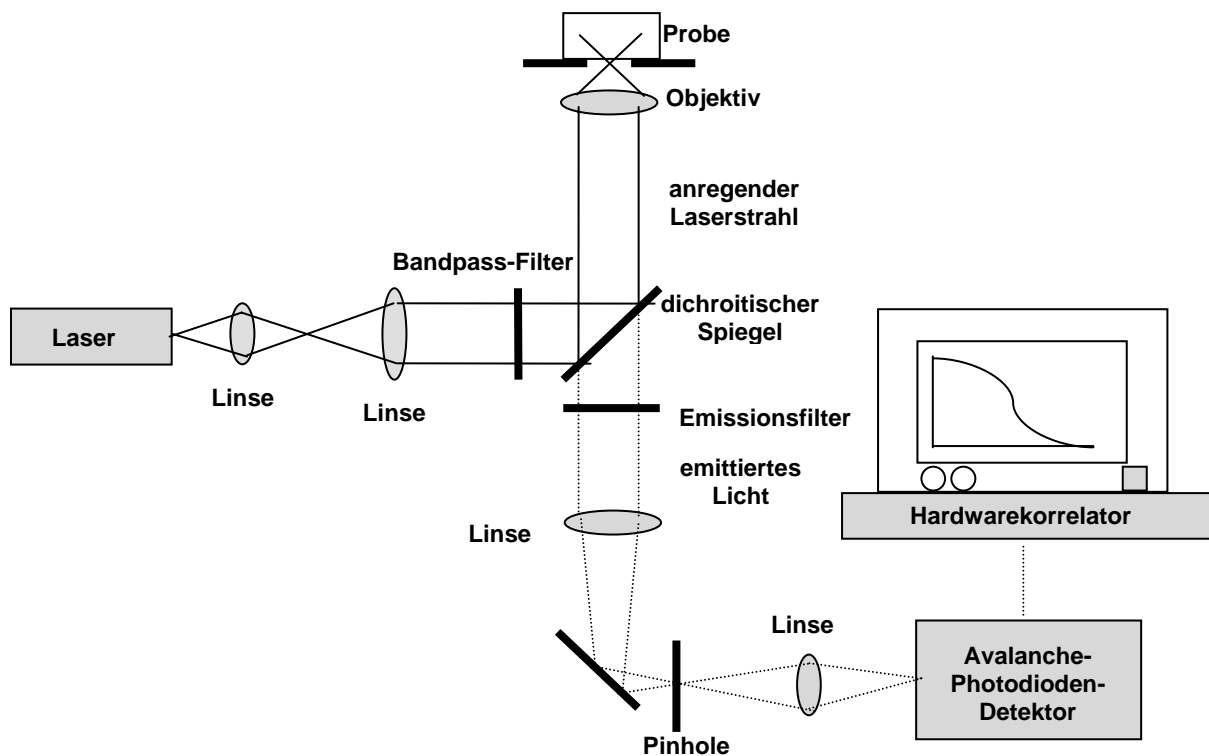


Abbildung 1.3-3: Setup und Strahlengang des FCS-Gerätes

### 1.3.4 Voraussetzungen für FCS-Messungen

#### 1.3.4.1 Fluorophore

Die grundlegende Voraussetzung für FCS-Messungen ist, dass das zu beobachtende Molekül entweder selbst fluoresziert oder an einen geeigneten Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Dessen Fluoreszenzeigenschaften bestimmen die Detektionsgrenze und den Messbereich, vor allem in komplexen Systemen wie lebenden Zellen.

Die verwendeten Farbstoffe müssen eine stabile Kopplung mit der Zielstruktur eingehen und sollten möglichst keine Veränderungen der Bioaktivität der Ausgangsstruktur bewirken oder unspezifische Interaktionen fördern. Das Fluorophor muss eine hohe photochemische Stabilität besitzen, da es sonst während der Messung zum Phänomen des Photobleaching, d.h. zu einer irreversiblen Zerstörung des Chromophors kommen kann. Ferner ist eine hohe Quantenausbeute des Farbstoffes ausschlaggebend, um das Fluoreszenzlicht einzelner Moleküle von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden. Faktoren wie z. B. Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert und inter- sowie intramolekulare Wechselwirkungen des Farbstoffes können die Quantenausbeute beeinflussen und sollten daher über den gesamten Messzeitraum konstant gehalten werden [254]. Wichtig für Lebendzelluntersuchungen ist weiterhin, dass die entsprechenden Farbstoffe eine gute Wasserlöslichkeit aufweisen und in zelloptimierten Puffersystemen von pH 6,8 – 7,4 möglichst ihr pH-abhängiges Fluoreszenzoptimum aufweisen. Ein hydrophiler Charakter verringert weiterhin die farbstoffvermittelte, unspezifische Einlagerung des fluoreszenzmarkierten Liganden in das lipophile Milieu der Biomembran. Darüber hinaus sollte das Auftreten von Tripletzuständen des Farbstoffes möglichst selten sein. Der Tripletzustand eines Elektrons ist ein Spin-verbotener Übergang auf ein niedrigeres Energieniveau als der Anregungszustand. Die Verweildauer von Elektronen im Tripletzustand ist relativ lang (ms im Vergleich zu ns im angeregten Zustand), wobei die Energie beim Zurückfallen in den Grundzustand als Phosphoreszenz abgegeben wird. Moleküle die sich im Tripletzustand befinden stehen daher für eine Fluoreszenzantwort nicht zur Verfügung. Dadurch wird die Fluoreszenzausbeute des Fluorophors verringert und die Qualität des Signals nimmt ab.

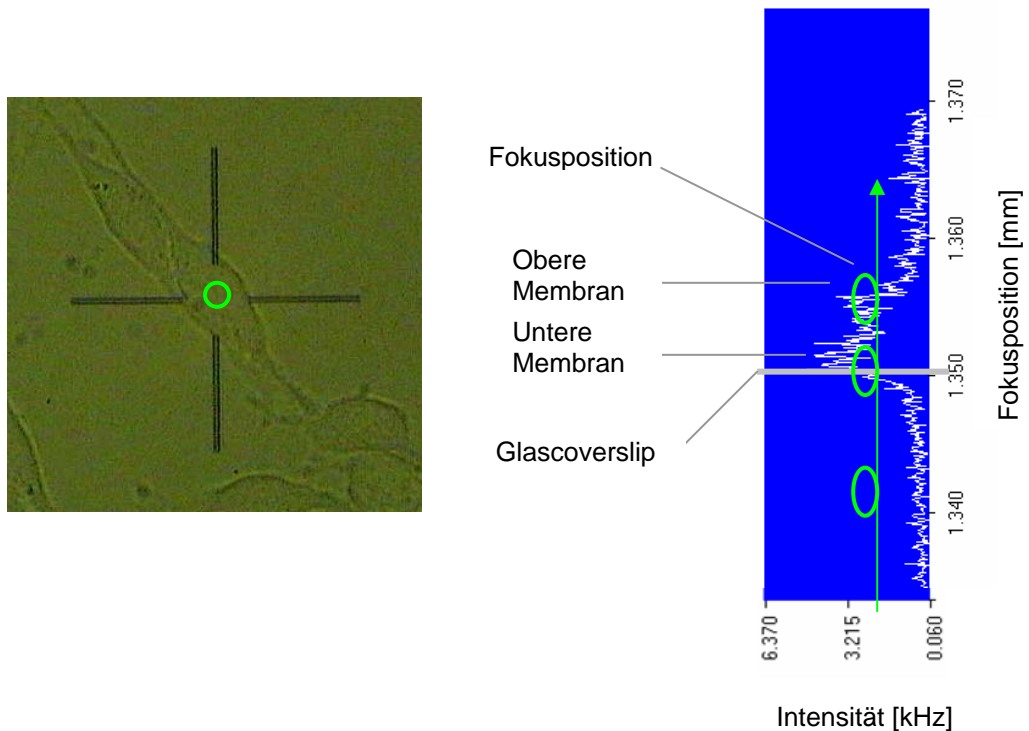
### 1.3.4.2 Hintergrundsignal

Besondere Aufmerksamkeit ist im Rahmen von FCS-Messungen auf die Hintergrundfluoreszenz in Form von Laserstreulicht, Raman-Effekt, optischen Bestandteilen des Setups sowie Autofluoreszenzsignalen aller verwendeten Substanzen eines Assays zu lenken. Alle eingesetzten Komponenten wie Puffersubstanzen, Lösungsmittel, Nährmedien, Detergenzien und alle anderen zugeführten Stoffe sind auf ihre Eigenfluoreszenz und eventuell dadurch bedingte störende Einflüsse in separaten FCS-Messungen zu überprüfen. Eine weitere Quelle störender Autofluoreszenzen stellen zelluläre Strukturen, bzw. subzelluläre Kompartimente dar. In diesen kommen eine Vielzahl autofluoreszierender Strukturen wie Flavoproteine und Nicotinamid-Fluorophore [5,14,127] vor, welche heterogen, meist in membranreichen Strukturen innerhalb der Zelle verteilt vorliegen. Die Detektion kleinster Lichtmengen einzelner Moleküle macht eine Reduktion der Hintergrundfluoreszenz zwingend erforderlich. Besonders in komplexen, biologischen Systemen ist ein Signal-zu-Hintergrund Verhältnis von etwa 10:1 anzustreben, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten [232].

### 1.3.5 FCS-Messungen an lebenden Zellen

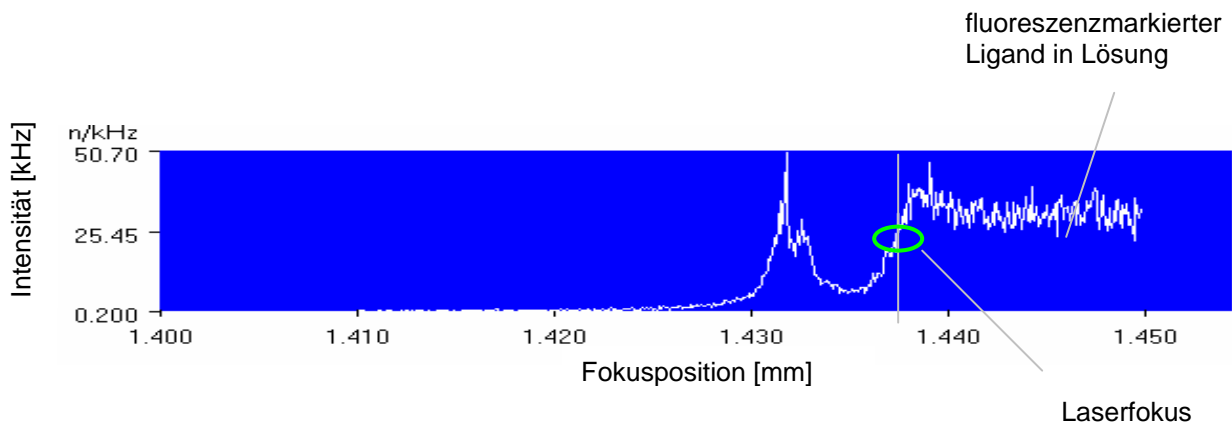
Für FCS-Untersuchungen an Zellen müssen diese in Kultur besondere Anforderungen erfüllen. Um eine gezielte Positionierung des fokalen Volumenelementes in einem Zellkompartiment zu ermöglichen, muss ein adhärentes Wachstum der Zellen an Glasoberflächen gewährleistet sein. Dieses kann entweder endogen vorhanden sein, oder durch Beschichten (engl.: coat) des Glascoverslips mit Substanzen wie z.B. Laminin oder Poly-D-Lysin erreicht werden. Die Zellen dürfen nur ein geringes Ausmaß an nicht autokorrelierbarer Autofluoreszenz zeigen. Außerdem müssen die Zellen über den Zeitraum der Messungen (bis zu 60 min) im Bindungspuffer und bei Raumtemperatur stabil sein. Zur Bestimmung der Autofluoreszenz einer Einzellzelle wird diese in x-y-Richtung über den Mikroskopisch angesteuert. Darauf wird in der Mitte des Zellsomas, in Richtung der z-Achse der konfokalen Optik, mittels eines Laser-Scans entlang des Zellkörpers ein Fluoreszenzprofil der Zelle aufgezeichnet. Dieses zeichnet sich für viele Zelllinien durch ein 2-Peak-Profil aus, welches räumlich aufgelöst die untere und obere Zellmembran mit dem dazwischen liegenden Zytosol als Bereich geringerer Autofluoreszenz erkennen lässt. Dies ermöglicht eine exakte Bestimmung der Gesamtausdehnung der Zelle sowie des Autofluoreszenzsignals einzelner Kompartimente wie z.B. der Biomembran und deren Position (Abb. 1.3-4). Messungen der zellulären Autofluoreszenz im Bereich der Biomembran sowie anderer membranär lokalisierter Fluoreszenzsignale wie z.B. von GFP-

Fusionsproteinen lassen sich durch Positionierung des Laserfokus im Maximum bzw. im abfallenden Schenkel der Fluoreszenz der oberen Zellmembran im Zellscan realisieren (Abb. 1.3-4). Dabei teilt die Biomembran den Laserfokus in zwei Hälften, von denen eine in den Inkubationspuffer ragt und den Bereich der Membran abdeckt und die andere ins Zytosol taucht.



**Abbildung 1.3-4: Schematische Abbildung eines Zellscans durch eine C6-Glioblastomzelle**

Nach Inkubation von Zellen mit einem farbstoffmarkierten Liganden wird das fokale Beobachtungsvolumenelement mit einer z-Ausdehnung von ca. 2  $\mu\text{m}$  so in der Zelle positioniert, dass die Zellmembran den Fokus halbiert. Die Position mit halbmaximaler fokaler Fluoreszenzintensität repräsentiert dann den Bereich, in dem das Beobachtungselement halb in die fluoreszierende Ligandlösung über der Zelle und halb in das Zytosol eintaucht (Abb. 1.3-5).



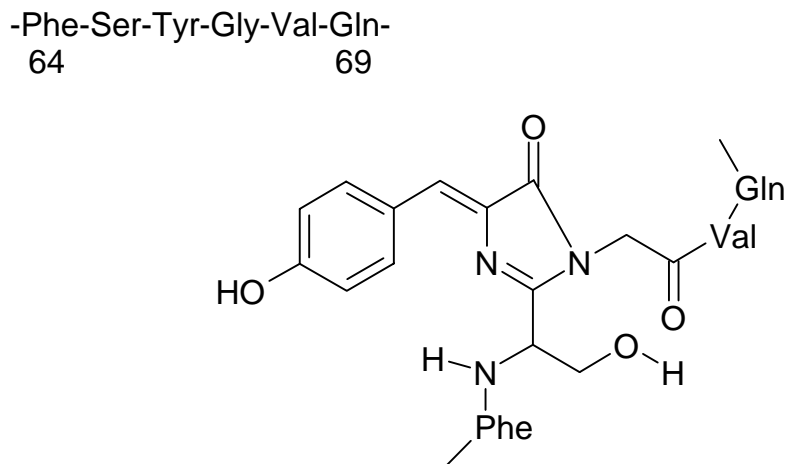
**Abbildung 1.3-5: Schematische Darstellung der Fokuspositionierung in einer Zelle nach Inkubation mit 10 nM eines fluoreszenzmarkierten Liganden**

Um einzelne Messungen in der Biomembran reproduzierbar zu machen, ist eine exakte Positionierung des Laserfokus erforderlich. Diese ist für jede Messreihe aufs neue via z-Scan zu kontrollieren, da es durch mögliche Eigenbewegungen der Zelle (vor allem im Bereich der Biomembran) zu einer Fehlpositionierung des Volumenelementes im Rahmen von Mehrfachmessungen oder Langzeitinkubationen kommen kann.

## 1.4 Grün fluoreszierendes Protein (GFP)

### 1.4.1 Wildtyp-GFP und Varianten

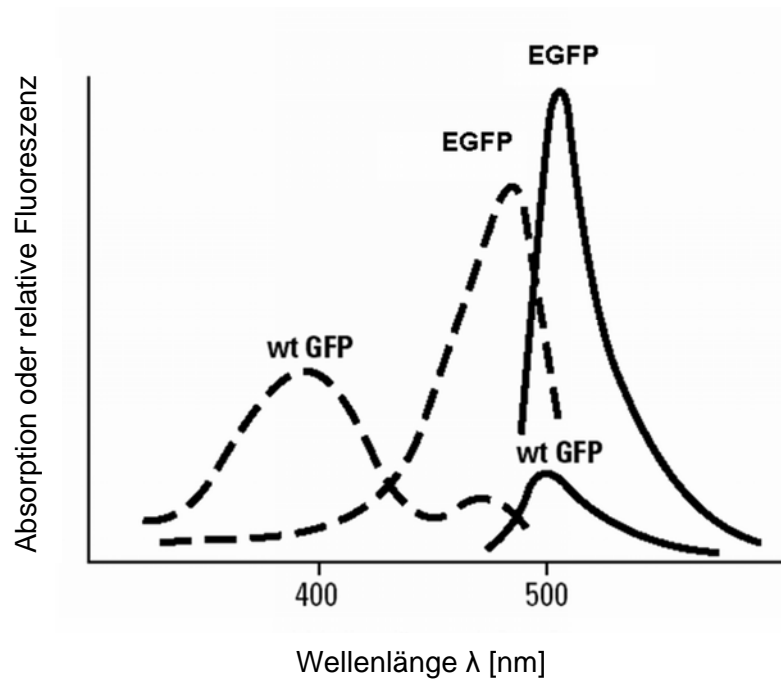
Das grün fluoreszierende Protein (green fluorescent protein, GFP) stammt aus der biolumineszierenden Qualle *Aequorea victoria*. Deren  $\text{Ca}^{2+}$ -aktiviertes Photoprotein Aequorin transferiert Energie auf GFP, welches diese in Form von grünem Fluoreszenzlicht wieder abgibt [152,208,250]. Wildtyp-GFP (wt-GFP) wurde als Aminosäuresequenz aus 238 Aminosäuren identifiziert, welche in 11  $\beta$ -Faltblättern und 6  $\alpha$ -Helices angeordnet sind, von denen eine das Chromophor enthält [169,260]. Dieses wird aus je einem Serin, Tyrosin und Glycin (Aminosäuren 65-67) aus der Primärsequenz des Proteins ohne Kofaktoren bei der Faltung des Proteins gebildet (Abb. 1.4-1). Anregung von wt-GFP mit blauem oder UV-Licht (~350 nm – 490 nm) führt zur Emission von grünem Fluoreszenzlicht (Abb.1.4-2)



**Abbildung 1.4-1: Das Chromophor von wt-GFP (nach [24])**

Im Zuge einer immer breiteren Anwendung von GFP als fluoreszierender Marker im Rahmen biochemischer Untersuchungen wurde das ursprünglich isolierte wt-GFP hinsichtlich seiner Fluoreszenz-Eigenschaften variiert und optimiert. EGFP (enhanced green fluorescent protein), EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) und ECFP (enhanced cyan fluorescent protein), um nur einige zu nennen, sind Weiterentwicklungen des wt-GFP, bei denen durch Aminosäuresubstitution auf die Fluoreszenzeigenschaften hinsichtlich Exzitation und

Emission Einfluss genommen wurde. Beim im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten EGFP, einer Exzitationsvariante des wt-GFP (GFPmut1, [51]), wurde durch Substitution von 2 Aminosäuren F64L und S65T eine höhere Effizienz in der Chromophorbildung (95 % bei 37°C, [176]) und ein höherer Extinktionskoeffizient erreicht. Nach Anregung mit blauem Licht bei 488 nm (Exzitationsmaximum) fluoresziert EGFP bei 509 nm (Emissionsmaximum) 4-35 mal stärker als wt-GFP [51,261] (Abb. 1.4-2).



**Abbildung 1.4-2: Absorptionsspektrum (gestrichelt) und Emissionsspektrum von wt-GFP und EGFP (nach BD Biosciences Clontech)**

EGFP zeigt stabile Fluoreszenzeigenschaften zwischen pH 7,0 und 11,5. Außerhalb dieses pH-Bereiches nimmt die Fluoreszenz deutlich ab, was auf eine Veränderung im Protonierungsgrad der Tyrosin-Hydroxyl-Gruppe des Chromophors zurückzuführen ist [24,175,242]. Bei pH 6,0 zeigt EGFP noch ca. 50 % der ursprünglichen Fluoreszenz [176].

## 1.4.2 GFP-Fusionsproteine und Anwendungen

Die Klonierung der wt-GFP-DNA [102,185] ermöglichte die Expression von GFP als Fusionsprotein mit vielen verschiedenen Proteinen in prokaryotischen wie eukaryotischen Zellsystemen [8,34,146,252]. In vielen Fällen behalten die chimere Gensequenzen, welche für N- oder C-terminale GFP-Fusionsproteine codieren, die normalen biologischen Eigenschaften des heterologen Proteins, sowie die Fluoreszenzeigenschaften des nativen GFPs [72,146,216,248]. GFP und seine Varianten ermöglichen somit eine Fluoreszenzmarkierung (engl.: „fluorescence tag“) für ein bestimmtes Protein, und dessen in-vivo Lokalisierung als Fusions-Protein nach Transfektion von Zellen mit einem entsprechenden Plasmid. Ein GFP-tag ermöglicht außerdem Messungen an lebenden Zellen ohne Fixierung, Zell-Permeabilisierung und Antikörper-Inkubation, wie sie für immunzytochemische Untersuchungen notwendig sind. GFP-Fusionsproteine werden u.a. als Genexpressionsmarker, zur Untersuchung von Protein-Protein Wechselwirkungen und Protein-Trafficking in lebenden Zellen eingesetzt [8,44,102,148,248]. Darüber hinaus ermöglicht die GFP-Markierung von Proteinen kinetische Studien der Proteinlokalisierung [72] sowie Untersuchungen dynamischer Prozesse von Proteinen in subzellulären Kompartimenten wie z.B. Nucleus, Plasmamembran oder Golgi-Apparat [27,49,103].

GFP-Fusionsproteine sind im Vergleich zu fluoreszenzmarkierten Antikörpern stabiler gegenüber photophysikalischen Einflüssen wie z.B. Photobleaching und zeigen in fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen keine Hintergrundfluoreszenz durch unspezifische Bindung [248]. Die subzelluläre Lokalisation von GFP-Fusionsproteinen in definierten Kompartimenten wie z.B. Zytoskelett, Endosomen oder Biomembranen führt zu intensiveren Signalen und somit zu größerer Sensitivität und Auflösung der Messungen im Vergleich zu Antikörperfärbungen in der Immunzytochemie.



## 2. Zielsetzung

Im komplexen Zusammenspiel verschiedener Faktoren bei der Entstehung und Fortdauer einer Depression spielt das noradrenerge Neurotransmittersystem im ZNS eine bedeutende Rolle [226]. In vitro-Studien haben gezeigt, dass der verzögerte klinische Wirkungseintritt vieler synthetischer Antidepressiva sowie von Zubereitungen aus *Hypericum perforatum* L. nach mehrwöchiger Behandlung [243,256] mit einer Abnahme der  $\beta$ -adrenergen Rezeptordichte im frontalen Cortex der Ratte einhergeht [156]. Eine pathologische Erhöhung der Dichte  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren ( $\beta_2$ -AR) wird wiederum als ein biochemischer Marker für depressive Erkrankungen mit Angstsymptomen erachtet und lässt sich bei bestimmten Krankheitsbildern wie Post Traumatic Stress Disorder (PTSD) und Panic Disorder (PD) in Patienten beobachten [85,86]. Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung von Einflüssen des pflanzlichen Antidepressivums *Hypericum perforatum* auf das  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsystem mit den Subtypen  $\beta_1$  /  $\beta_2$  am postsynaptischen Modell lebender Zellen. Nicht-invasive, fluoreszenztechnische Methoden wie Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) und Fluoreszenzmikroskopie (FM) sollten daher für diese Fragestellung in zellkulturbasierten Assays zur Anwendung kommen. Die hohe Empfindlichkeit der FCS sollte dabei genutzt werden, um die Regulation membranständiger  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren auf Einzelmolekülebene zu beschreiben. Insbesondere selektiven Einflüssen von Inhaltsstoffen aus *Hypericum perforatum* auf die  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsubtypen sollte nachgegangen werden. Dabei wurden zwei verschiedene Ansätze zur Beschreibung der lateralen Mobilitäten mit einhergehenden Funktionalitäten von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in der Biomembran lebender Zellen verfolgt: Zum einen die Bestimmung von Bindungsaffinitäten und Rezeptordynamiken nach Bindung von fluoreszenzmarkiertem Noradrenalin an den  $\beta_2$ -AR im Rezeptor-Ligand-Bindungsassay; zum anderen die Beobachtung von GFP-Fusionsproteinen des  $\beta_1$ - und des  $\beta_2$ -AR, stabil transfiziert in unterschiedliche Zelltypen.

Ausgehend von der arzneimittelrechtlichen Forderung der Entschlüsselung des Wirkprinzips von Arzneistoffen und speziell von Vielstoffgemischen wie Arzneipflanzenextrakten sollten mit dieser Arbeit mögliche Einflüsse von Einzelkomponenten eines *Hypericum*-Extraktes auf der Ebene zentraler postsynaptischer Signaltransduktion wie folgt untersucht werden:

- Etablierung eines  $\beta_2$ -AR-Bindungsassays an lebenden C6-Zellen mittels FCS
- Beschreibung der Einflüsse von *Hypericum*-Inhaltsstoffen auf die Ligand-Bindung am  $\beta_2$ -AR sowie nachgeschalteter Mechanismen

- Untersuchungen zur Mobilität und Regulation GFP-getaggtter  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren an lebenden C6- und HEK293-Zellen mittels FCS und FM
- Beschreibung der Einflüsse von Hypericum-Inhaltstoffen auf die Regulation und Verteilung von  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR-GFP Fusionsproteinen mittels FCS und FM

### 3. Experimenteller Teil

#### 3.1 Synthese von Alexa532-Noradrenalin

Wie eingangs erwähnt muss ein für FCS-Messungen geeigneter Ligand verschiedene Voraussetzungen erfüllen. Einerseits wird eine spezifische Ligandenstruktur benötigt, die sich durch eine reaktive funktionelle Gruppe für die Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff auszeichnet, welche keinen Anteil an der Rezeptorerkennung hat. Andererseits muss der eingeführte Farbstoff nach der Kopplung seine Fluoreszenzeigenschaften behalten, um sich für Messungen auch vor einem erhöhten Hintergrundsignal, z.B. an Zellen, zu eignen. Zusätzlich sollten nach der Kopplung keine intramolekularen Wechselwirkungen auftreten, die die Fluoreszenzeigenschaften des Farbstoffes verändern, noch darf die Bindungsaffinität des Liganden durch den eingeführten Farbstoffanteil wesentlich beeinflusst werden. Um dies zu gewährleisten, ist eine gezielte Auswahl unter den zur Verfügung stehenden Kombinationen aus Ligandenstrukturen und entsprechendem Farbstoff zu treffen [95]. Gerade für die laserangeregten konfokalen Techniken sind hohe Anforderungen an die Photostabilität und Quantenausbeute der verwendeten Farbstoffe zu stellen [54].

##### 3.1.1 Noradrenalin

Für Bindungsstudien am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor lebender Zellen wurde das körpereigene Noradrenalin ((-)Arterenol, NA) (Abb. 3.1-1) gewählt, um einen fluoreszenzmarkierten Liganden mit agonistischem Wirkprofil zu synthetisieren, der nach Rezeptorbindung zellregulatorische Prozesse wie z.B. die Rezeptorinternalisierung auslösen sollte. Der einleitend beschriebenen Struktur-Wirkungsbeziehung folgend, sollte durch Kopplung eines Farbstoffes an die primäre Aminfunktion des vornehmlich am  $\beta_1$ -AR bindenden Noradrenalins eine Affinitätssteigerung in Bezug auf den  $\beta_2$ -AR erreicht werden. Für diese Markierung wurde der besonders hydrophile Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor<sup>®</sup> 532 (Alexa532) gewählt, der schon bei der Synthese eines fluoreszenzmarkierten Benzodiazepins [95] sowie eines fluoreszenzmarkierten GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Agonisten [150] keine Eigenbindung an lipophile Biomembranen gezeigt hatte und als aktivierter Succinimidylester vorlag.

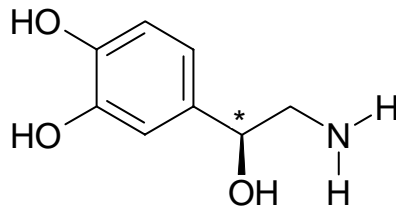


Abbildung 3.1-1: Noradrenalin (4-(2-Amino-1-hydroxy-ethyl)-benzen-1,2-diol)

### 3.1.2 Synthese

Die Reaktion zwischen dem Succinimidylester-aktivierten Farbstoff Alexa532 und der primären Aminfunktion des Noradrenalins wurde in Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel bei Raumtemperatur durchgeführt. Sie folgt einem nukleophilen Angriff des freien Elektronenpaares des Amins an den Carbonylkohlenstoff des Esters. Als Reaktionsprodukt erhält man das über eine stabile Amidbindung verknüpfte Ligand-Farbstoff-Konstrukt. Schematisch ist die Reaktion in Abb. 3.1-2 wiedergegeben.



Abbildung 3.1-2: Reaktion zwischen aktivierten Succinimidylestern und aliphatischen primären Aminen.

Die Umsetzung der Reaktion wurde über 24 h mittels HPLC auf einer analytischen LiChrospher RP8-select B Säule verfolgt. Es zeigten sich nach einigen Stunden in den HPLC-Chromatogrammen wachsende Anteile am Reaktionsprodukt, welche sich im UV/VIS-Spektrum der Dioden-Array-Detektion über die charakteristischen Banden des Farbstoffes in Kombination mit dem UV-Maximum des Noradrenalins identifizieren ließen (Abb. 3.1-4 A). Um die Ausbeute des fluoreszenzmarkierten Liganden zu optimieren, wurde die Reaktion mit

dem doppelten Äquivalent Noradrenalin durchgeführt. Das Reaktionsprodukt Alexa532-Noradrenalin (Alexa532-NA) und dessen Absorptions- und Emissionsspektrum sind in Abb. 3.1-3 und 3.1-4 wiedergegeben.

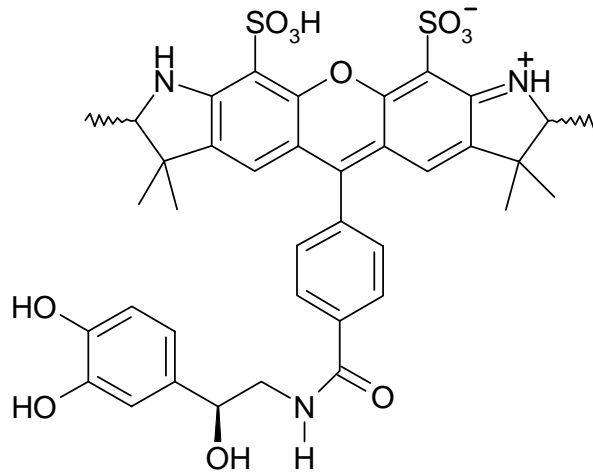


Abbildung 3.1-3: Alexa532-Noradrenalin (Alexa532-NA)

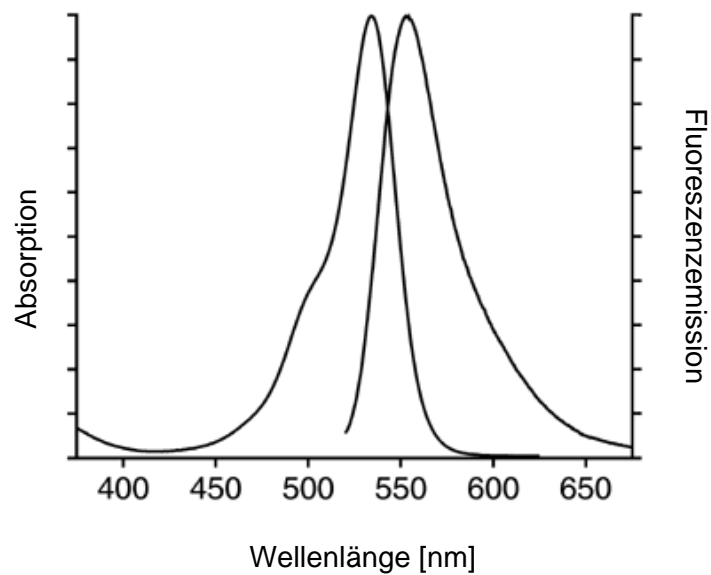
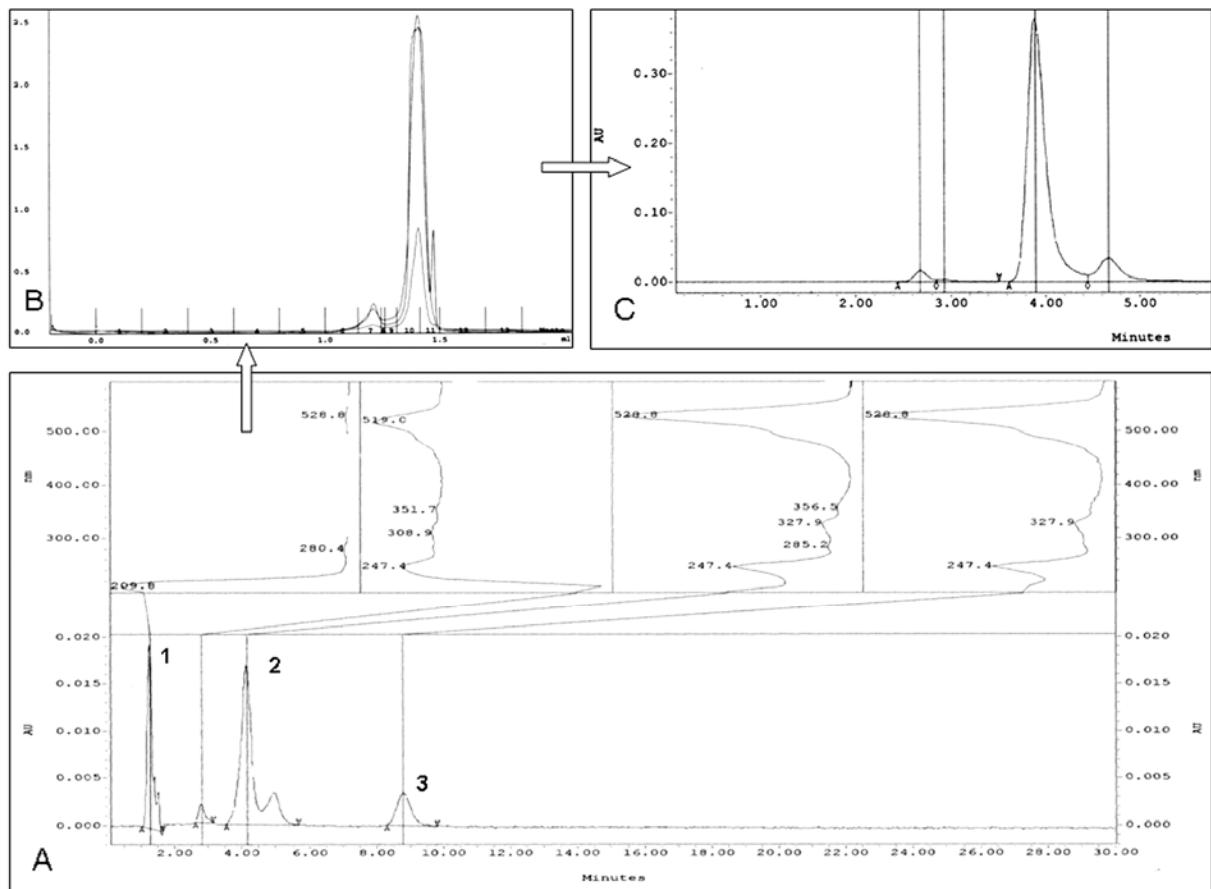


Abbildung 3.1-4: Absorptions- und Emissionsspektrum von Alexa532: Absorptionsmaximum  $\lambda_{\text{max}} = 532 \text{ nm}$ ; Emissionsmaximum  $\lambda_{\text{max}} = 555 \text{ nm}$  (nach Molecular Probes)

### 3.1.3 Reinigung und Analytik von Alexa532-NA

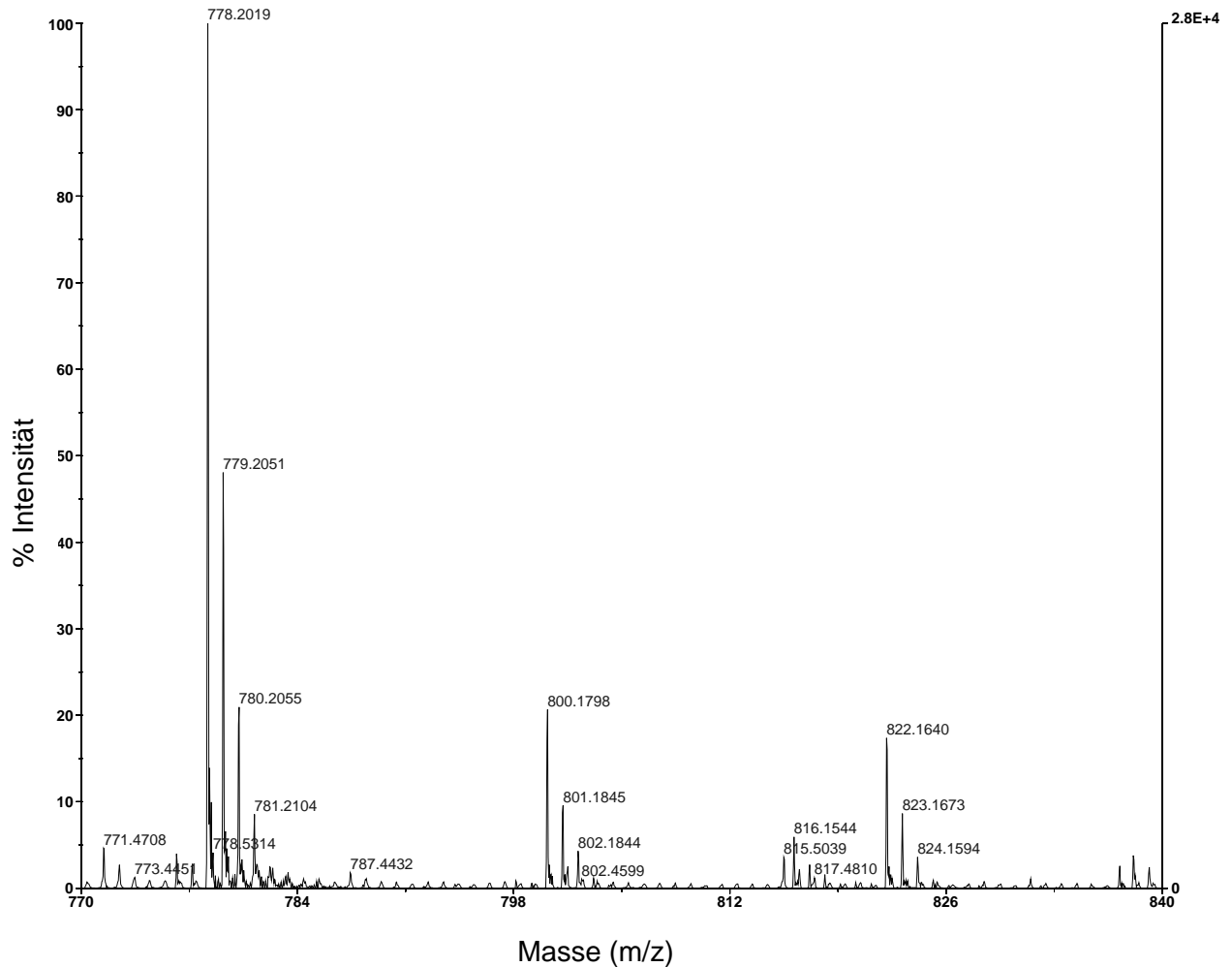
Die Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte auf einem SMART-System über eine Superdex Peptide PC 3.2/30 Säule (Abb. 3.1-4 B). Kleinere Verunreinigungen wurden mittels analytischer HPLC auf einer LiChrospher RP8-select B Säule abgetrennt (Abb. 3.1-4 C). Die Reinheit des isolierten Alexa532-NA wurde nach der 100% Flächenmethode mittels HPLC mit 100% festgestellt.



**Abbildung 3.1-4: Aufreinigung des fluoreszenzmarkierten Liganden Alexa532-NA:**

**(A) HPLC-Kontrolle der Umsetzung von Alexa532 und Noradrenalin: (1) Noradrenalin, (2) Alexa532-NA, (3) Alexa532; (B) präparative Trennung des Reaktionsgemisches und Isolierung von Alexa532-NA; (C) Aufreinigung von Alexa532-NA mittels analytischer HPLC**

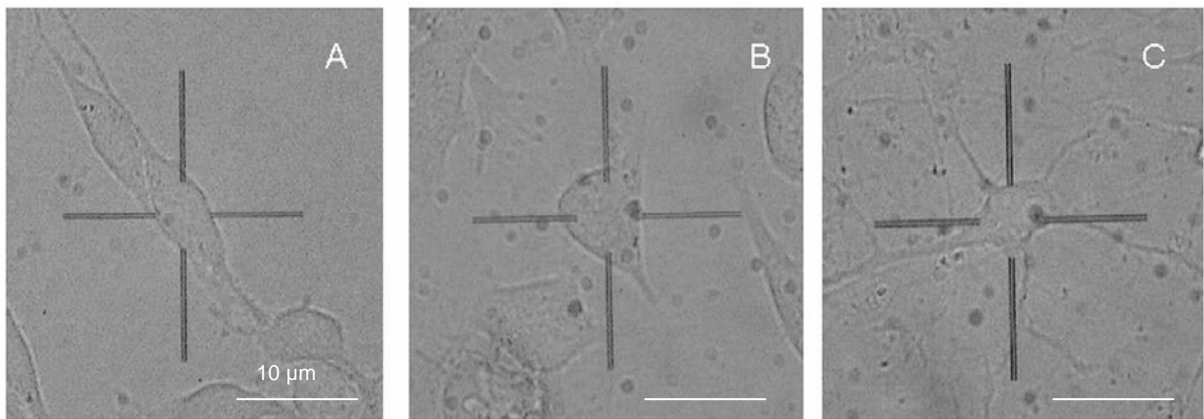
Die Identität des Produktes wurde über matrix-assisted laser-desorption ionization Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) verifiziert. Es zeigte sich im Massenspektrum für Alexa532-NA ein Molekülpeak  $[M^+]$  von  $m/z = 778,2019$  (ber.: 778,8840) für  $C_{38}H_{40}O_{11}N_3S_2$  (Abb. 3.1-5).



**Abbildung 3.1-5: Massenspektrum von Alexa532-NA im MALDI-TOF Massenspektrometer**

### 3.2 Zellen für Bindungsstudien am $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor mit Alexa532-NA

Die für die FCS-Messungen verwendeten Zellen sollten eine ausreichende Rezeptordichte besitzen und in Bezug auf den therapeutischen Nutzen von Hypericum-Präparaten als Antidepressiva ein physiologisch relevantes Modell darstellen. Näher untersucht wurden daher C6-Glioblastomzellen der Ratte [12] und N2a-Neuroblastomzellen der Maus [119], sowie primäre pränatale hippocampale Neurone aus Wistar-Ratten (Abb.3.2-1). Wie in Kapitel 1.3.5 eingehend beschrieben müssen Zellen für FCS-Messungen besondere Voraussetzungen erfüllen, wie z.B. eine geringe Autofluoreszenz, adhärentes Wachstum an Glasoberflächen und unter den Messbedingungen keine Eigenbewegung.



**Abbildung 3.2-1: Auswahl von (A) C6-Zellen, (B) N2a-Zellen und (C) primären hippocampalen Neuronen für FCS Messungen**

Alle 3 genannten Zelltypen ließen sich für einen ausreichend langen Zeitraum in Kultur halten, waren hinreichend adhärent an Deckgläschen entweder mit oder ohne Beschichtung der Oberfläche mit Poly-D-Lysin, und zeigten eine gleichbleibende Positionierung während mehrmaligem Laser-Scanning durch die Zelle. Allerdings unterschieden sich die verschiedenen Zelltypen in ihren Eigenschaften hinsichtlich Autofluoreszenz und Autokorrelierbarkeit des aufgezeichneten Fluoreszenzsignals (Abb. 3.2-2).



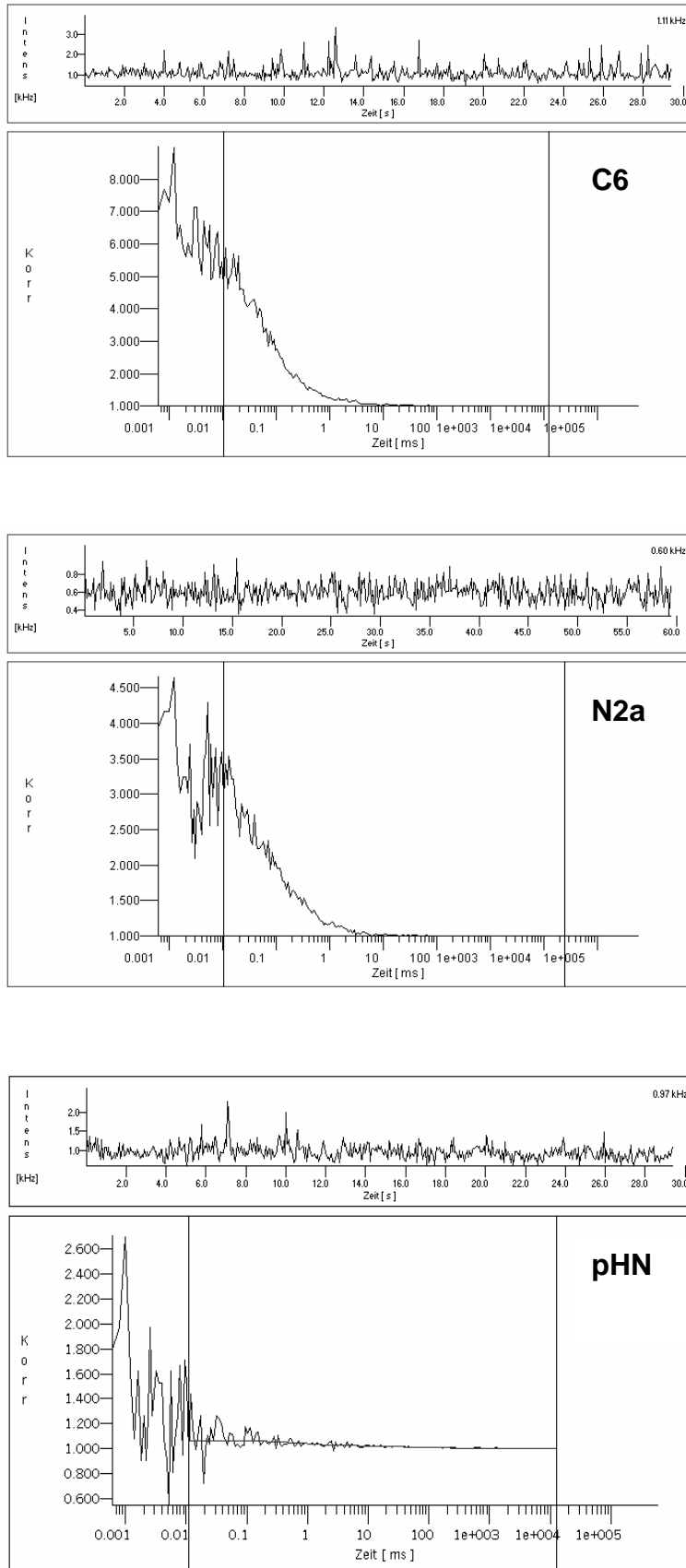


Abbildung 3.2-2: Fluoreszenzspuren und Autokorrelationskurven von FCS-Messungen in der Biomembran von C6-Zellen, N2a-Zellen und primären hippocampalen Neuronen (pHN)

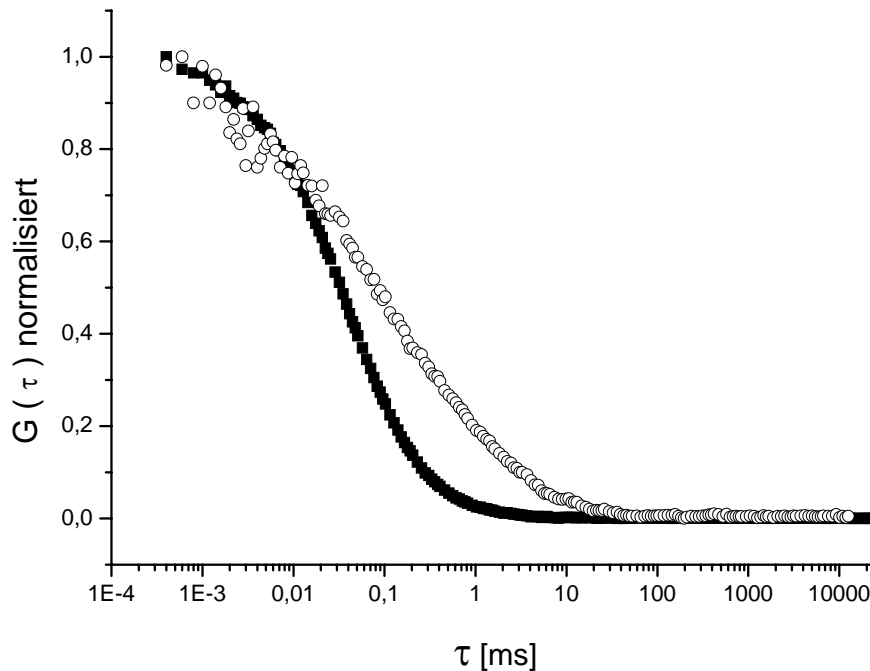
Eine Konzentration von 10 nM Alexa532-NA im Bindungspuffer über den Zellen zeigte bei einer Anregungsenergie von  $14,2 \text{ kW/cm}^2$  und einer Anregungswellenlänge von 514 nm eine Zählrate von  $\sim 40 \text{ kHz}$ . Wie bereits beschrieben, ist für FCS-Messungen an Zellen ein Signal-Hintergrund-Verhältnis von mindestens 10 : 1 zu fordern, wobei der fluoreszierende Ligand an der Biomembran das Signal und die Autofluoreszenz in der Biomembran den Hintergrund für die Messungen darstellen. Uninkubierte C6- und N2a-Zellen erfüllten die Anforderungen an geringe Autofluoreszenz mit durchschnittlichen Zählraten von  $< 4 \text{ kHz}$ , sehr wenigen registrierbaren Einzelereignissen (Amplituden) in der Fluoreszenzspur und einem daraus resultierenden nur schlecht autokorrelierbaren Fluoreszenzsignal (Abb.3.2.-2). Auch die primären pränatalen hippocampalen Neurone zeigten oft geringe durchschnittliche Zählraten von deutlich  $< 4 \text{ kHz}$  mit wenigen Einzelereignissen (Amplituden) in der Fluoreszenzspur, die im Gegensatz zu den C6- und N2a-Zellen nicht korrelierbar waren (Abb. 3.2-2). Die schwierige Präparation der hippocampalen Neurone am Embryonaltag 19 ergab aber auch häufiger Zellen mit hohen Zählraten und vielen Einzelereignissen mit bis zu 30 kHz. Derartige Zellen waren für FCS Messungen auf Einzelmolekülebene unbrauchbar. Die Ursachen für die teilweise hohe Autofluoreszenz der primären pränatalen hippocampalen Neurone können vielfältig sein. Die Präparation der Zellen, die Zellvereinzelung, die verwendeten Kulturmedien und Zusätze wie Sera, pH-Indikatoren oder Antibiotika können Einfluss auf das Vorkommen intrinsischer Chromophore wie Flavine und Flavoproteine haben [26]. Primäre hippocampale Neurone stellten sich demnach in den meisten Präparationen als gut geeignet für FCS-Messungen heraus, waren allerdings nicht immer in der gleichen Qualität verfügbar. C6- sowie N2a-Zellen zeigten dagegen eine geringe Autokorrelierbarkeit des Autofluoreszenzsignals. Dabei wurden Zählraten von  $< 1 \text{ cpm}$  (counts per molecule) und Triplettanteile  $> 50 \%$  detektiert. Demgegenüber findet man für Alexa532-NA gebunden am  $\beta_2$ -AR in der Biomembran Zählraten von ca. 15 cpm und Triplettanteile  $< 20 \%$ . Der Hintergrund der Autofluoreszenz war demnach diffus und vernachlässigbar klein und für FCS-Messungen im tolerierbaren Bereich. Die Wahl fiel dann auf C6-Zellen als Zellkulturmodell für die weiteren Messungen sowohl mit nativen, als auch mit transfizierten Zellen. C6-Zellen tragen den  $\beta_2$ -AR in geringer Dichte neben dem  $\beta_1$ -AR auf ihrer Oberfläche und sind in diesem Zusammenhang hinreichend charakterisiert [71,117]. Im Gegensatz zu N2a-Zellen wurden C6-Zellen bereits in früheren Arbeiten für Rezeptor-Ligand-Bindungsstudie am  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystem herangezogen [84] und als Modell für die Testung von Antidepressiva, z.B. im Radio-Rezeptor-Assay (RRA), verwendet [48,70,118,142,143]. Dabei erwiesen sich C6-Glioblastomzellen als ein geeignetes Modell für die Untersuchung von antidepressiven Effekten auf molekularer Ebene. Darüber hinaus wurde in C6-Zellmembranen eine effizientere Interaktion zwischen  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren und dem  $G_s$ -Protein im Vergleich zu zerebralen Kortex-Membranen gefunden [187]. Desweiteren bilden sich, anders als bei Neuronen im Rattenhirn, zwischen C6-Zellen keine

synaptischen Strukturen aus. Sämtliche Veränderungen nach Zugabe von Testsubstanzen repräsentieren somit „postsynaptische Effekte“. C6-Zellen sezernieren außerdem keine nennenswerten Mengen an Katecholaminen in ihre Umgebung, was zu einer Verfälschung von Ergebnissen führen könnte [70]. Der antagonisierende Effekt von  $\beta$ -Rezeptorenblockern wie Propranolol und Alprenolol verhindert zwar Effekte von  $\beta$ -Agonisten, kann den Verlust an  $\beta$ -adrenergen Bindungsstellen in C6-Zellmembranen, ausgelöst durch das trizyklische Antidepressivum Desipramin, aber nicht unterbinden [70]. In diesem Zusammenhang wurde die Bindung von Alexa532-NA an den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor, welche für hippocampale Neurone bereits bestimmt wurde [96], in der Membran von C6-Glioblastomzellen neu charakterisiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war daher auch von Interesse, inwieweit sich die FCS an lebenden Zellen auf ein für andere Techniken bewährtes Zellkulturmodell übertragen lässt und welche neuen Erkenntnisse sich daraus ergeben.

### 3.3 Bindungsstudien mit Alexa532-NA am $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor

#### 3.3.1 Bindung von Alexa532-NA an C6-Zellen

Nachdem der fluoreszenzmarkierte Ligand Alexa532-NA synthetisiert und identifiziert war, wurden seine Bindungseigenschaften am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor von C6-Zellen mittels FCS untersucht. Im Bindungspuffer (Locke's Solution) zeigte Alexa532-NA eine mittlere Diffusionszeitkonstante von  $\tau_{\text{free}} = 39,9 (\pm 2,3) \mu\text{s}$ , was einem Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{free}} = 2,14 (\pm 0,12) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  entsprach. Messungen in der Biomembran von C6-Zellen führten anhand der Autokorrelationskurven neben  $\tau_{\text{free}}$  für den frei diffundierenden Liganden zu 2 weiteren Diffusionszeitkonstanten mit  $\tau_{\text{Diff1}} = 0,62 (\pm 0,2) \text{ ms}$  und  $D_1 = 1,46 (\pm 0,47) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  sowie  $\tau_{\text{Diff2}} = 26,7 (\pm 0,6) \text{ ms}$  und  $D_2 = 3,2 (\pm 0,1) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ , welche den gebundenen Liganden repräsentierten (Abb.3.3-1).

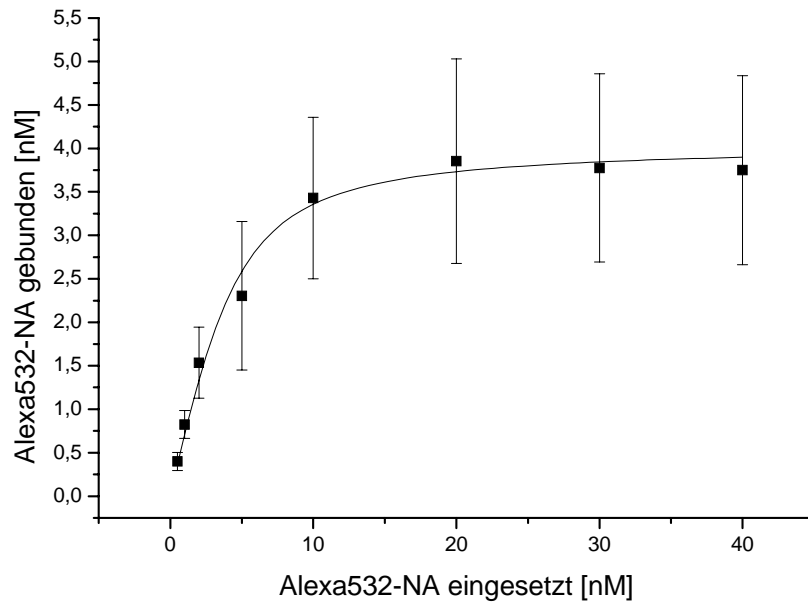


**Abbildung 3.3-1: Vergleich der normalisierten Autokorrelationskurven: freies Alexa532-NA (■) und Alexa532-NA in einem Inkubationsversuch mit 10 nM an der Membran der C6-Glioblastomzellen (○)**

Um einen Einfluss des hydrophilen Alexa-Farbstoffs auf die Bindung des Liganden auszuschließen wurden C6-Zellen mit 5 nM reinem Alexa532 für 15 min inkubiert und anschließend in der Biomembran gemessen. Es resultierte lediglich eine unspezifische Bindung von 13,4% der Gesamtbindung von 5 nM Alexa532-NA in der Membran der C6-Zellen.

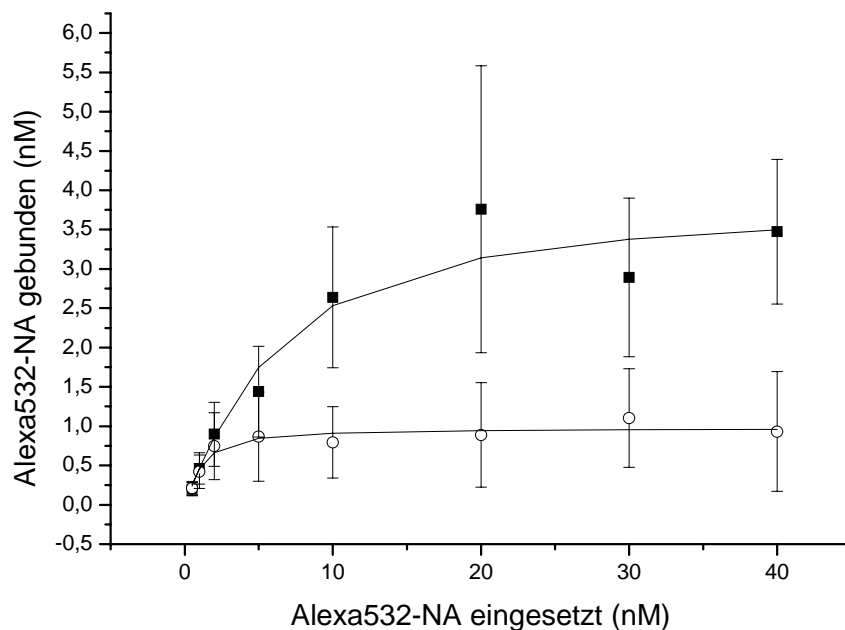
### 3.3.2 FCS-Bindungsstudien

Um die Bindungseigenschaften von Alexa532-NA an den C6-Zellen zu untersuchen, wurden Sättigungsexperimente und Kompetitionen mit verschiedenen  $\beta$ -adrenergen Liganden mittels FCS durchgeführt. Alexa532-NA zeigte in Sättigungsversuchen eine spezifische Bindung an den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren der C6-Glioblastomzellen mit einer Dissoziationskonstante von  $K_D = 1,36 (\pm 0,43)$  nM ( $n=36$ ) (Abb. 3.3-2) und einer maximalen Bindungsstellenanzahl von  $B_{max} = 4,04 (\pm 0,17)$  nM ( $n=36$ ), was bei einer durchschnittlich betrachteten Zellmembranoberfläche von  $0,108 \mu\text{m}^2$  eine erwartungsgemäß niedrige durchschnittliche Rezeptordichte auf den Zellkörpern von  $\rho = 4,5 (\pm 0,52)$  Rezeptoren /  $\mu\text{m}^2$  ( $n=36$ ) ergab.



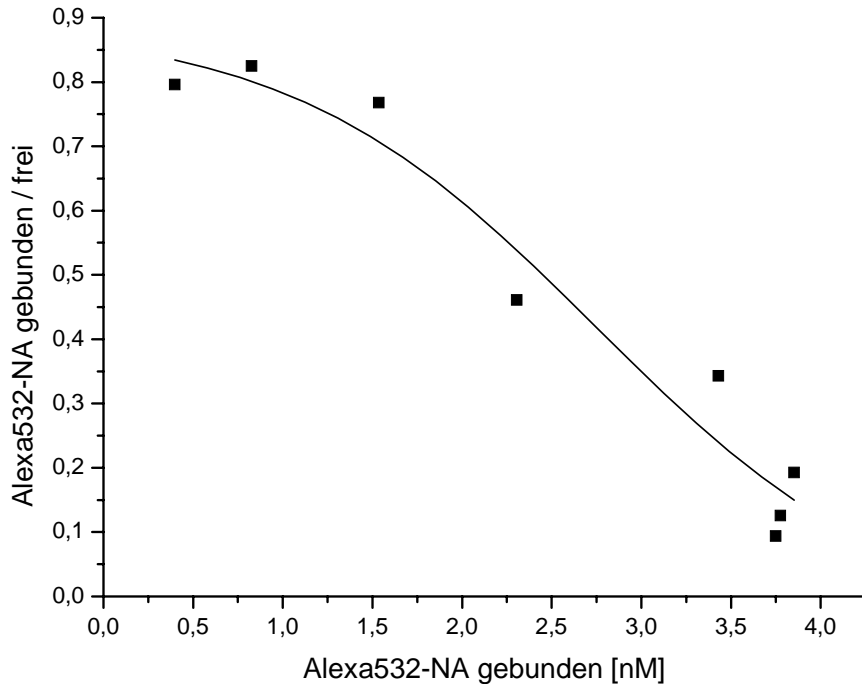
**Abbildung 3.3-2: Sättigung der Alexa532-NA Bindung an C6-Glioblastomzellen**

Teilt man die Alexa532-NA Bindung in die Anteile  $\tau_{\text{Diff}1}$  und  $\tau_{\text{Diff}2}$ , so findet man für beide Diffusionszeitkonstanten eine Sättigung der Bindung mit einem  $K_{D1} = 3,97 (\pm 1,26)$  nM und einer maximalen Anzahl an Bindungsstellen  $B_{\text{max}} = 3,88 (\pm 0,28)$  nM für  $\tau_{\text{Diff}1}$ , bzw. einem  $K_{D2} = 0,63 (\pm 0,66)$  nM und  $B_{\text{max}} = 0,98 (\pm 0,14)$  nM für  $\tau_{\text{Diff}2}$  (Abb.3.3-3). Somit tragen beide Anteile  $\tau_{\text{Diff}1}$  und  $\tau_{\text{Diff}2}$  zur Sättigung der Bindung bei, wobei für  $\tau_{\text{Diff}2}$  eine höhere Affinität der Bindung festgestellt werden konnte, und diese eher in den abgesättigten Bereich übergang.



**Abbildung 3.3-3: Sättigungskurven der Anteile von  $\tau_{\text{Diff}1}$  (■) und  $\tau_{\text{Diff}2}$  (○) der Bindung von 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen**

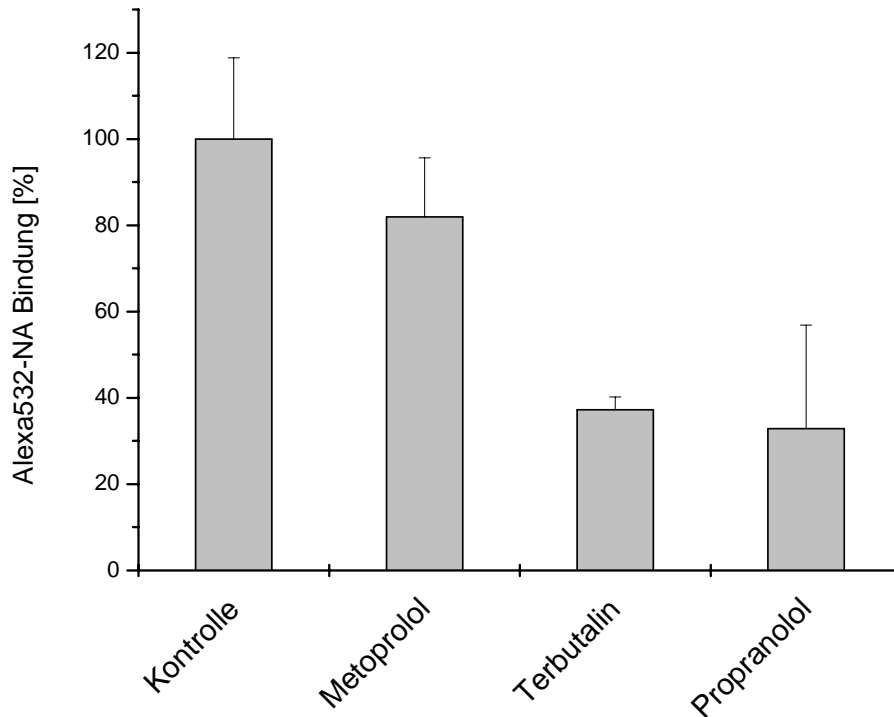
Ein Auftrag der Messwerte für die Alexa532-NA Gesamtbindung nach dem Scatchard-Verfahren mit  $[L^*]_{\text{geb}}$  (gebundener Ligand) gegen  $[L^*]_{\text{geb}} / [L^*]_{\text{o}}$  (gebundener Ligand / freier Ligand) resultierte in einem Plot, welcher sich besser mit einem nichtlinearen Modell anfitten ließ (Abb. 3.3-4), was ebenfalls auf unterschiedliche Rezeptoraffinitäten des Liganden schließen ließ.



**Abbildung 3.3-4: Scatchard-Plot der Alexa532-NA Bindung an C6-Zellen**

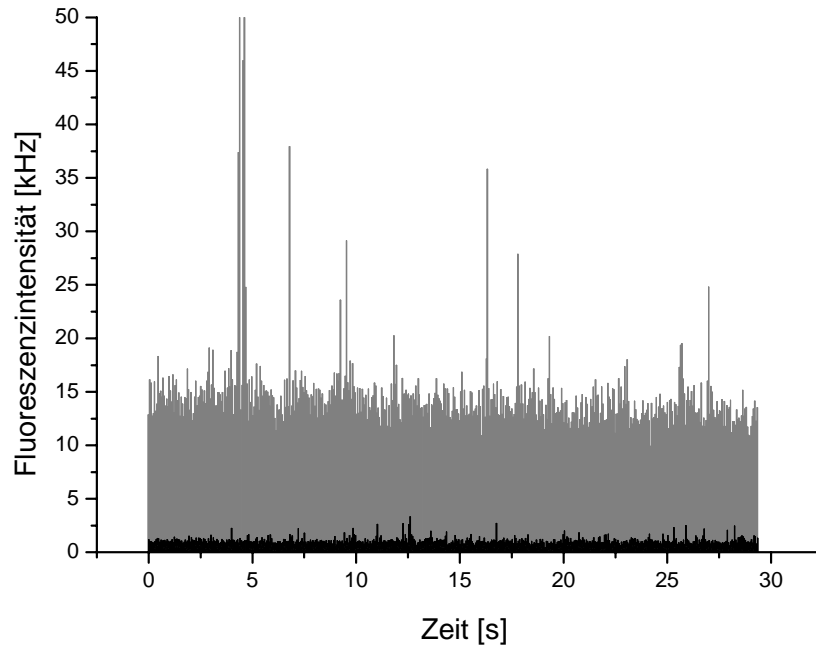
Um die durch Kopplung des Farbstoffes am Stickstoff des Noradrenalins zu erwartende Steigerung der Affinität des Alexa532-NA zum  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor zu überprüfen, wurden Hemmexperimente durchgeführt. C6-Zellen wurden zunächst mit dem  $\beta_1$ - /  $\beta_2$ -unspezifischen Antagonisten Propranolol im hundertfachen Überschuss für 30 min vorinkubiert und anschließend die Bindung von 10 nM Alexa532-NA in der Biomembran der Zellen bestimmt. Sie betrug 33 % der Gesamtbindung im Kontrollexperiment (n=36). Eine Vorinkubation mit 1  $\mu\text{M}$  des  $\beta_2$ -spezifischen Agonisten Terbutalin ergab eine dem Propranolol vergleichbare nichtverdrängbare Bindung von 38 % (n=36). Der  $\beta_1$ -spezifische Antagonist Metoprolol 1  $\mu\text{M}$  ergab eine Restbindung von 82 % (n=36) (Abb. 3.3-5).

Eine kompetitive Verdrängung von 10 nM Alexa532-NA mit einem tausendfachen Überschuss des  $\beta$ -unspezifischen Kompetitors Propranolol (10  $\mu\text{M}$ ) ergab eine unspezifische Bindung von 25 %.



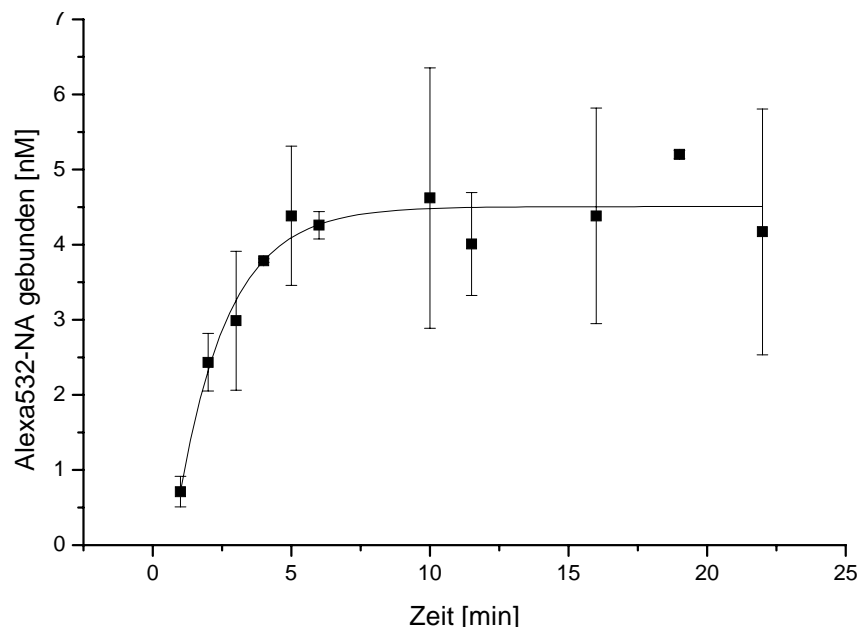
**Abbildung 3.3-5: Vergleich der Hemmexperimente der Bindung von Alexa532-NA an C6-Glioblastomzellen bei hundertfachem Überschuss des Kompetitors**

Die in Abbildung 3.3-5 dargestellten Wettbewerbsverhältnisse zeigen, dass es sich bei der Verteilung von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren auf den C6-Zellen wie erwartet um eine Mischpopulation handelte, und die Affinität des Alexa532-NA zum  $\beta_2$ -AR wesentlich stärker ausgeprägt war als zum  $\beta_1$ -AR. Die Bindung des Alexa532-NA ließ sich durch den  $\beta_1$ -spezifischen Kompetitor Metoprolol lediglich um 18 % zurückdrängen, wohingegen der  $\beta_2$ -spezifische Kompetitor Terbutalin die Gesamtbindung um 62 %, ähnlich dem Propranolol mit 67 %, reduzierte. Die rein unspezifische Bindung ließ sich am ehesten durch eine Konkurrenz mit dem  $\beta$ -unspezifischen Propranolol beschreiben. Hier wurde eine Reduktion der Bindung auf 25 % (1000 facher Überschuss) bzw. 33 % (100 facher Überschuss) erreicht. Im Vergleich zu der uninkubierten Zellmembran führte die Inkubation der C6-Zellen mit 10 nM Alexa532-NA zu einer Intensitätszunahme der Fluoreszenz, die sich in Form von gut korrelierbaren Einzelereignissen von bis zu 50 kHz vom Hintergrund unterscheiden ließ (Abb. 3.3-6).



**Abbildung 3.3-6: Autofluoreszenz der Biomembran einer C6-Zelle (schwarz). Fluoreszenz nach Inkubation mit 10 nM Alexa532-NA (grau)**

Eine zeitabhängige Anbindung von 10 nM Alexa532-NA an die C6-Zelle ist in Abb. 3.3-7 dargestellt. Hieraus ergab sich eine Assoziationskonstante  $K_{\text{ass}}$  von  $0,56 (\pm 0,11) \text{ min}^{-1} \text{ nM}^{-1}$  ( $n=5$ ).



**Abbildung 3.3-7: Zeitabhängiges Bindungsexperiment mit 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen**



Aus den experimentell ermittelten  $K_D$ - und  $k_{ass}$ -Werten errechnete sich eine Dissoziationszeit  $\tau_{diss}$  von 79 s und eine Dissoziationskonstante nach Gleichung (8) von  $k_{diss} = 1,27 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

$$K_D = \frac{k_{diss}}{k_{ass}} \quad (8)$$

Die so ermittelten Parameter ließen eine hohe Affinität und Spezifität der Bindung von Alexa532-NA an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in der Biomembran von C6-Zellen erkennen.

Der Ligand zeigte eine lange Verweildauer an seiner Bindungsstelle, was eine indirekte Fluoreszenzmarkierung der Rezeptoren für einen Zeitraum von 30 s pro Einzelmessung ermöglichte.

### 3.3.3 Agonistisches Profil und Funktionalität von Alexa532-NA

Um zu überprüfen, ob das Noradrenalin nach Modifizierung mit dem Farbstoff ein funktionelles agonistisches Profil beibehalten hatte, wurde mithilfe eines Chemilumineszenz-basierten Enzyme-Fragment-Complementation Assays (s. Kapitel 3.4.6) die intrazelluläre cAMP-Konzentration in C6-Kontrollzellen und nach 30 min Vorinkubation mit 500nM und 1  $\mu\text{M}$  Alexa532-NA bestimmt (Abb. 3.3-8).

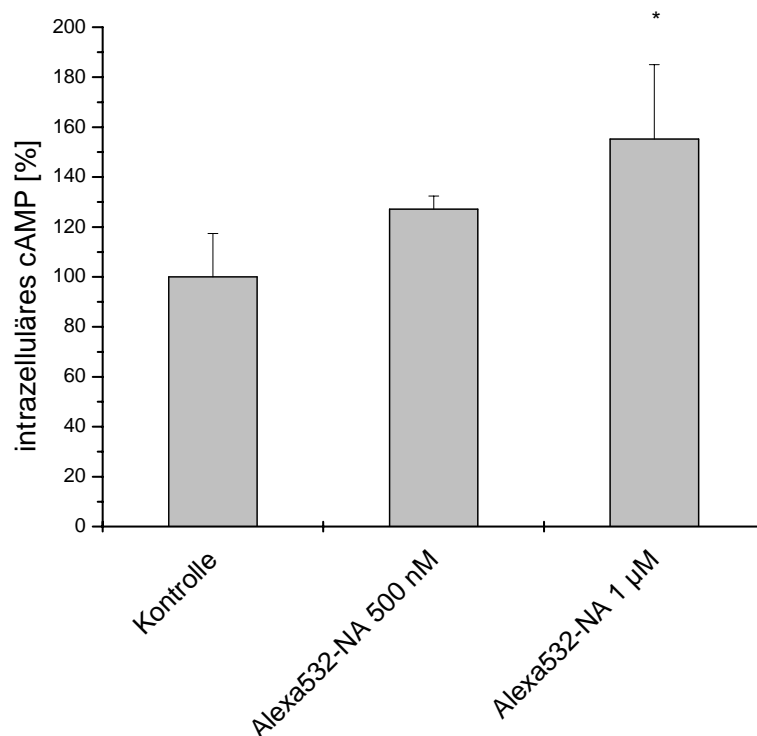
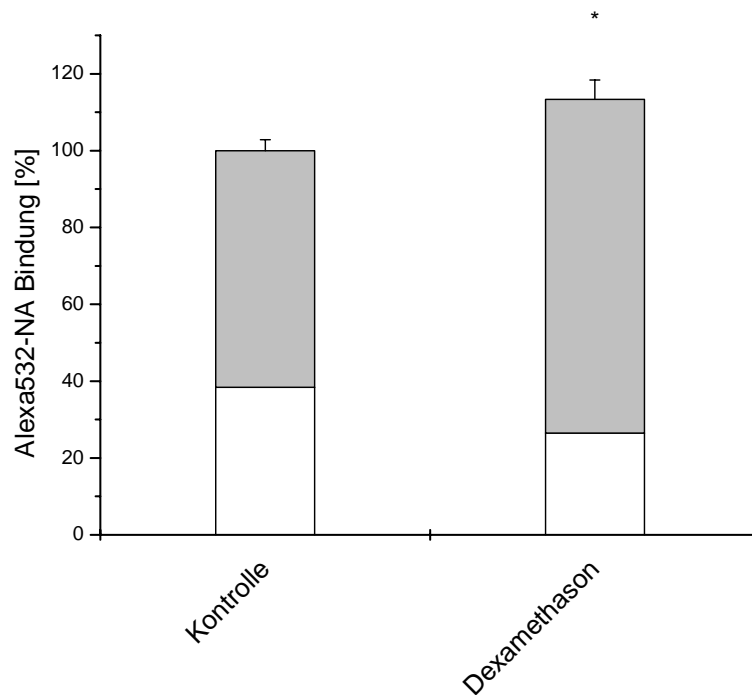


Abbildung 3.3-8: Vergleich der intrazellulären cAMP-Konzentrationen in C6-Zellen nach Vorinkubation mit Alexa532-NA mit Kontrollzellen ( $p^* < 0,05$ )

Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg an intrazellulärem cAMP nach 30 min, wobei eine Zunahme von 27,1 ( $\pm$  1,1) % für 500 nM Alexa532-NA, bzw. 55,2 ( $\pm$  10,6) % für 1  $\mu$ M Alexa532-NA im Vergleich mit Kontrollzellen zu verzeichnen war ( $n=3$ ). Demnach wurde Alexa532-NA nicht nur an den  $\beta_2$ -AR gebunden, sondern es wurde auch die sich anschließende Signalkaskade über die Adenylatzyklase (AC) mit nachgeschalteter Produktion des second-messengers cAMP ausgelöst. Der Ligand Alexa532-NA zeigte somit ein agonistisches Profil am  $\beta_2$ -AR in der Biomembran von C6-Zellen. Um einen weiteren Hinweis für einen funktionellen  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor in der Biomembran der C6-Zellen zu erhalten, wurden die Zellen vor Zugabe von 10 nM Alexa532-NA 30 min mit 1  $\mu$ M Forskolin vorinkubiert. Forskolin ist ein Liganden-unabhängiger Aktivator der AC, welche die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP) zu cAMP katalysiert. Dies führt, unabhängig vom Rezeptorstatus in der Biomembran, zu einer Phosphorylierung der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren durch die Proteinkinase A (PKA) und somit zu regulativen Prozessen, z.B. einer Clathrin-coated-pit vermittelten Internalisierung von Rezeptoren [180]. Nach Forskolin-Vorinkubation resultierte eine Reduktion der Alexa532-NA Bindung um 39 % im Vergleich zum Kontrollexperiment, was auf eine durch Forskolin eingeleitete Abnahme von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren durch Internalisierung schließen ließ ( $n=18$ ). Der Quotient der Anteile  $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$  erhöhte sich dabei von 2,8 auf 3,3, was auf eine bevorzugte Internalisierung von Rezeptoren mit erhöhter Ligand-Affinität und verlangsamer Geschwindigkeit in der Biomembran hindeutete. Dieser Befund lässt, zusammen mit den Ergebnissen der Sättigungs- und Affinitätsstudien, darauf schließen, dass dem Anteil des Rezeptor-Ligand-Komplexes mit  $\tau_{Diff2}$  eine Bedeutung als funktionalitätsgekoppelte Komponente des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in der Biomembran der C6-Zellen zukommt, welche im Zuge von Kopplungs- (z.B. an Kinasen oder G-Proteine) sowie Arretierungs- und Internalisierungsprozessen (z.B. Ausbildung von Clathrin-coated-pits) verlangsamt ist und von der Zelloberfläche eliminiert werden kann. Radio-Rezeptor-Assays an C6-Zellen haben gezeigt, dass Glucocorticoide das Verhältnis von  $\beta_1$ - zu  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in Richtung der  $\beta_2$ -AR verschieben, ohne jedoch die Gesamtzahl der Rezeptoren zu beeinflussen. Eine Hochregulation der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptordichte kommt wahrscheinlich durch Bindung der Glucocorticoide am zytosolisch lokalisierten Glucocorticoid-Rezeptor zustande, welcher dann an sogenannte „glucocorticoid-response“-Elemente (GREs) auf den Genen für die  $\beta$ -AR-Subtypen bindet und so die Genexpression für die  $\beta$ -AR beeinflusst [84,117].

Um diesen Einfluss zu untersuchen und damit die Regulation der  $\beta_2$ -AR zu bestätigen wurden C6-Zellen mit der maximal wirksamen Konzentration an Dexamethason (500 nM, 48 Std) [84,117] vorinkubiert und anschließend die Bindung von 10 nM Alexa532-NA an die Biomembran der Zellen mittels FCS gemessen. Es resultierte eine statistisch signifikante Erhöhung der Alexa532-NA-Gesamtbindung um 13% verglichen mit Kontrollzellen, wobei der

Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,6 auf 3,3 anstieg (Abb. 3.3-9). Die Zunahme in der Alexa532-NA-Gesamtbindung nach Vorinkubation mit dem Glucocorticoid Dexamethason resultierte somit in erster Linie aus einer Zunahme an  $\beta_2$ -AR mit einer Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff1}}$  und niedriger Ligandaffinität in der Biomembran der C6-Zellen.



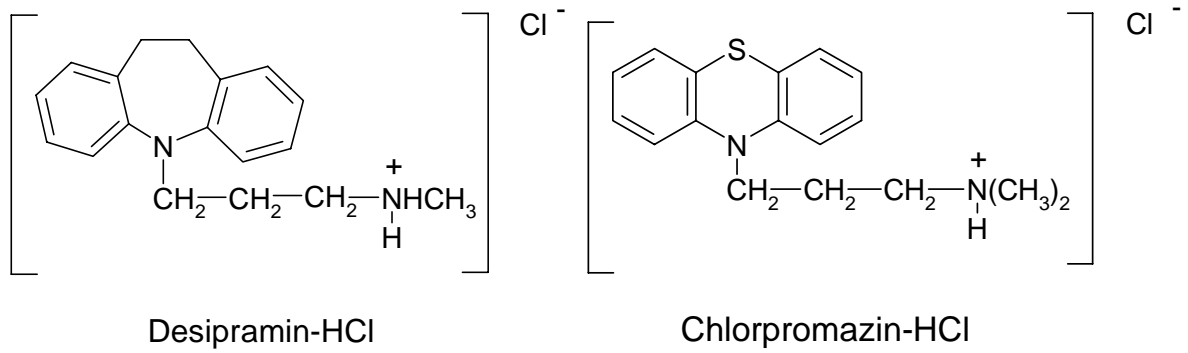
**Abbildung 3.3-9: Anteile  $\tau_{\text{Diff1}}$  (grau) und  $\tau_{\text{Diff2}}$  (weiß) der Alexa532-NA Bindung an C6-Zellen nach Vorinkubation der Zellen mit 500 nM Dexamethason für 48 Std**

### 3.4 Untersuchungen zum Einfluss von Inhaltsstoffen aus *Hypericum perforatum* L. auf die Regulation $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren

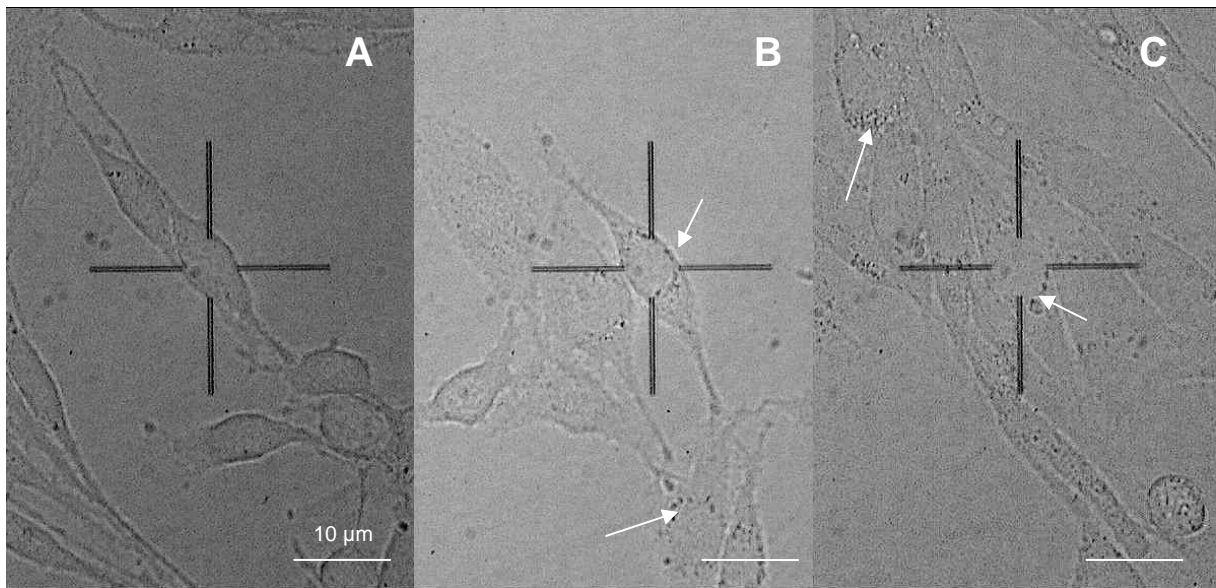
Inhaltsstoffe aus *Hypericum perforatum* sowie ein Hyperforin-reicher Hypericum-Extrakt wurden am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor hinsichtlich ihres Einflusses auf die Rezeptorbindung und die Rezeptorregulation untersucht. Zum Einsatz kamen das Phloroglucinderivat Hyperforin, die Biflavonoide Amentoflavin und Biapigenin sowie die Flavonoide Hyperosid, Quercetin und Rutin. Desweiteren wurde ein CO<sub>2</sub>-Hypericum-Extrakt mit einem Gehalt von mind. 70 % Hyperforin getestet. Als Positivkontrolle diente das klassische TCA Desipramin (Abb. 3.4-1), für das bereits in mehreren zellkulturbasierten Studien, u.a. an C6-Zellen, regulierende Einflüsse auf die Gesamtdichte  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren nach subchronischer Gabe von bis zu 7 Tagen gezeigt werden konnten [70,142,143]. Desweiteren kam das ebenfalls trizyklische Neuroleptikum Chlorpromazin (Abb. 3.4-1) zum Einsatz.

#### 3.4.1 Einsatz von Testsubstanzen und Kontrollen

Die Testung der Substanzen an C6-Glioblastomzellen wurde in einer Konzentration von 1  $\mu$ M (im Falle des CO<sub>2</sub>-Extraktes berechnet auf 1  $\mu$ M Hyperforin) durchgeführt. Bei dieser Konzentration zeigten sich keine Auswirkungen auf das Wachstum und die Morphologie der Zellen bei lichtmikroskopischer Betrachtung. Konzentrationen > 1  $\mu$ M von Hyperforin waren toxisch für die Zellen, was sich in einer deutlichen Wachstumshemmung und morphologischen Veränderungen der Zellen zeigte. Für Desipramin bildeten sich bei Konzentrationen > 1  $\mu$ M granuläre Strukturen im Zytosol der Zellen aus, deren Ursprung zunächst unklar blieb. Ähnliche Strukturen wurden nach Inkubation von C6-Zellen mit > 1  $\mu$ M Chlorpromazin gefunden. Chlorpromazin hemmt als kationisch amphiphile Substanz, zu denen auch Desipramin gehört, die Clathrin-coated-pit abhängige Internalisierung von Rezeptoren. Dies geschieht durch Umverteilung des AP-2 Proteins auf Endosomen, welches normalerweise für die Verankerung des Clathrins in der Zellmembran und in der Folge für dessen Vernetzung benötigt wird [114]. Chlorpromazin führt so zu einem Verlust an coated pits an der Zellmembran und zu einer Ansammlung von Clathrin coats der gleichen Zusammensetzung auf endosomalen Membranen [247], welche dann im Lichtmikroskop sichtbar werden können (Abb. 3.4-2).



**Abbildung 3.4-1: Strukturformeln des trizyklischen Antidepressivums Desipramin-HCl und des trizyklischen Neuroleptikums Chlorpromazin-HCl**

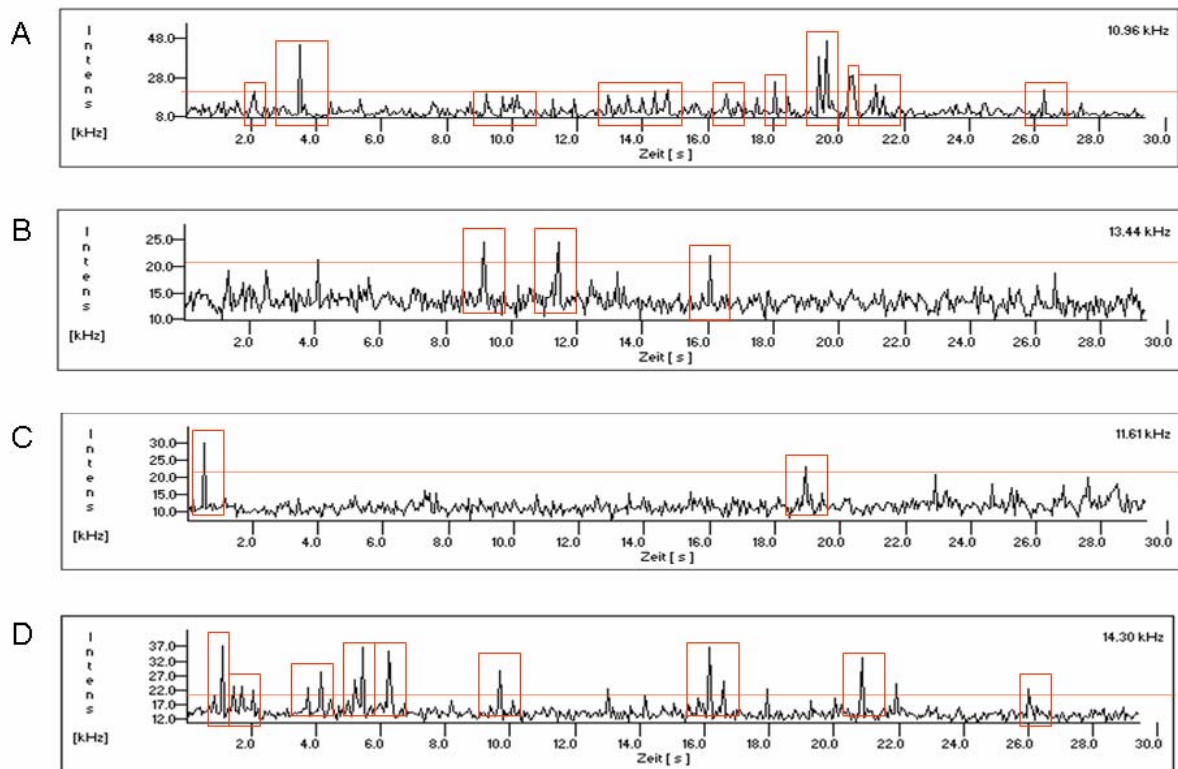


**Abbildung 3.4-2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von C6-Zellen: (A) Kontrolle, (B) vorinkubiert mit 5 µM Desipramin 72 h, (C) vorinkubiert mit 10 µM Chlorpromazin 72 h; die Pfeile weisen auf granuläre Strukturen im Zytosol der Zellen hin**

### 3.4.2 Subchronische Inkubationen von C6 Zellen für 72 h

Ausgehend von der Erkenntnis, dass Hypericum-Präparate, genau wie die meisten synthetischen Antidepressiva, ihre klinische Wirkung erst nach einigen Tagen bis wenigen Wochen entfalten, wurde für die Vorinkubationen mit den Naturstoffen und den synthetischen Substanzen ein Zeitraum von 72 h gewählt. Dieser erwies sich als ausreichend, um eine subchronische Gabe der Testsubstanzen mit Effekten auf die zu beobachtende Rezeptorpopulation zu erzeugen, und als probater Zeitraum für die Anzucht und Vorinkubationen der Zellen auf den für die FCS-Messungen benötigten Glascoverslips. Zunächst wurden Hyperforin, Amentoflavon und Desipramin auf eine mögliche direkte Beeinflussung der Alexa532-NA Bindung an den  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor von C6-Zellen untersucht. Nach 15 minütiger Inkubation der vorbehandelten Zellen mit 10 nM Alexa532-NA wurde die Bindung aus jeweils 6 Messungen pro Zelle ( $n=72$ ) an der Zellmembran bestimmt. Das für die Naturstoffstammlösungen eingesetzte Methanol wurde in jeweiligen Kontrollversuchen vermessen und führte zu keiner Beeinflussung der Ergebnisse.

Die Inkubation mit Hyperforin und Desipramin zeigte eine deutliche Beeinflussung der Alexa532-NA Bindung an die Biomembran der C6 Zellen, wohingegen die Bindung nach Inkubation mit Amentoflavon nahezu unbeeinflusst blieb. Schon während der Aufzeichnung der Fluoreszenzspuren zeigte sich ein Unterschied zu nicht vorinkubierten Kontrollzellen. Das Vorkommen von langsamen und fluoreszenzintensiven Ereignissen, welche die Bindung des Alexa532-NA an die Biomembran der Zellen repräsentierten, verringerte sich nach Hyperforin-, ebenso wie nach Desipramin-Vorinkubation im Vergleich mit der Kontrolle deutlich, wohingegen das Vorkommen dieser Einzelereignisse nach Gabe von Amentoflavon auf Kontrollniveau blieb (Abb. 3.4-3).



**Abbildung 3.4-3: Fluoreszenzspur einer Inkubation von C6-Zellen mit 10 nM Alexa532-NA (A) im Vergleich mit Vorinkubationen mit 1 µM Desipramin (B), 1 µM Hyperforin (C) und 1 µM Amentoflavin (D). Markiert (rote Kästchen) sind langsame und fluoreszenzintensive Einzelereignisse über einem Intensitätsschwellenwert von 20 kHz**

Nach Inkubation mit 10 nM Alexa532-NA wurde eine Gesamtbindung von  $4,26 (\pm 0,53)$  nM an C6-Zellen, gemittelt aus allen Kontrollversuchen, ermittelt ( $n=72$ ). Nach Vorbehandlung der Zellen ergab sich für Hyperforin und Desipramin eine signifikante Reduktion der Alexa532-NA Gesamtbindung um  $46,9 (\pm 9,3)$  % bzw.  $38,0 (\pm 12,6)$  %. Für Amentoflavin ergab sich lediglich eine nichtsignifikante Abnahme der Alexa532-NA Gesamtbindung um  $4,8 (\pm 5,3)$  % (Abb. 3.4-4, Tab. 3.4-2). Die aus den Autokorrelationskurven abgeleiteten Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff}1}$  und  $\tau_{\text{Diff}2}$  wiesen für die eingesetzten Substanzen keine signifikanten Unterschiede untereinander sowie zu Kontrollzellen auf (Tab. 3.4-1). Dies ließ einen direkten Vergleich der Anteile mit  $\tau_{\text{Diff}1}$  und  $\tau_{\text{Diff}2}$  und ihres Beitrages zur Gesamtbindung hinsichtlich Einflüssen der getesteten Substanzen zu.

**Tabelle 3.4-1: Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff1}}$  und  $\tau_{\text{Diff2}}$  von Alexa532-NA- $\beta_2$ -AR-Komplexen in vorbehandelten C6-Zellen und Kontrollzellen**

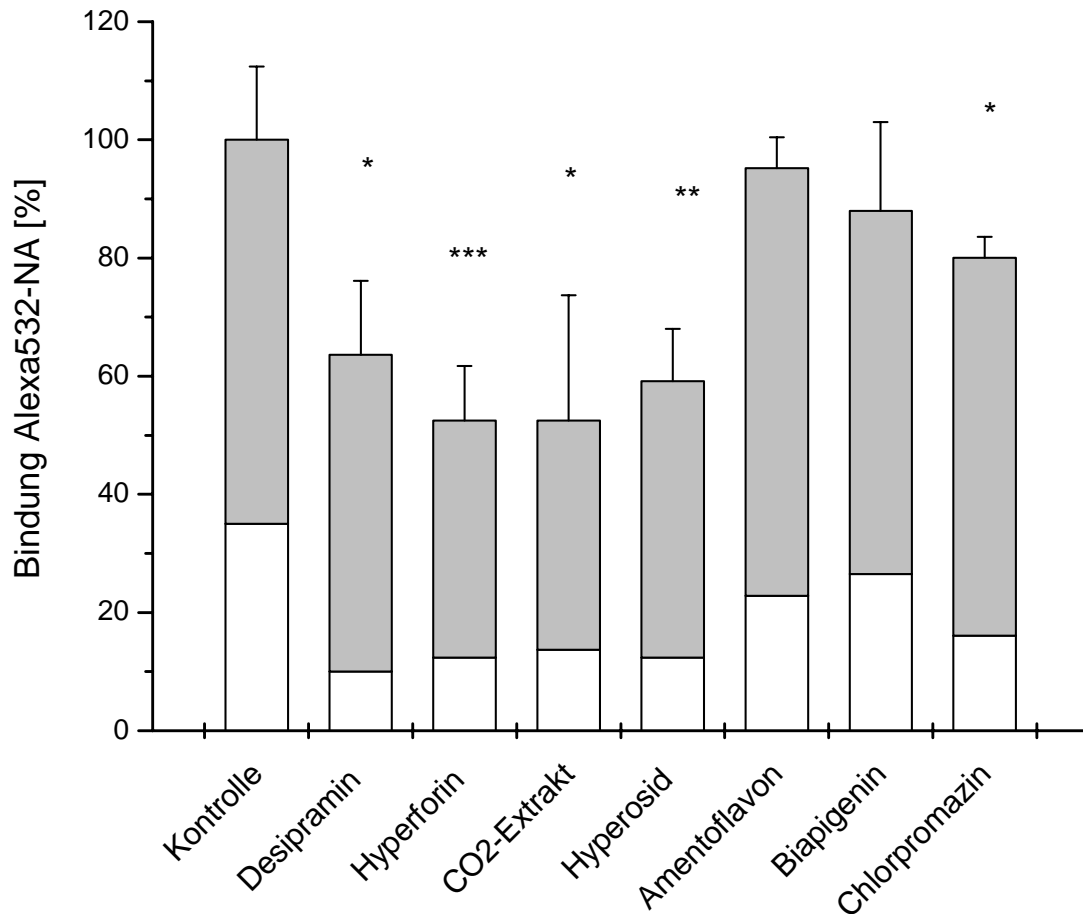
	$\tau_{\text{Diff1}}$ [ms]	$\tau_{\text{Diff2}}$ [ms]
<b>Kontrolle</b>	0,65 ( $\pm$ 0,36)	9,37 ( $\pm$ 3,38)
<b>Desipramin</b>	0,61 ( $\pm$ 0,05)	14,31 ( $\pm$ 10,76)
<b>Hyperforin</b>	0,87 ( $\pm$ 0,26)	9,58 ( $\pm$ 3,66)
<b>CO<sub>2</sub>-Hypericum-Extrakt</b>	0,98 ( $\pm$ 0,10)	18,76 ( $\pm$ 8,72)
<b>Hyperosid</b>	0,80 ( $\pm$ 0,27)	10,70 ( $\pm$ 5,29)
<b>Chlorpromazin</b>	0,60 ( $\pm$ 0,30)	10,56 ( $\pm$ 4,28)

Im Gegensatz zur Komponente  $\tau_{\text{Diff1}}$ , welche die mehr oder weniger freie laterale Mobilität des Rezeptor-Ligand-Komplexes repräsentiert, sind in  $\tau_{\text{Diff2}}$  verschiedene Funktionalitätszustände wie Integration in „lipid rafts“, Arretierung nach Ligandbindung oder Internalisierung von Rezeptor-Ligand-Komplexen zusammengefasst. Der Quotient der normalisierten Anteile der Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  für Rezeptor-Ligand-Komplexe mit schneller bzw. langsamer lateraler Mobilität in der Biomembran änderte sich von 1,9 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,65 (\pm 0,12)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,35 (\pm 0,10)$ ) in den Kontrollzellen zu 5,3 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,84 (\pm 0,20)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,16 (\pm 0,08)$ ) in Desipramin-vorbehandelten Zellen und 3,4 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,77 (\pm 0,12)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,23 (\pm 0,12)$ ) in Hyperforin-vorbehandelten Zellen. Für die Biflavonoide Amentoflavon und das nachfolgend eingesetzte Biapigenin ergaben sich Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 3,2 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,76 (\pm 0,22)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,24 (\pm 0,17)$ ), bzw. 2,2 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,69 (\pm 0,07)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,31 (\pm 0,10)$ ), wobei die Reduktion der Alexa532-NA Gesamtbindung durch Biapigenin mit 12,0 ( $\pm 15,0$ ) % ebenfalls nicht signifikant war. Bemerkenswert ist die Zunahme des Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  für Amentoflavon, wobei die Gesamtbindung unbeeinflusst blieb (Abb. 3.4-4, Tab. 3.4-2).

Das Chlorpromazin bewirkte eine signifikante Reduktion der Alexa532-NA Gesamtbindung um 20,3 ( $\pm 3,6$ ) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 4,0 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,80 (\pm 0,16)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,20 (\pm 0,08)$ ), wobei die Abnahme der Ligandbindung ausschließlich in der Komponente  $\tau_{\text{Diff2}}$  gesehen wurde (Abb.3.4-4). Bedenkt man, dass die Clathrin-coated-pit abhängige Internalisierung von Rezeptoren durch Chlorpromazin gehemmt wird, liegt auch hier der Schluss nahe, dass derartige Prozesse durch  $\tau_{\text{Diff2}}$  beschrieben werden. Die Inkubation mit einem CO<sub>2</sub>-Hypericum-Extrakt, eingestellt auf 1  $\mu\text{M}$  Hyperforin im Assay, zeigte eine dem Hyperforin als Einzelsubstanz vergleichbare signifikante Reduktion der Alexa532-NA Bindung in der Biomembran von 48,7 ( $\pm 21,3$ ) % und einen Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 2,9 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,74 (\pm 0,26)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,26 (\pm 0,19)$ ).



Hyperosid zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion in der Alexa532-NA Gesamtbindung von 40,6 ( $\pm 8,8$ ) % und einen Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 4,0 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,80 (\pm 0,14)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,20 (\pm 0,03)$ ) (Abb. 3.4-4, Tab. 3.4-2).



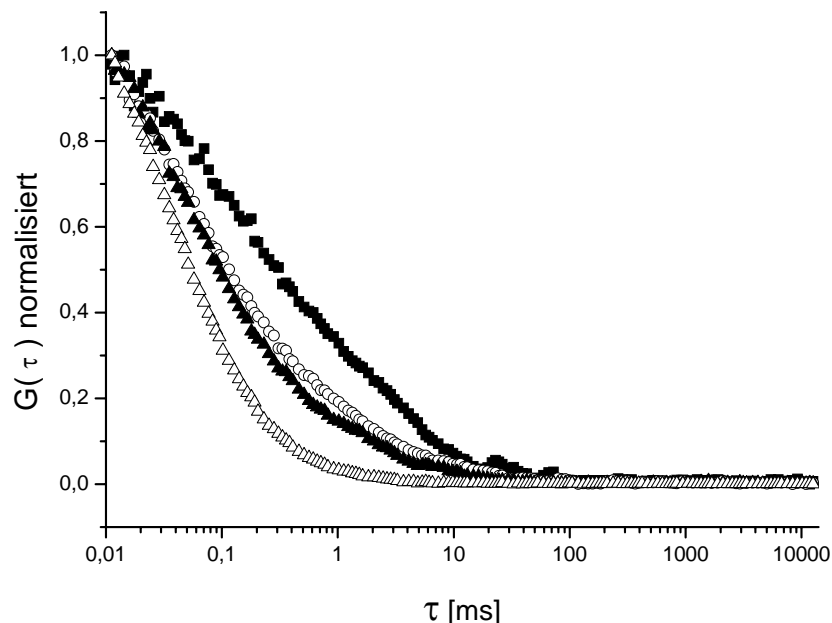
**Abbildung 3.4-4: Bindung von 10 nM Alexa532-NA an die Zellmembran von C6-Zellen und Anteile der Rezeptor-Ligand-Komplexe  $\tau_{\text{Diff1}}$  (grau) und  $\tau_{\text{Diff2}}$  (weiß) an der Gesamtbindung ( $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ ;  $p^{***} < 0,001$ )**

**Tabelle 3.4-2: Einfluss von Testsubstanzen 1 $\mu$ M nach 72 h auf die Bindung von 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen**

	Alexa532-NA Gesamtbindung [%]	Anteil $\tau_{\text{Diff1}}$ , normalisiert	Anteil $\tau_{\text{Diff2}}$ , normalisiert	Quotient $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$
Kontrolle	100 ( $\pm$ 12,4)	0,65 ( $\pm$ 0,12)	0,35 ( $\pm$ 0,10)	1,9
Desipramin	62,0 ( $\pm$ 12,6) *	0,84 ( $\pm$ 0,20)	0,16 ( $\pm$ 0,08)	5,3
Chlorpromazin	79,7 ( $\pm$ 3,6) *	0,80 ( $\pm$ 0,16)	0,20 ( $\pm$ 0,08)	4,0
Hyperforin	53,1 ( $\pm$ 9,3) ***	0,77 ( $\pm$ 0,12)	0,23 ( $\pm$ 0,12)	3,4
Hyperosid	59,4 ( $\pm$ 8,8) **	0,80 ( $\pm$ 0,14)	0,20 ( $\pm$ 0,03)	4,0
CO <sub>2</sub> -Hypericum- Extrakt	51,3 ( $\pm$ 21,3) *	0,74 ( $\pm$ 0,26)	0,26 ( $\pm$ 0,19)	2,9
Amentoflavon	95,2 ( $\pm$ 5,3)	0,76 ( $\pm$ 0,22)	0,24 ( $\pm$ 0,17)	3,2
Biapigenin	88,0 ( $\pm$ 15,0)	0,69 ( $\pm$ 0,07)	0,31 ( $\pm$ 0,1)	2,2

( $p^* < 0,05$ ;  $p^{**} < 0,01$ ;  $p^{***} < 0,001$ )

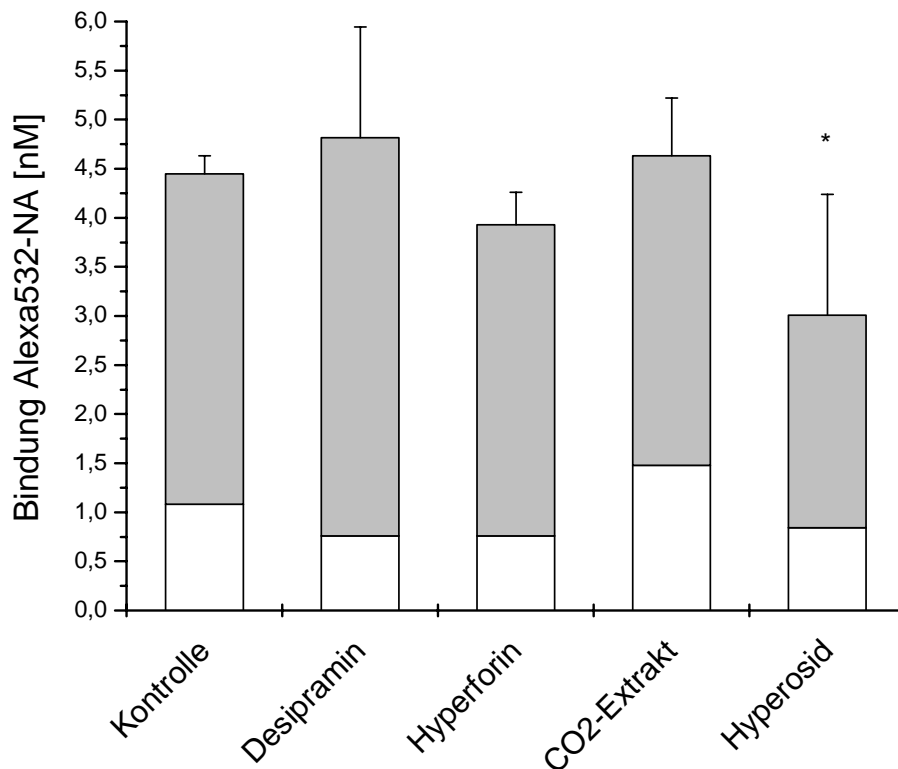
Die Reduktion der Alexa532-NA Bindung lässt sich auch anhand normalisierter Autokorrelationskurven durch einen „links-shift“ erkennen, der wiederum durch eine Abnahme im Anteil langsam diffundierender Rezeptor-Ligand-Komplexe bedingt ist (Abb. 3.4-5).



**Abbildung 3.4-5: Vergleich einer Autokorrelationskurve von 10 nM frei über den Zellen diffundierendem Alexa532-NA ( $\Delta$ ) mit Messungen der gleichen Konzentration Alexa532-NA an der Membran der C6-Zellen als Kontrolle ( $\blacksquare$ ) und nach Vorinkubation mit 1  $\mu$ M Hyperforin ( $\blacktriangle$ ) und 1  $\mu$ M Desipramin ( $\circ$ )**

### 3.4.3 Akute Gabe von Testsubstanzen für 24 h

Eine Inkubation von C6-Zellen mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  Desipramin, Hyperforin und dem  $\text{CO}_2$ -Hypericum-Extrakt (alle  $n=36$ ) über einen Zeitraum von 24 h zeigte keine signifikante Reduktion der Alexa532-NA Gesamtbindung im Vergleich zur Bindung an Kontrollzellen von  $4,45 (\pm 0,18)$  nM ( $n=54$ ). Für 1  $\mu\text{M}$  Hyperosid ( $n=18$ ) konnte jedoch schon nach einem Inkubationszeitraum von 24 h eine signifikante Reduktion der Alexa532-NA Bindung an die Membran der C6 Zellen um  $32,4 (\pm 27,6)$  % festgestellt werden (Abb. 3.4-6).

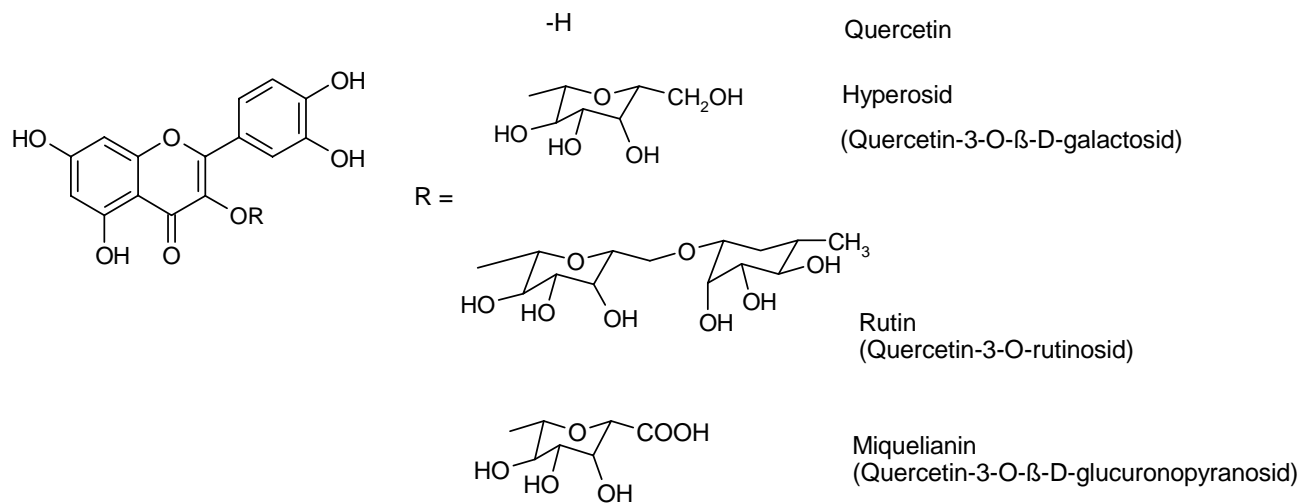


**Abbildung 3.4-6: Bindung von 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen nach Vorinkubation mit Desipramin, Hyperforin,  $\text{CO}_2$ -Hypericum-Extrakt berechnet als Hyperforin und Hyperosid jeweils 1  $\mu\text{M}$  für 24 h; Anteile an der Gesamtbindung:  $\tau_{\text{Diff}1}$  (grau) und  $\tau_{\text{Diff}2}$  (weiß) ( $p^* < 0,05$ )**

Die Abnahme in der Bindung von Alexa532-NA nach 24 h Hyperosid-Vorinkubation beruhte fast ausschließlich auf einer Reduktion der Komponente  $\tau_{\text{Diff}1}$  mit freier lateraler Mobilität in der Biomembran und niedriger Ligandaffinität. Die Abnahme im Rezeptor-Ligand-Anteil mit  $\tau_{\text{Diff}2}$ , wie sie nach subchronischer Gabe von Hyperosid gefunden wurde, scheint offensichtlich erst später einzusetzen.

### 3.4.4 Einfluss von Flavonoiden auf die Alexa532-NA Bindung an C6-Zellen

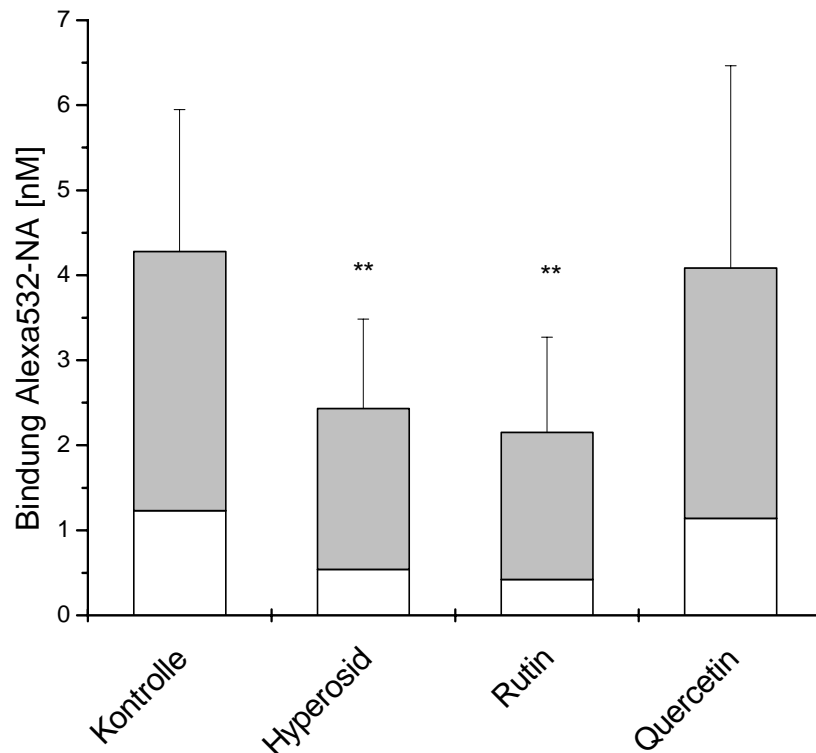
Für das Flavonoid Hyperosid konnte ein Einfluss auf die Alexa532-NA Bindung sowohl nach 72 h als auch bereits nach 24 h Inkubation nachgewiesen werden. Da Hypericum-Gesamtextrakte eine Reihe weiterer Flavonoide enthalten, wurden das Aglykon Quercetin und das ebenfalls glykosilierte Rutin (Abb.3.4-7) hinsichtlich ihres Einflusses auf die Alexa532-NA Bindung getestet.



**Abbildung 3.4-7: Strukturformeln der Flavonoide Quercetin, Hyperosid, Rutin und Miquelianin aus *Hypericum perforatum* L.**

Sowohl Hyperosid als auch Rutin zeigten jeweils eine hochsignifikante Reduktion nahezu gleichen Ausmaßes der Alexa532-NA Bindung an C6-Zellen nach 72 h Inkubation (n=18) (Abb. 3.4-8). Hyperosid senkte in diesem Ansatz die Alexa532-NA Bindung um 43,2 (± 24,5) % im Vergleich zur Bindung an Kontrollzellen von 4,28 (± 1,67) nM. Rutin reduzierte die Alexa532-NA Bindung um 50,3 (± 26,18) %. Der Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  lag für Hyperosid bei 3,4 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,77 (\pm 0,33)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,23 (\pm 0,28)$ ) und für Rutin bei 4,0 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,80 (\pm 0,54)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,20 (\pm 0,34)$ ) gegenüber 2,5 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,71 (\pm 0,39)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,29 (\pm 0,39)$ ) bei Kontrollzellen derselben Versuchsreihe. Das Aglykon Quercetin bewirkte keine signifikante Veränderung der Alexa532-NA Bindung an die C6 Zellmembranen. Sowohl die Gesamtbindung blieb mit 95,4 (±55,6) % auf Kontrollniveau, als auch der Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  mit 2,6 ( $\tau_{\text{Diff1}} = 0,72 (\pm 0,34)$ ;  $\tau_{\text{Diff2}} = 0,28 (\pm 0,49)$ ) (Abb. 3.4-8, Tab. 3.4-3).

Demnach scheint die Glykosilierung am Aglykon Quercetin eine Voraussetzung für die Reduktion der Bindung von Alexa532-NA an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in der Zellmembran von C6-Zellen nach Inkubation mit den Flavonoiden Hyperosid und Rutin darzustellen.



**Abbildung 3.4-8: Bindung von 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen nach Vorinkubation mit Hyperosid, Rutin und Quercetin, jeweils 1  $\mu$ M für 72h im Vergleich mit Kontrollzellen (\*\*p < 0,01)**

**Tabelle 3.4-3: Einfluss von Flavonoiden auf die Alexa532-NA Bindung nach Vorinkubation von C6-Zellen**

	Alexa532-NA Gesamtbindung [%]	Anteil $\tau_{Diff1}$ , normalisiert	Anteil $\tau_{Diff2}$ , normalisiert	Quotient $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$
<b>Kontrolle</b>	100 ( $\pm$ 39,0)	0,71 ( $\pm$ 0,39)	0,29 ( $\pm$ 0,39)	2,5
<b>Hyperosid</b>	56,8 ( $\pm$ 24,5) **	0,77 ( $\pm$ 0,33)	0,23 ( $\pm$ 0,28)	3,4
<b>Rutin</b>	49,7 ( $\pm$ 26,2) **	0,80 ( $\pm$ 0,54)	0,20 ( $\pm$ 0,34)	4,0
<b>Quercetin</b>	95,4 ( $\pm$ 55,6)	0,72 ( $\pm$ 0,34)	0,28 ( $\pm$ 0,49)	2,6

(\*\*p < 0,01)

### 3.4.5 Hypericin und Pseudohypericin im FCS-Bindungsassay

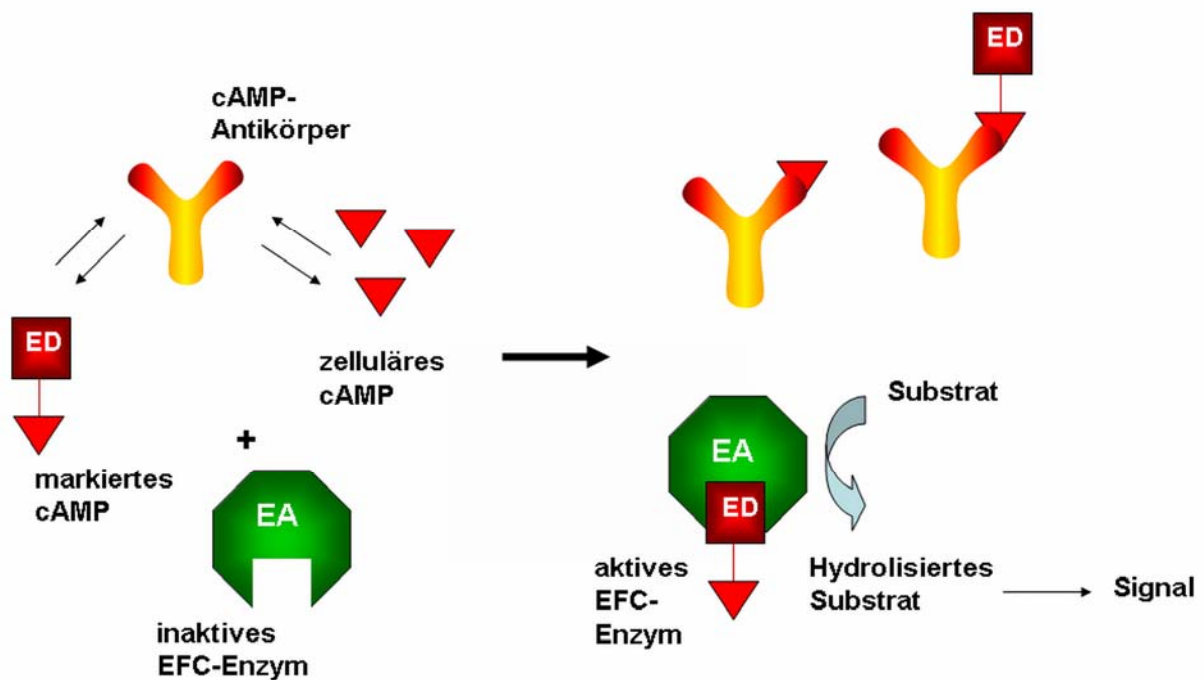
Die Naphthodianthronderivate Hypericin und Pseudohypericin, welche eine starke unspezifische Bindung an Biomembranen aufweisen [200,231], stellen aufgrund ihrer chemischen Struktur mit vielen konjugierten Doppelbindungen im polyaromatischen Ringsystem ein starkes Fluorophor bei der im FCS-Assay verwendeten Anregungswellenlänge von 514 nm dar. Die Fluoreszenzfluktuation einzelner Alexa532-NA Moleküle wurde durch die massive Eigenfluoreszenz der Naphthodianthronderivate überlagert, was ihren Einsatz für die Durchführung von Bindungsassays mittels FCS verhinderte.

### 3.4.6 Einfluss von Testsubstanzen auf stimulierbares, intrazelluläres cAMP

Auf physiologischer Ebene zieht eine Beeinflussung der  $\beta$ -adrenergen Sensitivität von Zellen durch Abnahme der Rezeptoraffinität oder Rezeptordownregulation eine Beeinflussung nachgeschalteter, zelleinwärtsgerichteter Signalprozesse nach sich [241].

Im Falle von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren auf C6-Zellen ist eine Beeinflussung des AC / cAMP – Signalweges nach Reduktion der Alexa532-NA Bindung zu erwarten. Um zu überprüfen, ob die im FCS-Assay für Testsubstanzen gefundene Reduzierung der Bindung eines  $\beta_2$ -adrenergen Liganden an die Biomembran von C6-Zellen auch zu einer tatsächlichen Reduktion der zellulären Antwort auf einen äußeren Stimulus führt, wurde die durch einen Agonisten stimulierbare Konzentration des intrazellulären second messengers cAMP mittels eines Enzyme Fragment Complementation Assay-Kits, nach Vorinkubation mit Testsubstanzen, bestimmt. Dieses nicht auf Radioaktivität beruhende cAMP-Assay, welches im Vorfeld schon für die Bestimmung des agonistischen Profils des Liganden Alexa532-NA zum Einsatz kam (s. Kapitel 3.3.3), funktioniert auf Basis eines gentechnisch hergestellten  $\beta$ -Galaktosidase-Enzyms, welches aus zwei Fragmenten besteht: Einem großen Proteinfragment, welches als Enzymakzeptor dient (EA) und einem kleinen Peptidfragment, welches den Enzymdonator (ED) darstellt. Liegen beide Fragmente getrennt voneinander vor, ist das Enzym inaktiv. Kommen beide Teile jedoch in Lösung zusammen, rekombinieren sie spontan zum aktiven Enzym (engl.: complementation). Die so formierte  $\beta$ -Galaktosidase hydrolysiert daraufhin ein chemilumineszierendes Substrat, und produziert somit ein einfach zu detektierendes Signal. Das ED- $\beta$ -Galaktosidase-Fragment liegt im Assay als ED-cAMP Peptidkonjugat vor. Dieses ED-cAMP-Fragment kann mit dem EA-Anteil zur aktiven Form des Enzyms reassoziieren, wird aber auch von ebenfalls im Assay enthaltenen anti-cAMP Antikörpern erkannt. Diese binden das ED-cAMP Konjugat, und verhindern so die Formierung der  $\beta$ -Galactosidase. Aus den Zellen durch Aufarbeitung freigesetztes cAMP

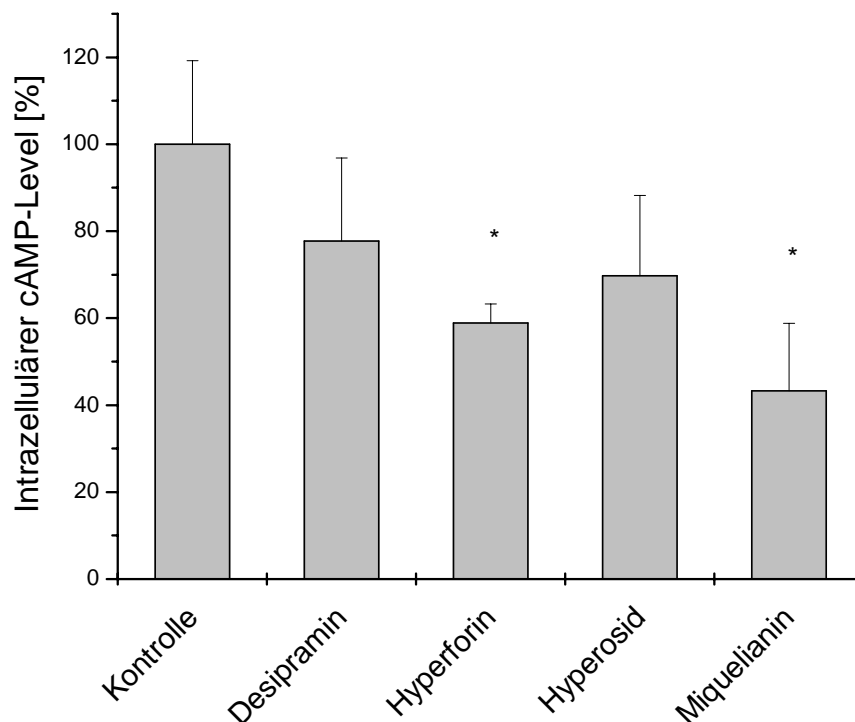
konkurriert mit den ED-cAMP-Konjugaten um die Antikörperbindungsstellen, was einen der zellulären cAMP-Konzentration equivalenten Teil an ED-cAMP für die Ausbildung des Enzyms verfügbar macht (Abb. 3.4-8). Mittels einer mit steigenden cAMP-Konzentrationen bestimmten Standardgeraden lassen sich so die intrazellulären cAMP-Konzentrationen von z.B. in 96-Well-Platten adhärent gewachsenen Zellpopulationen durch Auslesen des Chemilumineszenzsignals in einem entsprechenden Reader bestimmen [62,81].



**Abbildung 3.4-8:** Schematische Darstellung der Funktionsweise des Enzyme-Fragment-Complementation (EFC)-Assays zur Bestimmung von intrazellulärem cAMP (nach DiscoverX, Amersham Biosciences)

Das EFC-cAMP-Assay kam in der Folge für Testsubstanzen zum Einsatz, welche im FCS-Assay Wirksamkeit bezüglich einer reduzierten Ligand-Bindung an  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren gezeigt hatten. Zusätzlich wurde die Substanz Miquelianin (Abb. 3.4-7) getestet, ein weiteres Flavonoid aus der Gruppe der Quercetin-Glucuronide, welches sowohl nativ in *Hypericum perforatum* vorkommt als auch als Hauptmetabolit von Hyperosid pharmakologisch aktiv ist [39,75,82]. Als Folge einer reduzierten  $\beta_2$ -AR Bindung wurde in C6-Zellen eine verminderte intrazelluläre cAMP-Konzentration nach Vorbehandlung der Zellen für 72 h mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  Desipramin, Hyperforin, Hyperosid und Miquelianin unter stimulierenden Bedingungen gefunden. Kontrollzellen zeigten nach 30 min Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  des  $\beta_2$ -spezifischen

Agonisten Terbutalin eine relative Zunahme im Chemilumineszenzsignal von 107,0 ( $\pm$  27,1) RLU (relative light units). Dies entsprach 6,3 ( $\pm$  1,6) pmol cAMP / 25000 Zellen / Well gegenüber einem Basalwert von 2,4 ( $\pm$  0,5) pmol. Unter gleichen stimulierenden Bedingungen wurde für die vorbehandelten Zellen eine Abnahme im Chemilumineszenzsignal von 22,2 ( $\pm$  5,4) % für Desipramin, 41,1 ( $\pm$  3,1) % für Hyperforin, 30,3 ( $\pm$  8,0) % für Hyperosid und 56,7 ( $\pm$  20,4) % für Miquelianin gefunden (n = 3) (Abb. 3.4-9).



**Abbildung 3.4-9: Anstieg der Konzentration an intrazellulärem cAMP in C6-Zellen nach Stimulation mit 10  $\mu$ M Terbutalin (\* $p$ <0,05)**

Demnach verminderten Desipramin, Hyperforin, Hyperosid sowie Miquelianin die zelleinwärts gerichtete Signalübertragung mittels  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren nach Agonist-Stimulation. Für Hyperforin und Miquelianin zeigte sich hierbei ein statistisch signifikanter Effekt. Die Ergebnisse der FCS-Untersuchungen ließen sich somit auch auf der biochemisch nachgeschalteten Ebene der Signaltransduktion über Adenylatzyklase und cAMP als second messenger verifizieren.



### 3.5 Fluoreszenzbasierte Untersuchungen mit $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteinen

Die Anwendung eines fluoreszenzmarkierten physiologischen Liganden im FCS-Bindungsassay an lebenden C6-Zellen rückte die zentrale Frage des Verbleibs von Rezeptoren nach Ligandaktivierung und Desensitivierung der Zellen in den Mittelpunkt des Interesses. Eine Reduktion von Ligandbindungsstellen auf der Oberfläche von Zellen kann u.a. die Folge einer Internalisierung membranständiger Rezeptoren ins Zytosol der Zellen sein [180]. Für Internalisierungsstudien mittels fluoreszenzbasierter Untersuchungsmethoden muss entweder der Ligand oder der Rezeptor selbst fluoreszenzmarkiert sein. Nachteilig wirkt sich bei markierten Liganden aus, dass die Detektion von Rezeptor-Ligand-Komplexen aufgrund zytosolischer Prozesse fehlerhaft sein kann, z.B. weil Rezeptor-Ligand-Komplexe abgebaut, bzw. getrennt werden. Eine Möglichkeit zur Visualisierung von Rezeptoren in unterschiedlichen Verteilungsstadien, bzw. Funktionalitätszuständen besteht in der Fusion mit fluoreszierenden Proteinen wie dem EGFP (enhanced green fluorescent protein).

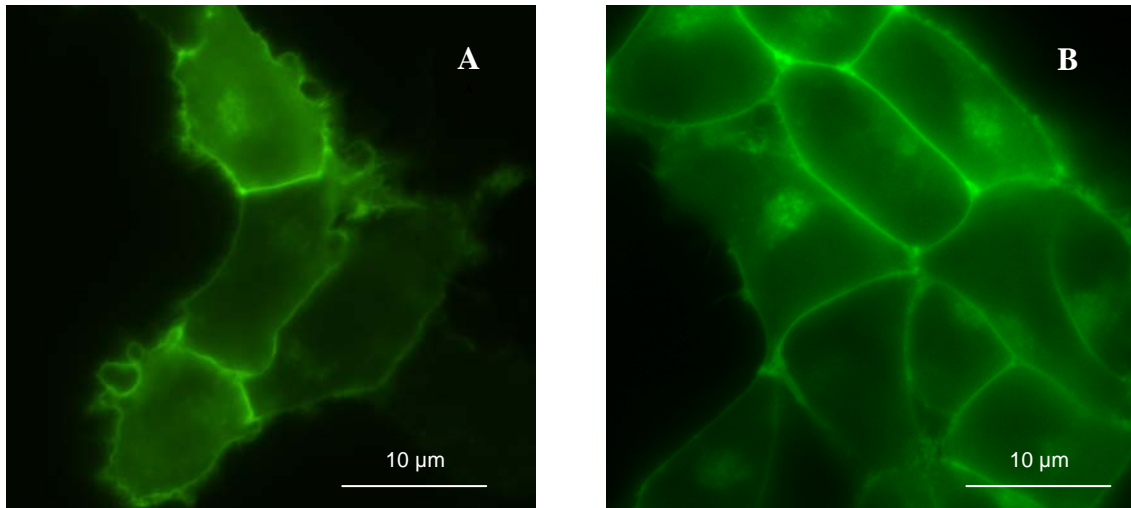
Die Detektion von z.B. internalisierten Rezeptoren ist so vom Liganden unabhängig und mittels Fluoreszenzmikroskopie oder FCS kann die Verteilung markierter Rezeptoren in der gesamten Zelle beobachtet werden. Für Internalisierungs- und Mobilitätsstudien wurden im Rahmen dieser Arbeit daher  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren als GFP-Fusionsproteine verwendet.

#### 3.5.1 $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteine

Für Untersuchungen an  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren wurden im Rahmen dieser Arbeit C-terminale Fusionsproteine des  $\beta_1$ - und des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors mit EGFP hergestellt. Diese wurden nach stabiler Transfektion in geeignete Zelltypen für FCS-Mobilitätsstudien sowie für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen verwendet.

Wie für membranständige Rezeptoren zu erwarten, reichert sich die überexprimierten Konstrukte in der Biomembran der Zellen an, was zu einer starken, deutlich vom zytosolischen Bereich der Zellen unterscheidbaren GFP-Fluoreszenz der Zellmembranen führte (Abb. 3.5-1). Die Funktionalität von  $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteinen wurde in früheren Arbeiten zuerst für  $\beta_2$ -AR in HEK293 und HeLa Zellen gezeigt [8,111,148], später auch für  $\beta_1$ -AR in HEK293 und C6 Zellen [34,149]. Diese Untersuchungen zeigten die Stimulierbarkeit von GFP-getaggten  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -AR durch den unspezifischen Agonisten Isoprenalin und eine dadurch bedingte Rezeptorinternalisierung in endosomale Kompartimente, sowie eine Zunahme der intrazellulären cAMP-Konzentration nach Stimulation. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Rezeptor-Ligand-Bindungsassay für den  $\beta_2$ -AR-Subtyp gewonnenen Erkenntnisse sollten im weiteren für ein  $\beta_1$ -AR-GFP-Fusionsprotein in C6-Zellen (C6 $\beta_1$ AR-

GFP) und für ein  $\beta_2$ -AR-GFP-Fusionsprotein in HEK293-Zellen (HEK293 $\beta_2$ AR-GFP) näher untersucht werden.



**Abbildung 3.5-1: (A) C6-Zellen, stabil transfiziert mit  $\beta_1$ AR-EGFP (C6 $\beta_1$ AR-GFP); (B) HEK293-Zellen, stabil transfiziert mit  $\beta_2$ AR-EGFP (HEK293 $\beta_2$ AR-GFP)**

### 3.5.2 Technische Voraussetzungen

Für die qualitative Beurteilung der transfizierten Zellen und die sich anschließenden FCS-Messungen an lebenden Zellen wurde das Setup des FCS-Gerätes um eine Lichtquelle in Form einer Quecksilberdampflampe für die kombinierte Fluoreszenzmikroskopie erweitert. Mittels eines beweglichen Spiegels, welcher in den Strahlengang des konfokalen Mikroskops gebracht wurde, konnte zwischen der Lichtquelle für Fluoreszenzmikroskopie und der Laserlichtquelle für FCS-Messungen umgeschaltet werden. Dadurch war es möglich, gezielt einzelne Zellen auf fluoreszenzmikroskopischer Ebene hinsichtlich ihrer Morphologie und ihres Expressionsmusters zu beurteilen und anschließend FCS-Messungen an ausgewählten Zellen durchzuführen (Abb. 3.5-2).

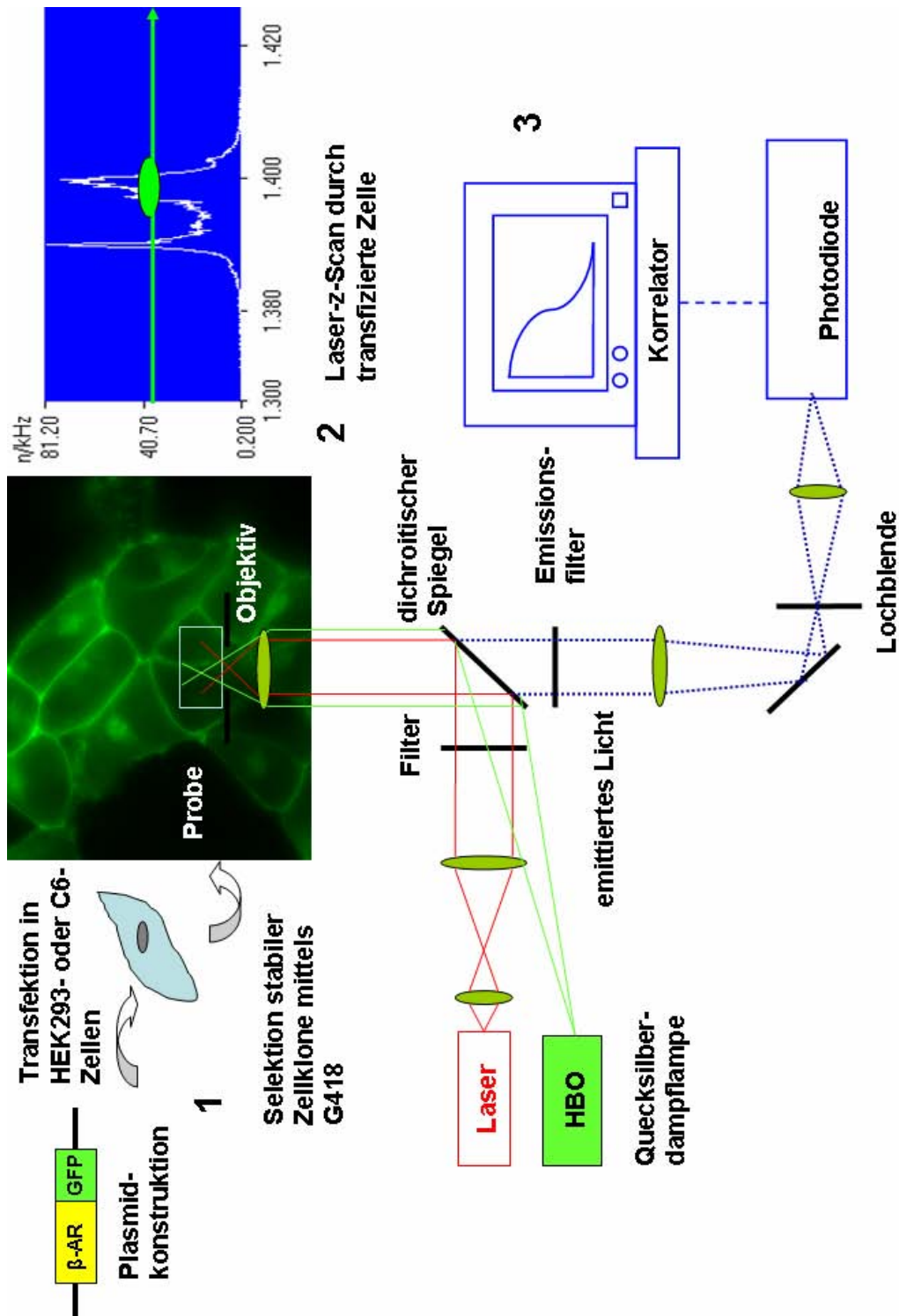
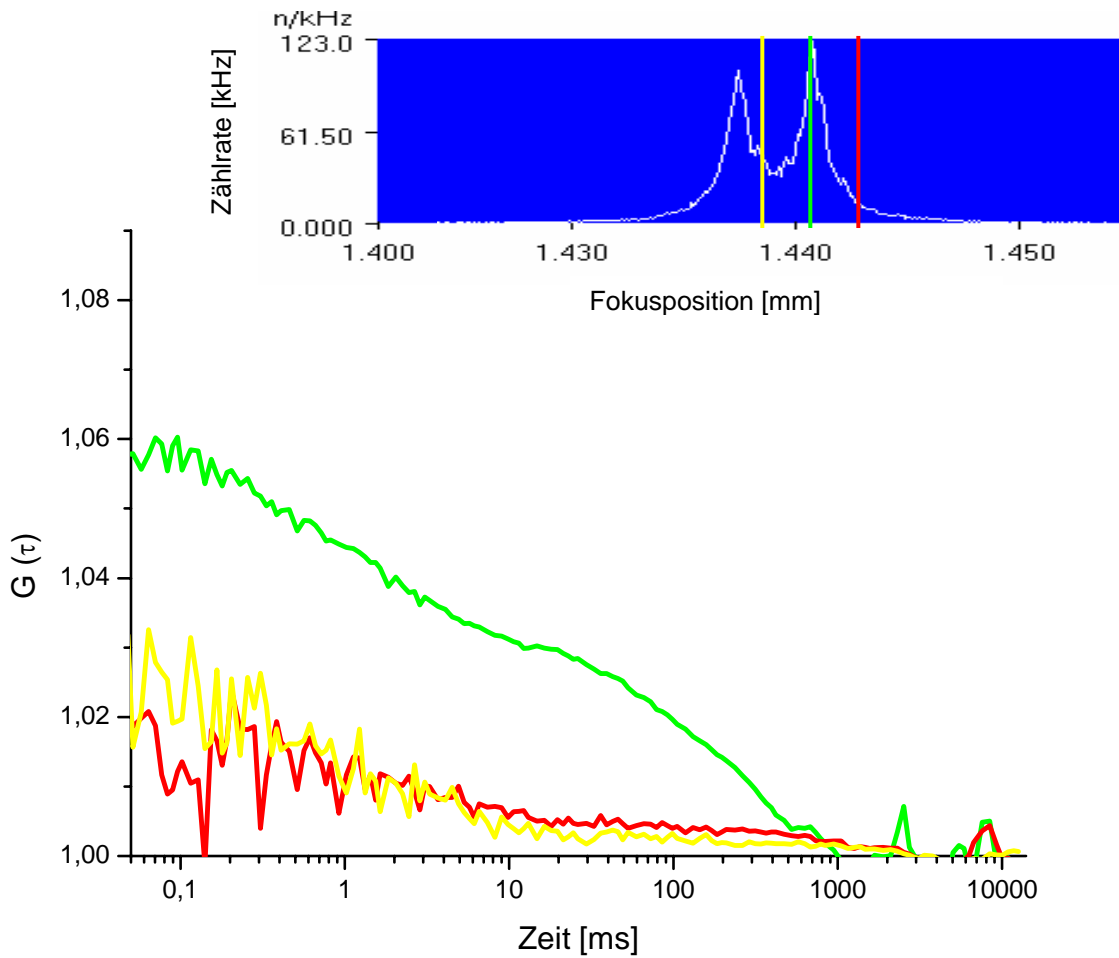


Abbildung 3.5-2: Charakterisierung von  $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteinen mittels FCS und kombinierter Fluoreszenzmikroskopie. (1) Herstellung stabil transfizierter Zellkulturen; Identifizierung transfizierter Zellen mittels Fluoreszenzmikroskopie; (2) Fluoreszenzmikroskopische Auswahl von morphologisch intakten Zellen mit geeigneten Expressionsleveln und Positionierung des Volumenelementes in x,y-Richtung; Laser-Zellscans zur subzellulären Positionierung des Volumenelementes in z-Richtung; (3) FCS-Messungen in der Biomembran von transfizierten Zellen

### 3.5.3 Rezeptormobilitäten und Verteilungsmuster

Um FCS-Messungen in der Biomembran von mit GFP-Fusionsproteinen transfizierten, lebenden Zellen durchführen zu können, müssen diese hinsichtlich Expressionsgrad und der daraus resultierenden Fluoreszenz in der Membran bestimmte Voraussetzungen erfüllen (s. Kapitel 1.3.5). Bei einer Anregungsenergie von  $4,7 \text{ kW/cm}^2$  der Wellenlänge  $488 \text{ nm}$  des Argon-Ionen-Lasers zeigten die Zellen zum Teil stark unterschiedliche Expressionslevel und Fluoreszenzzählraten in der Biomembran. Zellen mit initialen Zählraten im z-Scan zwischen  $100$  und  $200 \text{ kHz}$  stellten sich im Verlauf erster Testungen als geeignet für FCS-Messungen in der Biomembran sowohl von  $\text{C6}\beta_1\text{AR-GFP}$  als auch von  $\text{HEK293}\beta_2\text{AR-GFP}$  heraus (Abb. 3.5-3). Nach einer  $30 \text{ s}$  Ausbleichphase unbeweglicher Fluoreszenzfraktionen wurden autokorrelierbare Signale mit Zählraten von  $< 50 \text{ kHz}$  detektiert, welche im weiteren Verlauf der Messungen stabil blieben und mobile Fraktionen der GFP-Fusionsproteine in der Biomembran der Zellen repräsentierten. Eine korrekte Positionierung in der oberen Biomembran der Zellen war über eine Bestimmung des Fluoreszenzmaximums, ausgehend von den sich in der Zellmembran anreichernden Rezeptoren, jederzeit möglich. Messungen im Abstand von jeweils  $2 \mu\text{m}$  über bzw. unter dem Fluoreszenzmaximum zeigten für den Inkubationspuffer und das Zytosol sehr schlecht korrelierbare Signale geringer Fluoreszenz (Abb. 3.5-3). Die Auswahl von für FCS-Messungen geeigneten Zellen sowie eine exakte Positionierung des Volumenelementes in der Biomembran der Zellen erfolgten für  $\text{C6}\beta_1\text{AR-GFP}$  und  $\text{HEK293}\beta_2\text{AR-GFP}$  in gleicher Weise.



**Abbildung 3.5-3: Fluoreszenzprofil von C6 $\beta_1$ AR-GFP im Zell-z-Scan und aus FCS-Messungen resultierende Autokorrelationskurven in Abhängigkeit von der Positionierung des Volumenelementes; FCS-Messung in der Biomembran (grün), im Inkubationspuffer (rot), im Zytosol (gelb)**

Die Auswertung von FCS-Messungen in der Biomembran mehrerer Zellen von C6 $\beta_1$ AR-GFP und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP (Abb. 3.5-4) zeigte vergleichbare Zählraten pro Molekül, was die Gleichförmigkeit der GFP-Fluoreszenz in membranständigen GFP-Fusionsproteinen mit  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen demonstrierte. Unterschiede ergaben sich jedoch in der mittleren Anzahl detektierter Rezeptoren und für die Verteilungsmuster unterschiedlicher Rezeptormobilitäten in der Biomembran (Tabelle 3.5-1).

Die Autokorrelationskurven ließen sich am besten mit einem 2 Komponenten-Modell für 2 unterschiedliche Mobilitätszustände  $\tau_{\text{Diff1}}$  und  $\tau_{\text{Diff2}}$  der Rezeptor-GFP-Fusionsproteine in der Biomembran der Zellen anfitten. C6 $\beta_1$ AR-GFP zeigten eine schnelle Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff1}} = 0,78 (\pm 0,18)$  ms und eine deutlich langsamere Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff2}} = 122,53 (\pm 69,41)$  ms mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,0 (n=54). In HEK293 $\beta_2$ AR-GFP konnten Geschwindigkeiten von  $\tau_{\text{Diff1}} = 1,37 (\pm 0,87)$  ms und  $\tau_{\text{Diff2}} = 126,02 (\pm 59,76)$  ms und ein Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,7 gemessen werden (n=30). Die Verteilung der Anteile für eine Rezeptorpopulation mit schneller Mobilität und einer Rezeptorpopulation mit langsamer Mobilität stimmte in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP gut mit den Ergebnissen der Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien am  $\beta_2$ -AR mit Alexa532-NA an C6-Zellen überein (s. Kapitel 3.4.2). Im Mittel konnten in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP mit  $N = 12,9 (\pm 4,4)$  mehr Rezeptoren im Fokus als in C6 $\beta_1$ AR-GFP mit  $N = 8,04 (\pm 6,38)$  gefunden werden. Gründe für die Unterschiede hinsichtlich der Anzahl detektierter Rezeptoren und der relativen Verteilung der membranären Mobilitäten können u.a. unterschiedliche Expressionslevel der GFP-Fusionsproteine und Unterschiede in der Rezeptorregulation in verschiedenen Zelltypen sein [112,225]. Somit lagen die gefundenen Diffusionszeitkonstanten für eine schnelle Komponente  $\tau_{\text{Diff1}}$  in beiden Zelltypen im Bereich von ca. 1 ms und für eine langsamere Komponente  $\tau_{\text{Diff2}}$  im Bereich von  $> 100$  ms. Die Diffusionskoeffizienten für die Komponente mit  $\tau_{\text{Diff2}}$  von  $D = 6,98 (\pm 3,96) \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s in C6 $\beta_1$ AR-GFP bzw.  $D = 6,79 (\pm 3,22) \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP repräsentieren typische Geschwindigkeiten für membranständige Proteine, wie sie bereits für die Diffusion von GFP-Fusionsproteinen in Golgi-Membranen [49], für ein  $\beta_2$ -AR-Fusionsprotein [8] mittels FRAP und für ein Epidermal Growth Factor-Rezeptor Fusionsprotein mittels FCS [27] gezeigt wurden. Die Diffusionskoeffizienten für die Komponente mit  $\tau_{\text{Diff1}}$  von  $D = 0,11 (\pm 0,02) \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s in C6 $\beta_1$ AR-GFP, bzw.  $D = 6,25 (\pm 3,97) \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP repräsentieren eine deutlich schnellere Fraktion membranärer Rezeptormobilität. Diese liegen im Bereich der bereits im Rezeptor-Ligand-Bindungsassay als ungehinderte laterale Mobilität beschriebenen Dynamik von  $\beta_2$ -AR-Alexa532-NA Komplexen.

#### 3.5.4 Regulation der $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteine

Um die  $\beta$ -AR-GFP-Fusionsproteine auf ihre Funktionalität zu testen und die beobachteten Mobilitätszustände in den jeweiligen Zelltypen näher zu charakterisieren wurden C6 $\beta_1$ AR-GFP und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP jeweils mit 10  $\mu$ M des  $\beta_1$  /  $\beta_2$ -unspezifischen adrenergen Agonisten Isoprenalin für 30 min inkubiert und anschließend FCS-Messungen in der Biomembran der Zellen durchgeführt (Abb. 3.5-4, B, D).

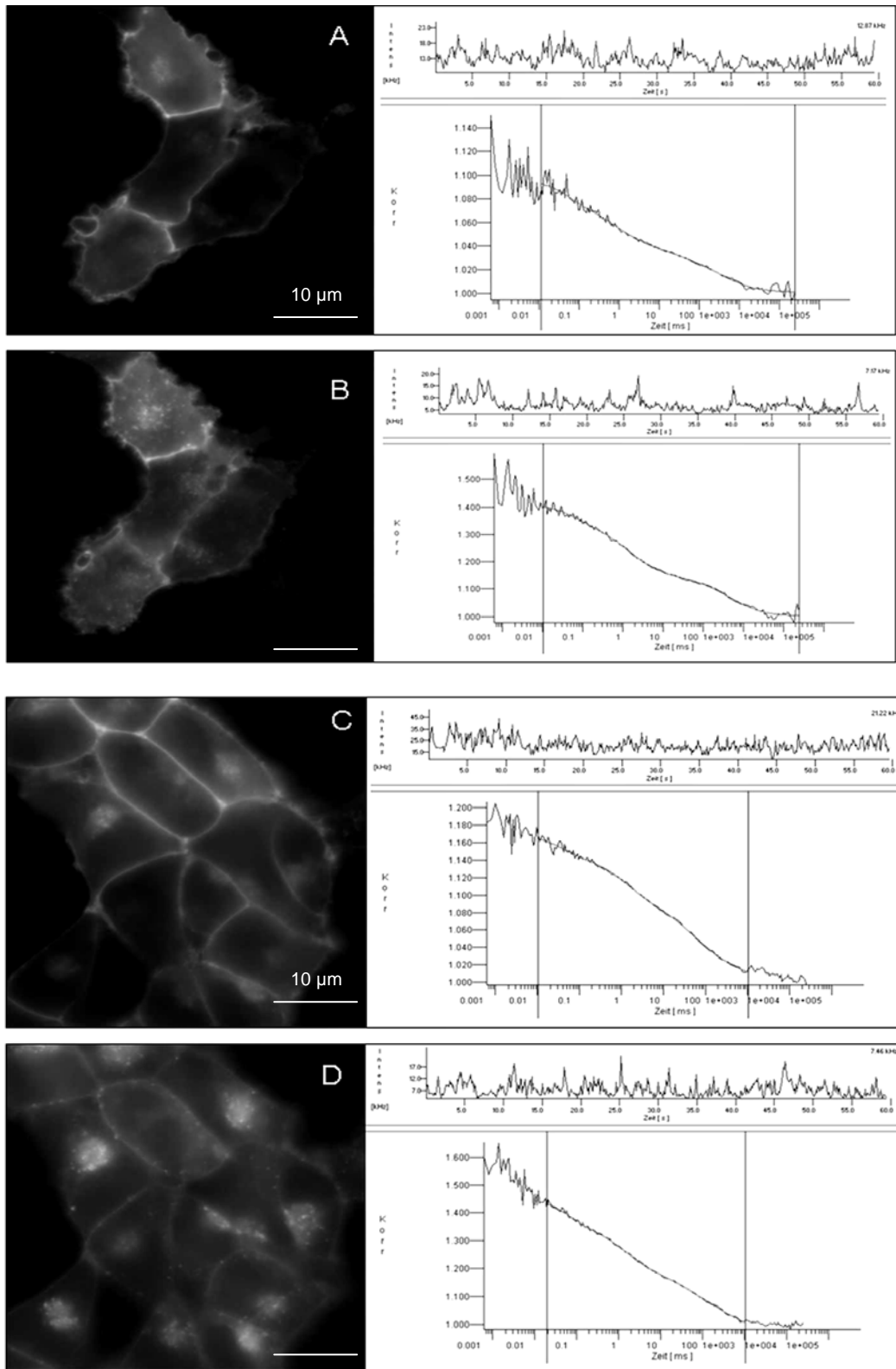


Abbildung 3.5-4: (A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von C6β<sub>1</sub>AR-GFP und Fluoreszenzspur mit abgeleiteter Autokorrelationskurve aus FCS-Messungen in der Biomembran unstimulierter Zellen; (B) C6β<sub>1</sub>AR-GFP stimuliert mit 10 μM Isoprenalin nach 30min; (C) HEK293β<sub>2</sub>AR-GFP und FCS-Messungen in der Biomembran unstimulierter Zellen; (D) HEK293β<sub>2</sub>AR-GFP stimuliert mit 10 μM Isoprenalin nach 30 min

Bereits nach wenigen Minuten konnte in den stimulierten Zellen von C6 $\beta_1$ AR-GFP und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP fluoreszenzmikroskopisch die Ausbildung von vesikulären Strukturen im Zytosol und eine gleichzeitige Abnahme der membranären Fluoreszenz beobachtet werden (Abb. 3.5-4, B, D). Beide Zelltypen reagierten auf den Agonist-induzierten Stimulus mit einer Internalisierung der jeweiligen Population an  $\beta$ -AR-GFP-Fusionsprotein und anschließender Umverteilung in Endosomen. Ein Maximum der Rezeptorinternalisierung wurde nach 30 min festgestellt. Der Mobilitätsstatus der Rezeptor-Fusionsproteine in der Zellmembran wurde daraufhin mittels FCS-Messungen nach 30 min Stimulation genauer untersucht. C6 $\beta_1$ AR-GFP und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP zeigten deutliche Veränderungen in den aufgezeichneten Fluoreszenzspuren, verglichen mit unstimulierten Zellen. Im Grundzustand wurden relativ homogene Fluoreszenzfluktuationen in der Biomembran der Zellen detektiert (Abb. 3.5-4, A, C), wohingegen nach 30 min Stimulation vermehrt größere Fluoreszenzereignisse verzeichnet werden konnten, welche sich als Fluoreszenzpeaks deutlich vom Mittel der gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Fokus abhoben (Abb. 3.5-4, B, D). Die Auswertung der generierten Autokorrelationskurven ergab für beide Zelllinien Änderungen hinsichtlich der im Fokus gemessenen Partikelzahlen. In C6 $\beta_1$ AR-GFP konnten nach 30 min Stimulation der Zellen lediglich noch 3,3 ( $\pm$  1,2) Rezeptoren im Fokus gefunden werden, in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP resultierte eine Partikelzahl von 9,4 ( $\pm$  5,4). Dies entsprach einer Abnahme der membranständigen Partikel-, bzw. Rezeptorenanzahl um 54,6 % in C6 $\beta_1$ AR-GFP und 26,0 % in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP. Demnach ließ sich der qualitative fluoreszenzmikroskopische Befund einer Abnahme der membranären GFP-Fluoreszenz aus  $\beta$ AR-GFP-Fusionsproteinen über eine Bestimmung der Partikelzahl im FCS quantifizieren. In C6 $\beta_1$ AR-GFP erfolgte darüberhinaus ein signifikanter Anstieg der Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff}2}$  für die langsamere Rezeptormobilität in der Biomembran auf 196,80 ( $\pm$  106,67) ms. In HEK293 $\beta_2$ AR-GFP zeigte sich ein deutlicher Effekt hingegen in einer signifikanten Zunahme der Anteile dieser langsamer diffundierenden Rezeptorpopulation, wobei sich die Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff}2}$  mit 124,30 ( $\pm$ 93,76) selbst nicht veränderte. In C6 $\beta_1$ AR-GFP resultierte ein Quotient  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 1,3 (n=9), in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP ein Quotient  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 1,2 (n=10) (Tab. 3.5-1).



**Tabelle 3.5-1: FCS-Parameter aus Messungen in der Biomembran von C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP und HEK293 $\beta$ <sub>2</sub>AR-GFP, unstimuliert und stimuliert mit 10  $\mu$ M Isoprenalin nach 30 min**

	Zählrate pro Molekül (cpm) [kHz]	$\tau_{Diff1}$ [ms]	$\tau_{Diff2}$ [ms]	Anteil $\tau_{Diff1}$ [%]	Anteil $\tau_{Diff2}$ [%]	Quotient $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$	Partikelzahl (N)
<b>C6<math>\beta</math><sub>1</sub>AR-GFP</b>	4,27 ( $\pm$ 1,95)	0,78 ( $\pm$ 0,18)	122,53 ( $\pm$ 69,41)	50,1 ( $\pm$ 6,7)	49,9 ( $\pm$ 6,7)	1,0	8,0 ( $\pm$ 6,4)
<b>HEK293<math>\beta</math><sub>2</sub>AR-GFP</b>	2,85 ( $\pm$ 0,97)	1,37 ( $\pm$ 0,87)	126,02 ( $\pm$ 59,76)	62,6 ( $\pm$ 8,7)	37,4 ( $\pm$ 8,7)	1,7	12,9 ( $\pm$ 4,4)
<b>C6<math>\beta</math><sub>1</sub>AR-GFP stimuliert</b>	2,38 ( $\pm$ 0,36)	0,84 ( $\pm$ 0,27)	196,80 ( $\pm$ 106,67) *	55,5 ( $\pm$ 10,1)	44,5 ( $\pm$ 10,1)	1,3	3,3 ( $\pm$ 1,2)
<b>HEK293<math>\beta</math><sub>2</sub>AR-GFP stimuliert</b>	2,48 ( $\pm$ 1,42)	1,30 ( $\pm$ 0,36)	124,30 ( $\pm$ 93,76)	55,3 ( $\pm$ 6,4)	44,7 ( $\pm$ 6,4) *	1,2	9,4 ( $\pm$ 5,4)

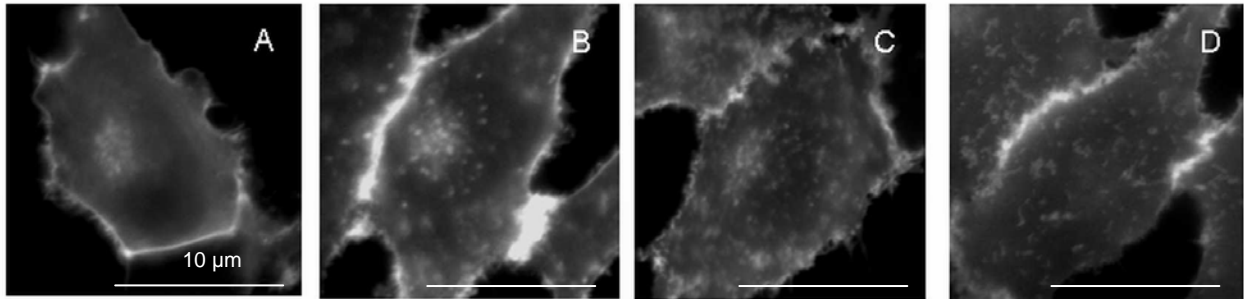
(p \* < 0,05)

Somit konnte die durch den Agonisten Isoprenalin eingeleitete Rezeptorinternalisierung und die damit einhergehenden Veränderungen der Rezeptormobilitäten mittels FCS charakterisiert werden. Interessanterweise veränderten sich die relativen Anteile der Rezeptormobilitäten in beiden Zelllinien in unterschiedlicher Weise. In C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP erfolgte eine geringfügige Verlagerung zur Rezeptorpopulation mit schneller lateraler Mobilität  $\tau_{Diff1}$ . Aufgrund der stark ausgeprägten Abnahme der Rezeptorzahlen im Fokus kann dieser Effekt mit einem Rückgang der funktionalitätsgebundenen, langsameren Komponente  $\tau_{Diff2}$  durch Internalisierung erklärt werden. In HEK293 $\beta$ <sub>2</sub>AR-GFP verschob sich das Verhältnis in Richtung  $\tau_{Diff2}$ , wobei noch deutlich mehr Rezeptoren im verlangsamten Mobilitätszustand in der Membran zu finden waren.

### 3.5.5 Einfluß von Hyperforin und Hyperosid auf die Regulation und Mobilität des $\beta$ <sub>1</sub>-AR

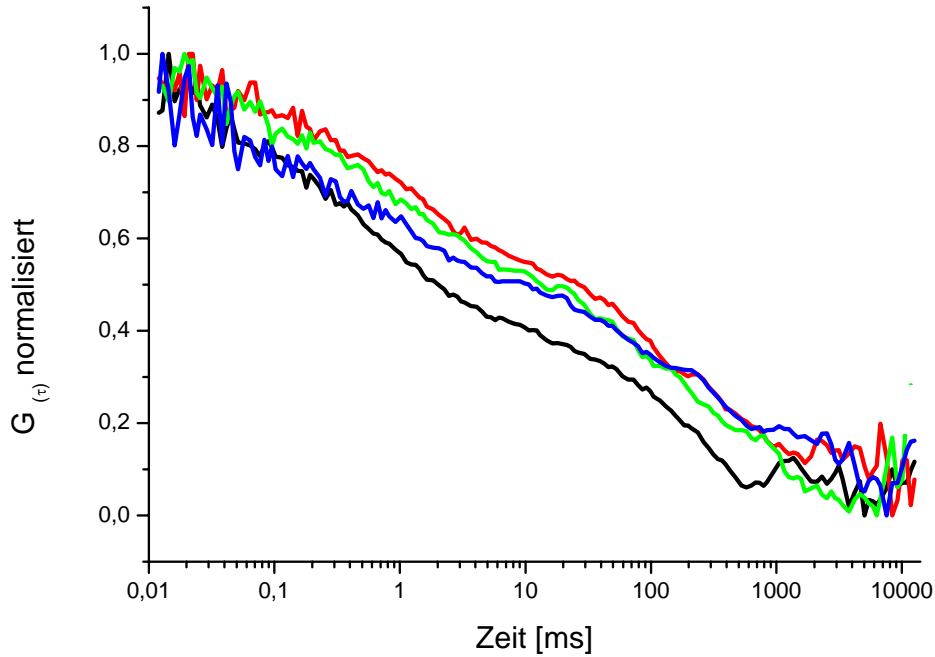
Der Einfluß von Hyperforin und Hyperosid auf den  $\beta$ <sub>1</sub>-AR sollte unter Verwendung der C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP getestet werden. Dazu wurden die Zellen mit jeweils 1  $\mu$ M Hyperforin, Hyperosid und Desipramin als Positivkontrolle 6 Tage im Kulturmedium vorinkubiert und anschließend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Dabei zeigten sich für Desipramin sowie für Hyperforin und Hyperosid vesikuläre Strukturen der  $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP-Fluoreszenz im Zytosol

der Zellen (Abb. 3.5-5). Diese Strukturen waren vergleichbar mit internalisierten Vesikeln in Kontrollzellen nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin nach 30 min (Abb. 3.5-4 B).



**Abbildung 3.5-5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von C6 $\beta_1$ AR-GFP: (A) Kontrollzellen und nach 6 Tagen Vorinkubation mit (B) 1  $\mu\text{M}$  Desipramin, (C) 1  $\mu\text{M}$  Hyperforin, (D) 1  $\mu\text{M}$  Hyperosid**

Hyperforin, Hyperosid und Desipramin zeigten somit einen Einfluss auf die Regulation und die Verteilung von  $\beta_1$ AR-GFP in C6-Zellen. Dieser Befund sollte nachfolgend mit FCS-Messungen in der Biomembran von C6 $\beta_1$ AR-GFP genauer untersucht werden. Dafür wurden die Zellen für 72 h mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  Hyperforin, Hyperosid sowie Desipramin im Kulturmedium vorinkubiert und anschließend die Verteilung der Rezeptormobilitäten  $\tau_{\text{Diff}1}$  und  $\tau_{\text{Diff}2}$  im Vergleich mit Kontrollzellen bestimmt. Bei der Auswertung der Autokorrelationsdaten zeigte sich in den vorinkubierten Zellen ein ‚rechts-shift‘ für die normalisierten Autokorrelationskurven hin zu langsameren Diffusionszeitkonstanten (Abb. 3.5-6).



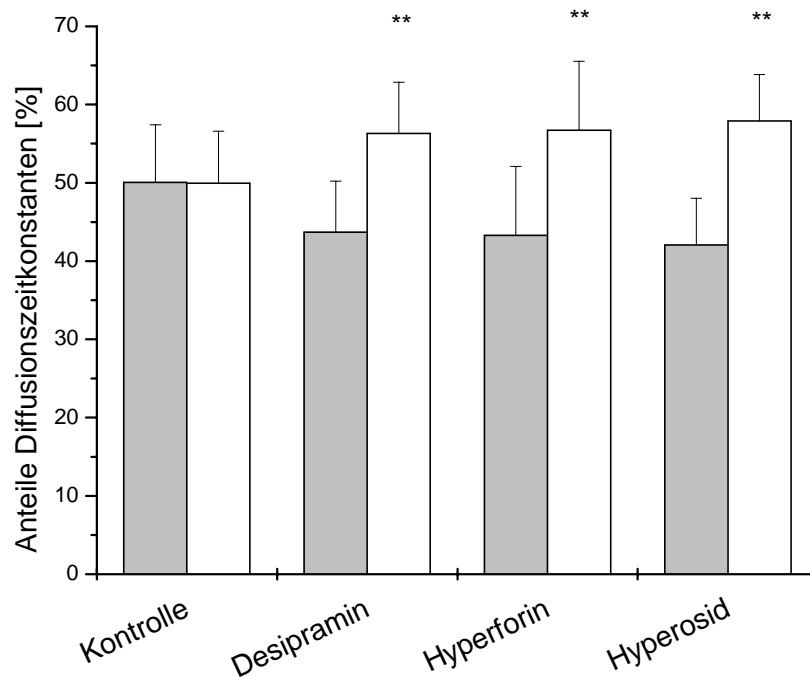
**Abbildung 3.5-6: Normalisierte Autokorrelationskurven, aufgenommen in der Biomembran von C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP: Kontrolle (schwarze Linie) und nach 72 h Vorinkubation mit 1  $\mu$ M Desipramin (rote Linie), 1  $\mu$ M Hyperforin (grüne Linie) und 1  $\mu$ M Hyperosid (blaue Linie)**

Interessanterweise zeigten sich nach Vorinkubation mit den Testsubstanzen keine wesentlichen Veränderungen hinsichtlich der Diffusionszeitkonstanten, wohl aber im Verhältnis der Anteile  $\tau_{\text{Diff1}}$  und  $\tau_{\text{Diff2}}$  der zwei unterschiedlichen Rezeptorpopulationen (Tab. 3.5-2). Es resultierten Anstiege der Rezeptoranteile mit langsamer membranständiger Mobilität  $\tau_{\text{Diff2}}$  auf 56,3 ( $\pm$  6,5) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 0,8 ( $n=26$ ) für Desipramin, 56,7 ( $\pm$  8,8) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 0,8 für Hyperforin ( $n=23$ ) und 57,9 ( $\pm$  5,9) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 0,7 für Hyperosid ( $n=12$ ). Kontrollzellen zeigten einen Anteil an  $\tau_{\text{Diff2}}$  von 49,9 ( $\pm$  6,7) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,0 (Abb. 3.5-7).

**Tabelle 3.5-2: FCS-Parameter nach Messungen in der Zellmembran von mit Testsubstanzen (1  $\mu$ M, 72 h) vorinkubierten C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP und uninkubierten Kontrollzellen.**

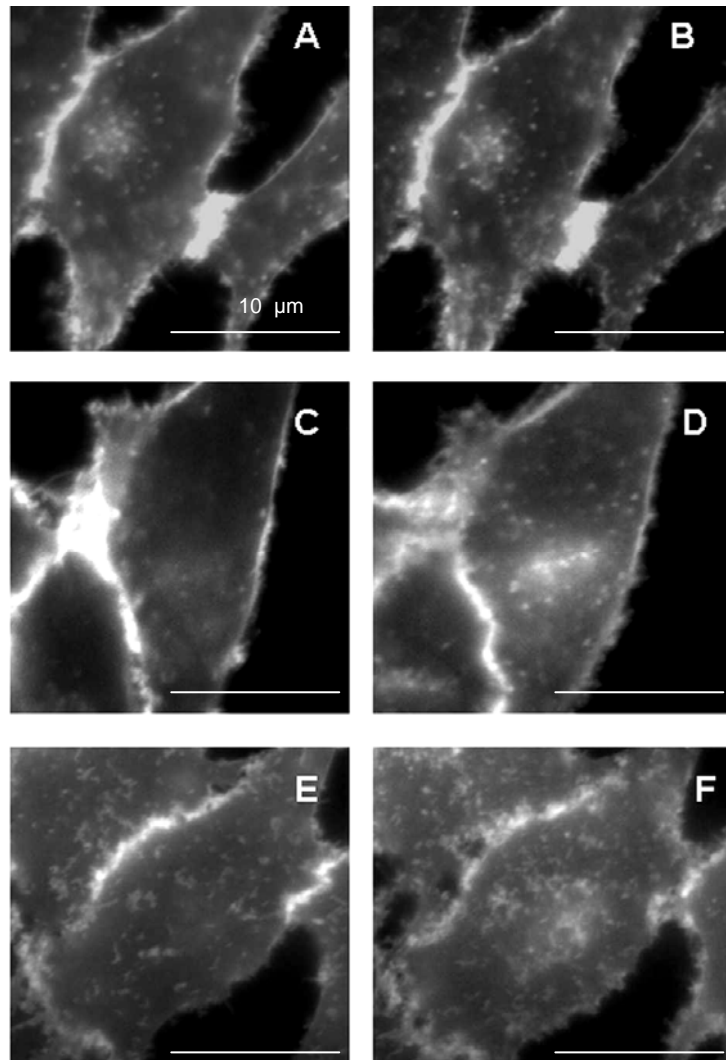
	$\tau_{Diff1}$ [ms]	$\tau_{Diff2}$ [ms]	Anteil $\tau_{Diff1}$ [%]	Anteil $\tau_{Diff2}$ [%]	Quotient $\tau_{Diff1} / \tau_{Diff2}$
<b>Kontrollzellen</b>	0,78 ( $\pm$ 0,18)	122,53 ( $\pm$ 69,41)	50,1 ( $\pm$ 6,7)	49,9 ( $\pm$ 6,7)	1,0
<b>Desipramin</b>	0,83 ( $\pm$ 0,31)	128,11 ( $\pm$ 82,46)	43,7 ( $\pm$ 6,5)	56,3 ( $\pm$ 6,5) **	0,8
<b>Hyperforin</b>	0,94 ( $\pm$ 0,49)	136,53 ( $\pm$ 69,61)	43,3 ( $\pm$ 8,8)	56,7 ( $\pm$ 8,8) **	0,8
<b>Hyperosid</b>	1,04 ( $\pm$ 0,28)	164,72 ( $\pm$ 74,10)	42,1 ( $\pm$ 5,9)	57,9 ( $\pm$ 5,9) **	0,7

(p \*\* <0,01)



**Abbildung 3.5-7: Einfluss von jeweils 1  $\mu$ M Desipramin, Hyperforin und Hyperosid nach 72 h Vorinkubation auf die Verteilung der Anteile von Rezeptorpopulationen mit Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{Diff1}$  (grau) und  $\tau_{Diff2}$  (weiß) in der Biomembran von C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP (p \*\* <0,01)**

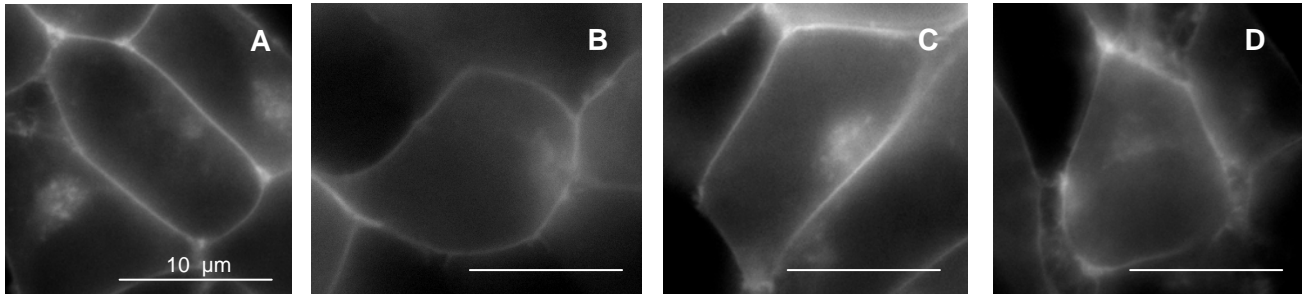
Demnach erhöhten die Testsubstanzen signifikant den Anteil an langsamer Rezeptorpopulation mit Diffusionszeitkonstante  $\tau_{Diff2}$ . Dieser konnte in den vorangegangenen Stimulations-Experimenten mit Isoprenalin als funktionalitätsgekoppelt und an Regulationsprozessen wie der Internalisierung membrabständiger Rezeptoren beteiligt identifiziert werden. Durch eine zusätzliche Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin für 30 min konnte in den mit Desipramin vorbehandelten Zellen keine wesentliche Zunahme an internalisierten Vesikeln beobachtet werden. In mit Hyperforin und Hyperosid vorbehandelten Zellen ließ sich die Anzahl internalisierter Vesikel hingegen weiter steigern (Abb. 3.5-8).



**Abbildung 3.5-8:** C6 $\beta$ <sub>1</sub>AR-GFP vorbehandelt mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  (A) Desipramin, (C) Hyperforin, (E) Hyperosid nach 6 Tagen und zusätzlich stimuliert mit 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin nach 30 min, (B, D, F)

### 3.5.6 Vorinkubationen von HEK293 $\beta_2$ AR-GFP

Im Gegensatz zu C6 $\beta_1$ AR-GFP ließen sich in HEK293 $\beta_2$ AR-GFP nach 6 tägiger Vorbehandlung der Zellen mit jeweils 1  $\mu$ M Desipramin, Hyperforin und Hyperosid keine internalisierten Vesikel im Zytosol der Zellen nachweisen (Abb. 3.5-9).



**Abbildung 3.5-9: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HEK293 $\beta_2$ AR-GFP: (A) Kontrollzellen und nach 6 Tagen Vorinkubation mit (B) 1  $\mu$ M Desipramin, (C) 1  $\mu$ M Hyperforin, (D) 1  $\mu$ M Hyperosid**

Da in den vorangegangenen Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien ein deutlicher Einfluss von Hyperforin und Hyperosid auf die Regulation des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptorsubtyps festgestellt werden konnte, lässt sich dieser scheinbar nicht auf eine Rezeptordownregulation im Sinne von vesikulär internalisierten Rezeptoren zurückführen. Für Hyperforin und Hyperosid kann daher, ebenso wie für Desipramin, ein Einfluss auf die Ligandaffinität  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren diskutiert werden.

## 4. Zusammenfassung, Diskussion und Ausblick

Antidepressiva werden zur Behandlung von Depressionen und Angststörungen eingesetzt. Diese gehören mit unterschiedlichen Schweregraden zu den häufigsten psychischen Erkrankungen, mit einer Prävalenz von über 15 % in der Bevölkerung.

Neben synthetischen Antidepressiva sind auch standardisierte hydroalkoholische Trockenextrakte aus der Arzneipflanze *Hypericum perforatum* L. für die Indikation leichte und mittelschwere Depressionen für die Therapie zugelassen und finden eine breite Anwendung. Die klinische Wirksamkeit von *Hypericum perforatum* ist ausschließlich für den Gesamtextrakt bestätigt worden, ohne die wirksamkeitsbestimmenden Bestandteile im Einzelnen zu kennen. Der klinische Wirkungseintritt aller verfügbaren Antidepressiva tritt verzögert erst nach einigen Wochen auf. Der diesem Phänomen zugrundeliegende Wirkmechanismus ist nicht vollständig geklärt. Klinische Befunde weisen darauf hin, dass bestimmte Krankheitsbilder einer Depression mit einer Dysregulation der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden (hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA) -Achse einhergehen können. Stresssituationen bewirken im Körper eine erhöhte Sekretion des Corticotropin-releasing-hormone/-factor (CRH/CRF) durch den Hypothalamus. Dadurch wird vermehrt Adrenocorticotropin-releasing-hormone (ACTH) von der Hypophyse ins Blut abgegeben, was wiederum zu einem Anstieg der Cortisol-Ausschüttung in der Nebennierenrinde führt [135]. Im Zuge einer Depression oder Angststörung kann es zu dauerhaft erhöhten CRH-Blutspiegeln oder zu einer Störung der durch Corticoid- und Mineralcorticoid-Rezeptoren vermittelten negativen Rückkopplung kommen. Cortisol reguliert im Körper metabolische sowie kognitive und emotionale Prozesse, dabei speziell Angst und Unruhe [135,226,262]. Studien an Zellkulturen und in vivo haben gezeigt, dass Glucocorticoide in verschiedenen Zelltypen und Geweben das Verhältnis  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren zugunsten des  $\beta_2$ -Subtyps durch Einfluss auf die Genexpression regulieren [50,84,85,86]. Angstassoziierte depressive Krankheitsbilder wie Panic Disorder (PD) und Post Traumatic Stress Disorder (PTSD) gehen mit einer sympathischen Übererregbarkeit einher, welche u.a. durch  $\beta_2$ -adrenerge Rezeptoren in den Endorganen vermittelt wird [85,86]. Eine Hyperaktivität der HPA-Achse konnte in klinischen und tierexperimentellen Studien mittels synthetischer Antidepressiva wie Imipramin (TCA) und Fluoxetin (SSRI) sowie einem *Hypericum*-Extrakt teilweise korrigiert werden. Hierzu waren chronische Gaben von bis zu 8 Wochen notwendig [40,263]. Antidepressiva entfalten ihre Wirksamkeit auf mehreren Ebenen des beschriebenen Regelkreislaufs. Es werden sowohl Einflüsse auf die Genexpression beteiligter Hypothalamushormone und Rezeptorproteine [40] als auch auf die nachgeschalteten Prozesse der Rezeptorregulation in den Endorganen beschrieben. Letztere sind u.a. Einflüsse auf das  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsystem wie Desensitivierung und Downregulation

postsynaptischer Rezeptoren [1,22,85,86]. Untersuchungen mit Desipramin (TCA) an C6-Glioblastomzellen [34,70,142,143] haben gezeigt, dass eine erhöhte Neurotransmitterkonzentration im synaptischen Spalt durch Wiederaufnahmehemmung nicht der alleinige Grund für eine Rezeptordownregulation im Sinne einer adaptiven Anpassung der Rezeptordichte sein kann. Desipramin bewirkte im als ‚postsynaptisch‘ bezeichneten Modell der C6-Zellen [234] eine Downregulation von  $\beta$ -adrenergen Rezeptoren, ohne daß jedoch zwischen  $\beta_1$ - und  $\beta_2$ -Subtyp unterschieden wurde. Dieser Effekt kommt ohne einen äußeren Einfluss von Neurotransmittern zustande. Darüberhinaus zeigt Desipramin keine Bindung an  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren [70,142,143], so dass ein postsynaptischer, postmembranärer Mechanismus vermutet wird. Weitergehende Untersuchungen mit trizyklischen Antidepressiva zeigten u.a. für Desipramin eine Verminderung der Rezeptoraffinität von Gesamt- $\beta$ -AR an Radioliganden [142,143] sowie eine Umverteilung von  $G_{sa}$ -Protein in C6-Zellen [59,234] und Einflüsse auf die Kopplungseffizienz zwischen  $G_s$ -Protein und dem Effektorprotein Adenylatzyklase [48]. Eine Verminderung der Rezeptoraffinität von  $\beta_2$ -AR an Radioliganden und der Kopplungseffizienz zwischen  $\beta_2$ -AR und  $G_s$ -Protein wurde für Imipramin gefunden [85]. Diese Befunde lassen vermuten, dass G-Proteine (speziell  $G_s$ ) potentielle Targets für den Wirkmechanismus von Antidepressiva darstellen [22]. Da *Hypericum*-Präparate sowohl in klinischen Studien wie auch in tierpharmakologischen Modellen der Depression [6,37,47] ähnliche Wirksamkeit zeigen wie synthetische Antidepressiva liegt die Annahme eines analogen biochemischen Wirkmechanismus nahe. Daher wurde das Modell der C6-Glioblastomzellen der Ratte mit Desipramin als Positivkontrolle für Testungen zur Wirkweise von Einzelstoffen aus *Hypericum perforatum* auf das  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsystem herangezogen. Gezielt sollte hier zuerst der  $\beta_2$ -AR untersucht werden, da in Radio-Ligand-Bindungsstudien überwiegend Gesamt- $\beta$ -AR-Dichten bestimmt worden waren [70,142,143].

Mittels Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie (FCS) können Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien an nativen Rezeptorpopulationen auf lebenden Zellen in Echtzeit durchgeführt werden. So können zum einen potentielle funktionalitätsgekoppelte Veränderungen der Rezeptormobilitäten nach Bindung von fluoreszierenden Liganden bestimmt werden. Zum anderen können Einflüsse von Testsubstanzen auf die Ligandbindung, Rezeptordynamiken und Rezeptorregulation in der physiologisch intakten Umgebung der Biomembran untersucht werden. Messungen am  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor von A549-Lungenepithelzellen [96] und am  $GABA_A$ -Rezeptor auf hippocampalen Neuronen [21,150] haben bereits gezeigt, dass mittels FCS der Einfluss von Naturstoffen in pharmakologisch relevanten Konzentrationen auf therapeutisch interessante Rezeptortypen bestimmt werden kann. Dabei kann selbst bei niedriger physiologischer Rezeptordichte auf die Notwendigkeit einer Überexpression klonierter Rezeptoren verzichtet werden.



Die Bindungsstudien am  $\beta_2$ -AR wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Noradrenalinderivat (Alexa532-NA) an C6-Zellen durchgeführt, welche den  $\beta_2$ -AR in geringer Dichte auf ihrer Oberfläche tragen [71,117]. Durch Kopplung des Farbstoffes Alexa532 an die Aminfunktion des Noradrenalins wurde ein voluminöser Substituent eingeführt, wodurch für Alexa532-NA ein  $\beta_2$ -selektives Bindungsverhalten erreicht wurde [96]. Für Katecholaminderivate, wie z.B. Terbutalin, konnte bereits gezeigt werden, dass durch eine 3,5-Stellung der Hydroxygruppen am aromatischen Ring der Ligandenstruktur und die Kopplung eines sterisch anspruchsvollen Substituenten an die Aminfunktion eine  $\beta_2$ -Selektivität resultiert [105,106].

Im Rezeptor-Ligand-Bindungsassay mittels FCS zeigte freies Alexa532-NA im Bindungspuffer eine mittlere Diffusionszeitkonstante von  $\tau_{\text{free}} = 39,9 (\pm 2,3) \mu\text{s}$ , was einem Diffusionskoeffizienten von  $D_{\text{free}} = 2,14 (\pm 0,12) \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$  entspricht.

Messungen in der Biomembran von C6-Zellen führten neben  $\tau_{\text{free}}$  zu 2 weiteren Diffusionszeitkonstanten mit  $\tau_{\text{Diff1}} = 0,62 (\pm 0,2) \text{ ms}$  und  $D_1 = 1,46 (\pm 0,47) \times 10^{-7} \text{ cm}^2/\text{s}$  sowie  $\tau_{\text{Diff2}} = 26,7 (\pm 0,6) \text{ ms}$  und  $D_2 = 3,2 (\pm 0,1) \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$  für den gebundenen Liganden. Ähnliche Diffusionszeitkonstanten konnten in FCS-Messungen mit fluoreszenzmarkiertem Insulin an humanen Nierenzellen mit  $\tau_{\text{Diff1}} = 0,8 \text{ ms}$  und  $\tau_{\text{Diff2}} = 20 \text{ ms}$  für gebundenes Insulin gefunden werden [266]. Andere Untersuchungen mit hippocampalen Neuronen und Alveolar Typ II Zellen (A549) ergaben Diffusionszeitkonstanten für  $\beta_2$ -AR-Ligand-Komplexe von  $\tau_{\text{Diff1}} = 1,8 \text{ ms}$  bzw.  $3,3 \text{ ms}$  und  $\tau_{\text{Diff2}} = 158,6 \text{ ms}$  bzw.  $95,2 \text{ ms}$  [96]. Die Unterschiede sind möglicherweise auf die verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen regulatorischen Aktivitäten zurückzuführen. So setzt z.B. die Sättigung der Ligandbindung und die Internalisierung der Rezeptoren bei Neuronen deutlich früher ein als bei Lungenepithelzellen [96]. Im Sättigungsexperiment an C6-Zellen resultierte für Alexa532-NA eine maximale Bindung von  $4,04 (\pm 0,17) \text{ nM}$  mit einem  $K_D$  von  $1,36 (\pm 0,43) \text{ nM}$ . Davon ausgehend konnte unter Berücksichtigung der fokussierten Membranoberfläche von  $0,108 \mu\text{m}^2$  eine durchschnittliche Rezeptordichte von  $\rho = 4,5 (\pm 0,5) / \mu\text{m}^2$  bestimmt werden. Eine identische Rezeptordichte  $\beta_2$ -adrenerger Rezeptoren konnte zuvor in der Membran hippocampaler Neurone mit  $\rho = 4,5 (\pm 0,9) / \mu\text{m}^2$  gefunden werden, wohingegen in A549-Zellen die Rezeptordichte mit  $\rho = 19,9 (\pm 2,0) / \mu\text{m}^2$  deutlich höher lag [96]. Desweiteren wurde an C6-Zellen eine Anbindungskonstante  $K_{\text{ass}}$  mit  $0,56 (\pm 0,11) \text{ s}^{-1} \text{ nM}^{-1}$  und eine Abbindekonstante  $K_{\text{diss}}$  mit  $1,27 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  bestimmt. Die kinetischen Parameter ließen auf eine langlebige, spezifische Bindung mit hoher Affinität von Alexa532-NA an seine Bindungsstellen in der Biomembran von C6-Zellen schließen. Die Selektivität zum  $\beta_2$ -AR wurde durch Verdrängungsexperimente mit  $\beta$ -adrenergen Liganden im Überschuß festgestellt und eine unspezifische Bindung von 25 % bestimmt. Vergleichbare unspezifische Bindungen wurden für Alexa532-NA bereits an hippocampalen Neuronen sowie an A549-Zellen gefunden [96]. Um einen Hinweis auf die Regulierbarkeit der  $\beta_2$ -adrenergen

Rezeptoren in der Biomembran der C6-Zellen zu erhalten, wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Forskolin für 30 min vor Ligandzugabe behandelt. Forskolin ist ein ligandenunabhängiger Aktivator der Adenylatzyklase (AC). Diese bewirkt über die Bildung von cAMP eine Phosphorylierung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren durch die Proteinkinase A (PKA) und leitet somit regulative Prozesse wie die Clathrin-coated-pit abhängige Internalisierung von Rezeptoren ein [180]. Nach Forskolin-Vorinkubation nahm die Alexa532-NA Bindung um 39 % im Vergleich zum Kontrollexperiment ab, was auf eine durch Forskolin eingeleitete Internalisierung von  $\beta_2$ -AR schließen ließ. Desweiteren konnten Messungen der intrazellulären cAMP-Konzentration einen durch Alexa532-NA vermittelten konzentrationsabhängigen Anstieg der Akkumulation des second messengers in C6-Zellen zeigen. Nach Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  des Liganden konnte ein signifikanter cAMP-Anstieg um 55,2 ( $\pm 10,6$ ) % im Vergleich zu Kontrollzellen bestimmt werden. Dieser Befund zeigt zusätzlich zur selektiven, hochaffinen Bindung ein agonistisches Profil des modifizierten physiologischen Liganden Noradrenalin am  $\beta_2$ -AR. Eine Inkubation mit 500 nM Dexamethason für 48 h resultierte in einer signifikanten Erhöhung der Alexa532-NA Bindungskapazität an C6-Zellen um 13 %. Radio-Rezeptor-Assays haben gezeigt, dass Glucocorticoide das Verhältnis von  $\beta_1$ - zu  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren in C6-Zellen in Richtung der  $\beta_2$ -AR verändern, ohne jedoch die Gesamtrezeptorenzahl zu beeinflussen. Die Erhöhung der  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptordichte kommt wahrscheinlich durch Bindung von Glucocorticoiden am zytosolisch lokalisierten Glucocorticoid-Rezeptor zustande, welcher dann an „glucocorticoid-response“-Elemente (GREs) auf den Genen für die  $\beta$ -AR-Subtypen bindet und daraufhin die Genexpression reguliert [84,117]. Die direkte Beeinflussung der  $\beta_2$ -AR-Dichte durch erhöhte Glucocorticoid-Konzentrationen in C6-Zellen zeigt zudem, dass diese ein physiologisch relevantes Modell für die Beeinflussung des  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystems durch potentiell antidepressiv wirksame Substanzen darstellen. Für die Rezeptor-Ligand-Komplexe mit  $\tau_{\text{Diff}1}$  wurde ein  $B_{\text{max}} = 3,88 (\pm 0,28)$  nM und ein  $K_{\text{D}1} = 3,97 (\pm 1,26)$  nM bestimmt. Rezeptor-Ligand-Komplexe mit  $\tau_{\text{Diff}2}$  zeigten ein  $B_{\text{max}} = 0,98 (\pm 0,14)$  nM und ein  $K_{\text{D}2} = 0,63 (\pm 0,66)$  nM. Der Anteil  $\tau_{\text{Diff}2}$  repräsentierte somit eine schneller sättigbare  $\beta_2$ -AR Population mit höherer Ligandaffinität und langsamerer Diffusionszeitkonstante. Dieser Anteil der Rezeptor-Ligand-Bindung konnte in früheren FCS-Studien bereits unterschiedlichen Mobilitätszuständen zugeordnet werden, in denen Rezeptor-Ligand-Komplexe u.a. des  $\beta_2$ -AR [96], des  $\text{GABA}_A$ -Rezeptors [150], eines Galanin-Rezeptors [184] und eines C-Protein-Rezeptors [191] regulatorischen Einflüssen wie Assoziation an Zytoskelettproteine, Bindung an G-Protein, Clusterung in Clathrin-coated-pits oder Internalisierung in Form von frühen Endosomen (engl.: early endosomes) unterliegen. Eine Erhöhung des Anteils an  $\tau_{\text{Diff}2}$  konnte im Zusammenhang mit der Internalisierung von  $\beta_2$ -AR auf A549-Zellen und hippocampalen Neuronen beobachtet werden [96]. Für die Bindung

eines fluoreszenzmarkierten Galanins auf Insulinoma-Zellen und eines fluoreszenzmarkierten C-Peptids auf humanen Nierenzellen wurde nach Inkubation mit Pertussis-Toxin eine vollständige Reduktion des Anteils mit  $\tau_{\text{Diff}2}$  gefunden [184,191]. Pertussis-Toxin löst die Bindung von G-Protein an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wodurch regulatorische Prozesse unterbunden werden. Weitere Bindungsexperimente mit 10 nM Alexa532-NA an C6-Zellen ergaben für den Rezeptor-Ligand-Komplex Diffusionszeitkonstanten von  $\tau_{\text{Diff}1} = 0,7 (\pm 0,4)$  ms und  $\tau_{\text{Diff}2} = 9,4 (\pm 3,4)$  ms mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 1,9. Die subchronische Vorbehandlung von C6-Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Desipramin für 72 h führte zu einer Abnahme der Alexa532-NA-Gesamtbindung um 38,0 ( $\pm 12,6$ ) %. Während sich die Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff}1} = 0,6 (\pm 0,1)$  ms und  $\tau_{\text{Diff}2} = 14,3 (\pm 10,7)$  ms nicht signifikant veränderten, erhöhte sich der Quotient  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  nach 5,3. Die Befunde lassen darauf schließen, dass die reduzierte Gesamtbindung größtenteils auf eine Abnahme an Rezeptor-Ligand-Komplexen mit  $\tau_{\text{Diff}2}$  und hoher Ligandaffinität zurückzuführen ist. Nach Inkubation mit Desipramin wurde bereits von einer Abnahme in der Gesamt- $\beta$ -AR-Dichte und verminderter Isoprenalin-stimulierbarer cAMP-Akkumulation in C6-Zellen berichtet, welche mit einer Erhöhung des Anteils niedrigaffiner, niedrigkonformativer Rezeptoren und einer Abnahme hochaffiner Rezeptoren im hochkonformativen Zustand einherging [142,143]. Der hochkonformative Zustand beschreibt die vorübergehende Ausbildung des Komplexes aus Agonist, Rezeptor und G-Protein-Trimer. Darauf erfolgt die Aktivierung der  $G_{\text{sa}}$ -Untereinheit, welche die Stimulation der Adenylatzyklase vermittelt [79]. Diese Untersuchungen lassen eine Veränderung in der Interaktion belegter Rezeptoren mit regulatorischen Proteinen wie  $G_{\text{s}}$ -Protein durch Desipramin vermuten, wie dies auch für  $\beta_2$ -AR auf Neutrophilen aus Plasma von Panic Disorder (PD)-Patienten nach Behandlung mit Imipramin beschrieben wurde [85]. Nach Vorbehandlung von C6-Zellen mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  der *Hypericum perforatum*-Inhaltsstoffe Hyperforin und Hyperosid für 72 h konnte im FCS-Bindungsassay ebenfalls eine Abnahme in der Alexa532-NA Gesamtbindung von 46,9 ( $\pm 9,3$ ) % bzw. 40,6 ( $\pm 8,8$ ) % festgestellt werden. Es ergaben sich Anteile der Diffusionszeitkonstanten von  $\tau_{\text{Diff}1} = 0,9 (\pm 0,3)$  ms und  $\tau_{\text{Diff}2} = 9,6 (\pm 3,7)$  ms mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 3,4 in Hyperforin-vorbehandelten Zellen und  $\tau_{\text{Diff}1} = 0,7 (\pm 0,1)$  ms und  $\tau_{\text{Diff}2} = 10,5 (\pm 7,5)$  ms mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 4,0 nach Hyperosid-Vorinkubation. Demnach führte die Inkubation mit Hyperforin und Hyperosid zu vergleichbaren Effekten auf die Alexa532-NA Bindung und die Mobilitäten der Rezeptor-Ligand-Komplexe wie Desipramin.

Hyperforin wird als ein relevantes Wirkprinzip aus *Hypericum perforatum* betrachtet. Diese Annahme stützt sich vor allem auf Daten zur synaptosomalen Wiederaufnahmehemmung der Neurotransmitter Serotonin, Noradrenalin, Dopamin, GABA und L-Glutamat [46,158]. Diese soll nicht-kompetitiv auf eine Beeinflussung der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration

zurückgehen [214]. Darüberhinaus konnte für Hyperforin nach subchronischer Gabe eines hochkonzentrierten CO<sub>2</sub>-Extraktes (40 % Hyperforin) an Ratten eine Downregulation von Gesamt-β-AR festgestellt werden [158]. Reines Hyperforin zeigte antidepressive Wirksamkeit in verschiedenen verhaltenspharmakologischen Tests [47]. Hyperforin-haltige Extrakte zeigten SSRI-vergleichbare Effekte in elektrophysiologischen Tests mit Ratten und Menschen [57,199] und waren konzentrationsabhängig antidepressiv wirksam in klinischen Studien mit depressiven Patienten [126,199]. Eine Desensitivierung von β<sub>2</sub>-AR, in ähnlichem Ausmaß wie durch trizyklische Antidepressiva vermittelt, wird im Rahmen dieser Arbeit für reines Hyperforin erstmalig beschrieben. Ein hochkonzentrierter CO<sub>2</sub>-Extrakt (70 % Hyperforin), berechnet auf 1 μM Hyperforin im Assay, zeigte eine Reduktion der Alexa532-NA-Bindung um 48,7 (± 21,3) % und einen Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 2,9. Dieser Befund entsprach den Ergebnissen mit der Reinsubstanz Hyperforin und deutet darauf hin, dass die im CO<sub>2</sub>-Extrakt zusätzlich vorkommenden Hyperforinderivate, wie z.B. Adhyperforin, für den Effekt offensichtlich keine Rolle spielen. Für Hyperosid aus der Flavonoidfraktion von *Hypericum perforatum* konnte erstmals ein Effekt auf β<sub>2</sub>-adrenerge Rezeptoren im Rahmen von biochemischen Modellen zur Wirkweise von Antidepressiva gezeigt werden. Frühere Studien zeigten bereits antidepressive Aktivität von Quercetin-Glykosiden wie Hyperosid und dessen Hauptmetabolit Miquelianin in verhaltenspharmakologischen Modellen an Ratten sowie Einflüsse auf den Regelkreislauf der HPA-Achse nach mehrwöchiger Fütterung [39,42]. Die Reduktion in der Ligandbindung und die Veränderung des Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  nach Hyperosid-Inkubation entsprach in etwa den Ergebnissen für Hyperforin. Allerdings war ausschließlich für Hyperosid eine signifikante Reduktion der Ligandbindung um 32,4 (± 27,6) % schon nach 24 h zu verzeichnen, wohingegen ein Effekt für Desipramin und Hyperforin erst nach 72 h zu beobachten war. Dieser Befund deutet zusätzlich auf eine Beeinflussung postmembranärer Mechanismen der β<sub>2</sub>-AR-Regulation durch Hyperosid hin, welche sich jedoch in der zeitlichen Ausprägung von Desipramin und Hyperforin unterscheidet.

Einen Hinweis auf eine Strukturwirkungsbeziehung ergaben Messungen mit dem ebenfalls glykosilierten Flavonoid Rutin und dem Aglykon Quercetin. Für Rutin konnte bereits ein Beitrag zur antidepressiven Wirksamkeit von Hypericum-Extrakten in einer Studie am Tiermodell gezeigt werden. Dort bewirkte ein Hypericum-Extrakt mit reduziertem Rutin-Gehalt keine antidepressive Wirkung im Forced-Swimming-Test an Ratten im Gegensatz zu Hypericum-Extrakten mit normalem Rutin-Gehalt [167]. Für 1 μM Rutin (Quercetin-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1→6)-β-D-glucopyranosid) ergab sich nach 72 h Inkubation von C6-Zellen eine dem Hyperosid (Quercetin-3-O-β-D-galaktosid) vergleichbare Reduktion der Alexa532-NA Bindung um 50,3 (±26,18) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 4,0. Eine Inkubation mit Quercetin hatte keinen Einfluss auf die Ligandbindung und das Verhältnis  $\tau_{\text{Diff1}}$  zu  $\tau_{\text{Diff2}}$ . Demnach scheint eine Glykosilierung in Position 3 des Flavonoid-Grundgerüsts

nicht nur für die Aufnahme von Flavonoiden über die Barrieren des Dünndarmes und der Blut-Hirn-Schranke ins ZNS von Bedeutung zu sein [110], sondern auch für antidepressive Effekte im Tiermodell und Einflüsse auf postmembranäre Effekte der Rezeptorregulation.

Die Biflavonoide Amentoflavon und I3,I18-Biapigenin zeigten keine signifikanten Einflüsse auf die Alexa532-NA-Bindung im Assay, jedoch veränderte sich der Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  unter Amentoflavon stärker als unter Biapigenin. Für Amentoflavon wurde in einer Studie über eine Bindung an Serotonin-, Dopamin-, Opioid-, und Benzodiazepinrezeptoren sowie an Dopamintransporter berichtet [41]. I3,I18-Biapigenin zeigte in einer anderen Untersuchung Bindung an den Estrogen- $\alpha$ -Rezeptor [210]. Inkubationen mit 1  $\mu\text{M}$  des trizyklischen Neuroleptikums Chlorpromazin für 72 h ergaben ebenfalls eine signifikante Reduktion der Alexa532-NA-Bindung um 20,3 ( $\pm$  3,6) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 4,0. Die Abnahme in der Bindung resultierte ausschließlich durch eine Abnahme in  $\tau_{\text{Diff2}}$ . Chlorpromazin ist ein in der Literatur beschriebener Hemmer der Clathrin-coated-pit-abhängigen Internalisierung von Rezeptoren [219]. Dies geschieht durch Umverteilung des AP-2 Proteins auf Endosomen. AP-2 wird für die Verankerung des Clathrins in der Zellmembran und in der Folge für dessen Vernetzung benötigt [114]. Chlorpromazin führt so zu einem Verlust an coated-pits an der Zellmembran und zu einer Ansammlung von Clathrin-coats der gleichen Zusammensetzung auf endosomalen Membranen [247]. Nach Inkubationen von C6-Zellen mit den kationisch amphiphilen Substanzen Chlorpromazin (10  $\mu\text{M}$ ) und Desipramin (5  $\mu\text{M}$ ) wurden gleichartige vesikuläre Strukturen im Zytosol der Zellen lichtmikroskopisch sichtbar. Diese Befunde liefern einen weiteren Hinweis für eine postmembranäre Beeinflussung der Regulation membranständiger Rezeptoren durch Desipramin, welche sich im hier etablierten FCS-Bindungsassay durch eine Abnahme des  $\beta_2$ -AR-Ligandkomplexes mit  $\tau_{\text{Diff2}}$  bestimmen lässt. Um zu überprüfen, ob die durch Desipramin und die Naturstoffe bedingte Reduktion der Ligandbindung im FCS-Bindungsassay auch mit einem hemmenden Einfluss auf die Signalübertragung in den Zellen einherging, wurde mittels eines Chemilumineszenz-basierten Enzyme-Fragment-Complementation (EFC)-Assays die Agonist-stimulierbare Bildung von intrazellulärem cAMP bestimmt. Die Vorbehandlung der C6-Zellen erfolgte analog den FCS-Messungen subchronisch mit jeweils 1  $\mu\text{M}$  Desipramin, Hyperforin, Hyperosid und zusätzlich Miquelianin für 72 h. Gegenüber dem Basalwert in unstimulierten Kontrollzellen erhöhte sich nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  des selektiven  $\beta_2$ -AR Agonisten Terbutalin für 30 min die intrazelluläre cAMP-Konzentration um 3,9 pmol cAMP / 25000 Zellen / Well, was einer Zunahme im Chemilumineszenzsignal von 107,0 ( $\pm$  27,1) RLU (relative light units) entsprach. In vorbehandelten Zellen resultierte nach Stimulation ein reduzierter cAMP-Anstieg, ausgedrückt als Abnahme im Chemilumineszenzsignal um 22,2 ( $\pm$  5,4) % für Desipramin, 41,1 ( $\pm$  3,1) % für Hyperforin, 30,3 ( $\pm$  8,0) % für Hyperosid und 56,7 ( $\pm$  20,4) % für Miquelianin. Demnach wurde durch Inkubation mit den Substanzen, welche im FCS-

Bindungsassay zu einer Abnahme der Alexa532-NA-Bindung geführt hatten, auch die nachgeschaltete  $\beta_2$ -adrenerg vermittelte Signalübertragung in die Zellen reduziert. Dieser Befund zeigt, dass ein Verlust an Ligand-Bindungsstellen, und hier vornehmlich der funktionalitätsassoziierten Rezeptor-Ligand-Komplexe mit  $\tau_{Diff2}$ , an eine Desensitivierung der Zellen im Sinne von verminderter  $\beta_2$ -adrenerger Signaltransduktion gekoppelt ist. Für die Reinsubstanzen Hyperforin sowie für Hyperosid und dessen Metaboliten Miquelianin konnte erstmals eine Reduktion der intrazellulären cAMP-Bildung, vermittelt über  $\beta_2$ -AR und Adenylatzyklase, gezeigt werden. Inwieweit die hier eingesetzte Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  im Assay von physiologischer Relevanz sind, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Für Hyperforin wurden steady-state-Plasmakonzentrationen nach üblichen therapeutischen Gaben von ca. 180 nM sowie eine maximale Plasmakonzentration von 280 nM nach einmaliger Gabe von 300 mg Hypericum-Extrakt (14,8 mg Hyperforin) bestimmt [16]. Für synthetische Antidepressiva werden in der Regel steady-state Plasmakonzentrationen im nanomolaren Bereich berichtet [183,235]. So werden für Desipramin therapeutische Plasmalevel von 0,1 -1  $\mu\text{M}$  gefunden [198]. Für glykosylierte Quercetin-Flavonoide aus *Hypericum perforatum* wurden in einer Studie Plasmakonzentrationen im einstelligen micromolaren Bereich nach einmaliger Fütterung eines alkoholischen Hypericum-Extraktes bestimmt [177]. Die insgesamt resultierenden Konzentrationen im ZNS dürften jedoch für alle Substanzen deutlich unter den Plasmakonzentrationen liegen. Davon ausgehend sind die in den meisten biochemischen Assays zur Untersuchung der Wirkmechanismen von synthetischen Antidepressiva und *Hypericum perforatum*-Inhaltsstoffen eingesetzten Konzentration im ein- bis zweistelligen micromolaren Bereich als unphysiologisch hoch anzusehen. Jedoch erklärt dies vielleicht das Einsetzen von Effekten auf biochemische Parameter der Zellregulation schon nach wenigen Tagen, wohingegen klinische Effekte mehrere Wochen zur Manifestation benötigen. Unter Umständen hängt dies auch mit einer geringen Bioverfügbarkeit, schlechter Überwindung der Blut-Hirn-Schranke und einer erst allmählichen Anreicherung der Wirkstoffe in pharmakologisch relevanten Strukturen zusammen [13,36].

Der Einfluß von Hyperforin und Hyperosid auf das  $\beta$ -adrenerge Rezeptorsystem wurde mit einer Kombination aus Fluoreszenzmikroskopie und FCS in der Biomembran lebender Zellen weiterführend untersucht. Hierfür kamen C6- und HEK293-Zellen zum Einsatz, welche stabil mit GFP-Fusionsproteinen des  $\beta_1$ - (C6 $\beta_1$ AR-GFP) und des  $\beta_2$ - (HEK293 $\beta_2$ AR-GFP) adrenergen Rezeptors transfiziert wurden und den jeweiligen Rezeptorsubtyp überexprimierten. Über potentielle Veränderungen in der Verteilung der rezeptorgekoppelten, membranständigen GFP-Fluoreszenz und deren Mobilitäten sollten ligandunabhängige Einflüsse auf die Rezeptorregulation untersucht werden. Als Positivkontrolle wurde auch hier Desipramin herangezogen, welches bereits in einer Studie einen hemmenden Einfluss auf das Rezeptorrecycling in C6 $\beta_1$ AR-GFP nach Isoprenalin-Stimulation gezeigt hatte [34]. FCS-

Messungen in der Biomembran führten in C6 $\beta_1$ AR-GFP zu 2 charakteristischen Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff1}} = 0,78 (\pm 0,18)$  ms mit  $D_1 = 0,11 (\pm 0,02) \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s und  $\tau_{\text{Diff2}} = 122,53 (\pm 69,41)$  ms mit  $D_2 = 6,98 (\pm 3,96) \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,0. In HEK293 $\beta_2$ AR-GFP konnten Diffusionszeitkonstanten von  $\tau_{\text{Diff1}} = 1,37 (\pm 0,87)$  ms mit  $D_1 = 6,25 (\pm 3,97) \times 10^{-8}$  cm<sup>2</sup>/s und  $\tau_{\text{Diff2}} = 126,02 (\pm 59,76)$  ms mit  $D_2 = 6,79 (\pm 3,22) \times 10^{-10}$  cm<sup>2</sup>/s und einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  von 1,7 bestimmt werden. Die Verteilung der Rezeptormobilitäten korrelierte hier gut mit der Verteilung für die Rezeptor-Ligandkomplexe mit  $\tau_{\text{Diff1}}$  und  $\tau_{\text{Diff2}}$  im Alexa532-NA Bindungsassay in C6-Zellen. Die aus den Diffusionszeitkonstanten  $\tau_{\text{Diff2}}$  abgeleiteten Diffusionskoeffizienten repräsentieren für beide hier untersuchten  $\beta$ -AR-Fusionsproteine typische Geschwindigkeiten für membranständige Proteine. Ähnliche Mobilitäten wurden bereits für GFP-Fusionsproteine in Golgi-Membranen mit  $D = 3 - 5 \times 10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s [49] und ein  $\beta_2$ -AR-GFP-Fusionsprotein mit  $D = 4 - 12 \times 10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s [8] mittels FRAP bestimmt, sowie für ein Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor-GFP-Fusionsprotein mit  $D = 1,6 (\pm 0,9) \times 10^{-9}$  cm<sup>2</sup>/s [27] mittels FCS. Die von  $\tau_{\text{Diff1}}$  abgeleiteten Diffusionskoeffizienten repräsentieren eine deutlich schnellere Fraktion membranärer Rezeptormobilität. Diese können einem mehr oder weniger ungehinderten lateralen Mobilitätszustand zugeordnet werden, vergleichbar der schnellen, niedrigaffinen Komponente des Alexa532-NA- $\beta_2$ -AR-Komplexes im FCS-Bindungsassay.

Eine Stimulation mit 10  $\mu$ M Isoprenalin führte nach 30 min in C6 $\beta_1$ AR-GFP und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP zu einer Internalisierung membranständiger Rezeptoren, welche in Form von vesikulären Strukturen im Zytosol der Zellen und einer Abnahme der membranären Fluoreszenz sichtbar wurde. Dieser Befund ließ sich mittels FCS-Messungen an stimulierten Zellen über eine Abnahme der im Fokus detektierten Partikelzahlen quantifizieren. Die Abnahme an membranständigen Rezeptoren durch endozytische, endosomale Internalisierungsprozesse korrelierte mit Veränderungen in der langsamen Diffusionszeitkonstante  $\tau_{\text{Diff2}}$ . In C6 $\beta_1$ AR-GFP verlangsamte sich diese signifikant auf 196,80 ( $\pm 106,67$ ) ms, wobei sich der Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  nur unwesentlich von 1,0 nach 1,3 veränderte. In HEK293 $\beta_2$ AR-GFP veränderte sich der Quotient  $\tau_{\text{Diff1}} / \tau_{\text{Diff2}}$  signifikant von 1,7 nach 1,2 in Richtung  $\tau_{\text{Diff2}}$ , wobei die Diffusionszeitkonstante mit 124,30 ( $\pm 93,76$ ) ms nahezu unverändert blieb. Der Anteil an Rezeptoren mit langsamerer Diffusionszeitkonstante kann daher auch hier als funktionalitätsgekoppelt, und an Vorgängen der Rezeptorregulation und Internalisierung beteiligt, betrachtet werden. Nach subchronischer Vorbehandlung von C6 $\beta_1$ AR-GFP mit jeweils 1  $\mu$ M Hyperforin und Hyperosid für 6 Tage konnte ebenfalls eine Abnahme in der membranständigen Fluoreszenz der Zellen gefunden werden. Desweiteren zeigten sich vesikuläre Strukturen im Zytosol der Zellen, was auf eine Internalisierung membranständiger Rezeptoren schließen ließ. 1  $\mu$ M Desipramin zeigte einen gleichartigen Effekt. Dieser Befund ist insoweit interessant, als in einer früheren Studie nach Inkubation

mit 10  $\mu\text{M}$  Desipramin für 6 Tage keine internalisierten Rezeptoren im Zytosol von  $\text{C6}\beta_1\text{AR-GFP}$  gefunden wurden, und sich ein Einfluß von Desipramin auf die Rezeptorregulation erst auf das nachgeschaltete Rezeptorrecycling nach Agonist-Stimulation herausstellte [34]. FCS-Messungen in der Biomembran von  $\text{C6}\beta_1\text{AR-GFP}$  nach 3 tägiger Vorbehandlung zeigten einen Einfluß von Hyperforin, Hyperosid und Desipramin auf die Rezeptordynamiken in der Biomembran. Es resultierte eine signifikante Umverteilung der verbliebenen Rezeptoren in den funktionalitätsgekoppelten Mobilitätszustand  $\tau_{\text{Diff}2}$  nach 56,3 ( $\pm$  6,5) % mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 0,8 für Hyperforin und 57,9 ( $\pm$  5,9) % und einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 0,7 für Hyperosid, gegenüber 49,9 ( $\pm$  6,7) % in Kontrollzellen mit einem Quotienten  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 1,0. Für Desipramin ergab sich eine Umverteilung in  $\tau_{\text{Diff}2}$  nach 56,7 ( $\pm$  8,8) % und ein Quotient  $\tau_{\text{Diff}1} / \tau_{\text{Diff}2}$  von 0,8. Die Veränderungen in der zellulären Verteilung der Rezeptoren zwischen Biomembran und Zytosol korrelierten demnach mit einer Veränderung der membranären Rezeptormobilitäten. Eine zusätzliche Inkubation mit 10  $\mu\text{M}$  Isoprenalin führte in Desipramin-vorbehandelten Zellen nach 30 min zu keiner nennenswerten Steigerung der Rezeptorinternalisierung. In mit Hyperforin und Hyperosid vorbehandelten Zellen konnte hingegen die Ausbildung zusätzlicher vesikulärer Strukturen im Zytosol der Zellen gezeigt werden. Die Befunde lassen auf eine gleichgerichtete, postmembranäre Beeinflussung der  $\beta_1\text{-AR-GFP}$  Rezeptorregulation am postsynaptischen Modell der C6-Zellen durch die Naturstoffe und Desipramin schließen, wobei sich Unterschiede in der verbleibenden agonistischen Ansprechbarkeit der Zellen zeigten.

Interessanterweise konnten in  $\text{HEK293}\beta_2\text{AR-GFP}$  nach 6 tägiger Inkubation weder für Hyperforin und Hyperosid, noch für Desipramin vesikuläre Strukturen internalisierter Rezeptoren im Zytosol der Zellen nachgewiesen werden. Legt man die Ergebnisse der Rezeptor-Ligand-Bindungsstudien und der Messungen an  $\text{HEK293}\beta_2\text{AR-GFP}$  für Einflüsse von Hyperforin und Hyperosid auf das  $\beta_2\text{-adrenerge}$  Rezeptorsystem zugrunde, scheint der Einfluss der Naturstoffe nicht primär in einer Desensitivierung von Zellen im Sinne einer durch Internalisierung vermittelten Downregulation von Rezeptoren zu liegen, sondern vielmehr in einer Veränderung des konformativen Rezeptorstatus und einem damit einhergehenden Affinitätsverlust für  $\beta\text{-adrenerge}$  Liganden. Der diesem Phänomen zugrunde liegende Mechanismus sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein. Inwieweit der begrenzte zeitliche Rahmen von maximal 6 Tagen Inkubation für die Beobachtung einer Beeinflussung der Rezeptorendichte durch Rezeptorinternalisierung oder verzögertem Rezeptorrecycling ausreichend war kann nicht abschließend beurteilt werden. Im Rezeptor-Ligand-Bindungsassay konnten jedoch schon nach 3 Tage Inkubation signifikante Veränderungen in der Rezeptorregulation am  $\beta_2\text{-AR}$  beobachtet werden.

Im Falle des  $\beta_1\text{-AR}$  konnten hingegen in  $\text{C6}\beta_1\text{AR-GFP}$  eine durch die Naturstoffe vermittelte Internalisierung und damit einhergehende Veränderung in der Verteilung der



Rezeptormobilitäten sowie Unterschiede in der verbleibenden agonistischen Ansprechbarkeit der Zellen im Vergleich mit Desipramin bestimmt werden.

Interessanterweise zeigten die  $\beta_1$ -AR hier einen Anstieg des Anteils an verlangsamter Rezeptormobilität  $\tau_{Diff2}$ , wohingegen für  $\beta_2$ -AR-Ligand-Komplexe eine Abnahme dieser Komponente nach Inkubation mit Hyperforin und Hyperosid sowie Desipramin zu verzeichnen war. Offensichtlich wirken diese Substanzen in unterschiedlicher Weise auf die Subtypen  $\beta_1 / \beta_2$  des adrenergen Rezeptors ein. Eine differenzierte Betrachtung der Einflüsse von Hyperforin, Hyperosid und Desipramin auf die unterschiedlichen Subtypen des  $\beta$ -adrenergen Rezeptorsystems ist von weiterführendem Interesse, da bereits gezeigt werden konnte, dass das relative Vorkommen von  $\beta_1 / \beta_2$ -AR die Aktivität nachgeschalteter Effektoren, z.B. der Adenylatzyklase, unterschiedlich beeinflusst [84,265]. In diesem Zusammenhang wird auch von einer höheren Effizienz des  $\beta_2$ -AR für die Stimulation der Adenylatzyklase berichtet [134].

Die hier präsentierten Ergebnisse tragen zum Verständnis des Wirkmechanismus von Hypericum-Extrakten für die zulassungsrelevanten Indikationen psychovegetative Störungen, depressive Verstimmungszustände einschließlich mittelschwerer Depression, Angst und / oder nervöse Unruhe, bei. Welche postmembranären Mechanismen für die durch Hyperforin und Hyperosid ausgelöste Reduktion der  $\beta$ -adrenergen Ansprechbarkeit eine Rolle spielen, bedarf weitergehender Untersuchungen. Für Desipramin wurde z.B. eine mögliche Beteiligung der Proteinkinase C und der Phospholipase  $A_2$  an der Downregulation  $\beta$ -adrenerger Rezeptoren durch einen direkten postsynaptischen Mechanismus gezeigt [143]. Unter Verwendung weiterer Liganden, wie z.B. fluoreszenzmarkiertem Serotonin, könnte der Einfluss der Naturstoffe auf andere für die Depressionsgenese relevante Rezeptorsysteme an lebenden Zellen untersucht werden. Einflüsse auf den gesamten Kreislauf der Rezeptorregulation könnten analog den hier vorgestellten Daten mittels weiterer Rezeptor-GFP-Fusionsproteine bestimmt werden. Fluoreszenzbasierte Untersuchungsmethoden auf Einzelmolekülebene wie FCS oder Single Particle Tracking bieten in diesem Zusammenhang gute Voraussetzungen für Messungen in der komplexen Umgebung von Biomembranen in physiologisch intakten Systemen. Die Zusammenhänge zwischen der Diffusion von membranständigen Rezeptoren und verschiedenen funktionellen Zuständen sind von großem pharmakologischem Interesse und sollten auch hinsichtlich des Einflusses von potentiell antidepressiv wirksamen Substanzen weiter erforscht werden. Da für die meisten Antidepressiva der Wirkmechanismus nicht abschließend geklärt ist und die therapeutische Wirksamkeit und Sicherheit der gesamten Arzneistoffgruppe der Antidepressiva immer wieder angezweifelt wird, sind weitergehende Forschungen auf diesem Gebiet notwendig.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Geräte

#### 5.1.1 FCS

Geräte-Setup ConfoCor<sup>®</sup> (Zeiss/Evotec, Jena/Hamburg): Laser: Argon-Ionen Laser (LGK 7812 ML 2, Lasos; Jena), Wasserimmersions-Objektiv (C-Apochromat, 63 x, NA 1.2, Zeiss); variable Lochblenden-Einrichtung, (Standardeinstellung, wenn nicht anders erwähnt: 40  $\mu\text{m}$ ); Anregungswellenlängen: 488 nm (verwendete Flächenleistung, gemessen vor Objektiv:  $p_{488\text{nm}} = 4,7 \text{ kW/cm}^2$ ) und 514 nm ( $p_{514\text{nm}} = 14,2 \text{ kW/cm}^2$ ); Wellenlängensplitting: 488 nm: Farbteiler FT 510, Emissionsfilter BP 515-565; 514 nm: FT 540, EF 530-600 (alle Zeiss); Detektionseinheit: Avalanche-Photodioden-Detektor (SPCM-AQ Series, EG & G Optoelectronics, Kanada); Datenverarbeitung und -aufzeichnung: Digitaler Hardware Korrelator (ALV-5000, ALV, Langen); Kamera: AxioCam Mrm (1,4 MegaPixel, Zeiss); Kamerasoftware: Axiovision AC (Zeiss); FCS-Software: FCS Access Control Software V. 1.2, FCS Access Fit Software V. 1.0.12. (Zeiss). Zur Kalibrierung des Beobachtungsvolumens wurde für eine 10 nM-Lösung von OregonGreen<sup>®</sup> (488 nm), bzw. Tetramethylrhodamin (514 nm, beide Molecular Probes, Leiden, NL) die Diffusionszeitkonstante als Mittelwert aus 10 Einzelmessungen bestimmt und über den bekannten Diffusionskoeffizienten von  $D = 280 \mu\text{m}^2/\text{s}$  die Ausdehnung und Symmetrie des konfokalen Volumenelementes errechnet (s. Kapitel 1.3.2, Gleichung 3).

#### 5.1.2 HPLC-Ausstattung

HPLC-Pumpe MSDS 600 E (Waters, Eschborn); Dioden Array Detektor 996 (Waters); Autosampler WISP 712 (Waters); 4-Kanal-Online Entgaser (Knauer, Berlin); Software Millennium V2.1 (Waters). Alle UV/VIS-spektroskopischen Daten wurden mit einer Auflösung von 3 nm in der mobilen Phase des jeweiligen HPLC-Systems aufgezeichnet.

### 5.1.3 Fluoreszenzmikroskop

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Zellen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 100M (Zeiss), Ölimmersionsobjektiv Plan Neofluar (100 x, NA 1.3, Zeiss), Kamera: AxioCam HRm (Zeiss), Lampe: Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50 (Zeiss), Software: Axiovision 3.1, durchgeführt.

Alternativ wurden Aufnahmen parallel zu FCS-Messungen am ConfoCor<sup>®</sup> mit einer zusätzlichen HBO 50 (Zeiss), deren Licht über einen beweglichen Spiegel (Mechanik: Eigenbau, Spiegel: Mirror Elliptic AN AL 1.25 (Edmund Optik, Karlsruhe)) in den Strahlengang des Mikroskops gelenkt wurde, gemacht.

### 5.1.4 Massenspektrometrie

Die MALDI-TOF Massenspektren wurden mit einem Voyager-DE STR Massenspektrometer (PE Biosystems) aufgenommen. Laser: Nitrogen Laser 337 nm; Mode of operation: Reflector; Extraction mode: Delayed; Polarity: Positive; Accelerating voltage: 20000 V; Grid voltage: 70 %; Mirror voltage ratio: 1.12; Extraction delay time: 150 nsec; Number of laser shots: 100 / spectrum; Calibration matrix:  $\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamäure; Shots in spectrum: 500.

## 5.2 Zellkulturen

### 5.2.1 Pränatale hippocampale Neurone

Die pränatale Kultur hippocampaler Ratten-Neurone wurde aus Wistar-Ratten am Embryonaltag 19 gewonnen. Nach Mikrodissektion der embryonalen Rattenhirne wurden die Hippocampi unter dem Binokular entnommen und durch Trituration vereinzelt. Nach Bestimmung der Zellzahl wurden ca.  $2,5 \times 10^5$  Zellen /  $\text{cm}^2$  auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Coverslips ausgesät (Beschichtungspuffer: 1,91 % Borax, 1,2 % Borsäure, 1mg/10ml Poly-L-Lysin (Sigma, Taufkirchen)). Die Anzucht erfolgte in 12 x Multiwells (Nunc, Wiesbaden) unter Verwendung von Start-V Medium + Penicillin/Streptomycin 100 U/ml (Biochrome, Berlin) im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte. Die kultivierten hippocampalen Neurone wurden von Tag 8 nach Inkulturnahme bis Tag 14 für die FCS-Messungen verwendet.

### 5.2.2 N2a-Zellen

Die N2a-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Nr.: ACC 148) wurden von Frau Prof. Schmitz vom Institut für Tierwissenschaften der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Sie wurden zwischen Passage 6 und 15 für die Messungen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium + 10 % Fetales Kälberserum + Penicillin/Streptomycin 100 U/ml (alles Gibco BRL<sup>®</sup>, Karlsruhe) in 10-cm Zellkulturschalen (Falcon). Für die Lebendzell-FCS-Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von  $2,5\text{--}5 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> auf zuvor hitzesterilisierten Deckgläschen für die Mikroskopie (#1, Durchmesser 18 mm, Menzel-Gläser, Braunschweig) in 12 x Multiwellschalen (Nunc, Wiesbaden) ausgesät. Die Anzucht erfolgte für 2 bis 4 Tage im Inkubator bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte. Die Zellen wurden nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz für die Experimente benutzt.

### 5.2.3 C6-Zellen

Die C6-Zellen (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) Nr.: ACC 550) wurden von Herrn Prof. Franz vom Anatomischen Institut der Universität Bonn zur Verfügung gestellt. Sie wurden zwischen Passage 10 und 30 für die Messungen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-F12 Medium + Glutamin 2 mM + Penicillin/Streptomycin 100 U/ml + 5 % Fetales Kälberserum (alles Gibco BRL<sup>®</sup>, Karlsruhe) in 10-cm Zellkulturschalen (Falcon). Die Aussaat der Zellen für FCS-Experimente erfolgte analog Kapitel 5.2.2.

### 5.2.4 C6 $\beta_1$ AR-GFP Zellen

Die C6-Zellen (Europäische Zellbank (ECACC) Nr.: 92090409), stabil transfiziert mit einem  $\beta_1$ Adrenozeptor-EGFP Konstrukt ( $\beta_1$ AR-GFP), wurden von Herrn Prof. Honegger vom Institut für Pharmakologie der Universität Bern zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde Wildtyp humane  $\beta_1$ AR DNA mit *EcoRI* und *Apal* aus pSP65-  $\beta_1$ AR gewonnen und in pcDNA3 (Invitrogen) subkloniert. Enhanced green fluorescent protein (EGFP; Clontech) wurde an den C-Terminus des humanen  $\beta_1$ AR fusioniert. Die 3'-Endsequenz des  $\beta_1$ AR mit dem Stopcodon wurde mit *TfiI* entfernt. Um das 3'-Ende der kodierenden Sequenz wieder herzustellen und eine geeignete *Bam*HI-Schnittstelle am 3'-Ende für die Fusion an EGFP zu erhalten, wurden die komplementären synthetischen Oligonucleotide 5'-AATCCAAGGTGGATCTGCAG-3' und 5'-GATCCTGCAGATCCACCTTGG-3' für die Ligation an pEGFP-N1 (Clontech) benutzt.

Die vorausgesagte Nucleotidsequenz der Fusionsregion wurde mit Didesoxy-Sequenzierung des resultierenden Produktes,  $\beta_1$ AR-GFP, bestätigt. Der synthetische Linker zwischen  $\beta_1$ AR und EGFP kodiert für die Aminosäuren ESKVDLQ, wobei die Aminosäuren ESKV den ursprünglichen C-Terminus des  $\beta_1$ AR wiederherstellen. Stabile Transfektion: C6-Zellen wurden in 10-cm Schalen bis 80 % Konfluenz angezogen. Das  $\beta_1$ AR-GFP Plasmid (6 $\mu$ g) wurde mit *AflIII* linearisiert und mit 20  $\mu$ l LipofectAMINE-Reagenz (Invitrogen) nach Herstellerangaben gemischt und den Zellen für 8 Stunden zugegeben. Zwei Tage nach Transfektion wurden die Zellen trypsinisiert, verdünnt und in 96-Well Schalen (Falcon) in einer Dichte von 15.000 Zellen / Well ausgesät. Stabil transfizierte Zellen wurden über G418-Sulfat (500  $\mu$ g/ml; Calbiochem) selektiert, welches 72 h nach Transfektion zum Kultur-Medium gegeben wurde. Antibiotikum-resistente Zellen wurden 2 Wochen nach Transfektion identifiziert. Diese wurden limitierend in 96-Well Schalen ausgesät um die klonale C6 $\beta_1$ AR-GFP Zelllinie zu etablieren. Zelllinien mit den höchsten Expressionsleveln wurden mittels Western-Blot und Fluoreszenzmikroskopie identifiziert.

Die Zellen wurden zwischen Passage 25 und 40 für die Messungen verwendet.

Die Kultivierung erfolgte in DMEM-F12 Medium + Glutamin 2 mM + Penicillin/Streptomycin 100 U/ml + 10 % Fetales Kälberserum (alles Gibco BRL<sup>®</sup>, Karlsruhe) in 10-cm Zellkulturschalen (Falcon). Für die Lebendzell-Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von 1,25–2,5 x 10<sup>4</sup> Zellen / cm<sup>2</sup> auf zuvor hitzesterilisierten Glascoverslips in 12 x Multiwellschalen ausgesät. Die Anzucht erfolgte für 2 bis 6 Tage im Inkubator bei 5 % CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte. Die Zellen wurden nach Erreichen von 70-80 % Konfluenz für die Experimente benutzt.

### 5.2.5 HEK293 $\beta_2$ AR-GFP Zellen

HEK293 (Human embryonal kidney) -Zellen (DSMZ Nr.: ACC 305) wurden mit einem  $\beta_2$ -AR-EGFP Konstrukt ( $\beta_2$ AR-GFP, Prof. Lohse, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universität Würzburg) stabil transfiziert. Humaner Wildtyp  $\beta_2$ -AR wurde mit *NcoI* / *XbaI* aus einem modifizierten PCR-Produkt (Stop-Codon durch *XbaI*-Schnittstelle mit zwei zusätzlichen Aminosäuren Serin und Arginin ersetzt) entfernt. GFP wurde mit *XbaI* / *SalI* aus einem modifizierten PCR-Produkt (*XbaI*-Schnittstelle am N-Terminus und *SalI*-Schnittstelle am C-Terminus) aus pHGFP-S65T (Clontech) entfernt. Die beiden PCR-Produkte wurden in den mit *NcoI* / *SalI* geöffneten Vektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert. Das resultierende Plasmid pcb2arG wurde für die stabile Transfektion in HEK293 Zellen benutzt.

Stabile Transfektion: Das  $\beta_2$ AR-GFP Plasmid (2  $\mu$ g) wurde mit ExGene-Reagenz (Fermentas) (6,6  $\mu$ l) nach Herstellerangaben gemischt und den Zellen in 3,5 cm Kulturschalen (Sarstedt) mit ~ 25.000 Zellen für 3 Stunden zugegeben. Transfizierte Zellen

wurden über G418-Sulfat (500 µg/ml, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich) selektiert, welches 72 h nach Transfektion zum Kultur-Medium gegeben wurde. Antibiotikum-resistente Zellen wurden 2 Wochen nach Transfektion identifiziert. Diese wurden limitierend in 96-Well Schalen ausgesät um die klonale HEK293β2AR-GFP Zelllinie zu etablieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurden Klone mit möglichst niedrigen Expressionsleveln für FCS-Messungen identifiziert. Die Zellen wurden zwischen Passage 10 und 30 für die Messungen verwendet. Die Kultivierung erfolgte in DMEM-F12 Medium + Glutamin 2 mM + Penicillin/Streptomycin 100 U/ml + 5 % Fetales Kälberserum (alles Gibco BRL<sup>®</sup>, Karlsruhe) in 10-cm Zellkulturschalen (Sarstedt). Die Aussaat der Zellen für Lebendzell-Experimente erfolgte analog Kapitel 5.2.4.

### 5.3 Synthese und Analytik des fluoreszenzmarkierten Alexa532-Noradrenalin

0,126 mg (-)Arterenol (Sigma-Aldrich, Taufkirchen) und 0,06 mg Alexa Fluor<sup>®</sup> 532-Carbonsäuresuccinimidylester (Molecular Probes) wurden jeweils in 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma) gelöst. Die Lösungen wurden tropfenweise miteinander vereint und für 24 h unter Lichtausschluss bei RT gerührt. Die präparative Trennung des Reaktionsgemisches erfolgte über HPLC mit einem SMART-System (Pharmacia): Säule: Superdex Peptide PC 3.2/30 (Amersham Bioscience); Fließmittel: Ethanol (10%, v/v); Fluß: 50 µl/min; Dioden Array Detektion: 285 nm, 214 nm und 532 nm. Die Reinheitsbestimmung erfolgte mittels analytischer HPLC auf einer LiChrospher RP8-select B (125 x 4 mm, 5 µm) Säule, (Merck, Darmstadt); Fließmittel: Acetonitril / H<sub>2</sub>O / Methanol / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % = 23 / 72,5 / 4 / 0,5 (v/v/v/v); Flußrate: 1 ml / min (isokratisch) (alle Lösungsmittel: HPLC gradient grade (Merck, Darmstadt)). Das verwendete Wasser stammte aus einer Reinstwasseranlage Nanopure (Barnstead). Die Peakdetektion erfolgte bei 254 nm und 488 nm über eine Dioden Array Detektion. Die Identität des Produktes wurde über UV-VIS-Spektroskopie und MALDI-TOF MS für Alexa532-NA (778.2019 gemessen; 778.8840 berechnet) bestimmt.

Die so erhaltenen aufgereinigten Fraktionen wurden vereint, lyophilisiert und in Aliquots zu 6,08 µg bei -20 °C gelagert.

### 5.4 Lebendzellmessungen

Vor den FCS- und fluoreszenzmikroskopischen Messungen wurden die Zellen auf den Glascoverslips 3 mal mit Locke's Solution pH 7,4 (9,00 g NaCl, 0,42 g KCl, 0,34 g CaCl<sub>2</sub>-Dihydrat, 0,20 g MgCl<sub>2</sub>-Hexahydrat, 0,30 g NaHCO<sub>3</sub> (alle Merck, Darmstadt, für

biochemische Zwecke), 1,26 g HEPES (Sigma), 3,96 g D-(+)-Glucose-Monohydrat (für die Zellbiologie, Merck), Aqua bidest. ad 1000,0 ml) gewaschen.

Anschließend wurde der Coverslip in einen Spezialhalter (Eigenbau) eingesetzt, welcher 400  $\mu$ l Inkubationspuffer (Locke's Solution) über den Zellen fasste. Dieser wurde in den Halterahmen des Mikroskoptisches eingesetzt und das Objektiv von unten an die Glasfläche herangefahren. Für FCS-Messungen wurde die Positionierung des Volumenelementes in subzelluläre Kompartimente oder die umgebende Lösung in x-y-Richtung über einen schrittmotorgetriebenen Objektisch mit einer Streckenauflösung von 1  $\mu$ m vorgenommen.

In Richtung der z-Achse wurde eine Orientierung des Meßvolumens durch einen vorgeschalteten Zellscan mit einer Streckenauflösung von 0,1  $\mu$ m erreicht.

C6 Zellen mit einer Autofluoreszenz von  $< 4$  kHz wurde fluoreszenzmarkierter Ligand ins Inkubationsvolumen zugegeben und anschließend vorsichtig trituiert. Nach Eintreten des Equilibriums wurde das Volumenelement in die Biomembran positioniert. Für C6 $\beta_1$ AR-GFP Zellen und HEK293 $\beta_2$ AR-GFP Zellen wurde das Volumenelement nach erfolgtem z-Scan in das Fluoreszenzmaximum der oberen Biomembran positioniert.

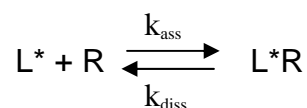
Alle Messungen wurden bei 20 °C und für maximal 60 min durchgeführt.

Die Datenauswertung aller durchgeführten Versuche wurde mit Excell (Microsoft) und Origin<sup>®</sup> 7.5 (OriginLab) durchgeführt.

## 5.5 Bindungsstudien am $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor

C6 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an gelabeltem Liganden (0,5, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 nM Alexa532-NA) 15 min inkubiert und die Bindung in der Biomembran mittels FCS bestimmt.

Der farbstoffmarkierte Ligand ( $L^*$ ) und sein Rezeptor (R) in der Zellmembran stehen mit dem korrespondierenden Rezeptor-Ligand-Komplex ( $L^*$ -R) in folgendem Gleichgewicht:



Dadurch ergibt sich eine Abhängigkeit der gebundenen Ligandkonzentration  $[L^*]_{\text{geb}}$  von der insgesamt eingesetzten Ligandkonzentration  $[L^*]_0$ :

$$[L^*]_{\text{geb}} = \frac{[L^*]_0 + B_{\text{max}} + K_D \pm \sqrt{([L^*]_0 + B_{\text{max}} + K_D)^2 - 4 \cdot [L^*]_0 \cdot B_{\text{max}}}}{2} \quad (9)$$

dabei ist  $[L^*]_{\text{geb}} = [L^*R]$  und

$$K_D = \frac{k_{\text{diss}}}{k_{\text{ass}}} = \frac{([L^*]_0 - [L^*]_{\text{geb}})(B_{\text{max}} - [L^*]_{\text{geb}})}{[L^*]_{\text{geb}}} \quad (10)$$

$B_{\text{max}}$  ist die maximale Zahl der Bindungsstellen und  $K_D$  repräsentiert die Dissoziationskonstante des Liganden. Durch Auftragen von  $[L^*]_{\text{geb}}$  gegen  $[L^*]_0$  wurden die Bindungsparameter  $K_D$  und  $B_{\text{max}}$  durch einen nicht-linearen Kurvenfit mit Gleichung (9) erhalten. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde in einem unabhängigen Experiment mit 10  $\mu\text{M}$  des  $\beta_1 / \beta_2$ -unspezifischen Antagonisten S(-)-Propranolol-HCl (Sigma) für 2 h bei 37 °C vorinkubiert, anschließend 10 nM Alexa532-NA zugegeben und weitere 15 min inkubiert. Die Beobachtung des Anbindungsverhalten von 10 nM Alexa532-NA an C6 Zellen lieferte die Assoziationskonstante  $k_{\text{ass}}$  mittels eines monomolekularen Reaktionsmodells, wiedergegeben durch Gleichung (11). Da der Ligand im Inkubationsmedium im Überschuss vorliegt, gilt  $[L_0]=\text{konstant}$ .

$$y = A_1 - A_2 e^{-k_{\text{ass}} t} \quad (11)$$

wobei  $A_1$  mit der maximalen Bindung von 100 % festgelegt wird.

Um die Spezifität der Bindung von Alexa532-NA an die Subtypen des  $\beta$ -AR zu untersuchen, wurden C6 Zellen jeweils mit 1  $\mu\text{M}$  des  $\beta_2$ -spezifischen Agonisten Terbutalin-Hemisulfat, des  $\beta_1$ -spezifischen Antagonisten ( $\pm$ )Metoprolol-Tartrat und des  $\beta_1$ - /  $\beta_2$ -unspezifischen Antagonisten S(-)-Propranolol-HCl (alle Sigma) zeitgleich mit 10 nM Alexa532-NA inkubiert.



## 5.6 Datenauswertung

### 5.6.1 FCS-Messungen

Die Datenauswertung der Messungen der freien Farbstoffe, bzw. des farbstoffmarkierten Liganden in Lösung wurde mittels der drei-dimensionalen Autokorrelationsfunktion durchgeführt (siehe Kap. 1.3.2, Gleichung 1).

Die vereinfachte Autokorrelationsfunktion  $G(\tau)$ , welcher eine zwei-dimensionale Diffusion des Rezeptor-Ligand-Komplexes bzw. des Rezeptor-GFP Fusionsproteins zugrunde liegt, wurde zur Datenauswertung der Bindungsstudien, bzw. der Mobilitätsstudien am FCS herangezogen:

$$G(\tau) = 1 + \frac{1}{N} \cdot \sum_{j=1}^n \frac{y_j}{1 + \tau / \tau_{D_j}} \quad (12)$$

Dabei ist  $y_j$  die Fraktion der Komponenten  $j$  der Autokorrelationsamplitude,  $N$  die mittlere Anzahl der Teilchen im effektiven Detektionsvolumen und  $\tau_{D_j}$  die Diffusionszeitkonstante der Komponente  $j$ . Diese Funktion konnte verwendet werden, da der Unterschied zwischen der drei- und zwei-dimensionalen Autokorrelationsfunktion weniger als 6 % für die berechneten Diffusionszeitkonstanten und weniger als 1 % für die Berechnung der korrespondierenden Partikelanzahl betrug. Messungen mit einem Triplettanteil  $> 20$  % an der Autokorrelationsamplitude wurden nicht für die Auswertungen herangezogen.

Die Autokorrelationskurve  $G(\tau)$  wurde mittels der nicht-linearen Quadrat-Flächen-Minimierung nach dem Marquardt Algorithmus angefitet [145].

### 5.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Signifikanz wurde mittels einfaktorierlicher Varianzanalyse (ANOVA) bewertet. Alle Messwerte aus den Lebendzell-FCS Experimenten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von 6 Messungen pro Zelle an mindestens 3 verschiedenen Zellen pro Coverslip an mindestens 2 voneinander unabhängigen Versuchstagen durchgeführt.

Ergebnisse einzelner Versuchsreihen wurden ausschließlich mit den am gleichen Tag durchgeführten Kontrollexperimenten verglichen. Durch Normalisierung der Absolutwerte wurden die unterschiedlichen Versuchsreihen miteinander verglichen.

Ergebnisse mit einem  $p < 0,05$  wurden als signifikant, mit  $p < 0,01$  als hochsignifikant und mit  $p < 0,001$  als höchstsignifikant angesehen.

## 5.7 cAMP-Messungen

Intrazelluläre Konzentrationen von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in C6 Zellen wurden mit einem HitHunter™ cAMP Assay Kit für adherente Zellen und EFC (Enzyme fragment complementation) Chemilumineszenz-Detektion (Amersham Biosciences) bestimmt. Dieses setzt sich zusammen aus: Zell-Lysis-Reagenz, EA-Reagenz (Enzym-Akzeptor), ED-cAMP-Reagenz (Enzym-Donor), anti-cAMP Antikörper, Chemilumineszenz  $\beta$ -Galactosidase Substrat-Reagenzien (alle DiscoverX, Fremont, CA).

C6 Zellen wurden in einer Dichte von 6000 Zellen / Well in 96-Well Schalen ausgesät und für 72 h mit Testsubstanzen in 100  $\mu$ l DMEM-Medium bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und gesättigter Luftfeuchte inkubiert. Zu Beginn des Assays wurde das Medium abgesaugt und durch 80  $\mu$ l serumfreies Medium ersetzt und 10 min inkubiert. Dann wurde den Zellen, wo angezeigt, 20  $\mu$ l Agonist (Terbutalin-Hemisulfat, Sigma, Endkonzentration 10  $\mu$ M) oder Phosphatpuffer (10 mM PBS pH 7,4: 0,26 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2,17 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 8,71 g NaCl (alle Merck, Darmstadt), Aqua bidest. ad 1000 ml) zugegeben und für 30 min bei 37 °C inkubiert.

Anschließend wurde das Medium abgesaugt und 40  $\mu$ l Lysis-Puffer und anti-cAMP-Antikörper-Reagenz (Mischung) hinzugefügt und 60 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Dann wurden 20  $\mu$ l ED-Reagenz (Kontrolle: PBS) zugegeben und weitere 60 min bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Danach wurden 50  $\mu$ l EA-Reagenz mit Chemilumineszenz-Substrat-Mix (Mischung) zugegeben und für 2 h bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Anschließend wurden die 96-Well Platten in einem Fluoreszenzreader Tecan GENios™ (Tecan) im Chemilumineszenz-Modus mit 1s / Well ausgelesen. Das Datenprocessing erfolgte über die Software Magellan 3.0.

## 5.8 Substanzen

### 5.8.1 Inhaltsstoffe aus *Hypericum perforatum* L.

Zellen wurden mit verschiedenen Hypericum-Extrakten sowie Reinsubstanzen aus Hypericum-Extrakt für 24 h – 72 h im Kulturmedium vorinkubiert: Hyperforin (Stock: 1mM in

Methanol), Hypericin (1mM in Ethanol), Amentoflavon (1 mM in 50 % Methanol (v/v)) , Biapigenin (1 mM in 50% Methanol) (alle HWI-Analytik, Rheinzabern), Hypericum-Extrakt (240 µM in 50 % Methanol), CO<sub>2</sub>-Hypericum Extrakt (mind. 70 % Hyperforin, 1,5 mM in Methanol); Quercetin (1 mM in 50 % Methanol), Hyperosid (1 mM in 50 % Methanol) (beide Roth, Karlsruhe); Rutin (1 mM in 50 % Methanol) (Merck). Die Endkonzentration der Substanzen im Medium betrug, wenn nicht anders angegeben, 1µM. Die Konzentration an Ethanol und Methanol betrug max. 0,1 % im Kulturmedium.

Gleiche Konzentrationen an Ethanol oder Methanol wurden Kontrollzellen als Vehikel zugesetzt. Alle Proben wurden in Stocks bei -20 °C gelagert.

### 5.8.1.1 Kontrolle der Stabilität von Hyperforin-haltigen Proben

Die in Methanol bei -20 °C gelagerten Proben von Hyperforin und einem Hyperforin-reichen CO<sub>2</sub>-Hypericum Extrakt wurden mittels HPLC nach Abbauprodukten untersucht.

Säule: LiChrospher RP8-select B (125 x 4 mm, 5 µm) Säule, (Merck), Fließmittel A: Acetonitril, H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % = 19 / 80 / 1 (v/v/v), B: Acetonitril, H<sub>2</sub>O, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 85 % = 59 / 40 / 1 (v/v/v), Gradient (linear): 0 – 8 min 100 % A, 8 – 30 min zu 50 % A / 50 % B, 30 – 40 min zu 100 % B, 40 – 60 min 100 % B, 60 – 63 min zu 100 % A, Fluß: 1 ml / min, Detektion: 220 nm.

### 5.8.2 Substanzen für Kontrollmessungen

Positiv- sowie Negativkontrollen für die Untersuchungen mit Hypericum-Inhaltsstoffen wurden durchgeführt mit: Desipramin-HCl (Stock: 1 mM in H<sub>2</sub>O) , Chlorpromazin-HCl (1mM in H<sub>2</sub>O), Forskolin (10 mM in DMSO, verdünnt in PBS) (alle ICN Biomedicals, Eschwege); Dexamethason (1 mM in Ethanol) (Sigma, Taufkirchen). Soweit nicht anders angegeben wurden die Substanzen in einer Endkonzentration von 1 µM (Dexamethason 500 nM) den Zellen zum Kulturmedium zugegeben und bis zu 6 Tagen vorinkubiert. Die Endkonzentration an Ethanol und DMSO betrug max. 0,05 % im Kulturmedium. Kontrollzellen wurden gleiche Konzentrationen an Ethanol und DMSO als Vehikel zugesetzt. Alle Proben wurden bei -20 °C gelagert.

Die Stimulation der Zellen erfolgte mit jeweils 10 µM Terbutalin-Hemisulfat (1 mM in H<sub>2</sub>O) oder Isoprenalin-Sulfat (1 mM in H<sub>2</sub>O) (beide Sigma, Taufkirchen) im Inkubationspuffer über den Zellen für 30 min.

## 6. Literaturverzeichnis

- [1] Ackenheil, M. (1990). The mechanism of action of antidepressants revised. *J Neural Transm Suppl* 32: 29-37.
- [2] Ahlquist, R.P. (1967). Development of the concept of alpha and beta adrenotropic receptors. *Ann N Y Acad Sci* 139, 549-552.
- [3] Anisman, H. and Z. Merali (2003). Cytokines, stress and depressive illness: brain-immune interactions. *Ann Med* 35(1): 2-11.
- [4] Arold, G., F. Donath, et al. (2005). No relevant interaction with alprazolam, caffeine, tolbutamide, and digoxin by treatment with a low-hyperforin St John's wort extract. *Planta Med* 71(4): 331-7.
- [5] Aubin, J.E. (1979). Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem* 27, 36-43.
- [6] Bhattacharya, S. K., A. Chakrabarti, et al. (1998). Activity profiles of two hyperforin-containing hypericum extracts in behavioral models. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 22-9.
- [7] Banks, J. H., Cameron, D.W., Raverty, W. (1976). Chemistry of the coccoidea.II. Condensed polycyclic pigments from two Australian pseudococcids (hemiptera). *Austr. J. Chem.* 29:1509-1521.
- [8] Barak, L. S., S. S. Ferguson, et al. (1997). Internal trafficking and surface mobility of a functionally intact beta2-adrenergic receptor-green fluorescent protein conjugate. *Mol Pharmacol* 51(2): 177-84.
- [9] Barnes, P.J. (1995). Beta-adrenergic receptors and their regulation. *Am J Respir Crit Care Med* 152, 838-860.
- [10] Basterzi, A. D., C. Aydemir, et al. (2005). IL-6 levels decrease with SSRI treatment in patients with major depression. *Hum Psychopharmacol* 20(7): 473-6.
- [11] Baureithel, K. H., K. B. Buter, et al. (1997). Inhibition of benzodiazepine binding in vitro by amentoflavone, a constituent of various species of *Hypericum*. *Pharm Acta Helvetiae* 72(3): 153-157.
- [12] Benda, P., J. Lightbody, et al. (1968). Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. *Science* 161(839): 370-1.
- [13] Bennett, D. A., Jr., L. Phun, et al. (1998). Neuropharmacology of St. John's Wort (*Hypericum*). *Ann Pharmacother* 32(11): 1201-8.
- [14] Benson, R.C., Meyer, R.A., Zazuba, E., McKhann, G.M. (1979). Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J. Histochem. Cytochem.* 27, 44-48.
- [15] Bergmann R., Nüßner J., Demling J. (1993). Behandlung leichter bis mittelschwerer Depressionen. *Neurol Psychiatr* 7:235-240.
- [16] Biber, A., H. Fischer, et al. (1998). Oral bioavailability of hyperforin from hypericum extracts in rats and human volunteers. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 36-43.

- [17] Bjerkenstedt, L., G. V. Edman, et al. (2005). Hypericum extract LI 160 and fluoxetine in mild to moderate depression: a randomized, placebo-controlled multi-center study in outpatients. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 255(1): 40-7.
- [18] Bladt, S. and H. Wagner (1994). Inhibition of MAO by fractions and constituents of hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S57-9.
- [19] Bollini, P., S. Pampallona, et al. (1999). Effectiveness of antidepressants. Meta-analysis of dose-effect relationships in randomised clinical trials. *Br J Psychiatry* 174: 297-303.
- [20] Boonen, G. and H. Haberlein (1998). Influence of genuine kavapyrone enantiomers on the GABA-A binding site. *Planta Med* 64(6): 504-6.
- [21] Boonen, G., A. Pramanik, et al. (2000). Evidence for specific interactions between kavain and human cortical neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Planta Med* 66(1): 7-10.
- [22] Bourin, M. and G. B. Baker (1996). The future of antidepressants. *Biomed Pharmacother* 50(1): 7-12.
- [23] Bourne, H.R. (1997). How receptors talk to trimeric G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 9, 134-142.
- [24] Brejc, K., T. K. Sixma, et al. (1997). Structural basis for dual excitation and photoisomerization of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2306-11.
- [25] Brenner, R., V. Azbel, et al. (2000). Comparison of an extract of hypericum (LI 160) and sertraline in the treatment of depression: a double-blind, randomized pilot study. *Clin Ther* 22(4): 411-9.
- [26] Brock, R., M. A. Hink, et al. (1998). Fluorescence correlation microscopy of cells in the presence of autofluorescence. *Biophys J* 75(5): 2547-57.
- [27] Brock, R., G. Vamosi, et al. (1999). Rapid characterization of green fluorescent protein fusion proteins on the molecular and cellular level by fluorescence correlation microscopy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(18): 10123-8.
- [28] Brockmann, H., Haschad, M.N., Maier K., Pohl F. (1939). Über das Hypericin, den photodynamisch wirksamen Farbstoff aus *Hypericum perforatum*. *Naturwissenschaften* 27:550
- [29] Brockmann, H. Franssen V., Spitzner D., Augustiniak H. (1974). Zur Isolierung und Konstitution des Pseudohypericins. *Tetrahedron Lett.* 1991-4
- [30] Brockmann, H. and Spitzner, D. (1975). Die Konstitution des Pseudohypericins. *Tetrahedron Lett.* 1:37-40.
- [31] Brodde, O. E., M. C. Michel, et al. (1995). Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30(4): 570-84.
- [32] Brodde, O.E., Michel, M.C. (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51, 651-690.

- [33] Brzostowski, J. A. and A. R. Kimmel (2001). Signaling at zero G: G-protein-independent functions for 7-TM receptors. *Trends Biochem Sci* 26(5): 291-7.
- [34] Bürgi, S., K. Baltensperger, et al. (2003). Antidepressant-induced switch of beta 1-adrenoceptor trafficking as a mechanism for drug action. *J Biol Chem* 278(2): 1044-52.
- [35] Bundesanzeiger vom 5.12.1984, i.d.F. vom 2.3.1989. Monographie der Kommission E Johanniskraut, Herba Hyperici. Vol. Nr. 228. Berlin: Bundesgesundheitsamt.
- [36] Burrows, G.D. and T.R. Norman (1981). Tricyclic antidepressants. Plasma levels and clinical response. In: *Psychotropic Drugs* (Burrows G.D. and Norman T.R., eds), pp. 169-204. Marcel Dekker, New York.
- [37] Butterweck, V., A. Wall, et al. (1997). Effects of the total extract and fractions of *Hypericum perforatum* in animal assays for antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 117-24.
- [38] Butterweck, V., F. Petereit, et al. (1998). Solubilized hypericin and pseudohypericin from *Hypericum perforatum* exert antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 64(4): 291-4.
- [39] Butterweck, V., G. Jurgenliemk, et al. (2000). Flavonoids from *Hypericum perforatum* show antidepressant activity in the forced swimming test. *Planta Med* 66(1): 3-6.
- [40] Butterweck, V., H. Winterhoff, et al. (2001). St John's wort, hypericin, and imipramine: a comparative analysis of mRNA levels in brain areas involved in HPA axis control following short-term and long-term administration in normal and stressed rats. *Mol Psychiatry* 6(5): 547-64.
- [41] Butterweck, V., A. Nahrstedt, et al. (2002). In vitro receptor screening of pure constituents of St. John's wort reveals novel interactions with a number of GPCRs. *Psychopharmacology (Berl)* 162(2): 193-202.
- [42] Butterweck, V., M. Hegger, et al. (2004). Flavonoids of St. John's Wort reduce HPA axis function in the rat. *Planta Med* 70(10): 1008-11.
- [43] Cameron, D.W. and W.D. Raverty (1976). *Austr. J. Chem.* 29, 1523-1533.
- [44] Chalfie, M., Y. Tu, et al. (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* 263(5148): 802-5.
- [45] Chatterjee, S. S., Bhattacharya, S., Singer, A., Wonnemann M., Müller, W.E. (1998). Hyperforin inhibits synaptosomal uptake of neurotransmitters in vitro and shows antidepressant activity in vivo. *Pharmazie* 53, 9.
- [46] Chatterjee, S. S., S. K. Bhattacharya, et al. (1998). Hyperforin as a possible antidepressant component of hypericum extracts. *Life Sci* 63(6): 499-510.
- [47] Chatterjee, S. S., M. Noldner, et al. (1998). Antidepressant activity of hypericum perforatum and hyperforin: the neglected possibility. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 7-15.

- [48] Chen, J. and M. M. Rasenick (1995). Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant drugs increases functional coupling between a G protein (Gs) and adenylyl cyclase. *J Neurochem* 64(2): 724-32.
- [49] Cole, N. B., C. L. Smith, et al. (1996). Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science* 273(5276): 797-801.
- [50] Collins, S., M. G. Caron, et al. (1988). Beta-adrenergic receptors in hamster smooth muscle cells are transcriptionally regulated by glucocorticoids. *J Biol Chem* 263(19): 9067-70.
- [51] Cormack, B. P., R. H. Valdivia, et al. (1996). FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* 173(1 Spec No): 33-8.
- [52] Cott, J. M. (1997). In vitro receptor binding and enzyme inhibition by *Hypericum perforatum* extract. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 108-12.
- [53] Cuatrecasas, P. (1974). Membrane receptors. *Annu Rev Biochem* 43(0): 169-214.
- [54] Cullander, C. (1999). Fluorescent probes for confocal microscopy. *Methods Mol Biol* 122: 59-73.
- [55] del Monte, F., A. J. Kaumann, et al. (1993). Coexistence of functioning beta 1- and beta 2-adrenoceptors in single myocytes from human ventricle. *Circulation* 88(3): 854-63.
- [56] DAC 1986. Deutscher Arzneimittel Codex, 3. Ergänzung 1991. Monographie Johanniskraut. Govi Verlag: Frankfurt, Deutscher Apotheker Verlag: Stuttgart 1-5.
- [57] Dimpfel, W., F. Schober, et al. (1998). Effects of a methanolic extract and a hyperforin-enriched CO<sub>2</sub> extract of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on intracerebral field potentials in the freely moving rat (Tele-Stereo-EEG). *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 30-5.
- [58] Dohlman, H. G., J. Thorner, et al. (1991). Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* 60: 653-88.
- [59] Donati, R. J., C. Thukral, et al. (2001). Chronic treatment of C6 glioma cells with antidepressant drugs results in a redistribution of G $\alpha$ . *Mol Pharmacol* 59(6): 1426-32.
- [60] Drewe, J., Gutmann, H., Török, M., Eschenmoser, M., Käufeler, R., Schaffner, W., Beglinger, C. (2000). Mechanismen der Interaktionen mit Johanniskrautextrakten. In: Rietbrock, N. (ed.), *Phytopharmaka in Forschung und klinischer Anwendung VI*. Steinkopff-Verlag, Darmstadt, 2000.
- [61] Edidin, M. (1997). Lipid microdomains in cell surface membranes. *Curr Opin Struct Biol* 7(4): 528-32.
- [62] Eglen, R. M. (2002). Enzyme fragment complementation: a flexible high throughput screening assay technology. *Assay Drug Dev Technol* 1(1 Pt 1): 97-104.
- [63] Ehrenberg, M., Rigler, R. (1974). Rotational brownian motion and fluorescence intensity fluctuations. *Chemical Physics* 4, 390-401.

- [64] Eigen, M., Rigler, R. (1994). Sorting single molecules: application to diagnostics and evolutionary biotechnology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 5740-5747.
- [65] Elson, E. & Magde, D. (1974) Fluorescence correlation spectroscopy I: Conceptual basis and theory, *Biopolymers*, 13, 1-27
- [66] Emorine, L. J., S. Marullo, et al. (1989). Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science* 245(4922): 1118-21.
- [67] Estler, C.-J. 2000. *Pharmakologie und Toxikologie*. Stuttgart: Schattauer-Verlag.
- [68] Fava, M., J. Alpert, et al. (2005). A Double-blind, randomized trial of St John's wort, fluoxetine, and placebo in major depressive disorder. *J Clin Psychopharmacol* 25(5): 441-7.
- [69] Ferguson, S.S., Zhang, J., Barak, L.S., Caron, M.G. (1998). Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor desensitization and resensitization. *Life Sci* 62, 1561-1565.
- [70] Fishman, P. H. and J. P. Finberg (1987). Effect of the tricyclic antidepressant desipramine on beta-adrenergic receptors in cultured rat glioma C6 cells. *J Neurochem* 49(1): 282-9.
- [71] Fishman, P. H., T. Miller, et al. (1994). Independent and coordinate regulation of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat C6 glioma cells. *J Recept Res* 14(5): 281-96.
- [72] Flach, J., M. Bossie, et al. (1994). A yeast RNA-binding protein shuttles between the nucleus and the cytoplasm. *Mol Cell Biol* 14(12): 8399-407.
- [73] Furchgott, R. F. (1967). The pharmacological differentiation of adrenergic receptors. *Ann N Y Acad Sci* 139(3): 553-70.
- [74] Gastpar, M., A. Singer, et al. (2005). Efficacy and tolerability of hypericum extract STW3 in long-term treatment with a once-daily dosage in comparison with sertraline. *Pharmacopsychiatry* 38(2): 78-86.
- [75] Gee, J. M., M. S. DuPont, et al. (2000). Intestinal transport of quercetin glycosides in rats involves both deglycosylation and interaction with the hexose transport pathway. *J Nutr* 130(11): 2765-71.
- [76] Gether, U., Lin, S., Ghanouni, P., Ballesteros, J.A., Weinstein, H., Kobilka, B.K. (1997). Agonists induce conformational changes in transmembrane domains III and VI of the beta2 adrenoceptor. *Embo J* 16, 6737-6747.
- [77] Gether, U., Kobilka, B.K. (1998). G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem* 273, 17979-17982.
- [78] Gilman, A. G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-49.
- [79] Gilman, A. G. (1989). The Albert Lasker Medical Awards. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Jama* 262(13): 1819-25.
- [80] Gleitz J., Teufel-Mayer, R. (1998). Einfluß einer Langzeitapplikation von Johanniskrautextrakt auf die Affinität und Dichte zentraler 5-HT-2<sub>A</sub>- und 5-HT-1<sub>A</sub>-Serotoninrezeptoren der Ratte. *Psychopharmakotherapie* 5 (Suppl 8): 46-50.



- [81] Golla, R. and R. Seethala (2002). A homogeneous enzyme fragment complementation cyclic AMP screen for GPCR agonists. *J Biomol Screen* 7(6): 515-25.
- [82] Graefe, E. U., J. Wittig, et al. (2001). Pharmacokinetics and bioavailability of quercetin glycosides in humans. *J Clin Pharmacol* 41(5): 492-9.
- [83] Granneman, J. G., K. N. Lahners, et al. (1993). Characterization of the human beta 3-adrenergic receptor gene. *Mol Pharmacol* 44(2): 264-70.
- [84] Guerrero, S. W., H. Zhong, et al. (1995). Selective desensitization of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in C6 glioma cells. Effects on catecholamine responsiveness. *Receptor* 5(4): 185-95.
- [85] Gurguis, G. N., J. E. Blakeley, et al. (1999). Adrenergic receptor function in panic disorder. II. Neutrophil beta 2 receptors: Gs protein coupling, effects of imipramine treatment and relationship to treatment outcome. *J Psychiatr Res* 33(4): 309-22.
- [86] Gurguis, G. N., R. Andrews, et al. (1999). Neutrophil beta2-adrenergic receptor coupling efficiency to Gs protein in subjects with post-traumatic stress disorder and normal controls. *Psychopharmacology (Berl)* 143(2): 131-40.
- [87] Hamilton, M. (1960). A rating scale for depression. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 23: 56-62.
- [88] Hänsgen, K.D., Vesper, J. (1996). Antidepressive Wirksamkeit eines hochdosierten Hypericum-Extraktes. *Münch Med Wschr* 138: 29-33.
- [89] Harden, T. K. (1983). Agonist-induced desensitization of the beta-adrenergic receptor-linked adenylate cyclase. *Pharmacol Rev* 35(1): 5-32.
- [90] Harder, T. and K. Simons (1997). Caveolae, DIGs, and the dynamics of sphingolipid-cholesterol microdomains. *Curr Opin Cell Biol* 9(4): 534-42.
- [91] Harman, J.G., Limbird, L.E., Goodman Gilman, A. (eds.) (1996): Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. McGraw-Hill Health Profession Division, 9<sup>th</sup> ed., 1905 S..
- [92] Harrer G., Schmidt U., Kuhn U. (1991). „Alternative“ Depressionsbehandlung mit einem Hypericum-Extrakt. *Neurol Psychiatr* 5:710-716.
- [93] Harrer, G., W. D. Hubner, et al. (1994). Effectiveness and tolerance of the hypericum extract LI 160 compared to maprotiline: a multicenter double-blind study. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S24-8.
- [94] Harrer, G., U. Schmidt, et al. (1999). Comparison of equivalence between the St. John's wort extract LoHyp-57 and fluoxetine. *Arzneimittelforschung* 49(4): 289-96.
- [95] Hegener, O., R. Jordan, et al. (2002). Benzodiazepine binding studies on living cells: application of small ligands for fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* 383(11): 1801-7.
- [96] Hegener, O., L. Prenner, et al. (2004). Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells. *Biochemistry* 43(20): 6190-9.

- [97] Hegi G. (1965). *Illustrierte Flora von Mittel-Europa*. Vol. V. München: Carl Hanser Verlag.
- [98] Hölzl, J., Sattler, S., Schütt, H. (1994). Johanniskraut: Eine Alternative zu synthetischen Antidepressiva? *Pharm. Ztg.* 139(46): 3959-3977.
- [99] Hubner, W. D., S. Lande, et al. (1994). Hypericum treatment of mild depressions with somatic symptoms. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S12-4.
- [100] Hypericum Depression Trial Study Group. Effect of Hypericum perforatum (St John's wort) in major depressive disorder: a randomized controlled trial. *JAMA* 2002;287:1807-14.
- [101] Iiri, T., Farfel, Z., Bourne, H.R. (1998). G-protein diseases furnish a model for the turn-on switch. *Nature* 394, 35-38.
- [102] Inouye, S. and F. I. Tsuji (1994). Aequorea green fluorescent protein. Expression of the gene and fluorescence characteristics of the recombinant protein. *FEBS Lett* 341(2-3): 277-80.
- [103] Jankevics, H., M. Prummer, et al. (2005). Diffusion-time distribution analysis reveals characteristic ligand-dependent interaction patterns of nuclear receptors in living cells. *Biochemistry* 44(35): 11676-83.
- [104] Johne, A., J. Brockmoller, et al. (1999). Pharmacokinetic interaction of digoxin with an herbal extract from St John's wort (*Hypericum perforatum*). *Clin Pharmacol Ther* 66(4): 338-45.
- [105] Johansson, L. H., H. Persson, et al. (1986). Beta 2-adrenoceptor selectivity in four series of beta-adrenoceptor agonists. *Eur J Pharmacol* 130(1-2): 97-103.
- [106] Johansson, L. H., E. L. Eliasson, et al. (1990). An analysis of the beta 2-adrenoceptor selectivity in three series of beta-adrenoceptor agonists. *Pharmacol Toxicol* 66(3): 203-8.
- [107] Johnson, D., Siebenhüner, G., Hofer, E., Sauerwein-Giese, E., Frauendorf, A. (1992). Einfluß von Johanniskraut auf die ZNS-Aktivität. *TW Neurol Psychiatr* 6: 436-444
- [108] Johnson, D., H. Ksciuk, et al. (1994). Effects of hypericum extract LI 160 compared with maprotiline on resting EEG and evoked potentials in 24 volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S44-6.
- [109] Johnson, M. (1998). The beta-adrenoceptor. *Am J Respir Crit Care Med* 158, S146-153.
- [110] Juergenliemk, G., K. Boje, et al. (2003). In vitro studies indicate that miquelianin (quercetin 3-O-beta-D-glucuronopyranoside) is able to reach the CNS from the small intestine. *Planta Med* 69(11): 1013-7.
- [111] Kallal, L., A. W. Gagnon, et al. (1998). Visualization of agonist-induced sequestration and down-regulation of a green fluorescent protein-tagged beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem* 273(1): 322-8.

- [112] Kallal, L. and J. L. Benovic (2000). Using green fluorescent proteins to study G-protein-coupled receptor localization and trafficking. *Trends Pharmacol Sci* 21(5): 175-80.
- [113] Kaul, R. (ed) (2000). *Johanniskraut: Botanik, Inhaltsstoffe, Qualitätskontrolle, Pharmakologie, Toxikologie und Klinik*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlags-Gesellschaft. 187 S.
- [114] Keen, J. H. (1990). Clathrin and associated assembly and disassembly proteins. *Annu Rev Biochem* 59: 415-38.
- [115] Kent, J. M. (2000). SNaRIs, NaSSAs, and NaRIs: new agents for the treatment of depression. *Lancet* 355(9207): 911-8.
- [116] Kerb, R., Bauer, S., Brockmüller J., Roots, I. (1997). Urinary 6- $\beta$ -hydroxycortisol excretion rate is affected by treatment with hypericum extract. Abstract. *Eur J Clin Pharmacol* 52 (suppl): A 186.
- [117] Kiely, J., J. R. Hadcock, et al. (1994). Glucocorticoids down-regulate beta 1-adrenergic-receptor expression by suppressing transcription of the receptor gene. *Biochem J* 302 ( Pt 2): 397-403.
- [118] Kientsch, U., S. Burgi, et al. (2001). St. John's wort extract Ze 117 (*Hypericum perforatum*) inhibits norepinephrine and serotonin uptake into rat brain slices and reduces 3-adrenoceptor numbers on cultured rat brain cells. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S56-60.
- [119] Klebe, R. J., Ruddle, F. H. (1969). Neuroblastoma: Cell culture analysis of a differentiating stem cell system. *J Cell Biol* 43: 69A
- [120] Klingler, J. and T. Friedrich (1997). Site-specific interaction of thrombin and inhibitors observed by fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J* 73(4): 2195-200.
- [121] Kobilka, B. (1992). Adrenergic receptors as models for G protein-coupled receptors. *Annu Rev Neurosci* 15: 87-114.
- [122] Krief, S., F. Lonqvist, et al. (1993). Tissue distribution of beta 3-adrenergic receptor mRNA in man. *J Clin Invest* 91(1): 344-9.
- [123] Kucik, D. F., E. L. Elson, et al. (1999). Weak dependence of mobility of membrane protein aggregates on aggregate size supports a viscous model of retardation of diffusion. *Biophys J* 76(1 Pt 1): 314-22.
- [124] Kugler J., Weidenhammer W., Schmidt A., Groll S. (1990). *Z Allg Med* 66: 21-29.
- [125] Kusumi, A. and Y. Sako (1996). Cell surface organization by the membrane skeleton. *Curr Opin Cell Biol* 8(4): 566-74.
- [126] Laakmann, G., C. Schule, et al. (1998). St. John's wort in mild to moderate depression: the relevance of hyperforin for the clinical efficacy. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 54-9.
- [127] Lakowicz, J.R. 1999. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

- [128] Lands, A. M., F. P. Luduena, et al. (1967). Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. *Life Sci* 6(21): 2241-9.
- [129] Langin, D., M. P. Portillo, et al. (1991). Coexistence of three beta-adrenoceptor subtypes in white fat cells of various mammalian species. *Eur J Pharmacol* 199(3): 291-301.
- [130] Lecrubier, Y., G. Clerc, et al. (2002). Efficacy of St. John's wort extract WS 5570 in major depression: a double-blind, placebo-controlled trial. *Am J Psychiatry* 159(8): 1361-6.
- [131] Lefkowitz, R. J., J. M. Stadel, et al. (1983). Adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptors: structure and mechanisms of activation and desensitization. *Annu Rev Biochem* 52: 159-86.
- [132] Lefkowitz, R.J., Pitcher, J., Krueger, K., Daaka, Y. (1998). Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 42, 416-420.
- [133] Lehl S., Burkard G., Woelk H. (1993). Ergebnisse von Messungen der kognitiven Leistungsfähigkeit bei Patienten unter Therapie mit Johanniskrautextrakt. *Nervenheilkunde* 12: 281-284.
- [134] Levy, F. O., X. Zhu, et al. (1993). Efficacy of beta 1-adrenergic receptors is lower than that of beta 2-adrenergic receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(22): 10798-802.
- [135] Liberzon, I., M. Krstov, et al. (1997). Stress-restress: effects on ACTH and fast feedback. *Psychoneuroendocrinology* 22(6): 443-53.
- [136] Linde, K., G. Ramirez, et al. (1996). St John's wort for depression--an overview and meta-analysis of randomised clinical trials. *Bmj* 313(7052): 253-8.
- [137] Linden, M., Ahrens, B., Schotte, K. (2000). Der Einfluß von Richtlinienempfehlungen auf die Niedrigdosierung trizyklischer Antidepressiva am Beispiel von Doxepin. *Psychopharmakotherapie* 7: 75-79.
- [138] Lonnqvist, F., S. Krief, et al. (1993). Evidence for a functional beta 3-adrenoceptor in man. *Br J Pharmacol* 110(3): 929-36.
- [139] Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W. (1972). Thermodynamic fluctuations in a reacting system-measurement by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *Physical Review Letters* 29, 705-708.
- [140] Magde, D., Elson, E.L., Webb, W.W. (1974). Fluorescence correlation spectroscopy. II. An experimental realization. *Biopolymers* 13, 29-61.
- [141] Maisenbacher, P. (1991). Dissertation, Universität Tübingen.
- [142] Manji, H. K., G. A. Chen, et al. (1991). Chronic exposure of C6 glioma cells to desipramine desensitizes beta-adrenoceptors, but increases KL/KH ratio. *Eur J Pharmacol* 206(2): 159-62.
- [143] Manji, H. K., G. A. Chen, et al. (1991). Down-regulation of beta receptors by desipramine in vitro involves PKC/phospholipase A2. *Psychopharmacol Bull* 27(3): 247-53.

- [144] Markowitz, J. S., C. L. DeVane, et al. (2000). Effect of St. John's wort (*Hypericum perforatum*) on cytochrome P-450 2D6 and 3A4 activity in healthy volunteers. *Life Sci* 66(9): PL133-9.
- [145] Marquardt, D., W. (1963). An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *J Soc Indust Appl Math* 11: 431-441.
- [146] Marshall, J., R. Molloy, et al. (1995). The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function. *Neuron* 14(2): 211-5.
- [147] Martinez, B., S. Kasper, et al. (1994). *Hypericum* in the treatment of seasonal affective disorders. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S29-33.
- [148] McLean, A. J., N. Bevan, et al. (1999). Visualizing differences in ligand regulation of wild-type and constitutively active mutant beta(2)-adrenoceptor-green fluorescent protein fusion proteins. *Mol Pharmacol* 56(6): 1182-91.
- [149] McLean, A. J. and G. Milligan (2000). Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human beta(1)- and beta(2)-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. *Br J Pharmacol* 130(8): 1825-32.
- [150] Meissner, O. and H. Haberlein (2003). Lateral mobility and specific binding to GABA(A) receptors on hippocampal neurons monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 42(6): 1667-72.
- [151] Moore, L. B., B. Goodwin, et al. (2000). St. John's wort induces hepatic drug metabolism through activation of the pregnane X receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(13): 7500-2.
- [152] Morin, J. G. and J. W. Hastings (1971). Energy transfer in a bioluminescent system. *J Cell Physiol* 77(3): 313-8.
- [153] Morris, A. J. and C. C. Malbon (1999). Physiological regulation of G protein-linked signaling. *Physiol Rev* 79(4): 1373-430.
- [154] Müller, W. E., Schäfer, C. (1996). Johanniskraut. In vitro Studie über *Hypericum*-Extrakt, Hypericin und Kaempferol als Antidepressiva. *Dtsch. Apoth. Ztg.* 136, 1015-1022.
- [155] Müller, W.E., Schäfer, C., Rolli, M., Wonnemann, M. (1996/1997). *Phytomedicine* 3 (Suppl. I) 100.
- [156] Müller, W. E., M. Rolli, et al. (1997). Effects of *hypericum* extract (LI 160) in biochemical models of antidepressant activity. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 102-7.
- [157] Müller, W.E., Catterjee, S.S. (Eds) (1998). Hyperforin and the antidepressive activity of St. John's wort. *Pharmacopsychiatry* 31 (Suppl): 1-60
- [158] Müller, W. E., A. Singer, et al. (1998). Hyperforin represents the neurotransmitter reuptake inhibiting constituent of *hypericum* extract. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 16-21.
- [159] Müller, W.E., Singer, A., Wonnemann M., Rolli M., Schäfer C., Hafner U. (1998). Wirkungen von standardisiertem Johanniskraut-Extrakt (LI 160) in biochemischen Modellen antidepressiver Wirksamkeit. *Psychopharmakotherapie* 5 (Suppl 8): 40-45.

- [160] Mulrow, C. D., J. W. Williams, Jr., et al. (1999). Treatment of depression--newer pharmacotherapies. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*(7): 1-4.
- [161] Munizza, C., G. Tibaldi, et al. (1995). Prescription pattern of antidepressants in out-patient psychiatric practice. *Psychol Med* 25(4): 771-8.
- [162] Mutschler, E. 2001. *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. 1186 S.
- [163] Nebel, A., B. J. Schneider, et al. (1999). Potential metabolic interaction between St. John's wort and theophylline. *Ann Pharmacother* 33(4): 502.
- [164] Neary, J. T. and Y. Bu (1999). Hypericum LI 160 inhibits uptake of serotonin and norepinephrine in astrocytes. *Brain Res* 816(2): 358-63.
- [165] Neary, J. T., S. R. Whitemore, et al. (2001). Biochemical mechanisms of action of Hypericum LI 160 in glial and neuronal cells: inhibition of neurotransmitter uptake and stimulation of extracellular signal regulated protein kinase. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S103-7.
- [166] Nishida, A., K. Hisaoka, et al. (2002). Antidepressant drugs and cytokines in mood disorders. *Int Immunopharmacol* 2(12): 1619-26.
- [167] Noldner, M. and K. Schotz (2002). Rutin is essential for the antidepressant activity of Hypericum perforatum extracts in the forced swimming test. *Planta Med* 68(7): 577-80.
- [168] Okamoto, T., A. Schlegel, et al. (1998). Caveolins, a family of scaffolding proteins for organizing "preassembled signaling complexes" at the plasma membrane. *J Biol Chem* 273(10): 5419-22.
- [169] Ormo, M., A. B. Cubitt, et al. (1996). Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. *Science* 273(5280): 1392-5.
- [170] o.V. (2005). Johanniskraut: So gut oder schlecht wie konventionelle Antidepressiva?. *arznei-telegramm* 36(5): 48
- [171] o.V. (2005). Antidepressiva: Lebensgefährliche Placebos?. *arznei-telegramm* 36(5): 45-46
- [172] Pace, N. and Mackinney, G. 1941. Hypericin, the photodynamic pigment from St. John's wort. *J. Am. Chem. Soc.* 63:2570-2574.
- [173] Pacher, P., E. Kohegyi, et al. (2001). Current trends in the development of new antidepressants. *Curr Med Chem* 8(2): 89-100.
- [174] Palczewski, K., Kumasaka, T., Hori, T., Behnke, C.A., Motoshima, H., Fox, B.A., Le Trong, I., Teller, D.C., Okada, T., Stenkamp, R.E. *et al.* (2000). Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289, 739-745.
- [175] Palm, G. J., A. Zdanov, et al. (1997). The structural basis for spectral variations in green fluorescent protein. *Nat Struct Biol* 4(5): 361-5.
- [176] Patterson, G. H., S. M. Knobel, et al. (1997). Use of the green fluorescent protein and its mutants in quantitative fluorescence microscopy. *Biophys J* 73(5): 2782-90.

- [177] Paulke, A., M. Schubert-Zsilavec, et al. (2006). Determination of St. John's wort flavonoid-metabolites in rat brain through high performance liquid chromatography coupled with fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 832(1): 109-13.
- [178] Perovic, S. and W. E. Muller (1995). Pharmacological profile of hypericum extract. Effect on serotonin uptake by postsynaptic receptors. *Arzneimittelforschung* 45(11): 1145-8.
- [179] Philipp, M., R. Kohnen, et al. (1999). Hypericum extract versus imipramine or placebo in patients with moderate depression: randomised multicentre study of treatment for eight weeks. *Bmj* 319(7224): 1534-8.
- [180] Pierce, K. L., R. T. Premont, et al. (2002). Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 639-50.
- [181] Porsolt, R. D., G. Anton, et al. (1978). Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol* 47(4): 379-91.
- [182] Porsolt, R.D., Lenégre, A., McArthur R.A. (1991). Pharmacological models of depression. In: *Animal models in psychopharmacology – advances in pharmacological sciences*. Birkhäuser Verlag Basel 1991, S. 137-159.
- [183] Potter, W.Z., Manji, H.K., Rudorfer, M.V. (1998). Tricyclics and tetracyclics. In: Schatzberg, A.F., Nemeroff, C.B. (eds). *The American Psychiatric Press textbook of psychopharmacology*, 2<sup>nd</sup> edn. American Psychiatric Press, Washington, DC, pp 199-218.
- [184] Pramanik, A. and R. Rigler (2001). Ligand-receptor interactions in the membrane of cultured cells monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Biol Chem* 382(3): 371-8.
- [185] Prasher, D. C., V. K. Eckenrode, et al. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* 111(2): 229-33.
- [186] Quandt, J., Schmidt, U., Schenk N. (1993). Ambulante Behandlung leichter und mittelschwerer depressiver Verstimmungen. *Der Allgemeinarzt* 2: 97-102.
- [187] Rasenick, M., M., Lazarevic, M., Watanabe, M., Hamm H., E. (1993). Permeable cell systems as models for studying disruption, by site-specific synthetic peptides, of receptor-G protein-effector coupling. *Methods Enzymol* 225, 252-257.
- [188] Riederer, P., Laux G., Pödlinger W. (1993). *Neuro-Psychopharmaka. Ein Therapie Handbuch*, Vol. 3: Antidepressiva und Phasenprophylaktika. Springer-Verlag Vienna New York, pp. 1-10.
- [189] Rigler, R., Widengren, J. (1990). Ultrasensitive Detection of Single Molecules by Fluorescence Correlation Spectroscopy. In: *BioScience. Ausg.*, B. Klinge, C. Oymar, Hrsg. 180-183.
- [190] Rigler, R., Mets, U., Widengren, J., Kask, P. (1993). Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *Eur. Biophys. J.* 22, 169-175.
- [191] Rigler, R., A. Pramanik, et al. (1999). Specific binding of proinsulin C-peptide to human cell membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(23): 13318-23.

- [192] Robson, N.K.B. (1977). Studies in the Genus *Hypericum* (Guttiferae). Bulletin of the British Museum (natural History), Botany series, 5, 292-355.
- [193] Rosenbaum, M., C. C. Malbon, et al. (1993). Lack of beta 3-adrenergic effect on lipolysis in human subcutaneous adipose tissue. *J Clin Endocrinol Metab* 77(2): 352-5.
- [194] Ross, E. M. and A. G. Gilman (1980). Biochemical properties of hormone-sensitive adenylate cyclase. *Annu Rev Biochem* 49: 533-64.
- [195] Rote Liste 2006. Arzneimittelverzeichnis des BfArM. Editio Cantor Verlag: Aulendorf
- [196] Roth, B.L., Willins, D.L., Kroeze, W.K. (1998). G protein-coupled receptor (GPCR) trafficking in the central nervous system: relevance for drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend* 51, 73-85.
- [197] Roth, L. 1990. *Hypericum, Hypericin: Botanik, Inhaltsstoffe, Wirkung*. Edited by Roth. *Arzneipflanzenmonographien*. Landsberg/Lech: ecomed Verlag.
- [198] Rudorfer, M. V. and R. C. Young (1980). Plasma desipramine levels after single dosage and at steady state in outpatients. *Commun Psychopharmacol* 4(3): 185-8.
- [199] Schellenberg, R., S. Sauer, et al. (1998). Pharmacodynamic effects of two different hypericum extracts in healthy volunteers measured by quantitative EEG. *Pharmacopsychiatry* 31 Suppl 1: 44-53.
- [200] Schinazi, R. F., C. K. Chu, et al. (1990). Anthraquinones as a new class of antiviral agents against human immunodeficiency virus. *Antiviral Res* 13(5): 265-72.
- [201] Schrader E., Meier B., Brattström A. (1998). *Hypericum* treatment of mild-moderate depression in a placebo-controlled study. A prospective, double-blind, randomized, placebo-controlled, multicentre study. *Human Psychopharmacology* 13: 163-169.
- [202] Schrader, E. (2000). Equivalence of St John's wort extract (Ze 117) and fluoxetine: a randomized, controlled study in mild-moderate depression. *Int Clin Psychopharmacol* 15(2): 61-8.
- [203] Schütt, H., Schulz, V. (1993). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis*, S. 474-495. Hrsg.: Hänsel, R., Keller, K., Rimpler H., Schneider, G., 5. Aufl. Bd. 5, Springer verlag Berlin-Heidelberg-New York.
- [204] Schulz, H. and M. Jobert (1994). Effects of hypericum extract on the sleep EEG in older volunteers. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S39-43.
- [205] Schulz, V. (2001). Incidence and clinical relevance of the interactions and side effects of *Hypericum* preparations. *Phytomedicine* 8(2): 152-60.
- [206] Schwille, P., J. Korf, et al. (1999). Fluorescence correlation spectroscopy with single-molecule sensitivity on cell and model membranes." *Cytometry* 36(3): 176-82.



- [207] Shelton, C.R., Keller, M.B., Gelenberg, A. et al. (2001). Effectiveness of St. John's Wort in major depression: a randomized controlled trial. *JAMA* 285: 1978-85.
- [208] Shimomura, O., F. H. Johnson, et al. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59: 223-39.
- [209] Simbrey, K., H. Winterhoff, et al. (2004). Extracts of St. John's wort and various constituents affect beta-adrenergic binding in rat frontal cortex. *Life Sci* 74(8): 1027-38.
- [210] Simmen, U., J. Higelin, et al. (2001). Neurochemical studies with St. John's wort in vitro. *Pharmacopsychiatry* 34 Suppl 1: S137-42.
- [211] Simons, K. and E. Ikonen (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387(6633): 569-72.
- [212] Simons, K. and D. Toomre (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1): 31-9.
- [213] Singer, S. J. and G. L. Nicolson (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175(23): 720-31.
- [214] Singer, A., M. Wonnemann, et al. (1999). Hyperforin, a major antidepressant constituent of St. John's Wort, inhibits serotonin uptake by elevating free intracellular Na<sup>+</sup>. *J Pharmacol Exp Ther* 290(3): 1363-8.
- [215] Sommer, H. and G. Harrer (1994). Placebo-controlled double-blind study examining the effectiveness of an hypericum preparation in 105 mildly depressed patients. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S9-11.
- [216] Stearns, T. (1995). Green fluorescent protein. The green revolution. *Curr Biol* 5(3): 262-4.
- [217] Stecker, H.-W. (2006). Berufsverband Deutscher Psychologinnen und Psychologen. [http://www.bdp-verband.org/bdp/politik/2006/60228\\_recht.html](http://www.bdp-verband.org/bdp/politik/2006/60228_recht.html)
- [218] Stiles, G. L., M. G. Caron, et al. (1984). Beta-adrenergic receptors: biochemical mechanisms of physiological regulation. *Physiol Rev* 64(2): 661-743.
- [219] Subtil, A., A. Hemar, et al. (1994). Rapid endocytosis of interleukin 2 receptors when clathrin-coated pit endocytosis is inhibited. *J Cell Sci* 107 ( Pt 12): 3461-8.
- [220] Sulser, F., A. J. Janowsky, et al. (1983). Regulation of recognition and action function of the norepinephrine (NE) receptor-coupled adenylate cyclase system in brain: implications for the therapy of depression. *Neuropharmacology* 22(3 Spec No): 425-31.
- [221] Summers, R. J., P. Molnaar, et al. (1989). Coexistence and localization of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart. *Eur Heart J* 10 Suppl B: 11-21.
- [222] Suzuki, O., Y. Katsumata, et al. (1984). Inhibition of monoamine oxidase by hypericin. *Planta Med* 50(3): 272-4.

- [223] Szegedi, A., R. Kohnen, et al. (2005). Acute treatment of moderate to severe depression with hypericum extract WS 5570 (St John's wort): randomised controlled double blind non-inferiority trial versus paroxetine. *Bmj* 330(7490): 503.
- [224] Tang, Y., L. A. Hu, et al. (1999). Identification of the endophilins (SH3p4/p8/p13) as novel binding partners for the beta1-adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12559-64.
- [225] Tarasova, N. I., R. H. Stauber, et al. (1998). Spontaneous and ligand-induced trafficking of CXC-chemokine receptor 4. *J Biol Chem* 273(26): 15883-6.
- [226] Taylor, C., A. D. Fricker, et al. (2005). Mechanisms of action of antidepressants: from neurotransmitter systems to signaling pathways. *Cell Signal* 17(5): 549-57.
- [227] Tetin, S. Y., K. M. Swift, et al. (2002). Measuring antibody affinity and performing immunoassay at the single molecule level. *Anal Biochem* 307(1): 84-91.
- [228] Teufel-Mayer, R. and J. Gleitz (1997). Effects of long-term administration of hypericum extracts on the affinity and density of the central serotonergic 5-HT1 A and 5-HT2 A receptors. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 113-6.
- [229] Thiede, H. M. and A. Walper (1994). Inhibition of MAO and COMT by hypericum extracts and hypericin. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S54-6.
- [230] Thiele B., Brink I., Ploch M. (1993). Modulation of cytokine expression by hypericum extract. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 (Suppl. 1): 60-62.
- [231] Thomas, C., R. S. MacGill, et al. (1992). Photoactivation of hypericin generates singlet oxygen in mitochondria and inhibits succinoxidase. *Photochem Photobiol* 55(1): 47-53.
- [232] Thompson, N. L. (1991) Fluorescence Correlation Spectroscopy, in: Lakowicz, J. R. (Ed.) *Topics in Fluorescence Spectroscopy*, 337-378 (New York / London, Plenum Press).
- [233] Toews, M.L., Perkins, J.P. (1984). Agonist-induced changes in beta-adrenergic receptors on intact cells. *J Biol Chem* 259, 2227-2235.
- [234] Toki, S., R. J. Donati, et al. (1999). Treatment of C6 glioma cells and rats with antidepressant drugs increases the detergent extraction of G(s alpha) from plasma membrane. *J Neurochem* 73(3): 1114-20.
- [235] Tollefson, G.D., Rosenbaum, J.F. (1998). Selective serotonin reuptake inhibitors. In: Schatzberg, A.F., Nemeroff, C.B. (eds). *The American Psychiatric Press textbook of psychopharmacology*, 2<sup>nd</sup> edn. American Psychiatric Press, Washington, DC, pp 219-237.
- [236] Uebelhack, R., J. Gruenwald, et al. (2004). Efficacy and tolerability of Hypericum extract STW 3-VI in patients with moderate depression: a double-blind, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Adv Ther* 21(4): 265-75.
- [237] Unger, V.M., Hargrave, P.A., Baldwin, J.M., Schertler, G.F. (1997). Arrangement of rhodopsin transmembrane alpha-helices. *Nature* 389, 203-206.
- [238] Van Craenenbroeck, E. and Y. Engelborghs (1999). Quantitative characterization of the binding of fluorescently labeled colchicine to tubulin in vitro using fluorescence correlation spectroscopy. *Biochemistry* 38(16): 5082-8.

- [239] Van Rompaey, E., Y. Engelborghs, et al. (2001). Interactions between oligonucleotides and cationic polymers investigated by fluorescence correlation spectroscopy. *Pharm Res* 18(7): 928-36.
- [240] Verkade, P. and K. Simons (1997). Robert Feulgen Lecture 1997. Lipid microdomains and membrane trafficking in mammalian cells. *Histochem Cell Biol* 108(3): 211-20.
- [241] Vetulani, J. and F. Sulser (1975). Action of various antidepressant treatments reduces reactivity of noradrenergic cyclic AMP-generating system in limbic forebrain. *Nature* 257(5526): 495-6.
- [242] Voityuk, A. A., Michel-Beyerle, M. E., Rösch, N. (1997). Protonation effect on the chromophore of green fluorescent protein. Quantum chemical study of the absorption spectra. *Chem. Phys. Lett.* 272, 162-167.
- [243] Volz, H. P. (1997). Controlled clinical trials of hypericum extracts in depressed patients - an overview. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 72-6.
- [244] Volz, H. P., H. Murck, et al. (2002). St John's wort extract (LI 160) in somatoform disorders: results of a placebo-controlled trial. *Psychopharmacology (Berl)* 164(3): 294-300.
- [245] Vorbach, E. U., W. D. Hubner, et al. (1994). Effectiveness and tolerance of the hypericum extract LI 160 in comparison with imipramine: randomized double-blind study with 135 outpatients. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 7 Suppl 1: S19-23.
- [246] Vorbach, E. U., K. H. Arnoldt, et al. (1997). Efficacy and tolerability of St. John's wort extract LI 160 versus imipramine in patients with severe depressive episodes according to ICD-10. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 81-5.
- [247] Wang, L. H., K. G. Rothberg, et al. (1993). Mis-assembly of clathrin lattices on endosomes reveals a regulatory switch for coated pit formation. *J Cell Biol* 123(5): 1107-17.
- [248] Wang, S. and T. Hazelrigg (1994). Implications for bcd mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila* oogenesis. *Nature* 369(6479): 400-03.
- [249] Wang, Z., J. C. Gorski, et al. (2001). The effects of St John's wort (*Hypericum perforatum*) on human cytochrome P450 activity. *Clin Pharmacol Ther* 70(4): 317-26.
- [250] Ward, W. W., Cody, C. W., Hart, R. C. & Cormier, M. J. (1980) Spectrophotometric identity of the energy transfer chromophores in *Renilla* and *Aequorea* green-fluorescent proteins. *Photochem. Photobiol.* 31:611–615.
- [251] Watkins, R. E., J. M. Maglich, et al. (2003). 2.1 Å crystal structure of human PXR in complex with the St. John's wort compound hyperforin. *Biochemistry* 42(6): 1430-8.
- [252] Webb, C. D., A. Decatur, et al. (1995). Use of green fluorescent protein for visualization of cell-specific gene expression and subcellular protein localization during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177(20): 5906-11.

- [253] Wentworth, J. M., M. Agostini, et al. (2000). St John's wort, a herbal antidepressant, activates the steroid X receptor. *J Endocrinol* 166(3): R11-6.
- [254] Widengren J. (1996). Fluorescence Correlation Spectroscopy, photophysical aspects and applications. Dissertation, Repro Print AB, Carolinska Institut Stockholm.
- [255] Wheatley, D. (1997). LI 160, an extract of St. John's wort, versus amitriptyline in mildly to moderately depressed outpatients--a controlled 6-week clinical trial. *Pharmacopsychiatry* 30 Suppl 2: 77-80.
- [256] Wheatley, D (1998). Hypericum extract – potential in the treatment of depression. *CNS Drugs* 9, 431-440.
- [257] Winterhoff, H., Hambrügge, M., Vahlensieck, U. (1993). Testung von Hypericum perforatum L. im Tierexperiment. *Nervenheilkunde* 12: 341-345.
- [258] Woelk, H. (2000). Comparison of St John's wort and imipramine for treating depression: randomised controlled trial. *Bmj* 321(7260): 536-9.
- [259] Wolf, D. E. and J. K. Voglmayr (1984). Diffusion and regionalization in membranes of maturing ram spermatozoa. *J Cell Biol* 98(5): 1678-84.
- [260] Yang, F., L. G. Moss, et al. (1996). The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 14(10): 1246-51.
- [261] Yang, T. T., L. Cheng, et al. (1996). Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic Acids Res* 24(22): 4592-3.
- [262] Young, E. A., J. F. Lopez, et al. (2003). Mineralocorticoid receptor function in major depression. *Arch Gen Psychiatry* 60(1): 24-8.
- [263] Young, E. A., M. Altemus, et al. (2004). HPA axis activation in major depression and response to fluoxetine: a pilot study. *Psychoneuroendocrinology* 29(9): 1198-204.
- [264] Zaremba, T. G. and P. H. Fishman (1984). Desensitization of catecholamine-stimulated adenylate cyclase and down-regulation of beta-adrenergic receptors in rat glioma C6 cells. Role of cyclic AMP and protein synthesis. *Mol Pharmacol* 26(2): 206-13.
- [265] Zhong, H., S. W. Guerrero, et al. (1996). Inducible expression of beta 1- and beta 2-adrenergic receptors in rat C6 glioma cells: functional interactions between closely related subtypes. *Mol Pharmacol* 50(1): 175-84.
- [266] Zhong, Z. H., A. Pramanik, et al. (2001). Insulin binding monitored by fluorescence correlation spectroscopy. *Diabetologia* 44(9): 1184-8.

## 7. Poster, Publikationen und Vorträge

### 7.1 Publikationen

Hegener, O., Prenner L., Runkel, F., Baader, S. L., Kappler, J., Haerberlein, H. (2004). "Dynamics of beta2-adrenergic receptor-ligand complexes on living cells." *Biochemistry* 43(20): 6190-9.

Abouzied, M. M., El-Tahir, H. M., Prenner, L., Haerberlein, H., Gieselmann, V., Franken, S. (2005). "Hepatoma-derived growth factor. Significance of amino acid residues 81-100 in cell surface interaction and proliferative activity." *J Biol Chem* 280(12): 10945-54.

Prenner, L., Sieben, A., Zeller, K., Weiser, D. , Haerberlein, H.. „Hyperforin and Hyperoside downregulate  $\beta_1$ -adrenergic receptor density and decrease the binding affinity of  $\beta_2$ -adrenergic receptors at C6 glioblastoma cells".  
Submitted.

Prenner, L., Sieben, A., Hegener, O., Runkel, F., Haerberlein, H.. „ $\alpha$ -Hederin, but not hederagenin and hederacoside C, affects the binding behavior, dynamics, and regulation of  $\beta_2$ -adrenergic receptors at alveolar type II cells.“  
Submitted.

### 7.2 Poster

Prenner, L., Hegener, O., Haerberlein, H.. „Principle of FCS“. 1. Helmholtz-Kolloquium, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, October 30, 2002.

Prenner, L., Hegener, O., Haerberlein, H.. „FCS and its Relevance to Molecular Interaction in Cell Biology and Drug Research“.1. Helmholtz-Kolloquium, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, October 30, 2002.

### 7.3 Vorträge

Prenner, L., Haeberlein, H.. „Einfluß von Hyperosid und Hyperforin auf die postsynaptische  $\beta_1/\beta_2$ -adrenerge Rezeptordichte an C6 Glioblastomzellen: Ein neuer Ansatz zum Wirkmechanismus von Johanniskraut“. Phytopharmaka und Phytotherapie 2005, 6. bis 8. Oktober 2005, Berlin.

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hanns Häberlein herzlich für die Ermöglichung dieser Arbeit und die intensive Betreuung, die große Diskussionsbereitschaft und den Freiraum, den er mir während der Durchführung gewährt hat. Den stets freundschaftliche Umgang in seiner Arbeitsgruppe möchte ich an dieser Stelle besonders hervorheben.

Frau Prof. Dr. G. M. König danke ich für ihr Interesse an dieser Arbeit und die freundliche Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank gilt meinen Kollegen Christiane Halbsguth, Oliver Meissner, Thorsten Haas und Oliver Hegener für den guten und freundschaftlichen Einstand in den Arbeitskreis in Marburg, sowie meinen Kollegen Anne Sieben, Anne Wolf, Ole Anders, Thomas Sorkalla und Daniel Jakobs für die gute Atmosphäre im Arbeitskreis in Bonn und die große Hilfsbereitschaft und die freundliche Zusammenarbeit.

Weiterhin danke ich allen anderen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Oliver Hegener für die Einführung auf den Gebieten der Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie und der Zellkultur.

Bei Frau Anne Sieben bedanke ich mich für die Transfektion der HEK293 Zellen mit dem  $\beta_2$ AR-EGFP Konstrukt.

Herrn PD Dr. Joachim Kappler danke ich für die Einführung auf den Gebieten der Fluoreszenzmikroskopie und der Präparation primärer pränataler hippocampaler Neurone, seinen Einsatz für die Arbeitsgruppe und die kollegiale Zusammenarbeit.

Frau Prof. Dr. B. Schmitz danke ich für die Bereitstellung der N2a Zellen.

Herrn Prof. Dr. M. J. Lohse danke ich für die Überlassung des  $\beta_2$ AR-EGFP-Plasmids.

Herrn Prof. Dr. Th. Franz danke ich für die Bereitstellung der C6-Glioblastomzellen.

Herrn Prof. Dr. U. Honegger danke ich für die Überlassung der C6 $\beta_1$ AR-GFP Zellen.

Bei der Firma Steigerwald Arzneimittel GmbH Darmstadt bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit und die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Ich danke meiner Familie für alles und ganz besonders meiner Freundin Laty für ihre liebevolle und einzigartige Unterstützung.