

Aus der Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Hans-Jürgen Möller

und

aus dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München
Arbeitsgruppe von Dr. rer. nat. Theo Rein
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h.c. Florian Holsboer

Untersuchungen neuer biologisch-chemischer Methoden zur Auffindung der Bindungsstellen von Antidepressiva

Dissertation zum Erwerb
des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Vanessa Ganal
aus
Lindau am Bodensee

2011

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Rainer Rupprecht
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Alexander Dietrich
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Priv. Doz. Dr. Dr. Manfred Uhr
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	22.11.2011

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei **Prof. Florian Holsboer** für die Möglichkeit bedanken, am Max-Planck-Institut für Psychiatrie meine Doktorarbeit durchzuführen.

Des Weiteren danke ich **Prof. Rainer Rupprecht** recht herzlich für die Fachvertretung meiner Doktorarbeit an der Fakultät für Medizin an der LMU München.

Bei **Dr. Theo Rein** möchte ich mich für die hervorragende Betreuung während meiner Doktorarbeit bedanken. Besonders, dass er sich stets Zeit für fachliche Diskussionen und Ratschläge für das weitere Vorgehen bei den Versuchsdurchführungen genommen hat und immer ein offenes Ohr für meine Probleme und Sorgen hatte.

Der gesamten **Arbeitsgruppe Rein** danke ich für das einzigartige Arbeitsklima, die vielen fruchtbaren fachlichen Diskussionen, die motivierenden Worte und die vielen unvergesslichen Stunden im Labor, an die ich gerne zurückdenken werde:

- insbesondere **Dr. Thomas Kirmeier** für die Erlernung grundlegender Techniken im Labor, für die vielen projektbezogenen Diskussionen, für das Korrekturlesen dieser Arbeit, für die Energie, die er in das Projekt und somit meiner Doktorarbeit gesteckt hat, für das ins Leben rufen des Statistikseminars und für die Organisation des Ringbergsymposiums, das für mich unvergesslich bleiben wird - es war einfach kirmeischerlich mit Dir zusammengearbeitet zu haben.
- ein riesiges Dankeschön geht an **Anna Werner** für die Unterstützung bei der Durchführung zahlreicher Experimente, vor allem in der Endphase meiner Doktorarbeit und für die vielen aufmunternden Worte – Anna, du bist wirklich eine hervorragende TA, es war mir eine Ehre, mit Dir zusammenzuarbeiten
- **Dr. Jürgen Zschocke** für die einzigartige wissenschaftliche Unterstützung, das Korrekturlesen meiner Doktorarbeit und die vielen lustigen und unvergesslichen Momente beim Tanzen, Klettern und Bergwandern
- **Nils Gassen** für die Unterstützung bei der Erziehung unserer „Labor-Zieh-Tochter“ und für die Hilfsbereitschaft und sichernde Hand im und außerhalb des Labors
- **Nicole Zimmermann** für die Astrozyten- und Neuronenkultur und für die viele guten wissenschaftlichen Tipps und Ideen
- **Dr. Jan-Philip Schülke** für die zahlreichen Computertipps und die unterstützenden wissenschaftlichen Diskussionen
- **Dr. Regina Knapp** für die kollegiale Labor-Nachbarschaft, die mir den Einstieg in das Laborleben extrem erleichtert hat
- **Tatjana Perisic** für die gemeinsame Freude an deutschsprachiger Musik, die uns den Laboralltag versüßte
- **Kathrin Hafner** für ihre Unterstützung und Hilfe im Labor, insbesondere der Astrozyten- und Neuronenkultur und das gute Essen nach manchem harten Labortag
- **Barbara Berning** für die Beständigkeit und Ruhe, die sie in unser Labor gebracht hat
- **Lorenz Kollmannsberger** für gute Beiträge und Diskussionen zu dieser Arbeit

- **Andrea Steiner**, deren ruhige, ausgeglichene und starke Persönlichkeit mich sehr beeindruckt hat
- **Brigitte Hochreiter**, deren Literaturrecherche uns viele Einzelheiten über antidepressiv wirksame Substanzen erbrachte
- **Birgit Fuchs** für ihre Unterstützung bei zahlreichen Versuchen und dem ersten perfekten BCA-Assay

Außerdem möchte ich auch unseren Kooperationspartnern aus der Arbeitsgruppe Hausch danken:

- **Ranganath Gopalakrishnan** für die Synthese der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten funktionalisierten trizyklischen Antidepressiva und für das Interesse und die Freude, mit denen er stets mein Projekt begleitet hat
- **Dr. Felix Hausch** für die Durchführung dieser Synthesen in seiner Arbeitsgruppe

Herzlich bedanken möchte ich mich bei **Prof. Christoph Turck**, **Dr. Giuseppina Maccarrone** und **Christiane Rewerts** für die massenspektrometrischen Analysen.

Der **Arbeitsgruppe Schmidt** danke ich für die gute und kollegiale Zusammenarbeit und natürlich für den guten Kuchen!

Weiterhin geht ein großes Dankeschön an **Birgit Dietlein-Rauschenbach** und an **Alexander Matzner**, deren Überzeugungskraft mir das notwendige Selbstbewusstsein schenkte, mit dieser Doktorarbeit zu beginnen.

Meinen Eltern, meinen Schwestern, meinen Neffen und Nichten, meinen Tanten und all meinen Freunden möchte ich für die starke moralische Unterstützung und für das Verständnis danken, dass ich mir nicht immer so viel Zeit für sie nehmen konnte, wie ich es mir eigentlich gewünscht hätte. Insbesondere danke ich **Philipp** für die Unterstützung in der Endphase meiner Doktorarbeit, die mir die notwendige Ruhe schenkte, diese Arbeit fertig zu stellen.

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
1 EINLEITUNG	1
1.1 GRUNDLAGEN DER DEPRESSION (STAND DER FORSCHUNG)	1
1.1.1 <i>Monoamin-Mangel-Hypothese</i>	1
1.1.2 <i>Weitere Überlegungen</i>	4
1.1.2.1 Erweiterung der Monoamin-Mangel-Hypothese	5
1.1.2.2 Glutamat und γ -Aminobuttersäure	5
1.1.2.3 Stress-Hypothese der Depression	6
1.1.2.4 Entzündliche Hypothese	6
1.1.2.5 Mitochondrien-Hypothese	7
1.1.2.6 Netzwerk-Hypothese der Depression	7
1.1.3 <i>Schlussfolgerung</i>	9
1.2 CHEMISCHE PROTEOMIK ZUR AUFKLÄRUNG KOMPLEXER WIRKMECHANISMEN NIEDERMOLEKULARER SUBSTANZEN	9
1.2.1 <i>Basisstrategie</i>	10
1.2.2 <i>UV-Linker zur Photoaffinitätsmarkierung</i>	10
1.2.3 <i>Click-Reaktion</i>	14
1.3 ZIELSETZUNG DIESER ARBEIT	15
2 MATERIAL	16
2.1 TFA	16
2.2 CHEMIKALIEN.....	17
2.3 VERBRAUCHSMATERIALIEN	20
2.4 GERÄTE	20
2.5 KITS UND WEITERE MATERIALIEN.....	22
2.6 LÖSUNGEN UND NÄHRMEDIEN.....	22
2.7 ENZYME UND PROTEINE.....	23
2.8 BAKTERIENSTÄMME	23
2.9 ZELLINIEN	23
2.9.1 <i>Native Zelllinien</i>	23
2.9.2 <i>Stabile Zelllinien</i>	23
2.10 TIERE	24
2.11 ANTIKÖRPER, AZIDE UND ZELLORGANELL-SPEZIFISCHE MARKER	24
2.12 PLASMIDE	24
3 METHODEN	25
3.1 ZELLKULTURMETHODEN	25
3.1.1 <i>Standardzelllinien</i>	25
3.1.2 <i>Primäre Astrozytenkulturen</i>	25
3.1.3 <i>Primäre Neuronenkulturen</i>	26
3.1.4 <i>Bestimmung der Zellzahl</i>	27
3.1.5 <i>MTT-Assay</i>	27
3.2 ÜBEREXPRIMIERENDE ZELLSYSTEME	28
3.2.1 <i>Transfektion von HEK-293-Zellen</i>	28
3.2.2 <i>Herstellung und Kultivierung stabiler Zelllinien</i>	28

3.3	ZELLFÄRBUNGEN.....	29
3.3.1	Antikörperfärbung.....	29
3.3.2	Färbung mit zellorganellspezifischen Markern.....	29
3.3.3	Färbung mit dem TFA.....	30
3.3.4	Kombinierte Färbungen.....	30
3.4	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	31
3.4.1	Proteingewinnung aus kultivierten Zellen.....	31
3.4.1.1	Zelllysate.....	31
3.4.1.2	Membran- Zytosol- und Kernpräparationen.....	31
3.4.1.3	Mitochondrienaufeinigung.....	32
3.4.1.4	Lysosomenaufeinigung.....	32
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	33
3.4.2.1	BCA-Assay.....	33
3.4.2.2	Bradford-Assay.....	33
3.4.3	Proteinfällung.....	33
3.4.4	Kovalente Bindung des TFA an Interaktionspartner.....	33
3.4.5	Gelelektrophorese.....	34
3.4.5.1	Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	34
3.4.5.2	Zweidimensionale Gele.....	35
3.4.5.2.1	Verwendung einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) für die erste Dimension.....	35
3.4.5.2.2	Verwendung eines 16-BAC-Gels für die erste Dimension.....	36
3.4.6	Visualisierung von Proteinen nach SDS-PAGE.....	37
3.4.6.1	Fluoreszenzgele.....	37
3.4.6.2	Colloidal Coomassie Färbung.....	37
3.4.6.3	Coomassie-Färbung.....	38
3.4.6.4	Immunoblotting.....	39
3.5	RADIOAKTIVE BINDUNGSVERSUCHE.....	41
3.5.1	Bestimmung von Affinität und Bindungskapazität.....	41
3.5.1.1	SERT.....	41
3.5.1.2	NET.....	42
3.5.1.3	Berechnung von K_d und B_{max}	42
3.5.2	Kompetitionsversuche.....	43
3.5.2.1	SERT.....	44
3.5.2.2	Norepinephrintransporter.....	44
3.5.2.3	Berechnung der IC_{50} - und K_i -Werte.....	44
3.6	DNA-ANALYTIK.....	45
3.6.1	RNA Isolierung.....	45
3.6.2	cDNA Synthese.....	45
3.6.3	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	46
3.6.4	Agarosegelelektrophorese.....	47
3.6.5	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen.....	47
3.6.6	DNA Fällung mit Ethanol und linearem Polyacrylamid.....	47
3.6.7	Restriktionsspaltung und Ligation.....	48
3.7	KLONIERUNG ZUR HERSTELLUNG VON EXPRESSIONSVEKTOREN.....	48
3.7.1	kompetente Bakterienstämme.....	49
3.7.2	Transformation kompetenter Bakterienstämme.....	49
3.7.3	Plasmidaufreinigung.....	50
3.7.4	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	50

4	ERGEBNISSE	51
4.1	DESIGN DES TRIFUNKTIONELLEN ANTIDEPRESSIVUMS	51
4.1.1	<i>UV-Linker</i>	53
4.1.2	<i>Click-Einheit</i>	54
4.2	CHARAKTERISIERUNG DER BIOCHEMISCHEN EIGENSCHAFTEN DES TFA	54
4.2.1	<i>Charakterisierung der stabil SERT und NET überexprimierenden Zelllinien</i>	55
4.2.2	<i>Radioaktive Bindungstests</i>	55
4.2.2.1	Bestimmung von B_{\max} und K_d	56
4.2.2.2	Bestimmung der K_i -Werte	56
4.3	AUFNAHME UND VERTEILUNG DES TFA IN LEBENDEN ZELLEN	62
4.3.1	<i>Kolokalisation mit Serotonintransporter</i>	62
4.3.2	<i>Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten</i>	63
4.3.2.1	Anreicherung in Mitochondrien	63
4.3.2.2	Anreicherung in Lysosomen	64
4.3.3	<i>Kompetitionsexperimente</i>	65
4.4	ANALYSE PROTEOMISCHER BINDUNGSPARTNER	76
4.4.1	<i>Kovalente Markierung der Bindungspartner – Vergleich zwischen Zellextrakten und lebenden Zellen</i>	76
4.4.2	<i>Kovalente Markierung der Bindungspartner in Zellfraktionen</i>	77
4.4.3	<i>Kovalente Markierung der Bindungspartner in lebenden Zellen</i>	78
4.4.4	<i>Kompatibilität der Click-Reaktion mit unterschiedlichen Puffersystemen</i>	79
4.4.5	<i>Test zur Spezifität der mit TFA markierten Proteine</i>	79
4.4.6	<i>Massenspektroskopie - Identifizierung von Interaktionspartnern</i>	80
5	DISKUSSION	90
5.1	BEWERTUNG DER VERWENDETEN METHODEN ZUR DETEKTION UND IDENTIFIZIERUNG DER TFA-INTERAKTIONSPARTNER	90
5.1.1	<i>Zellfärbungen</i>	90
5.1.2	<i>Fluoreszenzgele</i>	90
5.1.3	<i>Massenspektroskopische Methoden</i>	91
5.2	ANREICHERUNG DES TFA IN ZELL-KOMPARTIMENTEN	92
5.2.1	<i>Aufnahme der Antidepressiva ins Zellinnere</i>	92
5.2.2	<i>Zellmembran-SERT</i>	92
5.2.3	<i>Mitochondrien</i>	93
5.2.4	<i>Lysosomen</i>	97
5.3	ABSCHLIEßENDE BEWERTUNG ZUR FUNKTIONALITÄT DES TFA	99
5.3.1	<i>Click-Einheit</i>	99
5.3.2	<i>UV-Linker</i>	99
5.3.3	<i>Vergleichende Analyse des TFA mit Referenzsubstanzen</i>	100
5.4	AUSBLICK	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
8	ABKÜRZUNGEN	115
9	ANHANG	116

1 Einleitung

„Die Welt erscheint mir so grau!“ – Dieser Satz findet meist im übertragenen Sinn Verwendung, um eine depressive Stimmung auszudrücken. Wie jedoch eine Studie von der Albert-Ludwigs Universität in Freiburg vor Kurzem zeigte, trifft dieser Satz für depressive Menschen auch wörtlich zu. Sie sehen die Welt wirklich farbloser und kontrastärmer. Dies wird durch eine Veränderung der Netzhaut des Auges hervorgerufen (Bubl u. a. 2010). Auch wenn Wissenschaftler durch intensive Forschung seit Mitte des letzten Jahrhunderts viele Rätsel wie dieses im Zusammenhang mit Depressionen aufklären konnten, bleiben die pathophysiologischen Grundlagen der Depression bis heute unverstanden.

1.1 Grundlagen der Depression (Stand der Forschung)

1.1.1 Monoamin-Mangel-Hypothese

Die Monoamin-Mangel-Hypothese stellt eine der bekanntesten Hypothesen der physiologischen Grundlage der Depression dar. Monoamine sind Stoffe, welche die chemische Erregungsleitung der Neuronen vermitteln (Neurotransmitter) und deren Abnahme mit der Entstehung der Depression in Verbindung gebracht wird. Im Mittelpunkt stehen hierbei Monoamine wie Serotonin und die Katecholamine Norepinephrin und Dopamin. Herkömmliche Antidepressiva führen entweder zu einer Erhöhung der Monoamine im synaptischen Spalt oder provozieren durch Rezeptorbindung eine erhöhte Signalübertragung.

Die Monoamin-Mangel-Hypothese setzt sich aus der Katecholamin- und der Serotonin-Hypothese zusammen, welche parallel voneinander entwickelt wurden. Die Entwicklung der Monoamin-Mangel-Hypothese begann Mitte des letzten Jahrhunderts, als zwei antidepressiv-wirksame Substanzen entdeckt wurden (López-Muñoz & Alamo 2009). Es handelt sich zum einem um Iproniazid, welches in der Therapie von Tuberkulose eingesetzt wurde, und um Imipramin, welches als Abwandlung von Chlorpromazin ursprünglich als Antipsychotikum entwickelt worden war (Salzer & Lurie 1953; Kuhn 1958). Bis zu diesem Zeitpunkt wurde angenommen, dass Arzneimittel die Symptome einer Depression höchstens verdecken, aber keinesfalls Heilung bewirken (Salzer & Lurie 1953). Die Entdeckung dieser Antidepressiva widerlegte die bis dahin anerkannte Meinung und legte den Grundstein für die heutige Behandlung psychischer Erkrankungen.

Es galt nun zu klären, auf welche Art und Weise diese Substanzen ihren erwünschten antidepressiven Effekt erzielen. Wie von Iproniazid bereits bekannt war, erhöht es durch Hemmung der Monoaminoxidase die Konzentration des Katecholamins Norepinephrin, welches über dieses mitochondriale Enzym verstoffwechselt wird (Zeller u. a. 1952). Einige Zeit nach der Entdeckung des antidepressiven Effekts von Imipramin konnte gezeigt werden, dass diese Substanz die Aufnahme des Katecholamins Norepinephrin in Rattenhirne

vermindert (Glowinski & Axelrod 1964). Zudem kehrt Imipramin den Effekt von Reserpin um. Bei Reserpin handelt es sich um eine Substanz, welche als Neuroleptikum und Antihypertensivum verwendet wurde und in einigen Patienten während der Behandlung Depressionen auslöste (Muller u. a. 1955). Reserpin führt in Ratten zu leicht messbaren Effekten, wie z.B. Sedation, Diarrhö, Ptosis oder Hypothermie. Durch die Behandlung der Ratten mit Imipramin konnten diese Effekte vermindert werden und da Reserpin depressiogene Wirkung besitzt, nutzte man diesen Test um die „antidepressiven“ Effekte von weiteren Imipramin-ähnlichen Substanzen zu bestimmen. Daher wurde zu dieser Zeit eine ganze Gruppe von neuen, Imipramin-ähnlichen Antidepressiva, die trizyklischen Antidepressiva (TZA), entwickelt, welche immer noch zur Behandlung der Depression zum Einsatz kommen (López-Muñoz & Alamo 2009). Die Frage, welche von Imipramin ausgelösten pharmakologischen Effekte für die antidepressive Wirkung ausschlaggebend sind, konnte jedoch hiermit nicht beantwortet werden.

Sowohl für Imipramin, als auch für den Monoaminoxidasehemmer Iproniazid waren somit Effekte auf das Katecholamin Norepinephrin messbar. Schließlich konnte gezeigt werden, dass Reserpin durch Neurotransmitter-Entleerung von Nervenendigungen ebenfalls das Katecholamin Norepinephrin beeinflusst (Potter & Axelrod 1963). Diese Erkenntnisse führten schließlich 1967 zur Entwicklung der Katecholamin-Hypothese (Schildkraut 1967). Einige Jahre später wurde zusätzlich das Katecholamin Dopamin im Zusammenhang mit Depression diskutiert (Randrup & Braestrup 1977).

Serotonin wurde 1953 als weiterer Neurotransmitter identifiziert und es wurde vermutet, dass die zentrale Wirkung der stimmungsbeeinflussenden Substanz Lysergsäurediethylamid (LSD) ebenfalls über das Serotoninsystem abläuft (Twarog & Page 1953; Hirschfeld 2000). Daher wurde parallel zur Entwicklung der Katecholamin-Hypothese die Wirkung von Iproniazid, Imipramin und Reserpin auf den Serotonin-Haushalt untersucht. 1957 konnte gezeigt werden, dass Iproniazid durch Hemmung der Monoaminoxidase nicht nur den Abbau des Katecholamins Norepinephrin hemmt, sondern gleichzeitig die Serotonin-Konzentration im Gehirn erhöht (Udenfriend u. a. 1957). Außerdem verstärkt Tryptophan, eine Vorstufe des Serotonins, den antidepressiven Effekt von Monoaminoxidase-Hemmern (Coppen u. a. 1963). Zu dieser Zeit konnten jedoch noch keine klaren biochemischen Veränderungen im Gehirn gemessen werden, und so entwickelte sich die Serotonin-Hypothese vielmehr basierend auf Studien, in welchen Veränderungen von Serotonin in Blutplättchen untersucht wurden (Marshall u. a. 1960; Pletscher & Tranzer 1967; Murphy u. a. 1970). 1968 konnte schließlich zum ersten Mal gezeigt werden, dass TZA die Wiederaufnahme von Serotonin im Gehirn hemmen (Carlsson u. a. 1968). Diese Entdeckung führte zur Entwicklung der ersten selektiven Serotonin-Wiederaufnahmehemmer (SSRI = selective serotonin reuptake inhibitor), welche ihre Wirkung über die Hemmung des Serotonintransporters (SERT) entfalten. Fluoxetin wurde schließlich 1986 als erster SSRI zur Therapie der Depression zugelassen. Wie gezeigt werden konnte, hemmt Fluoxetin die Serotonin-Wiederaufnahme spezifisch, und

in der Behandlung der Depression erreicht es mit den TZA vergleichbare Wirkeffekte bei gleichzeitiger Reduktion der Nebenwirkungen (Montgomery 1989). Diese Ergebnisse bekräftigten die Serotonin-Hypothese der Depression.

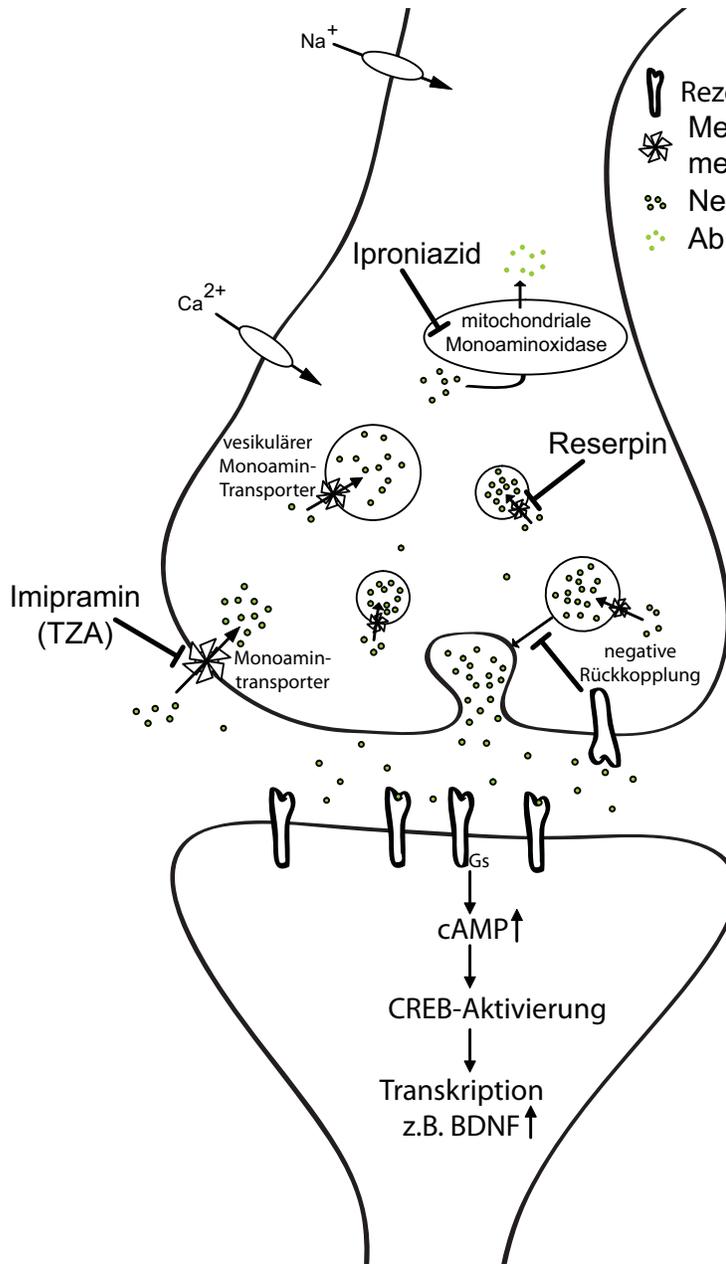


Abb. 1: prä- und postsynaptische Prozesse der Signalübertragung

Eine Erregung des präsynaptischen Neurons führt nach Ca²⁺-Einstrom zur Verschmelzung von Vesikeln mit der Membran und somit zur Transmitter-Freisetzung (wie z.B. Norepinephrin und Serotonin) in den synaptischen Spalt. Die freigesetzten Neurotransmitter können entweder über Autorezeptoren an der präsynaptischen Membran zur negativen Rückkopplung führen oder über Bindung an ionotrope und metabotrope Rezeptoren in der postsynaptischen Membran die Erregung auf das postsynaptische Neuron übertragen. Im postsynaptischen Neuron finden bei dauerhafter Stimulation Adaptationsprozesse statt, wie z.B. die verstärkte Transkription von BDNF (siehe auch 1.1.2.1).

Effekte der Substanzen Iproniazid, Imipramin und Reserpin:

Iproniazid hemmt den Abbau von Neurotransmittern in den Mitochondrien über die Monoaminoxidase. Imipramin erhöht durch Hemmung der Monoamintransporter die Konzentration von Monoaminen im synaptischen Spalt. Reserpin hemmt den vesikulären Monoamintransporter und somit die Aufnahme der Monoamine in die Vesikel.

Heute werden beide Hypothesen unter der Monoamin-Mangel-Hypothese zusammengefasst. **Abb. 1** zeigt die Angriffspunkte der für die Entwicklung dieser Hypothese wichtigen Substanzen Reserpin, Iproniazid und Imipramin in einem präsynaptischen Neuron. Wichtig erscheint zusammenfassend zu erwähnen, dass viele der heute verwendeten Antidepressiva vor Entwicklung der Monoamin-Mangel-Hypothese auf den Markt gekommen sind. Die ersten Antidepressiva wurden nicht aufgrund zielgerichteter Forschung entdeckt,

sondern allein aufgrund eines glücklichen Zufalls. Ohne jegliche Anhaltspunkte war es zur damaligen Zeit schwer, den Wirkmechanismus von Substanzen aufzuklären. Deshalb versuchte man, durch Erfahrungen in unterschiedlichen Forschungsgebieten herauszufinden, welches System für die psychischen Veränderungen verantwortlich sein könnte, welche bei depressiven Patienten vorliegen. Die Monoamine wurden in diesem Zusammenhang immer bedeutender; deshalb wurde schließlich versucht die Wirkung der Antidepressiva auf Effekte in diesem System zurückzuführen. Dies führte zur Entwicklung der Monoamin-Mangel-Hypothese. Heute ist jedoch bekannt, dass Antidepressiva neben der Hemmung der Monoamintransporter weitere Effekte ausnützen, die ebenfalls als Erklärung für ihre antidepressive Wirkung in Frage kommen.

1.1.2 Weitere Überlegungen

In den letzten Jahren entwickelten sich weitere Hypothesen der physiologischen Grundlage der Depression. Ein Grund hierfür ist, dass die Monoamin-Mangel-Hypothese alleine viele Fragen im Bezug auf Depressionen nur unzureichend beantwortet. Zusätzlich wurden weitere Systeme bekannt, welche neben dem Monoaminsystem mit Depressionen in Zusammenhang gebracht werden können.

Bislang ist z.B. unzureichend verstanden, warum Patienten erst nach Wochen auf eine Antidepressiva-Behandlung mit einer Symptom-Verbesserung ansprechen, obwohl die pharmakologische Hemmung der Serotonin-Wiederaufnahme innerhalb weniger Stunden abläuft. Ebenfalls schwer erklärbar ist, dass selektivere Wirkstoffe wie die SSRI zwar ein günstigeres Nebenwirkungsprofil, aber keine größere Wirkeffizienz aufweisen. In einigen Studien zeigten die SSRI im Vergleich mit den älteren TZA sogar geringere Effektivität (Steffens u. a. 1997). Des Weiteren ist noch unbekannt, wie die mit anderen Antidepressiva vergleichbare Wirkung von Tianeptin zu erklären ist. Tianeptin steigert die Wiederaufnahme von Serotonin über den SERT und führt somit, im Gegensatz zu anderen Antidepressiva, zu einer Verminderung von Serotonin im synaptischen Spalt (Lôo u. a. 1999). In der heutigen Zeit sprechen immer noch über 40% der Patienten nicht oder nur teilweise auf eine Therapie mit Antidepressiva an und in einigen Studien konnte lediglich ein geringer Unterschied zwischen Placebo und Antidepressivum gefunden werden (Kirsch u. a. 2008; Insel & P. S. Wang 2009; Fournier u. a. 2010). Erstaunlich ist auch, dass gesunde Probanden keine depressiven Symptome zeigen, wenn ihre Serotonin- bzw. Norepinephrinspiegel durch bestimmte Diäten gesenkt werden (Delgado u. a. 1990). Dies zeigt, dass die Monoamin-Mangel-Hypothese, auf der das Wirkprinzip der meisten heute verwendeten Antidepressiva basiert, nicht in der Lage ist, die Komplexität der Depression vollständig darzustellen. Die Entwicklung weiterer Hypothesen ist daher notwendig, um die pathophysiologischen Grundlagen der Depression besser zu verstehen.

1.1.2.1 Erweiterung der Monoamin-Mangel-Hypothese

Das späte Ansprechen der Patienten auf eine Therapie mit Antidepressiva kann durch Adaptationsprozesse erklärt werden, welche auf eine anhaltende Steigerung der Neurotransmitter im synaptischen Spalt folgen (Duman u. a. 1997). Nach Bindung von Serotonin bzw. Norepinephrin an G_s -Protein gekoppelte Rezeptoren wird vermehrt zyklisches Adenosin-monophosphat (cyclic Adenosine-Mono-Phosphate = cAMP) gebildet. Dieses induziert u.a. cAMP Response Element-Binding protein (CREB), welches nach Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen (CRE = cAMP response element) zur gesteigerten Expression von Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) in bestimmten Neuronenpopulationen im Hippokampus und präfrontalen Kortex führt (Duman & Monteggia 2006). BDNF gehört zu den Neurotrophinen und fördert die Neurogenese. In Tiermodellen führen unterschiedliche Stressoren zu einer Abnahme von BDNF im Hippokampus (Duman u. a. 1997; Duman & Monteggia 2006). In weiteren Tierstudien wirkt BDNF selbst antidepressiv und im „social defeat stress model“, einem Tiermodell für Depression, ist es in bestimmten Hirnregionen herunterreguliert (Siuciak u. a. 1997; Tsankova u. a. 2006). Adaptationsprozesse nach einer gesteigerten Monoaminstimulation scheinen mit der Besserung der klinischen Symptomatik der Patienten in zeitlichem Zusammenhang zu stehen.

1.1.2.2 Glutamat und γ -Aminobuttersäure

Seit einigen Jahren werden außerdem die Rolle zweier weiterer Neurotransmitter, Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA), für die Depression diskutiert. Die Aminosäure Glutamat ist der wichtigste erregende Neurotransmitter im zentralen Nervensystem. Diese Aminosäure kann im zentralen Nervensystem durch das Enzym L-Glutaminsäuredecarboxylase in ihr biogenes Amin GABA umgewandelt werden. GABA nimmt die Position des wichtigsten hemmenden Neurotransmitters im zentralen Nervensystem ein. Beide Neurotransmitter entfalten ihre Wirkung durch Bindung an transmembranäre ionotrope oder metabotrope Rezeptoren. Veränderungen an Glutamat oder GABA sind im Gehirn oder Serum depressiver Patienten messbar (Kugaya & Sanacora 2005). Der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor) nimmt eine zentrale Rolle als Rezeptor im glutamatergen System ein. Es konnte gezeigt werden, dass einige NMDA-Rezeptor-Antagonisten, wie z.B. das Anästhetikum Ketamin oder das antivirale Medikament Amantadin, antidepressive Effekte hervorriefen (Huber u. a. 1999; Berman u. a. 2000; Kudoh u. a. 2002; Stryjer u. a. 2003; Zarate u. a. 2006). In der Therapie der Depression kommen heutzutage stimmungsstabilisierende Substanzen wie z.B. Lamotrigin als Phasenprophylaxe zum Einsatz. Diese Substanz setzt die Freisetzung von Glutamat im zentralen Nervensystem herab (Maltese 1999; Barbee & Jamhour 2002; Normann u. a. 2002). Es scheinen daher nicht nur Neurotransmitter aus der Gruppe der Monoamine (siehe 1.1.1), sondern auch die Neurotransmitter Glutamat und GABA im Zusammenhang mit Depression zu stehen.

1.1.2.3 Stress-Hypothese der Depression

Veränderungen der Stress-Achse depressiver Patienten konnte durch mehrere Studien belegt werden (Holsboer 2000). Die Stress-Achse setzt sich aus Hypothalamus, Hypophyse und Nebennierenrinde zusammen. Ist der Körper Stress ausgesetzt, wird als erstes Corticotropin-releasing-Hormon (CRH) im Hypothalamus freigesetzt. CRH führt in der Hypophyse zur Ausschüttung von adrenokortikotropem Hormon (ACTH), welches in der Nebennierenrinde schließlich die Cortisol-Sekretion erhöht. Cortisol ist schließlich durch Veränderung der Transkription durch Bindung und Aktivierung von Glucocorticoid-Rezeptoren für die physiologischen Effekte dieser Stress-Achsen-Aktivierung verantwortlich. Des Weiteren führt Cortisol zur negativen Rückkopplung und hemmt die Ausschüttung von CRH im Hypothalamus und ACTH in der Hypophyse und beeinflusst damit seine eigene Ausschüttung. Bereits 1957 wurde ein Hypercortisolismus in depressiven Patienten festgestellt und in Verbindung mit einer Veränderung der Stress-Achse gebracht (Board u. a. 1957). Ein wichtiger Test für den Zusammenhang zwischen Stress-Achse und Depression, ist der Dex-CRH-Test (Dexamethason-Corticotropin-Releasing-Hormon-Test). Bei diesem Test wird eine niedrige Dosis Dexamethason um 23 Uhr verabreicht. Am nächsten Tag werden, nach einer Applikation von CRH um 15 Uhr, die ACTH- und Cortisol-Konzentrationen im peripheren Blut bestimmt. Bei depressiven Patienten zeigt sich hierbei eine vermehrte Ausschüttung von ACTH und Cortisol im Vergleich zu gesunden Probanden (Bardleben & Holsboer 1989; Heuser u. a. 1994; Rybakowski & Twardowska 1999). Mittels des Dex-CRH-Tests kann mit 80%iger Sicherheit zwischen gesundem und krankhaftem Zustand unterschieden werden (Heuser u. a. 1994). Zusätzlich lassen sich mit Hilfe dieses Tests Aussagen über den Therapieerfolg machen. Eine Normalisierung der Stress-Achse scheint hierbei für einen Behandlungserfolg entscheidend zu sein (Holsboer u. a. 1987; Zobel u. a. 1999). Die messbaren Veränderungen in der Stress-Achse erleichtern die Diagnose und Behandlung der Depression und stellen außerdem ein wichtiges Bindeglied zu anderen Hypothesen, wie z.B. der Monoamin-Mangel- (siehe 1.1.2.1) oder der entzündlichen Hypothese (siehe 1.1.2.4) dar.

1.1.2.4 Entzündliche Hypothese

Eine weitere Hypothese der Depression stellt entzündliche Prozesse in den Mittelpunkt der Überlegungen, bei welchen proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, INF γ oder TNF α freigesetzt werden (M. Maes u. a. 2009). In depressiven Patienten konnte eine erhöhte Menge bestimmter Zytokine, z.B. IL-1 und IL-6 festgestellt werden (M. Maes 1995; Nunes u. a. 2002). Ebenfalls scheint die Normalisierung des erhöhten Zytokinpiegels durch eine Behandlung mit Antidepressiva aufzutreten (Kenis & M. Maes 2002). Neben diesen Messungen in depressiven Patienten konnte ebenso gezeigt werden, dass eine Behandlung von Tumor- bzw. Hepatitis-Patienten mit IL-2 oder IFN α häufig zu

ausgeprägt depressiven Symptomen führt (M. Maes u. a. 2001; Bonaccorso u. a. 2001; Bonaccorso, Marino, Biondi, u. a. 2002; Bonaccorso, Marino, Puzella, u. a. 2002). Dadurch wird deutlich, dass ein enger Zusammenhang zwischen Depression und entzündlichen Prozessen vorhanden ist. Es wird sogar spekuliert, ob die Entzündung als Ursache für die Veränderungen der Stress-Achse, des Serotonin-Systems und der gesteigerten Neurodegeneration zu verstehen ist (Schiepers u. a. 2005; M. Maes u. a. 2009).

1.1.2.5 Mitochondrien-Hypothese

Seit 1994 Rolf Luft den Begriff der „mitochondrial medicine“ zum ersten Mal verwendete, traten die Mitochondrien in den Mittelpunkt vieler Untersuchungen unterschiedlichster Erkrankungen (Luft 1994). Der Begriff der „mitochondrial psychiatry“ trat schließlich 2005 auf (Gardner & Boles 2005). Eine gestörte Kommunikation zwischen Nervenzellen scheint für das Auftreten psychiatrischer Erkrankungen ausschlaggebend. Neuronale Netzwerke benötigen für die Aufrechterhaltung der Kommunikation viel Energie in Form von ATP und sind daher neben dem Muskelgewebe vor allem von mitochondrialen Erkrankungen betroffen. Daher versuchten Forscher in den letzten Jahren festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen mitochondrialen Funktionsstörungen und dem Auftreten von psychiatrischen Erkrankungen besteht (Gardner & Boles 2010). Die wichtigste Funktionseinheit der Mitochondrien stellen die 5 Komplexe dar, die in der oxidativen Phosphorylierung ATP produzieren. Für einige Antidepressiva, wie z.B. Imipramin und Clomipramin, wurde gezeigt, dass sie stark an Rattenlebermitochondrien binden und selbst durch Waschen nicht aus den Mitochondrien entfernt werden (Weinbach u. a. 1986). Weiterhin ist bekannt, dass Antidepressiva z.B. die ATP-Synthese, das mitochondriale Membranpotential und den apoptotischen Zelltod beeinflussen. In den unterschiedlichen Studien scheint es jedoch von mehreren Faktoren, wie z.B. Antidepressiva, Inkubationszeit, verwendetes Material abhängig zu sein, in welche Richtung sich die mitochondriale Funktion verändert (Curti u. a. 1999; Xia, Lundgren, Bergstrand, J. W. DePierre, u. a. 1999; Daley u. a. 2005; Nahon u. a. 2005; Búrigo u. a. 2006; Zhang u. a. 2008; Maurer u. a. 2009; Abdel-Razaq u. a. 2011). Zusätzlich konnten Defekte in der mitochondrialen DNA bzw. der nukleären DNA, welche für mitochondriale Proteine kodieren, mit psychischen Erkrankungen in Verbindung gebracht werden (Shao u. a. 2008; Ben-Shachar & Karry 2008; Gardner & Boles 2010). Ein Zusammenhang zwischen Depression und mitochondrialer Dysfunktion ist daher wahrscheinlich.

1.1.2.6 Netzwerk-Hypothese der Depression

Die Netzwerk-Hypothese verbindet die oben genannten Hypothesen. Dies erscheint sinnvoll, da keine der oben genannten Hypothesen eindeutig als die zentrale Hypothese angesehen werden kann. Vielmehr scheint ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren für die Entstehung einer Depression verantwortlich zu sein.

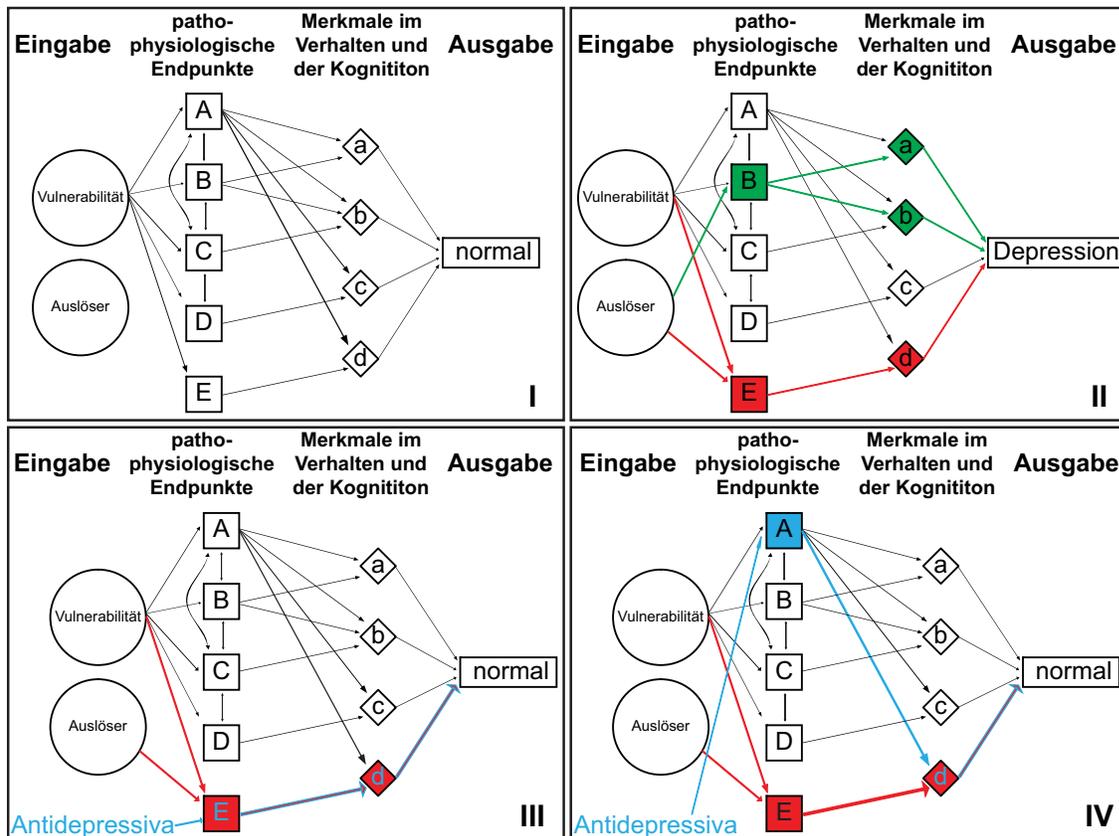


Abb. 2: Netzwerk-Hypothese: **I:** gesunder Zustand, **II:** Veränderungen unterschiedlicher pathophysiologischer Endpunkte (rot und grün) können zu einer Depression führen. Teilweise ist das Zusammenspiel von vorhandener Vulnerabilität und einem auslösenden Ereignis nötig (rote Pfeile), manchmal reicht jedoch bereits ein auslösendes Ereignis aus (grüne Pfeile); **III:** Gesunder Zustand wird durch Behandlung mit Antidepressiva erreicht, welche den veränderten pathophysiologischen Endpunkt normalisieren. **IV:** Gesunder Zustand wird durch Behandlung mit Antidepressiva erreicht, welche einen anderen pathophysiologischen Endpunkt beeinflussen und damit indirekten Einfluss auf die Symptomatik und somit den Gesundheitszustand haben (modifiziert, nach Tanti & Belzung 2010).

Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Netzwerkhypothese. Grundsätzlich werden drei Ebenen in dieser Hypothese unterschieden: die Eingabe-, die Mittel- und die Ausgabe-Ebene. Die Ausgabe-Ebene entspricht dem klinischen Bild des Patienten, ob er als gesund eingestuft wird oder ob er an einer Depression leidet. In der Mittelebene werden die pathophysiologischen Endpunkte und Merkmale im Verhalten und der Kognition aufgeführt. Als pathophysiologische Endpunkte werden messbare Faktoren bezeichnet, welche im Zusammenhang mit Depression auftreten und bereits in den oben beschriebenen Hypothesen auftauchen. Zu ihnen zählen z.B. der Cortisol-, Serotonin- oder BDNF-Spiegel. Zu Merkmalen im Verhalten und der Kognition gehören unter anderem Stressbewältigung und die Stimmung der Person. Die Eingabe-Ebene (Vulnerabilität und auslösende Ereignisse) kann indirekt über die Mittel-Ebene die Ausgabe-Ebene (klinisches Bild) beeinflussen. Wie **Abb. 2** zeigt, ist der Zusammenhang zwischen klinischem Bild des Patienten und der Eingabe-Ebene sehr komplex. Eine Vorhersage über die Entwicklung des klinischen Bildes des Patienten aus

der Eingabe-Ebene heraus scheint somit mit heutigem Wissen fast unmöglich zu sein. Es wird deutlich, dass unterschiedliche pathophysiologische Endpunkte für die Entwicklung einer Depression verändert sein können. Meistens ist das Zusammenspiel mehrerer pathophysiologischer Endpunkte nötig, um eine Depression auszulösen. Ebenso können in der Behandlung mit Antidepressiva unterschiedliche Wege zu einem beschwerdefreien Patienten führen. Eine direkte Beeinflussung des veränderten pathophysiologischen Endpunkts kann ebenso zum Ziel führen wie die indirekte Beeinflussung von einem oder mehreren unveränderten pathophysiologischen Endpunkten (Tanti & Belzung 2010). Dieses Model ist sehr vielschichtig, erlaubt die Kombination aller Erklärungsansätze, spiegelt die Komplexität der Depression wider und verhilft zu einer neuen Blickweise.

1.1.3 Schlussfolgerung

Für Kraepelin (1856-1926), der als Begründer der modernen Psychopharmakologie gesehen wird, galt der Grundsatz, dass durch eine genauere Betrachtung der depressiven Symptomatik Patienten in Subtypen eingeteilt und durch unterschiedliche Behandlungsstrategien Verbesserungen der depressiven Symptomatik erreicht werden können. Dies machte ihn zum Begründer des heutigen Klassifizierungssystems psychischer Störungen (Braceland 1957; Engstrom u. a. 2006). Im Gegensatz dazu steht die Ansicht Winokurs, der die Einteilung der Depression in Subtypen für nicht relevant ansieht, da die Depression klinisch gesehen eine sehr homogene Erkrankung ist, welche aber durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst und beeinflusst werden kann. Daher erscheint sie aus ethologischer Sicht sehr heterogen zu sein (Winokur 1997). Die moderne Ansicht Winokurs spiegelt sich in den unterschiedlichen, im Laufe der Zeit entwickelten Hypothesen wider. Keine dieser Hypothesen kann die Ursachen und die Grundlagen der Depression vollständig erklären.

1.2 Chemische Proteomik zur Aufklärung komplexer Wirkmechanismen niedermolekularer Substanzen

Die TZA bilden die älteste Gruppe der Antidepressiva. Die antidepressive Wirkung dieser Substanzen wurde zu einer Zeit entdeckt, in der die Monoamine aus unterschiedlichsten Gründen in Zusammenhang mit Depression Bedeutung erlangten. Es scheint daher naheliegend, dass versucht wurde die antidepressive Wirkung der TZA auf eine Veränderung der Monoaminspiegel zurückzuführen, vor allem, weil es zu dieser Zeit methodisch unmöglich war, neue Bindungspartner von Arzneistoffen Proteom-weit zu identifizieren. Dies kann jedoch zur Folge haben, dass nicht zwangsläufig die wirklichen Wirkmechanismen aufgedeckt werden.

Heute gibt es neuere, modernere Verfahren, die es ermöglichen Bindungspartnern niedermolekularer Substanzen, wie z.B. die TZA, Proteom-weit zu identifizieren. Eine der

Möglichkeiten ist durch die chemische Proteomik gegeben. Der Vorteil liegt vor allem darin, dass die Erforschung der Wirkmechanismen dieser Substanz frei von bereits vermuteten Hypothesen stattfinden kann.

1.2.1 Basisstrategie

In der chemischen Proteomik werden verschiedene Gebiete vereinigt: die allgemeine Biologie, die Chemie, die Biochemie, die Proteomik, die Strukturbiologie und die Bioinformatik (S.-Y. Han & Hwan Kim 2007). Um mit Hilfe der chemischen Proteomik Bindungspartner niedermolekularer Substanzen identifizieren zu können, werden diese chemisch verändert, wobei die chemische Gruppe das Bindungsprofil und die Affinitäten der Substanz zu ihren Interaktionspartnern möglichst wenig verändern sollte. Hierbei gilt eine Affinitätsabnahme um den Faktor 1 000 als tolerabel. Ein Teilbereich der chemischen Proteomik bildet die Photoaffinitätsmarkierung. Hierbei wird ein UV-Linker in die niedermolekulare Substanz integriert, welcher eine kovalente Bindung der Interaktionspartner ermöglicht. Die niedermolekulare Substanz kann mit einem Fluorophor, Biotin oder radioaktiv markiert und somit die kovalent gebundenen Interaktionspartner visualisiert werden. Die chemische Modifikation der niedermolekularen Substanz mit großen Gruppen wie Fluorophoren und Biotin kann jedoch zu weitaus größeren Affinitätsverlusten führen und darüber hinaus die Aufnahme der modifizierten Substanz in die Zelle vermindern (Speers u. a. 2003). Des Weiteren bleibt die Möglichkeit, die Substanz direkt radioaktiv zu markieren, jedoch ist das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen aufwendig und teuer. Deshalb wurde eine Methode der chemischen Synthese, die sogenannte Click-Chemie, in den letzten Jahren in diesem Zusammenhang in die Biologie überführt (Kolb u. a. 2001; Speers u. a. 2003; Speers & Cravatt 2004). Die Click-Chemie ermöglicht die Markierung der niedermolekularen Substanzen nach dem kovalenten Binden an Interaktionspartner. Hierzu muss lediglich eine sehr kleine chemische Gruppe (Alkin oder Azid) in die niedermolekulare Substanz eingebaut werden, welche die Eigenschaften der niedermolekularen Substanz meist wenig verändert. Durch diese Gruppe können in einer chemischen Reaktion die Interaktionspartner, welche die niedermolekulare Substanz kovalent gebunden haben, mit z.B. Fluorophoren, Biotin oder Goldpartikeln (für Elektronenmikroskopie) markiert und dadurch visualisiert werden. Im Falle von markierten Proteinen können diese nach Aufreinigung mit massenspektroskopischen Methoden identifiziert werden.

Mit dieser Methode können somit Bindungspartner niedermolekularer Substanzen Proteom-weit gebunden, visualisiert und identifiziert werden.

1.2.2 UV-Linker zur Photoaffinitätsmarkierung

Heutzutage verwendete UV-Linker sind unter anderen die Arylazide, die Benzophenone, die Diazoniumsalze und die Diazirine (siehe **Abb. 3**) (Kotzyba-Hibert Florence u. a. 1995).

Diese Linker können durch UV-Licht in Carbene, Nitrene oder Carbokationen überführt werden. Diese sind sehr reaktiv und können mit Kohlenstoff, Schwefel, Stickstoff oder Sauerstoff eine kovalente Bindung eingehen. Bei der Wahl des richtigen UV-Linkers müssen mehrere Faktoren, wie z.B. Größe, Stabilität während der Lagerung, Anregungswellenlänge, Reaktivität der durch UV-Licht aktivierten Form, Stabilität der Endprodukte, Synthesemöglichkeiten und Verwendbarkeit in der niedermolekularen Substanz beachtet werden. Es sollte möglichst ein UV-Linker mit einer Anregungswellenlänge über 300 nm verwendet werden, da sonst vermehrt Proteinschäden auftreten können. Des Weiteren sollte der UV-Linker möglichst reaktiv sein, damit ebenfalls eine Reaktion mit CH-Gruppen eintreten kann und somit die kovalente Bindung des Interaktionspartners wahrscheinlicher wird. Zur Minimierung unspezifischer Bindungen sollte ein UV-Linker verwendet werden, bei welchem die reaktive Form nur für kurze Zeit stabil ist (Brunner 1993; MacKinnon & Taunton 2009). Die Vor- und Nachteile der unterschiedlichen UV-Linker sind in Tab. 1-1 zusammengefasst.

Tab. 1-1: Vor- und Nachteile der am häufigsten verwendeten UV-Linker (siehe auch Abb. 3) (Brunner 1993; Dormán & Prestwich 1994; Kotzyba-Hibert Florence u. a. 1995; Dormán & Prestwich 2000; Hatanaka & Sadakane 2002; Sadakane & Hatanaka 2006; Tanaka u. a. 2008; MacKinnon & Taunton 2009; Gubbens u. a. 2009)

Namen	Vorteile	Nachteile
Arylazide	<p>leichte Synthese</p> <p>Anregung nitrosubstituierter Arylazide bei ~340 nm (Proteinschäden begrenzt)</p> <p>Nitren sehr reaktiv</p> <p>kaum Bildung von Keteniminen bei fluorosubstituierten Arylaziden</p>	<p>chemisch weniger stabil als andere UV-Linker</p> <p>Anregung unsubstituierte Arylazide bei ~260 nm (vermehrtes Auftreten von Proteinschäden)</p> <p>Reaktion von nicht fluorosubstituierter Arylazide vor allem über langlebige elektrophile Ketenimine (vermehrt unspezifische Bindungen)</p> <p>Ketenimine können nicht mit C-H-Bindungen interagieren</p>
Diazonium-salze	<p>Aryl-Kation-Zwischenprodukt sehr reaktiv</p> <p>Anregung bei > 300 nm</p> <p>erhöhte chemische Stabilität und Reaktivität durch Einführung von Substituenten mit +I- bzw. +M-Effekt</p>	<p>erhöhte Instabilität durch Substituenten mit -I- bzw. -M-Effekt in nicht-sauren Bedingungen</p>
Benzo-phenone	<p>chemisch stabil</p> <p>Anregung bei ~350 nm</p> <p>Selektivität für kovalente Bindung an C-H-Bindungen</p> <p>keine Reaktion des reaktiven Diradikals mit Wasser möglich => kein Einfluss des Lösungsmittels</p>	<p>sehr groß, Steigerung der Hydrophobizität</p> <p>keine Reaktion des reaktiven Diradikals mit Wasser möglich => vermehrt unspezifische Bindungen mit Proteinen, die durch Diffusion erreicht werden</p>
Diazirine	<p><u>Alkyl-Diazirin</u></p> <p>leichte Synthese</p> <p>sehr klein</p> <p>Anregung bei ~350 nm</p> <p>Carben-Zwischenprodukt sehr reaktiv (~25% kovalente Bindung an Proteine)</p> <p><u>Trifluoromethylphenyldiazirin</u></p> <p>chemisch sehr stabil</p> <p>Anregung bei ~350 nm</p> <p>Carben-Zwischenprodukt sehr reaktiv (~75% kovalente Bindung an Proteine)</p> <p>wenig unspezifische Bindungen (Diazoisomer stabil)</p>	<p><u>Alkyl-Diazirin</u></p> <p>Verhinderung intermolekularer Reaktionen mit Proteinen wegen intramolekularer Umlagerung des Carben-Zwischenproduktes</p> <p>Unspezifische Bindungen durch Reaktionen des elektrophilen Diazoisomers (lange Halbwertszeit)</p> <p><u>Trifluoromethylphenyldiazirin</u></p> <p>Synthese problematisch</p> <p>relativ groß</p>

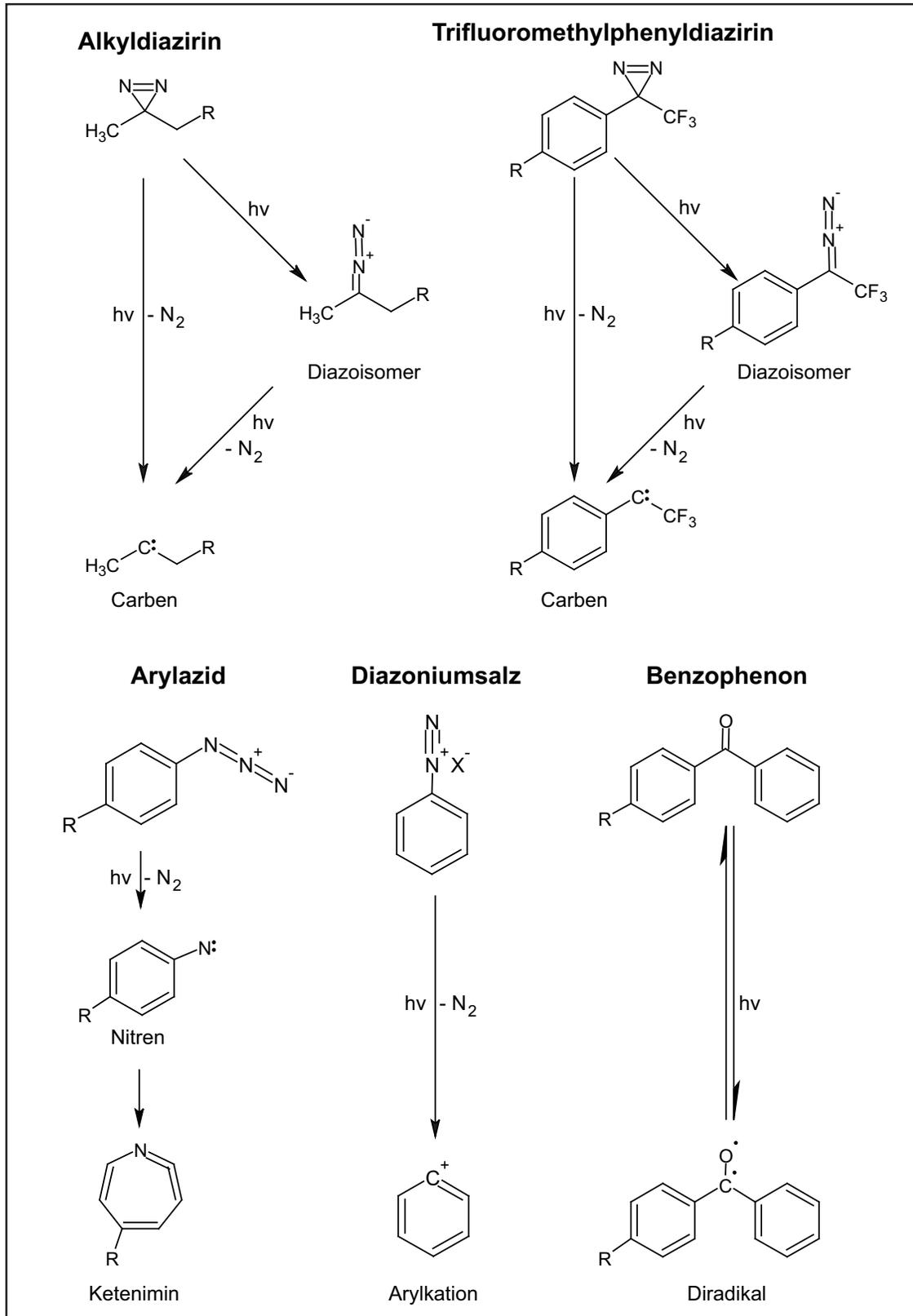


Abb. 3: UV-Linker: Bildung des reaktiven Zwischenprodukt nach UV-Licht-Aktivierung (modifiziert, nach Tanaka u. a. 2008 und Kotzyba-Hibert Florence u. a. 1995)

1.2.3 Click-Reaktion

Bei Click-Reaktionen handelt es sich um sehr selektive und einfach durchzuführende chemische Reaktionen mit hoher Spezifität und Ausbeute (Kolb u. a. 2001). Ein Beispiel für eine Click-Reaktion ist die Kupfer-katalysierte 1,3-dipolare Zykoaddition zwischen einem Azid und einem Alkin, auch Huisgenaddition genannt (siehe **Abb. 4**) (Huisgen 1963; Kolb u. a. 2001; Rostovtsev u. a. 2002; Tornøe u. a. 2002; Kolb & K.B. Sharpless 2003; Speers u. a. 2003; Moses & Moorhouse 2007). In der Biologie ist diese Reaktion einerseits von Bedeutung, da Azide und Alkine auch unter biologischen Bedingungen sehr spezifisch und schnell miteinander reagieren. Andererseits kommen Azide und Alkine in biologischen Materialien kaum vor, was zur Reduktion von Nebenreaktionen führt. Diese Eigenschaften werden auch unter dem Begriff Bioorthogonalität zusammengefasst (Breinbauer & Köhn 2003; Q. Wang u. a. 2003; Prescher & Bertozzi 2005; Jewett & Bertozzi 2010). In lebenden Zellen kann diese Reaktion jedoch aufgrund der Toxizität des zur Katalyse benötigten Kupfers nur in einer abgewandelten, Kupfer-freien Form durchgeführt werden (Link & Tirrell 2003; Baskin u. a. 2007). Bei einer Integration des Alkins in die niedermolekulare Substanz und Verwendung einer mit Azid versehenen Substanz zur Visualisierung bzw. Anreicherung wurde bei der Click-Reaktion weniger Hintergrund beobachtet (Speers & Cravatt 2004).

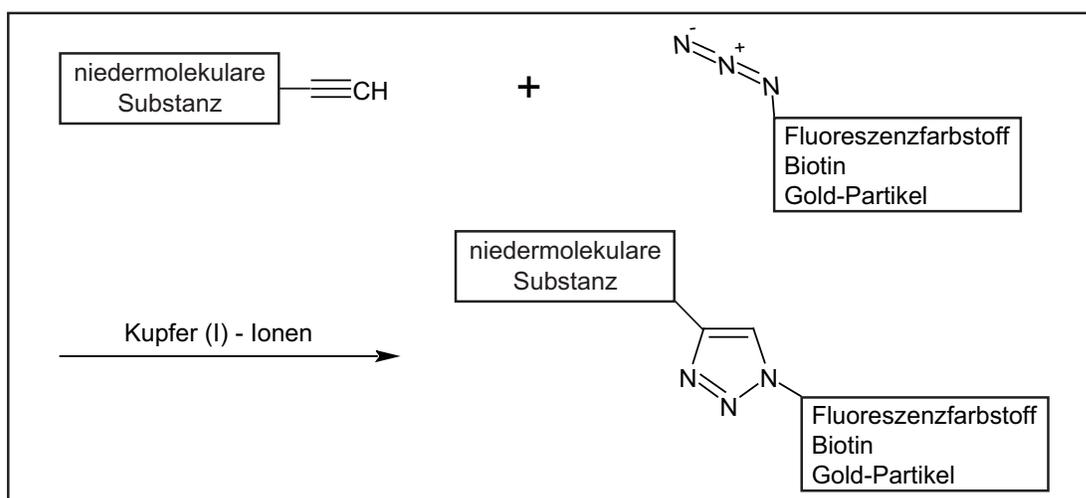


Abb. 4 Click-Reaktion, Huisgen – 1,3 – dipolare Zykoaddition

Kupfer (I) – Ionen stabilisieren den Komplex zwischen Azid und Alkin und erleichtern die 1,3 – dipolare Zykoaddition. Bei der kovalenten Bindung dieser beiden Gruppen entsteht als Endprodukt ein 1,4 – disubstituiertes – 1,2,3 - Triazol.

Zusammenfassend wird die Click-Reaktion in der Biologie immer bedeutender, da sie eine bioorthogonale Reaktion darstellt, die spezifisch und mit biologischen Materialien kompatibel ist.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Welche biochemischen Veränderungen im Gehirn bei der Entwicklung und Manifestation der Depression vorliegen, ist weitgehend ungeklärt. Nach dem heutigen Kenntnisstand ist ein Zusammenspiel mehrerer Faktoren, wie in der Netzwerk-Hypothese beschrieben, wahrscheinlich. Für die meisten Antidepressiva, allen voran für die TZA, wird ein über das Monoaminsystem hinausgehender Wirkmechanismus diskutiert. Die Aufklärung noch unbekannter Wirkmechanismen antidepressiv wirkender Substanzen könnte zur Entwicklung neuer, besser wirksamer Antidepressiva beitragen.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode etabliert, die es zukünftig ermöglicht, unter Verwendung eines chemisch modifizierten trifunktionellen Antidepressivums (TFA, siehe **Abb. 5**), neue Interaktionspartner von Antidepressiva zu visualisieren und zu identifizieren. Darüber hinaus sollten erste Interaktionsprofile von Antidepressiva unter Verwendung dieser Methode erstellt werden. TFA wird aus Imipramin durch Einführung zweier chemisch funktionellen Gruppen hergestellt. Für die kovalente Bindung des TFA an potentielle Interaktionspartner wird ein UV-aktivierbares Arylazid und für die Visualisierung ein „clickbares“ Alkin eingebaut. Über die Click-Einheit können Interaktionspartner des TFA mit z.B. Fluorophoren, Biotin oder Goldpartikeln markiert werden.

Zunächst sollten die pharmakodynamischen Eigenschaften des TFA in SERT bzw. NET Bindungsanalysen untersucht werden. Die Bindungsstudien erlauben eine Vorhersage über die Affinität des TFA zu einem gut charakterisierten Bindungspartner im direkten Vergleich zu unmodifizierten, handelsüblichen Antidepressiva. Im nächsten Schritt sollte auf zellulärer Ebene die Verteilung und Sichtbarmachung des TFA und dessen Interaktionspartner untersucht werden. Hierzu wurden HEK-Zellen und primäre Astrozyten und Neuronen verwendet. Auf diesen Analysen aufbauend wurde die Anreicherung in subzellulären Organellen untersucht. Des Weiteren sollte direkt in Proteinlysaten ein Profil neuer Bindungspartner erstellt werden. Bindungspartner werden hierzu durch Gele aufgetrennt und visualisiert und unter Verwendung von massenspektroskopischen Methoden identifiziert.

2 Material

2.1 TFA

TFA, sowie zwei bifunktionelle Antidepressiva (BFA), welche dem TFA gleichen jedoch entweder einen UV-Linker oder eine Click-Einheit besitzen (BFA-UV und BFA-Click), wurden im Rahmen einer Kollaboration mit Ranganath Gopalakrishnan (Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München; AG Hausch) synthetisiert (**Abb. 5**). Die Reinheit und Stabilität wurde durch HPLC-, Massenspektrometrie- und NMR-Analysen bestätigt.

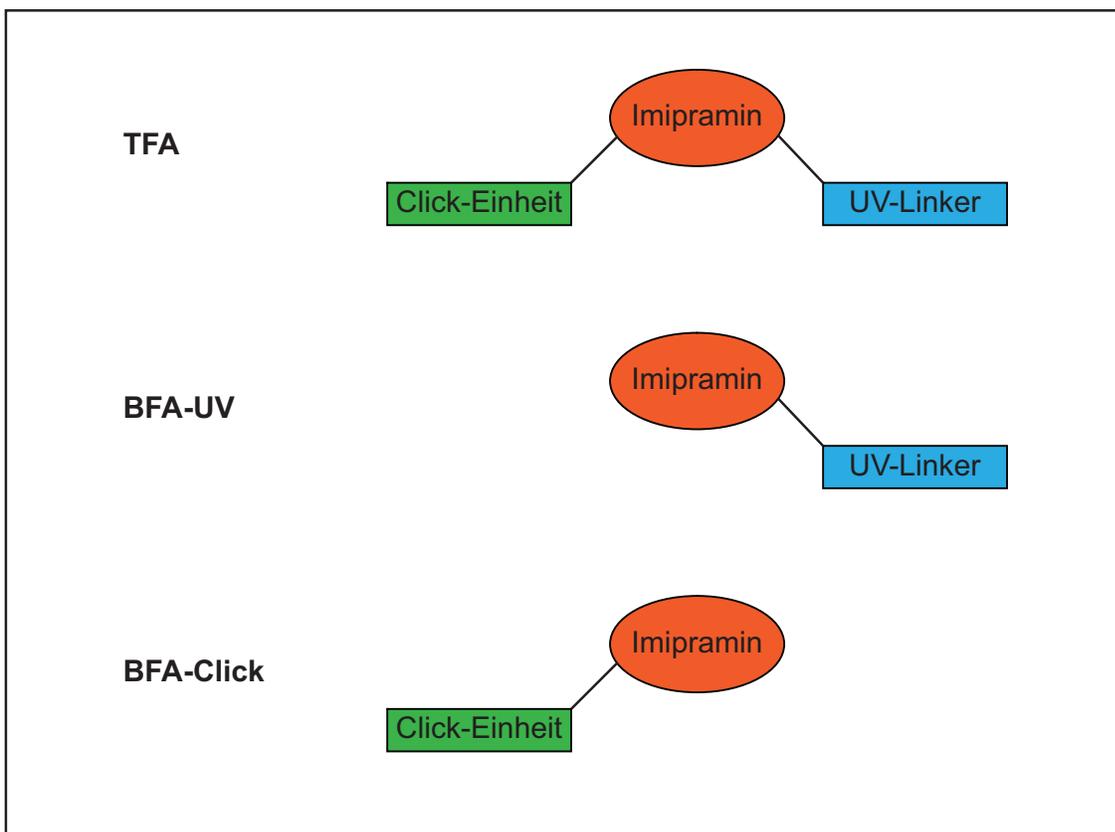


Abb. 5: schematische Darstellung: a) trifunktionelles Antidepressivum (TFA), b) bifunktionelles Antidepressivum mit UV-Linker (BFA-UV), c) bifunktionelles Antidepressivum mit Click-Einheit (BFA-Click)

2.2 Chemikalien

Name	Bezugsquelle
[³ H]-Citalopram	Perkin Elmer (Boston; USA)
[³ H]-Nisoxetin	Perkin Elmer (Boston; USA)
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Roth (Karlsruhe)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	PEQLAB (Erlangen)
Amitriptylin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Ammoniumsulfat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Merck (Darmstadt)
APS	Biorad (München)
Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt)
ATP	Fluka (Buchs)
Benzyldimethyl-n-hexadecylammonium-chlorid (16-BAC)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Biolyte	Biorad (München)
Bisacrylamid	AppliChem (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	Biorad (München)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Chaps	Biorad (München)
Citalopram-Hydrobromid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Coomassie Brilliant Blue R-250	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Deoxycholat	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Desipramin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Dikaliumhydrogenphosphat-Trihydrat	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)

Dinatriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Roth (Karlsruhe)
Eisensulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Formaldehyd	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Gentamicin	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerin	Merck (Darmstadt)
Glycin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Imipramin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Immobilon Western HRP Substrat	Millipore (Eschborn)
Iodacetamid	Biorad (München)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Roth (Karlsruhe)
Kupfersulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Laminin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
LB Broth Base	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Lineares Polyacrylamid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Lofepamin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Low-melt-Agarose	Biozym (Hess. Oldendorf)
Lumac LSC, Lumasafe (Szintillationsfluid)	Perkin Elmer (Rodgau)
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Magnesiumsulfat	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid	Roth (Karlsruhe)
Methanol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Milchpulver	Roth (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure - Natriumsalz	Roth (Karlsruhe)

MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Natriumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis (Heidelberg)
Neomycin (G418)	Serva (Heidelberg)
Nisoxetin-Hydrochlorid	MP Biomedicals, LLC (Illkirch; Frankreich)
Paroxetin-Hydrochlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Phosphorsäure	Merck (Darmstadt)
Poly-D-Lysin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Polyethylenimin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
ProLong Gold Antifade	Invitrogen (Karlsruhe)
Protease-Inhibitor (EDTA-frei)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Puromycin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Pyronin	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
RNase-Free	CLP (Grossbritannien)
Rubidiumchlorid	Roth (Karlsruhe)
Saponin	Fluka (Buchs)
Sucrose	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Thioharnstoff	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Trazodon	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Tris(Benzyltriazolymethyl)amin (TBTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Tris-Carboxyethylphosphin (TCEP)	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Triton-X-100	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Trizol® Reagent	Life Technologies (USA)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Wasserstoffperoxid	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Xylencyanol	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Name	Bezugsquelle
96 well, Rundbodenplatten, nicht bindende Oberfläche	Corning (Corning, New York; USA)
Kryoröhrchen	Corning (Corning, New York; USA)
Deckgläser	Roth (Karlsruhe)
Elektroporationsküvetten	Biorad (München)
Faltenfilter	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filterpapier 3 MM Whatman	Schleicher und Schuell (Dassel)
Filtersäulen Vivabiospin (5 kDa cutoff)	Sartorius (Goettingen)
Nitrocellulosemembran	Schleicher und Schuell (Dassel)
Nylonmembran (80 µm)	Millipore (Eschborn)
Objektträger	Roth (Karlsruhe)
Pico Pro Vial, 4ml, Anti-Static (Szintillationsgefäße)	Perkin Elmer (Rodgau)
ProteinLoBind Tubes	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
ReadyStrip IPG Strips 3-10 NL, 7cm	Biorad (München)
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml	Peske (Aindling)
Reaktionsgefäße 1,5 ml; 2 ml Safelock	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Röntgenfilme	Fujifilm (Düsseldorf)
Sterilfilter Top Bottle Filter	Nalgene Nunc International (USA)
Whatman GF-C Filter	Whatman GmbH (Dassel)
Zellkulturflaschen 75 cm ² / 150 cm ²	Peske (Aindling-Arnhofen)
Zellkulturplastikware	TPP (Schweiz)
Zentrifugationsröhrchen 50 ml; 15 ml	TPP (Schweiz)
Zentrifugationsröhrchen für die UZ	Beckman (Krefeld)

2.4 Geräte

Name	Bezugsquelle
Axioplan2 Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss (Jena)
Begasungsbrutschrank	Heraeus (Mannheim)
Begasungsbrutschrank	Binder (Tuttlingen)
Combi Cell Harvester-Model 11025	Skatron Instruments Ltd (Newmarket; UK)

Densitometrie-Scanner GS-800	Biorad (München)
Dounce-Homogenisator 2 ml (Glas)	Sartorius (Göttingen)
Elektrophoresezubehör	Biorad (München)
Elektroporationsgerät, Gene Pulser II	Biorad (München)
Feinwaage Voyager 50228	Ohaus (Giessen)
Gefrierschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Gelträger Agarosegele	Biorad (München)
Konfokales Mikroskop FV 1000	Olympus (Hamburg)
Kühlschrank	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)
LaminAir HB2448	Heraeus (Hanau)
Magnetrührer RCT basic	IKA Labortechnik (Staufen)
Mikroplattenreader MR 7000	Dynatech (Denkendorf)
Mikrotiterplattenreader MR 7000	Dynatech (Denkendorf)
Mini Trans Blot cell	Biorad (München)
Molecular Imager FX	Biorad (München)
pH-Meter	WTW (Weilheim)
Power-Pac 400	Biorad (München)
Protean IEF cell	Biorad (München)
Reinstwasseranlage PureLab ultra	Labtech (Wohlen)
Sonifikator, Cell Disruptor B15	Branson (USA)
Spektrophotometer DU 640	Beckman (Krefeld)
Szintillationszähler LS 6500	Beckman Coulter (Krefeld)
Thermocycler Primus 25	Peqlab (Erlangen)
Thermomixer compact	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)
Überkopf-Schüttler Rotamix	ELMI (Lettland)
Ultrazentrifuge Allegra 21 (Rotor SW60 oder Ti70)	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Transilluminator	Stratagene (Amsterdam)
UV-Transilluminator, Geldoc	Biorad (München)
Vortexer MS2	IKA Labortechnik (Staufen)
Waage Voyager 50187	Ohaus (Giessen)
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (Burgwedel)

2.5 Kits und weitere Materialien

Name	Bezugsquelle
Affinity Script Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit	Agilent Technologies (USA)
BCA-Protein-Assay-Kit	Thermo Fischer Scientific (USA)
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit	Peqlab (Erlangen)
Lysosomen-Isolationskit	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Nucleobond AX Plasmid Megaprep Kit	Macherey-Nagel (Düren)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)

2.6 Lösungen und Nährmedien

Name	Bezugsquelle
Antibiotikum-Antimykotikum 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
B27	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
F12	Invitrogen (Karlsruhe)
Fötales Kälber-Serum (FBS)	Invitrogen (Karlsruhe)
GlutaMAX (Glutamin)	Invitrogen (Karlsruhe)
LB-Medium	Roth (Karlsruhe)
Minimum essential media (MEM)	Invitrogen (Karlsruhe)
N2-Supplement	Invitrogen (Karlsruhe)
Natrium-Pyruvat 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Neuro Basal A (NBA) Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Phosphate buffered saline (PBS) 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Pferdeserum	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenolhaltiges HBSS 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA Lösung 10x (0,5%)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ziegen Serum	Invitrogen (Karlsruhe)

2.7 Enzyme und Proteine

Name	Bezugsquelle
Herculase II-Fusion DNA Polymerase	Stratagene (USA)
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

2.8 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
DH5 α	F- Φ 80LacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169 deoR recA1 end A1 hsdR17 (r k-;m r+)phoA supE44 thi-1gyrA96relA1

2.9 Zelllinien

2.9.1 Native Zelllinien

Name	Herkunft	Zelltyp
HEK-293	ATCC-Katalog (CRL-1573)	humane Nierenzellen
HT22	Dr. Schubert (the Salk Institut; San Diego, USA)	Hippokampale Mauszelllinie

2.9.2 Stabile Zelllinien

Name	Expressionsvektor	Zelltyp	Herkunft
HEK-SERT	pcDNA3.1(+); SERT	HEK-293	SERT-DNA aus Expressionsvektor: Blakely (Ramamoorthy u. a. 1993)
HEK-SERT-FLAG	pRK5SV4; SERT mit Flag-Tag am N-Terminus	HEK-293	AG Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München)
HEK-NET	pcDNA3	HEK-293	Blakely (Galli u. a. 1995)

2.10 Tiere

Name	Herkunft
Sprague Dawley Ratten	Charles River Wiga

2.11 Antikörper, Azide und Zellorganell-spezifische Marker

Name	Herkunft
Alexa-Azid 488	Invitrogen (Karlsruhe)
Alexa-Azid 594	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-ATP-Synthase Komplex V	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Flag-HRP	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Anti-human-NET	Mabtechnologies (Stone Mountain, GA; USA)
Anti-human-SERT	Mabtechnologies (Stone Mountain, GA; USA)
Anti-Maus, sekundär Antikörper	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
Anti-Maus-Alexa 488	Invitrogen (Karlsruhe)
Anti-Maus-Alexa 594	Invitrogen (Karlsruhe)
DAPI	Sigma-Aldrich (St. Louis; USA)
LysoTracker	Invitrogen (Karlsruhe)
MitoTracker	Invitrogen (Karlsruhe)
Tetramethylrhodamin-Azid (Tamra-Azid)	Primetech (Belarus)

2.12 Plasmide

Name	Bezugsquelle
pcDNA 3.1 (+)	Invitrogen (Karlsruhe)
pRK5-SV40-MCS	AG Rein (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München)
SERT-pcDNA 3	(Ramamoorthy u. a. 1993)

3 Methoden

3.1 Zellkulturmethoden

3.1.1 Standardzelllinien

Standardzelllinien wie HEK-293 und HT22-Zellen wurden bei 37 °C und unter 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Das Passagieren erfolgte bei Erreichen eines konfluenten Stadiums. Hierzu wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und anschließend 1-2 Min. mit Trypsin abgelöst. Das Trypsin wurde mit Kultiviermedium gestoppt, die Zell-Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt und für 4 Min. bei 180 g pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in Kultiviermedium aufgenommen und anteilig auf Zellkultur-Flaschen oder -Schalen verteilt. Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Zellen bei -190 °C in flüssigem Stickstoff zu lagern. Dafür wurde das Zellpellet einer 75 cm² Zellkulturflasche in 1 ml Einfriermedium suspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt. Nach einer 2-wöchigen Lagerung bei -80 °C wurden die Zellen zur Langzeit-Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

Verwendete Lösungen:

<i>Kultiviermedium:</i>	DMEM 10% FBS 1% Antibiotikum-Antimykotikum 1% Natrium-Pyruvat
<i>1x PBS (sterilfiltriert):</i>	100 ml 10x PBS 900 ml dH ₂ O
<i>Trypsin (sterilfiltriert):</i>	100 ml Trypsin-EDTA 10x (0,5%) 100 ml phenolhaltiges 10x HBSS 800 ml dH ₂ O
<i>Einfriermedium:</i>	40% Kultiviermedium 50% FBS 10% DMSO

3.1.2 Primäre Astrozytenkulturen

Die Präparation der Astrozyten aus Rattenhirnen (Sprague Dawley Ratten) erfolgte im Wesentlichen nach Franke (Franke u. a. 1998). Ratten wurden ein Tag nach der Geburt (P1)

durch Dekapitation getötet. Aus dem entnommenen Gehirn wurde der Kortex in HBSS bei 4 °C präpariert. Nach einem 20 Min. Inkubation in 0,1% (m/v) Trypsin in PBS bei 37 °C wurde der Kortex in HBSS / 10% FBS überführt, um die Trypsin-Aktivität zu inhibieren. Im Anschluss wurde das Gewebe schonend durch Auf- und Ab-Pipettieren in einer 5 ml Pipette und durch Zuhilfenahme einer Nylon Membran (80 µm) dissoziiert und die Zellen bei 400 g für 5 Min. zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Passagiermedium aufgenommen und auf mit Poly-L-Ornithin (0,1 mg/ml) beschichtete Zellkulturschalen ausgesät. Die Astrozyten wurden zweimal passagiert bevor sie schließlich für die nachfolgenden Experimente verwendet wurden. Vor dem Beginn der Experimente wurden die Zellen zweimal mit MEM / F12 (1:1) gewaschen und anschließend im Differenzierungsmedium, wie unter 3.1.1 beschrieben, kultiviert.

Verwendete Lösungen:

HBSS: 7 mM HEPES pH 7,4

Passagiermedium: MEM
10% Pferdeserum
0,5% Gentamicin
1% Natrium-Pyruvat

Differenzierungsmedium: MEM / F12 (1:1)
0,5% Gentamicin
1% Natrium-Pyruvat
1% N2 Supplement

3.1.3 Primäre Neuronenkulturen

Die Präparation der Neuronen ähnelt in den meisten Schritten der Astrozyten-Präparation (siehe 3.1.2). Anstelle von Jungtieren wurden Embryonen (E18) verwendet. Die Neuronen wurden direkt in Neuronen-Kultiviermedium für die folgenden Experimente ausgesät (150 000 Zellen/cm²).

Verwendete Lösungen:

Neuronen-Kultiviermedium: Neuro Basal A (NBA) Medium
2% B27
0,5% Gentamicin
0,5 mM GlutaMAX

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dazu wurden 50 µl einer gut durchmischten Zellsuspension mit 70 µl 1x PBS und 30 µl Trypanblau gemischt. Diese Suspension wurde unter das Deckgläschen der Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop wurden die lebenden Zellen aus 4 Großquadraten gezählt, tote Zellen sind durch die Aufnahme von Trypanblau gefärbt und wurden nicht erfasst. Die Gesamtzellzahl wurde im Anschluss durch folgende Formel berechnet.

$$b = c \cdot a \cdot 10\,000 \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot 1/\text{ml}$$

a = Anzahl der Zellen pro Grossquadrat
b = Anzahl der Zellen
c = Volumen der Zellsuspension (ml)

3.1.5 MTT-Assay

Im MTT-Assay wird die metabolische Aktivität von Zellen gemessen. Dies dient zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen und wird daher verwendet, um die Toxizität von Substanzen abschätzen zu können. Bei dieser Prüfung wird 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT; gelbe Farbe) durch Nicotinamidadeninucleotid (NADH) in Formazan (blaue Farbe) umgewandelt. Der Farbwechsel wird bei 630 nm und 570 nm gemessen und ist ein Maß für den Anteil an lebenden bzw. toten Zellen. Für den Test wurden 5 000 Zellen / well einer 96-well-Platte ausgesät und einen Tag kultiviert. Nach Mediumwechsel wurden unterschiedliche Konzentrationen der zu testenden Substanz hinzugefügt. Nach 24 Std. wurden die Zellen zunächst 4 Std. im Brutschrank bei 37 °C mit MTT-Lösung (10 µl/well) inkubiert, dann 100 µl Solubilisierungslösung zugegeben und über Nacht lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Absorption von Formazan wurde bei 630 nm mit einem Spektrophotometer ermittelt.

Verwendete Lösungen:

MTT-Lösung:

1 ml 1x PBS
5 mg MTT

Solubilisierungslösung (pH 4,8):

40% Dimethylformamid
10% SDS
in H₂O (pH mit konzentrierter Essigsäure eingestellt)

3.2 Überexprimierende Zellsysteme

3.2.1 Transfektion von HEK-293-Zellen

Zur Überexpression eines gewünschten Proteins können Expressionsvektoren (siehe 3.7) durch die Transfektion in humane Zellen eingeschleust werden. Pro Transfektion wurde eine 10 cm² Zellkulturschale HEK-293-Zellen verwendet. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst und anschließend pelletiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl Elektroporationspuffer resuspendiert und mit 10 µl einer 1 M MgSO₄-Lösung und 10 µg Plasmid-DNA vermischt und in eine Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation wurde in einem Elektroporationsgerät (Gene Pulser II) bei 350 V und 700 µF durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend in 10 ml Kultiviermedium aufgenommen und in 10 cm² Zellkulturschalen wie unter 3.1.1 beschrieben kultiviert. Nach etwa 2 bis 3 Tagen konnten die Zellen für proteinbiochemische Methoden (siehe 3.4) verwendet werden.

Verwendete Lösungen:

Elektroporationspuffer

50 mM K₂HPO₄*3 H₂O (pH 7,35):

20 mM Kaliumacetat

3.2.2 Herstellung und Kultivierung stabiler Zelllinien

Stabile Zelllinien besitzen dauerhaft eingeführte Expressionsvektoren. Für die Etablierung wurde zuerst eine Transfektion, wie unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Anschließend wurden wenige Zellen in eine 150 cm² Zellkulturflasche (mit abziehbarem Foliendeckel) ausgesät und im Falle des SERT-Expressionsvektors (Vektor = pcDNA3.1(+)) mit 500 µg/ml Neomycin versetzt. Neomycin dient dabei zur Selektionierung der SERT-Expressionsvektor-positiven Klone. Die zur Abtötung nativer HEK-Zellen nötige minimale Neomycin-Konzentration wurde zuvor mittels MTT-Assay (siehe 3.1.5) bestimmt. SERT-Expressionsvektor-positive Zellen bildeten resistente Kolonien aus, welche in 24-well-Zellkulturplatten überführt wurden. Die Zellen wurden weiterhin mit Neomycin behandelt und die unterschiedlichen Klone vermehrt, bis eine Expressionsprüfung mittels Nassblot-Analyse durchgeführt wurde (siehe 3.4.6.4). Der am stärksten exprimierende Klon wurde für die weiteren Versuche verwendet. Die Kultivierung der stabilen Zelllinien erfolgte wie unter 3.1.1 beschrieben, jedoch wurde dem Medium im Falle von HEK-SERT- oder HEK-NET-Zellen 250 µg/ml Neomycin und im Falle von HEK-SERT-FLAG-Zellen 2,5 µg/ml Puromycin zugesetzt.

3.3 Zellfärbungen

Auf Glasplättchen fixierte Zellen wurden mit Antikörpern, zellorganellspezifischen Markern und mit Hilfe des TFA gefärbt. Die Zellen wurden hierfür auf sterile Glasplättchen in Zellkulturplatten (24-well Format) ausgesät. Die Glasplättchen wurden zuvor für HEK-Zelllinien sowie für primäre Astrozyten mind. 3 Std. mit Poly-Ornithin (0,1 mg/ml) und für Neuronen mind. 3 Std. mit Poly-D-Lysin (100 µg/ml) und anschließend mind. 3 Std. mit Laminin (10 µg/ml) vorbehandelt. Die Plättchen wurden vor dem Aussäen der Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Für die Färbungen wurden die Zellen nach 3 PBS-Waschschritten zuerst 20 Min. mit 4% Formaldehydlösung in 1x PBS fixiert und anschließend nach weiteren PBS-Waschschritten mit Saponinlösung (0,05% in 1x PBS) für 20 Min. permeabilisiert. Dadurch wird eine Färbung intrazellulärer Domänen ermöglicht. Am Ende der unterschiedlichen Färbungen (siehe 3.3.1-3.3.4) wurde zusätzlich noch eine Kernfärbung mit DAPI (50 ng/ml) in 1x PBS für 10 Min. durchgeführt. Die Glasplättchen wurden zum Schluss mit 1x PBS und dann mit dH₂O gewaschen, um anschließend auf Objektträger überführt zu werden. Hierfür wurde das Deckgläschen mit einen Tropfen ProLong Gold Antifade fixiert, um einen frühzeitigen Fluoreszenzverlust zu verhindern. Nach dem vollständigen Trocknen der Glasplättchen (bei 4 °C) wurden sie mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Die Bilder wurden entweder mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops oder eines konfokalen Lasermikroskops aufgenommen. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20 °C.

3.3.1 Antikörperfärbung

Für die Antikörperfärbung wurde nach der Permeabilisierung erst 1 Std. bei Raumtemperatur mit 10% Ziegen-Serum in 1x PBS geblockt, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern. Anschließend wurde die Antikörperlösung (SERT-Antikörper 1:1 000) direkt auf die Glasplättchen pipettiert, die Plättchen mit Parafilm überdeckt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Glasplättchen zuerst dreimal für jeweils 10 Min. mit 1x PBS gewaschen, dann mit dem Sekundärantikörper (Anti-Maus-Alexa 488 oder Alexa 594 1:500) für 2 Std. inkubiert und anschließend dreimal 10 Min. mit 1x PBS gewaschen. Die Durchführung der weiteren Schritte erfolgte wie unter 3.3 beschrieben.

3.3.2 Färbung mit zellorganellspezifischen Markern

Als zellorganellspezifische Marker wurden ein „MitoTracker“ und ein „LysoTracker“ verwendet. Der MitoTracker reichert sich aufgrund des Membranpotentials der Mitochondrien in diesen Organellen an, wobei der LysoTracker aufgrund eines Farbumschlags saure Kompartimente wie z.B. Lysosomen visualisiert. Für die Färbung wurde die Zellen mit

MitoTracker (50 nM) oder LysoTracker (75 nM) für mindestens 30 Min. in Zellkulturmedium inkubiert. Die weiteren Schritte wurden wie unter 3.3 beschrieben durchgeführt.

3.3.3 Färbung mit dem TFA

Für diese Färbungen wurde das Medium der Zellen zwischen 10 Min. und 48 Std. mit unterschiedlichen Konzentrationen TFA (50 nM – 10 μ M) versetzt. Die kovalente Bindung des Antidepressivums an Interaktionspartner erfolgte durch UV-Licht-Exposition, dazu wurden die Zellen 1 Min. mit einem Transluminator bestrahlt. Nach der Permeabilisierung wurde die Click-Reaktion (siehe Jao & Salic 2008) durchgeführt, bei welcher ein Fluoreszenzfarbstoff (Alexa594- oder Alexa488-Azid) kovalent an das TFA gebunden wird. Dazu wurden die Zellen 30 Min. mit 25 μ l Click-Puffer Glasplättchen inkubiert und anschließend dreimal mit 1x PBS gewaschen. Die weiteren Schritte erfolgten wie unter 3.3 beschrieben.

Verwendete Lösungen:

Click-Puffer:

100 mM Tris; pH 8,5

1 mM Kupfer-(II)-sulfat

25 μ M Alexa-Azid (488 oder 594)

100 mM Ascorbinsäure (zuletzt zugeben)

3.3.4 Kombinierte Färbungen

Die Kombination von zellorganellspezifischer Färbung und TFA-Färbung war ohne Veränderung der Protokolle möglich. Um die Antikörper-Färbung mit der TFA-Färbung kombinieren zu können, mussten die Antikörper nach der Bindung an ihre Zielstrukturen durch 4% Formaldehyd in 1x PBS für 20 Min. fixiert werden. Durch diesen Schritt konnte das Ablösen der Antikörper durch die Click-Reaktion unterbunden werden, welche im Anschluss an die Fixierung wie unter 3.3.3 beschrieben durchgeführt wurde. Das konfokale Lasermikroskop und das Fluoreszenzmikroskop ermöglichen das gleichzeitige Aufnehmen von mind. 3 unterschiedlichen Färbungen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Proteingewinnung aus kultivierten Zellen

3.4.1.1 Zelllysate

Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden die Zellen zuerst mit 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit Lysispuffer und Abschaben in ein Reaktionsgefäß überführt und kurz gepulst sonifiziert (Sonifikator, Cell Disruptor B15, 2x 3 Sek., Output control: 4-5, Duty cycle: 50%, pulsed). Um verbleibende Proteasen zu denaturieren, wurden die Proben 5 Min. bei 95 °C aufgeköcht. Beim darauffolgenden Zentrifugationsschritt (13 000 rpm, 10 Min., 4 °C) wurden unlösliche Bestandteile abgetrennt. Die Lagerung der Zelllysate erfolgte bei -80 °C.

Verwendete Lösungen:

Lysispuffer (Ripa):

50 mM Dinatriumhydrogenphosphat pH 7,3
1% Deoxycholat
1% Triton X-100
0,5% SDS
150 mM Natriumchlorid
2 mM EDTA

3.4.1.2 Membran- Zytosol- und Kernpräparationen

Bei dieser Präparation werden Membranproteine von Kern- und Zytosolproteinen getrennt. Hierfür wurde ein Protokoll nach Zschocke leicht variiert (Zschocke u. a. 2005). Zellen wurden zunächst mit 1x PBS gewaschen und anschließend durch Abschaben in Tris-SERT-Puffer (siehe 3.5.1.1) bzw. in HEPES-Puffer mit EDTA-freiem Protease-Inhibitor (1:100) in ein Reaktionsgefäß überführt. Alle weiteren Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zuerst unter Verwendung eines Homogenisators für 2 Min. aufgebrochen und anschließend dreimal 15 Sek. sonifiziert (Sonifikator, Cell Disruptor B15, Output control: 4-5, Duty cycle: 50%, pulsed). Um die Kerne zu entfernen, wurde anschließend mit 800 rcf für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das Kernpellet wurde durch leichtes Sonifizieren in Tris-SERT-Puffer bzw. HEPES-Puffer gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert. Der Überstand wurde in Ultrazentrifugenröhrchen überführt und bei 38 000 rpm und 4 °C für 1 Std. zentrifugiert. Die Membranproteine werden bei diesem Schritt pelletiert und somit von den zytosolischen Proteinen abgetrennt. Das Pellet wurde in Tris-SERT Puffer bzw. HEPES-Puffer durch kurzes Sonifizieren gelöst und beide Proteinfraktionen bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

<i>HEPES-Buffer:</i>	25 mM HEPES pH 7,9
	126,4 mM Natriumchlorid
	5,26 mM Kaliumchlorid

3.4.1.3 Mitochondrienaufreinigung

Zur Mitochondrien-Isolierung wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit 1x PBS in Isolationsmedium abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt (Almeida & Medina 1998). Die Zellen wurden anschließend durch Zentrifugation bei 500 g bei 4 °C für 5 Min. pelletiert und das Pellet wiederum in Isolationsmedium resuspendiert. Durch Verwendung eines Homogenisators wurden die Zellen mit 30 Stößen aufgebrochen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1 500 g, 10 Min., 4 °C) wurde der Überstand auf Eis gelagert, das Pellet in Isolationsmedium resuspendiert und mit 1 500 g für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Die beiden Überstände wurden vereinigt und mit 17 000 g für 11 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das Mitochondrien-Pellet wurde in EDTA-freiem Isolationsmedium mit EDTA-freiem Protease-Inhibitor (1:100) gelöst und erneut mit 17 000 g für 11 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde schließlich in HEPES-Puffer (siehe 3.4.1.2) gelöst und bis zum weiteren Gebrauch bei -80 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

<i>Isolationsmedium:</i>	10 mM Tris pH 7,4
	320 mM Sucrose
	1 mM EDTA
	1:100 Protease-Inhibitor

3.4.1.4 Lysosomenaufreinigung

Für die Lysosomenaufreinigung wurde ein Lysosomen-Isolationskit (SigmaAldrich) nach Option C der Herstellerangaben verwendet. Dabei wurde die CLF (Crude Lysosomal Fraction) wie im Protokoll beschrieben gewonnen, wobei die Mengen der Puffer an die Menge der verwendeten Zellen angepasst wurde. Zur Herstellung der DOF (Diluted Optiprep Fraction) wurden zu 800 µl CLF, 505 µl Optiprep (D1556) und 275 µl Optiprep Dilution Buffer (20x Puffer im Kit enthalten) pipettiert. Die Fällung des rauen endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien erfolgte mit 8 mM Calciumchlorid für 15 Min. auf Eis. Anschließend wurde mit 5 000 g für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert und das Pellet verworfen. Die Lagerung der erhaltenen Lysosomen (Überstand) erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

3.4.2.1 BCA-Assay

Bei der Bestimmung mittels BCA-Protein-Assay-Kit werden zweiwertige Kupferionen durch das vorhandene Protein in einwertige Kupferionen umgewandelt (Biuret-Reaktion), welche anschließend, durch die Bildung violetter Chelate mit dem Natriumsalz der Bicinochninsäure (BCA), detektiert werden können. Die Menge an Chelat und somit die Proteinkonzentration kann durch Messung der Absorption bei 562 nm bestimmt werden. Die Proteinmessung wurde mit einem Albumin-Standard nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die Proteinproben soweit verdünnt, dass ihre Konzentration innerhalb des Konzentrationsbereichs der Standardgeraden lag.

3.4.2.2 Bradford-Assay

Bei der Proteinmessung nach Bradford handelt es sich ebenfalls um eine photometrische Quantifizierung. Coomassie Brilliant Blau wird als Reagenz eingesetzt. Dieses reagiert mit basischen Aminosäuren, wobei das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschoben wird. IgG (0 - 24,15 µg) wurde für diese Proteinbestimmung als Standard eingesetzt und die Proteinproben gegebenenfalls verdünnt, um ebenfalls Proteinmengen zwischen 0 und 24 µg zu erhalten. Für die Proteinbestimmung wurden die Standards und die Proteinproben mit 1 ml Bradford-Reagenz (1:5 mit Wasser verdünnt) versetzt und 10 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Absorptionen bei 595 nm gemessen. Die Proteinmengen der Proben wurden mit Hilfe der Standardgeraden berechnet.

3.4.3 Proteinfällung

Die Proteinfällung dient der Aufkonzentrierung von Proteinen und der Entfernung von Aceton-löslichen, niedermolekularen Stoffen. Hierfür wurde ein 5-facher Überschuss kalten Acetons (-20 °C) zur Proteinprobe hinzugegeben, gemischt und 30 Min. bei -20 °C inkubiert. Anschließend wurde mit 10 000 g für 10 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde einmal mit 50% Ethanol gewaschen und erneut wie oben beschrieben zentrifugiert. Das getrocknete Pellet wurde, je nach weiterer Verwendung, in unterschiedlichen Puffern gelöst.

3.4.4 Kovalente Bindung des TFA an Interaktionspartner

Das TFA besitzt die Eigenschaft, mit Bindungspartnern unter UV-Licht-Exposition eine kovalente Bindung einzugehen. Es wurden hierfür entweder lebende Zellen in Kultur oder Proteinextrakte mit dem TFA behandelt. Für die Bindung des TFA an Proteine in lebenden Zellen wurden diese wie unter 3.1 beschrieben kultiviert. TFA wurde mit Hilfe von UV-Licht

(1 Min. auf Transluminator) kovalent an die Proteine gebunden. Proteine, welche mit dem TFA markiert worden waren, konnten mit Hilfe der unter 3.4.1 gelisteten Methoden gewonnen und deren Proteinkonzentration (siehe 3.4.2) bestimmt werden. Für die Bindung des TFA in Proteinextrakten wurde diese als erstes, wie unter 3.4.1 beschrieben, gewonnen und wiederum ihre Proteinkonzentration (siehe 3.4.2) bestimmt. Anschließend wurden die Proteine für 1 Std. bei Raumtemperatur mit unterschiedlichen Konzentrationen TFA in einem „ProteinLoBind Tube“ inkubiert und anschließend 1 Min. auf dem Transluminator mit UV-Licht bestrahlt, um die kovalente Bindung des TFA an seine Bindungspartner zu ermöglichen. Diese Bindungspartner wurden im Anschluss, wie unter 3.4.6.1 beschrieben, visualisiert.

3.4.5 Gelelektrophorese

3.4.5.1 Eindimensionale SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wird verwendet, um Proteine nach Größe aufzutrennen. SDS ist ein Detergens, welches sich an Proteine lagert und ihnen eine stark negative Ladung verleiht. Die Auftrennung der Proteine im elektrischen Feld ist daher unabhängig von ihrer Eigenladung und wird ausschließlich durch ihre Größe bestimmt. Das SDS-Gel besteht aus einem Sammelgel im oberen Bereich, und einem Trenngel im unteren Bereich. Trenn- und Sammelgel wurde zwischen zwei Glasplatten (1 mm Abstand) gegossen, wobei ein 10er oder 15er Kamm im Sammelgel die Taschen für die Proteinauftragung bildeten. Nach der Polymerisation des Gels konnten Proteinproben und der Protein-Marker PeqGold IV oder V geladen werden. Die Proteinproben wurden hierfür zuvor in Laemmli-Auftragspuffer bei 95 °C 5 Min. gekocht, um eine Denaturierung der Proteine und die Anlagerung des SDS zu gewährleisten. Die Gele wurden anschließend in einer Elektrophoresekammer mit Laemmli-Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese zu Beginn bei 80 V und später bei 150 V durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

<i>Sammelgel:</i>	130 mM Tris pH 6,8
	0,1% SDS
	5% Acrylamid
	0,1% APS
	0,1% TEMED
<i>Trenngel:</i>	390 mM Tris pH 8,8
	0,1% SDS
	10-15% Acrylamid
	0,1% APS

<i>Laemmli-Auftragspuffer:</i>	32 mM Tris pH 6,8
	1% SDS
	8% Glycerin
	0,005% Bromphenolblau
	5% 2-Mercaptoethanol

<i>Laemmli-Laufpuffer:</i>	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,5% SDS

3.4.5.2 Zweidimensionale Gele

3.4.5.2.1 Verwendung einer isoelektrischen Fokussierung (IEF) für die erste Dimension

Bei der IEF werden Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt aufgetrennt. Dieser Punkt entspricht dem pH-Wert, an dem die Summe der Ladungen in einem Protein null beträgt. An diesem Punkt kann ein Protein im elektrischen Feld nicht mehr bewegt werden. Das Gel der IEF besitzt einen pH-Gradienten und die Proteine wandern im elektrischen Feld bis zu ihrem isoelektrischen Punkt. In der zweiten Dimension werden die Proteine im Anschluss durch die SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt.

Für die erste Dimension wurden die Proteine im 200 µl IEF-Auftragspuffer gelöst und in eine IEF-Kammer pipettiert. Anschließend wurde „ReadyStrip IPG Strips 3-10 NL, 7cm“ ohne Luftblasenbildung mit der Gelseite auf die Probe gelegt und 1 Std. bei Raumtemperatur mit der Probe inkubiert. Nachdem das Gel mit 1 ml Mineralöl überschichtet wurde, erfolgte die aktive Rehydratation (50 V, 12 Std.) in der Protean IEF cell (Biorad). Nach 12 Std. wurden zuerst mit Wasser befeuchtete „electrode wicks“ zwischen das Gel und die Pole positioniert und anschließend die eigentliche IEF gestartet (zuerst 50 µA für 15 Min., anschließend linearer Anstieg auf 8 000 V innerhalb von 150 Min.). Nach Beendigung der IEF (35 000 Vh) wurde das Gel entweder bei -80 °C gelagert oder direkt weiterbearbeitet. Dazu wurde es mit der Gelseite nach oben in eine IEF-Aufbewahrungsbox gelegt und zuerst für 20 Min. mit Äquilibrationpuffer I und anschließend für 20 Min. mit Äquilibrationpuffer II überschichtet. Danach wurde das Gel mit Laemmli-Laufpuffer (siehe 3.4.5.1) gewaschen, waagrecht mit der Gelseite zur Glasplatte in die Tasche des Sammelgels der zweiten Dimension, welche zuvor mit Low-melt-Agarose-Lösung gefüllt worden war, transferiert. Das Gel der zweiten Dimension wurde wie unter 3.4.5.1 beschrieben vorbereitet, wobei ein spezieller Kamm benutzt wurde.

Zusammenfassend ist ein 2D-Gel mit einer IEF als erste Dimension eine gute Möglichkeit, Proteine besser auftrennen zu können. Dies ist für die anschließende Identifikation durch Massenspektroskopie entscheidend. Die Nachteile dieser Methode sind einerseits die große Proteinmenge (200 µg), welche nötig ist, um fluoreszierende Proteine

(siehe 3.4.6.1) detektieren zu können und andererseits der Verlust der meisten hydrophoben Membranproteine. Dies hat unterschiedliche Ursachen, wie z.B. die schlechte Löslichkeit dieser Proteine im IEF-Auftragspuffer und die Unlöslichkeit bei ihrem isoelektrischen Punkt. Daher wird der Anteil der Membranproteine, der in der ersten Dimension aufgetrennt wird nicht in das Gel der zweiten Dimension transportiert (Nothwang & Schindler 2009).

Verwendete Lösungen:

<i>IEF-Auftragspuffer:</i>	2 M Thioharnstoff 7 M Harnstoff 2% Chaps 0,2% Biolyte 100 mM DTT 0,025% Bromphenolblau
<i>Äquibrierungspuffer:</i>	50 mM Tris pH 8,8 6 M Harnstoff 2% SDS 20% Glycerin
<i>Äquibrierungspuffer I:</i>	2% DTT in Äquibrierungspuffer
<i>Äquibrierungspuffer II:</i>	2,5% Iodacetamid in Äquibrierungspuffer
<i>Low-melt-Agarose-Lösung:</i>	0,5% Low-melt-Agarose 0,025% Bromphenolblau

3.4.5.2.2 Verwendung eines 16-BAC-Gels für die erste Dimension

Dieses Gelsystem zeigt sich für die Auftrennung von Membranproteinen als hilfreiche Alternative zur IEF (Braun u. a. 2007). Benzyldimethyl-n-hexadecylammonium-chlorid (16-BAC) ist ein kationisches Detergens, welches sich, ähnlich wie SDS, in einem festen Verhältnis an Proteine anlagert und deren Ladung maskiert. Somit werden die Proteine nur nach Masse aufgetrennt, aber im Gegensatz zu SDS sind die Proteine positiv geladen und wandern somit zur Kathode einer Elektrophoresekammer. Für die zweite Dimension wird ein SDS-PAGE verwendet, in welchem die Proteine ebenfalls nach Größe aufgetrennt werden. Die Proteine sind jetzt jedoch durch die Anlagerung von SDS negativ geladen und wandern zu Anode einer Elektrophoresekammer. Da die Auftrennung in beiden Fällen durch Größe erfolgt und nur eine leichte Veränderung des Laufverhaltens der Proteine durch die unterschiedlichen

Detergenzien zu erwarten ist, ordnen sich die Proteine im Gel der zweiten Dimension in einer Diagonalen an. Das durch Nothwang und Schindler etablierte Protokoll wurde mit geringen Veränderungen übernommen (Nothwang & Schindler 2009). Das 16-BAC-Gel (erste Dimension) wurde nach den Angaben des Protokolls gegossen, in einer Elektrophoresekammer mit Laufpuffer überschichtet, mit Proteinproben beladen und anschließend zuerst eine Spannung von 70 V und später von 150 V angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das 16-BAC-Gel wie im Protokoll beschrieben gefärbt und in „Equilibration Buffer“ über Nacht bei Raumtemperatur gewaschen. Nach Inkubation mit „Reducing Buffer“ wurden die Banden ausgeschnitten und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde die 16-BAC-Gelbande im Sammelgel eines SDS-Gels eingebettet und die Elektrophorese der zweiten Dimension, wie im Protokoll beschrieben, gestartet.

3.4.6 Visualisierung von Proteinen nach SDS-PAGE

3.4.6.1 Fluoreszenzgele

Proteine, welche kovalent mit dem TFA verknüpft sind, können mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und anschließend über ein Gel aufgetrennt werden. Die Gewinnung dieser Proteine verläuft wie unter 3.4.1 beschrieben. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe der Click-Reaktion kovalent mit einem Tamra-Azid verknüpft. Dazu wurden 100 µl Protein mit 5 µl Click-Reagenz für 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Bei zu großem Probenvolumen wurden die Proteine nach erfolgter Click-Reaktion mit Aceton gefällt (siehe 3.4.3). Um eine der unter 3.4.5 genannten Gelelektrophoresemöglichkeiten durchzuführen, wurden die Proteine im passenden Auftragspuffer gelöst und anschließend über ein Gel aufgetrennt. Die fluoreszierenden Banden wurden mit dem Biorad Molecular Imager FX detektiert.

Verwendete Lösungen:

<i>Click-Reagenz:</i>	400 µM Tamra-Azid
	20 mM TCEP
	2 mM TBTA
	20 mM Kupfer-(II)-sulfat

3.4.6.2 Colloidal Coomassie Färbung

Diese Färbung wurde eingesetzt, um Proteine nach einer SDS-PAGE zu visualisieren. Hierfür müssen mindestens 0,5 – 5 ng Protein/Bande vorhanden sein. Die Proteine wurden zuerst für 5 Std. mit Fixierlösung in dem SDS-Gel fixiert und anschließend dreimal innerhalb 1 Std. mit destilliertem Wasser gewaschen. Für die Färbung wurde das Gel zuerst 1 Std. in

Färbelösung inkubiert bevor schließlich Coomassie Blue G (1 mg/ml) aufgestreut wurde. Das Gel wurde bis zu 3 Tage gefärbt, anschließend in destilliertem Wasser gewaschen und mit Hilfe des Densitometrie-Scanner GS-800 (Biorad) gescannt.

Um diese Gele auf Nitrocellulosemembranen zu transferieren, mussten diese für die unter 3.4.6.4 beschriebene Methode vorbehandelt werden. Hierzu wurden sie zuerst 30 Min. in SDS-Puffer inkubiert und nach dreimaligem Waschen mit dH₂O in Transferpuffer überführt und für 10 Min. äquiliibriert. Der eigentliche Transfer wurde wie unter 3.4.6.4 beschrieben durchgeführt, jedoch wurde Transferpuffer mit SDS verwendet und der Transfer bei konst. 330 mA für 3 Std. durchgeführt.

Verwendete Lösungen:

<i>Fixierlösung:</i>	30% Ethanol 2% Phosphorsäure
<i>Färbelösung:</i>	17% Ammoniumsulfat 2% Phosphorsäure 34% Methanol
<i>SDS-Puffer:</i>	10 mM Tris pH 8,5 0,5% SDS
<i>Transferpuffer:</i>	48 mM Tris 39 mM Glycin 0,04% SDS 20% Methanol

3.4.6.3 Coomassie-Färbung

Diese Färbung wurde ebenfalls verwendet um Proteine nach einer SDS-PAGE zu visualisieren. Diese Methode ist im Vergleich zur Colloidal Coomassie Färbung (siehe 3.4.6.2) weniger sensitiv, jedoch schneller durchführbar. Die SDS-Gele wurden hierfür 20 Min. in Färbelösung inkubiert und anschließend in Entfärbelösung solange gewaschen bis Proteinbanden sichtbar wurden. Nach einem Waschschrift in destilliertem Wasser wurde das Gel mit Hilfe des Densitometrie Scanner GS-800 (Biorad) gescannt.

Verwendete Lösungen:

<i>Färbelösung:</i>	0,25% Coomassie Brilliant Blue R-250 45% Methanol 10% Essigsäure
---------------------	--

Entfärbelösung: 45% Methanol
10% Essigsäure

3.4.6.4 Immunoblotting

Beim Immunoblotting werden Proteine, welche auf einer Nitrocellulosemembran fixiert sind, mit Hilfe von Antikörpern detektiert. Die Proteine werden somit mit einer hohen Spezifität erkannt. Die Visualisierung dieser Proteine wird durch eine Peroxidase ermöglicht. Diese ist entweder an einen Zweitantikörper, welcher spezifisch an einen Erstantikörper bindet, oder direkt an den Erstantikörper gekoppelt. Diese Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol in Gegenwart von H_2O_2 , wobei das oxidierte Luminol chemiluminesziert und somit einen Röntgenfilm durch Lichtemission schwärzt.

Der Proteintransfer wurde nach dem Nassblot-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurden zuerst Blot-Schwämme, Filterpapiere, eine Nitrocellulosemembran und das SDS-Gel in Transferpuffer äquilibriert. Um Luftblasenbildung zu verhindern, wird der Nassblot in Transferpuffer zusammengebaut und Luftblasen durch Ausstreichen entfernt. Der Transfer wurde für 1,5 Std. bei konst. 250 mA mit Kühlakkus oder im Kühlraum unter Rühren durchgeführt. Die Nitrocellulosemembran muss dabei zwischen Gel und Anode platziert sein. Dies ermöglicht den Transfer der zur Anode wandernden, negativ geladenen Proteine auf die Membran. Nach dem Transfer wird die Membran mit 5% Milchpulver in TBS-T geblockt und anschließend wie in Tab. 3-1 gelistet mit Antikörpern inkubiert. Zwischen und nach den Inkubationen mit Antikörpern bzw. spezifischen Bindungspartnern wurde dreimal 10 Min. mit TBS-T gewaschen. Zur Detektion wurden die Nassblots mit Immobilon Western HRP Substrat für 1-2 Min. inkubiert und anschließend mit einem Röntgenfilm entwickelt.

Verwendete Lösungen:

Transferpuffer: 125 mM Tris
190 mM Glycin
20% Methanol

TBS-T: 10 mM Tris pH 7,6
150 mM Natriumchlorid
0,1% Tween

Tab. 3-1: Nassblot-Inkubationen

Antigen	Erstantikörper	Zweitantikörper
SERT	1:1 000 Anti-human-SERT-Antikörper in TBS-T	1:2 000
NET	1:10 000 Anti-human-NET-Antikörper in TBS-T	1:20 000
ATP-Synthase-Komplex V	1:1 000 Anti-ATP-Synthase Komplex V in TBS-T	1:2 000
Flag-Tag	1:50 000 Anti-Flag-Antikörper-HRP- gekoppelt in 2% Milchpulver in TBS-T	/

3.5 Radioaktive Bindungsversuche

3.5.1 Bestimmung von Affinität und Bindungskapazität

In radioaktiven Sättigungsversuchen können die Affinität eines Stoffs gegenüber einem bestimmten Ziel-Protein und die Konzentration des Ziel-Proteins in einer Proteinmischung (B_{\max}) bestimmt werden. Die Antidepressiva-Konzentration, bei der 50% der Transporter radioaktiv markiertes Antidepressivum binden, ist gleich dem K_d -Wert dieser Substanz zu diesem Transporter. Für die Sättigungsversuche wird ein Proteingemisch, welches das zu bestimmende Ziel-Protein enthält, mit einer möglichst selektiven, radioaktiv markierten Substanz in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Diese Substanz bindet mit steigender Konzentration vermehrt an seinen Bindungspartner bis die Bindung gesättigt ist. Trägt man die Bindung gegen die Konzentration auf, erhält man eine Sättigungskurve, aus welcher der B_{\max} -Wert berechnet werden kann. Um die Hintergrundbindung zu bestimmen, wird die radioaktiv markierte Substanz mit einem 1 000 fachen Überschuss nicht radioaktiv markierter Substanz von der spezifischen Bindungsstelle kompetiert.

3.5.1.1 SERT

Für diesen Versuch wurde das Ziel-Protein in Form einer Membranpräparation angereichert, da es sich bei SERT um ein membranäres Protein handelt. Die Proteinmenge wurde auf 4 bzw. 5 $\mu\text{g}/100\mu\text{l}$ eingestellt. Die Membranpräparation wurde für 1 Std. bei Raumtemperatur in einer 96 well-Rundbodenplatten (nicht bindende Oberfläche) mit [^3H]-Citalopram in unterschiedlichen Konzentrationen (10 pM – 200 nM) und eventueller Zugabe eines Kompetitors (1 mM Imipramin) in 100 μl Puffer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben über eine für 1 Std. mit Polyethylenimin (0,1%) vorinkubierte GF-C Whatman Membran mit Hilfe des „Combi Cell Harvester-Model 11025“ gesaugt und mit eiskaltem Tris-SERT-Puffer für 9 Sek. gespült. Dabei binden Membranproteine auf der GF-C Whatman Membran und freies, ungebundenes, radioaktiv markiertes Antidepressivum wird weggespült. Die Membran wurde anschließend für 30 Min. bei 60 °C getrocknet und in Szintillationsröhrchen überführt. Nach Zugabe von 2 ml Szintillationslösung wurden die Zerfälle pro Minute (cpm) der Proben in einem Szintillationszähler LS 6500 gemessen. Puffer und Lösungsmittel für [^3H]-Citalopram-Konzentrationen (5 mM HCl in 50% Ethanol) wurden wie bereits beschrieben hergestellt und verwendet (Owens u. a. 1997). Alle Werte wurden in Form von Triplikaten erhoben und jeder Versuch mindestens dreimal wiederholt.

Verwendete Lösungen:

Tris-SERT-Puffer:

52,6 mM Tris; pH 7,9

126,4 mM Natriumchlorid

5,26 mM Kaliumchlorid

3.5.1.2 NET

Die Sättigungskurven für NET wurden wie unter 3.5.1.1 beschrieben durchgeführt. Auch bei diesem Transporter handelt es sich um ein membranäres Protein, daher wurden auch hier Membranpräparationen eingesetzt. Statt [³H]-Citalopram wurde [³H]-Nisoxetin verwendet, welches als selektiver NET-Inhibitor bekannt ist. Die Bindung wurde in Tris-NET-Puffer durchgeführt. Dieser Puffer wurde ebenfalls für das Waschen der GF-C Membran nach Bindung der Proteine verwendet (siehe (Owens u. a. 1997)). Die Konzentration von [³H]-Nisoxetin bewegte sich in Bereichen von 50 pM bis 5 nM. Für die Bestimmung der Hintergrundbindung wurde mit kaltem Nisoxetin (5 µM) kompetiert.

Verwendete Lösungen:

<i>Tris-NET-Puffer:</i>	52,6 mM Tris; pH 7,4
	316 mM Natriumchlorid
	5,26 mM Kaliumchlorid

3.5.1.3 Berechnung von K_d und B_{max}

Als Messwerte erhält man bei radioaktiven Bindungsversuchen Zerfälle pro Minute. Diese müssen zu Beginn der Berechnung in die Stoffmenge der gebundenen radioaktiven Substanz umgerechnet werden. Dazu wurde eine Standardkurve mit unterschiedlichen Konzentrationen radioaktiver Substanz in Szintillationsröhrchen pipettiert und gemessen. Durch die erhaltene Standardkurve konnten die cpm der Proben in Stoffmenge gebundene Substanz umgerechnet werden. K_d und B_{max} wurden einerseits unter Verwendung des Programms SigmaPlot11 bestimmt, andererseits mit Hilfe des Rosenthalplots berechnet. Für jede Sättigungskurve wurden 5-6 unterschiedliche Konzentrationen an radioaktiv markierter Substanz verwendet. Für jede Konzentration wurden die Werte in Triplikaten gemessen und insgesamt mindestens 3 Experimente durchgeführt. Zusätzlich wurden zum Vergleich dieser 3 Experimente die relativen B_{max} -Werte aufgetragen, da sich diese Werte je nach verwendeter Membranpräparation leicht unterscheiden.

Abb. 6 zeigt eine Sättigungskurve, welche in Sigmaplot erstellt und berechnet wurde. Die Verwendung des Rosenthalplots (siehe **Abb. 7**) ermöglicht es, die Sättigungskurve in eine Gerade zu überführen. K_d und B_{max} werden im Rosenthalplot aus der Geradengleichung wie folgt berechnet.

$$K_d = -\frac{1}{a}$$

$$B_{max} = -\frac{b}{a}$$

Wie man Anhand der K_d - und B_{max} -Werte sehen kann, ergeben beide Berechnungsmethoden in etwa die gleichen Ergebnisse.

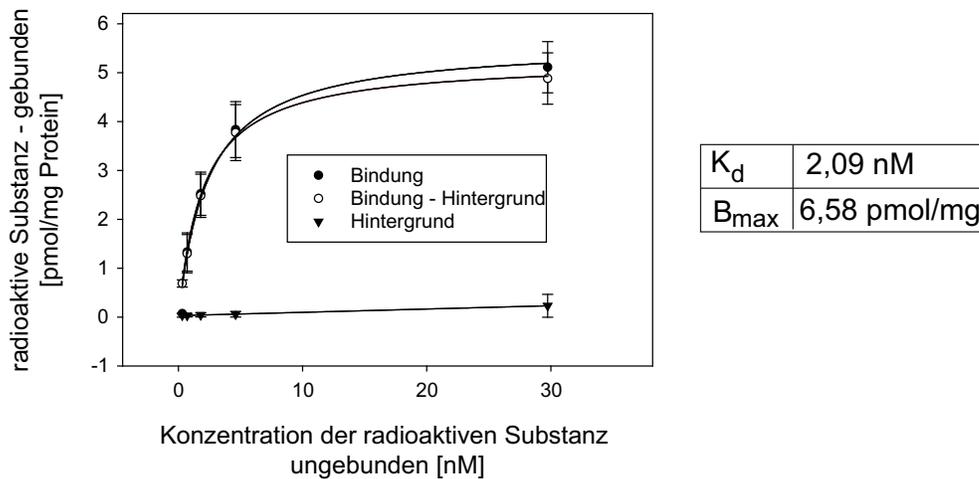


Abb. 6: Sättigungskurve (Sigmaplot11)

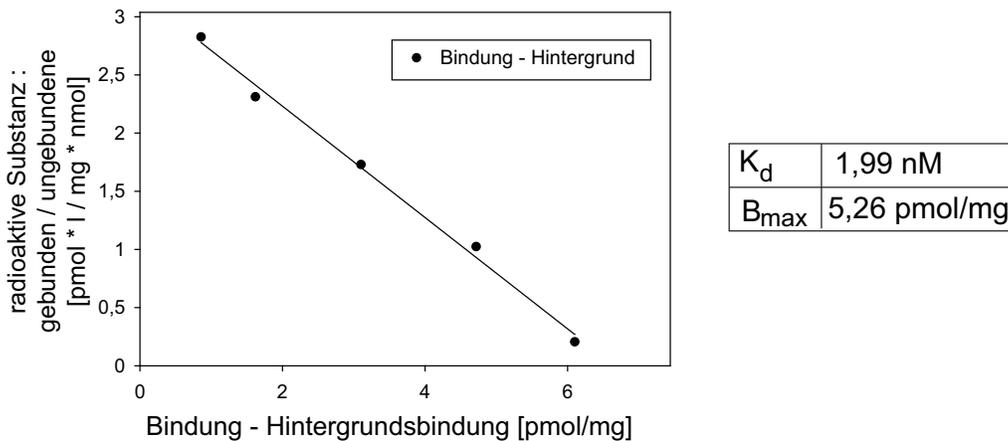


Abb. 7: Rosenthalplot

3.5.2 Kompetitionsversuche

Kompetitionsversuche werden verwendet, um die Affinität unterschiedlicher, nicht-radioaktiv markierter Substanzen zu einem bestimmten Protein zu bestimmen. Dabei wird gemessen, welche Konzentration an nicht-markierter Substanz nötig ist, um eine bestimmte Menge radioaktive Substanz von ihrer Bindungsstelle zu verdrängen. Die Versuche wurden, wie bereits bei Owens (Owens u. a. 1997) beschrieben, durchgeführt.

3.5.2.1 SERT

Die Kompetitionsexperimente wurden ähnlich wie die Sättigungsexperimente (siehe 3.5.1.1) durchgeführt. Im Unterschied zu den Sättigungsexperimenten wurde eine definierte [^3H]-Citalopram-Konzentration von 15 nM eingesetzt, die etwa dem durch die Sättigungsexperimente bestimmten K_d entspricht. Zusätzlich wurden zu den Proben unterschiedliche Antidepressiva-Konzentrationen zugegeben. Die Antidepressiva wurden hierfür in 5 mM HCl in 50% Ethanol gelöst. Jede Probe enthielt am Ende 5% 5 mM HCl in 50% Ethanol. Für jedes getestete Antidepressivum wurden jeweils 8-18 unterschiedliche Konzentrationen in Doublets gemessen und jede Kompetition mindestens dreimal wiederholt. Zur Bestimmung der Maximalbindung wurde eine Probe ohne Antidepressivum inkubiert und zur Bestimmung der Hintergrundbindung wurde eine Probe mit 1 mM Imipramin versetzt. Die Auswertung erfolgte mit SigmaPlot11 (Ligand Binding – one site competition) und die IC_{50} wurden wie bei Yung-Chi und Prusoff beschrieben in die entsprechende K_i -Werte umgerechnet (Yung-Chi & Prusoff 1973).

3.5.2.2 Norepinephrintransporter

Die Kompetitionsexperimente wurden wie unter 3.5.2.1 beschrieben durchgeführt. Jedoch wurde [^3H]-Nisoxetin in einer Konzentration von 4,75 nM eingesetzt, welche wiederum in etwa dem durch die Sättigungsexperimente bestimmten K_d entsprach. Wie für die Sättigungsexperimente wurde für die Inkubations- und Waschschriffe der Tris-NET-Puffer von 3.5.1.2 verwendet.

3.5.2.3 Berechnung der IC_{50} - und K_i -Werte

IC_{50} und K_i beschreiben die Konzentration von unmarkierter Substanz, die in der Lage ist 50% der radioaktiv markierten Substanz von ihrer Bindungsstelle zu verdrängen. K_i im Gegensatz zur IC_{50} ist unabhängig von dem Versuchsaufbau und kann somit leichter zum Vergleich zwischen Daten aus unterschiedlichen Laboren herangezogen werden. Für jedes verwendete Antidepressivum wurden 3 unabhängige Experimente mit jeweils 8-18 Messpunkte, welche in Doublets bestimmt worden waren, durchgeführt. Die Kurven wurden mit SigmaPlot11 ausgewertet. Die angegebenen K_i -Werte wurden aus den zugehörigen IC_{50} -Werten berechnet.

Abb. 8 zeigt eine Kompetitionskurve, welche in SigmaPlot11 erstellt wurde und den IC_{50} Wert 686 nM lieferte.

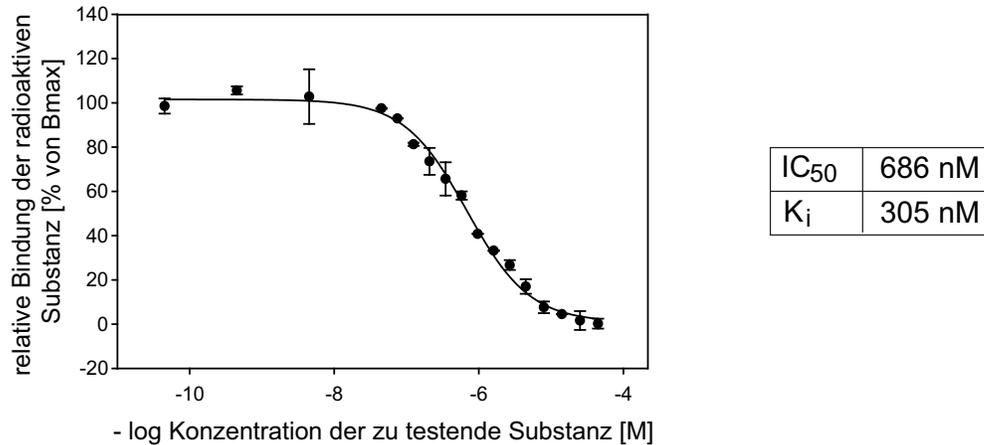


Abb. 8: Kompetitionskurve (Sigmaplot)

Die IC₅₀ wurde mit folgender Gleichung (siehe (Yung-Chi & Prusoff 1973)) in K_i umgerechnet, dazu musste die Konzentration der radioaktiven Substanz (S) und ihr K_d, welcher in Sättigungsexperimenten bestimmt werden kann, bekannt sein.

$$IC_{50} = K_i \left(1 + \frac{K_d}{S} \right)$$

3.6 DNA-Analytik

3.6.1 RNA Isolierung

RNA wurde aus HT22 Zellen mit Trizol® Reagent laut Herstellerangaben isoliert. Die RNA wird hierbei durch eine Phenol/Chloroform Extraktion gewonnen und befindet sich nach der Phasentrennung in der oberen, wässrigen Phase. Die RNA wird im Anschluss gefällt, gewaschen und in dH₂O frei von RNase gelöst. Konzentration und Reinheit der gelösten RNA wurde spektrophotometrisch (siehe 3.7.4) bestimmt. Die Lagerung der gewonnenen RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

3.6.2 cDNA Synthese

Aus 1 µg RNA wurde unter Zuhilfenahme des AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit cDNA, entsprechend den Herstellerangaben, gewonnen. Die Reaktion

basiert auf einer reversen Transkription. Hierbei wurde zuerst RNA für 5 Min. bei 65 °C denaturiert. Beim anschließenden Abkühlen der Reaktion auf Raumtemperatur lagerten sich die Oligo(dT)-Primer an den 3'-Poly-A-Schwänze der mRNA an. Folglich wurde ausschließlich mRNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Lagerung der neu synthetisierten cDNA erfolgte bei -20 °C.

3.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Gewünschte DNA-Abschnitte können unter Verwendung von Polymerasen und spezifischen 5'- bzw. 3'- Oligonukleotiden (Primer) in der Polymerasekettenreaktion vervielfacht werden. Die frisch synthetisierten DNA-Stücke dienen wiederum als Matrize für den nächsten Verdopplungsschritt. Primer, die spezifisch für einen bestimmten DNA-Abschnitt synthetisiert werden, müssen den gewünschten DNA-Abschnitt flankieren und spezifisch an die DNA binden. Um eine Ligation dieser DNA-Abschnitte in einen Vektor zu ermöglichen, können durch die Primer zusätzlich Schnittstellen für gewünschte Restriktionsenzyme eingeführt werden (siehe 3.6.7). Außerdem können mit Hilfe der Primer auch DNA-Stücke eingefügt werden, die für Marker-Proteine kodieren können (z.B. Flag-Tag). Die DNA-Polymerasen schreibt die von den Primern flankierten DNA-Abschnitte, durch Hinzufügen von dNTPs, ab. Von den unterschiedlichen DNA-Polymerasen, die auf dem Markt erhältlich sind, wurden die Herculase II-Fusion DNA Polymerase oder die Taq-DNA-Polymerase verwendet. Erstere garantiert eine hohe Reaktionsgeschwindigkeit und verspricht, im Gegensatz zur Taq-Polymerase, weniger Fehler durch die sogenannte „Proof Reading“ Aktivität selbst bei langen oder Guanin- und Cytosin-reichen DNA-Abschnitten. Die PCR wurde in 50 µl Volumen durchgeführt, hierzu wurde ein für die DNA-Polymerase spezifischer, vom Hersteller mitgelieferter Puffer, verwendet. Das Reaktionsvolumen setzte sich aus Primern (jeweils 12,5 pmol), cDNA (2 µl), dNTP (0,2 mM), DNA-Polymerase (1-2,5 Einheiten) und, bei Verwendung der Taq-Polymerase, MgCl₂ (1,5 mM) zusammen. Anstelle der cDNA kann auch ein Expressionsvektor als Matrize dienen. Für die PCR ist eine bestimmte Temperaturabfolge erforderlich, welche sowohl von den Primern, als auch von der verwendeten DNA-Polymerase abhängt. Im ersten Schritt wird die DNA bei 95 °C für 1-5 Min. denaturiert, anschließend erfolgt das Anlagern der Primer an die DNA bei ca. 60 °C für 30 Sek. Im letzten Schritt erfolgt das Abschreiben des mit Primern flankierten DNA-Abschnitts bei ca. 70 °C für 60-90 Sek. Dieser Temperaturzyklus wird in etwa 30 Mal wiederholt, wobei der Denaturierungsschritt auf 20-45 Sek. reduziert wird. Zum Abschluss wird die Temperatur für 10 Min. bei 70 °C gehalten, um unvollständige PCR-Produkte aufzufüllen. Die vervielfachten DNA-Abschnitte können über ein Agarosegel visualisiert und für die Klonierungsschritte aufgereinigt werden.

3.6.4 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese werden negativ geladene DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufgetrennt. Ethidiumbromid wird hierbei zur Visualisierung der DNA-Fragmente verwendet. Für die Herstellung von 1-2% Gelen wurde eine entsprechende Menge Agarose durch Erhitzen in 1x TBE gelöst. Ethidiumbromid (1:50 000) wurde in das abgekühlte Agarosegel zugegeben, und das Gel in horizontale Gelträger mit Kamm gegossen. Das feste Gel wurde anschließend mit den Gelträgern in eine Gelelektrophoresekammer überführt und mit 1x TBE überschichtet. DNA-Marker und die mit DNA-Auftragspuffer versetzten DNA Proben wurden geladen. Die Elektrophorese erfolgte je nach Größe der Kammer bei 60-150 V. DNA wurde durch Anregung von eingelagertem Ethidiumbromid (Anregungswellenlänge 254–366 nm) unter UV-Licht visualisiert und photographiert.

Verwendete Lösungen:

10x TBE-Puffer:

0,45 M Tris
0,45 M Borsäure
10 mM EDTA

5x DNA-Auftragspuffer pH 7,6:

50 mM Tris-HCl pH 7,6
65% Glycerin
50 mM EDTA
0,025% Bromphenolblau
0,0025% Xylencyanol

3.6.5 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction Kit verwendet. DNA-Banden wurden auf einem UV-Tisch visualisiert und aus dem Agarosegel mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde nach Herstellerangaben mit dem Kit aufgearbeitet. Die aufgereinigte DNA wurde mit 30 µl autoklaviertem dH₂O von der im Kit enthaltenen Säule eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.6.6 DNA Fällung mit Ethanol und linearem Polyacrylamid

Diese Methode zur DNA Fällung wurde verwendet, um DNA Proben aufzukonzentrieren (Gaillard & Strauss 1990). Lineares Polyacrylamid ist ein neutrales Trägermaterial für DNA, welches die DNA-Fällung mit Ethanol selbst bei sehr geringen DNA-Konzentrationen ermöglicht. Für die Fällung wurde die DNA zuerst mit Natriumchlorid (Endkonzentration >0,1 M), anschließend mit 10-20 µg linearem Polyacrylamid (Herstellung laut Protokollangaben) und nach Mischen 2,5-fachem Volumen Ethanol versetzt. Die DNA

wurde bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 10 Min. in einem Trockeneis-Ethanol-Bad gefällt und bei 13 000 g für 10 Min. zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend einmal mit Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in autoklaviertem dH_2O gelöst. Gefällte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

3.6.7 Restriktionsspaltung und Ligation

In der Restriktionsspaltung wird DNA (Plasmid- oder PCR-DNA) mit Enzymen, den Restriktionsendonukleasen, geschnitten. Wie unter 3.6.3 beschrieben können mit Hilfe von Primern DNA-Abschnitte synthetisiert werden, die an den Enden bestimmte Restriktionsstellen besitzen. Auch Plasmide enthalten Restriktionsstellen. Wird nun die PCR-DNA (Insert) und die Plasmid-DNA (Vektor) mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten, kann das Insert durch Ligation mit DNA-Ligasen in den Vektor eingebaut werden.

Die Restriktionsspaltung wurde mit unterschiedlichen Restriktionsenzymen nach Herstellerangaben mit 2-10 μg Plasmid oder aufgereinigtem PCR-Produkt angesetzt. Insert und Vektor wurden anschließend über ein Agarosegel aufgereinigt (siehe 3.6.4). Durch ein Agarosegel konnte außerdem die Spaltung des Vektors kontrolliert und das Verhältnis von Vektor und Insert bestimmt werden. Die Ligation wurde im Verhältnis 1:5 mit einer T4-DNA-Ligase (10 Einheiten) in 20 μl Ligationspuffer 16 Std. bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Die Ligation wurde wiederum mit einem Agarosegel kontrolliert. Die Plasmid-DNA wurde wie unter 3.6.4 beschrieben aufgereinigt. Die Lagerung des gewonnenen und aufgereinigten Plasmids erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Verwendete Lösungen:

Ligationspuffer:	50 mM Tris; pH 7,5
	10 mM Magnesiumchlorid
	1 mM ATP
	10 mM DTT

3.7 Klonierung zur Herstellung von Expressionsvektoren

Expressionsvektoren sind kleine, ringförmige, autonom replizierende, doppelsträngige DNA-Moleküle, welche sich von Plasmid-DNA der Bakterien ableiten. Sie werden verwendet, um DNA-Abschnitte in Zellen einzuschleusen und somit zur Überexpression von bestimmten Proteinen zu führen. Expressionsvektoren enthalten einerseits Schnittstellen, an denen cDNA eingefügt werden kann, andererseits DNA-Sequenzen, die z.B. zu einer Ampicillin- oder Kanamycin- bzw. Neomycin- oder Puromycin-Resistenz führen. Diese Resistenzen werden ausgenutzt, um selektiv Bakterien bzw. menschliche Zellen (HEK-

Zellen), welche das Plasmid aufgenommen und exprimiert haben, von den Zellen zu unterscheiden, welche das Plasmid nicht aufgenommen haben und somit das gewünschte Protein nicht exprimieren.

3.7.1 kompetente Bakterienstämme

Die Verwendung kompetenter Bakterienstämme ist entscheidend, um die Aufnahme von Plasmid-DNA und somit deren Replizierung sicher zu stellen. Hierfür wurde eine Übernachtskultur (10 µl) eines chemisch kompetenten Bakterienstammes (DH5α) in 5 ml LB-Medium angesetzt (37 °C, 200 rpm). Am nächsten Tag wurde diese in 400 ml LB-Medium überimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD₅₅₀) von 0,48 bei 37 °C geschüttelt. Die Kultur wurde daraufhin 5 Min. auf Eis abgekühlt und im Anschluss mit 5 000 rpm für 5 Min. bei 4 °C und zentrifugiert. Das Pellet wurde zuerst auf Eis in 10 ml Tfb I-Lösung resuspendiert und nach 10 Min. Inkubation erneut mit 5 000 rpm für 5 Min. bei 4 °C zentrifugiert. Das nun erhaltene Pellet wurde in 2 ml Tfb II-Lösung resuspendiert, zu je 200 µl aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Bakterien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

<i>LB-Medium (autoklaviert):</i>	2% LB Broth Base
<i>Tfb I pH 5,8 (sterilfiltriert):</i>	30 mM Kaliumacetat 100 mM Rubidiumchlorid 10 mM Calciumchlorid 50 mM Manganchlorid 15% Glycerin
<i>Tfb II pH 6,5 (sterilfiltriert):</i>	10 mM 3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure - Natriumsalz 75 mM Calciumchlorid 10 mM Rubidiumchlorid 15% Glycerin

3.7.2 Transformation kompetenter Bakterienstämme

Die Transformation von Plasmid-DNA in kompetente DH5α Bakterien wurde durch Hitzeschock durchgeführt. Dazu wurden 10-50 ng Plasmid-DNA bzw. 10 µl Ligationsansatz vorgelegt und mit 50 µl auf Eis aufgetauten kompetenten DH5α Bakterien gemischt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 45 Sek. bei 42 °C im Wasserbad.

Anschließend wurde erneut 10 Min. auf Eis inkubiert. Der komplette Ansatz wurde mit 900 µl SOC Medium versetzt und bei 700-800 rpm für 1 Std. bei 37 °C geschüttelt. Für eine Klonierung wurden 200 µl des Ansatzes auf Ampicillin-Agar-Platten ausplattiert, für eine Megapräparation wurde der komplette Ansatz in 400 ml Ampicillin-LB-Medium angeimpft und beides bei 37 °C über Nacht bei 200 rpm geschüttelt.

Verwendete Lösungen:

<i>Ampicillin-Endkonzentration:</i>	100 µg/ml
<i>Kanamycin-Endkonzentration:</i>	25 µg/ml
<i>Agar-Platten:</i> (wurde vor Ausplattierung und Antibiotikazugabe autoklaviert)	15 g Agar 1000 ml LB-Medium

3.7.3 Plasmidaufreinigung

Eine Minipräparation wurde durchgeführt, um DNA zu Sequenzierungszwecken zu gewinnen. Es wurde eine Übernachtskultur mit dem E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit nach Herstellerangaben verarbeitet und die Plasmid-DNA mit 50 µl dH₂O eluiert. Die Lagerung der gewonnenen Plasmid-DNA erfolgte bei -20 °C.

Die Megapräparation wird genutzt, um genügend große Plasmid-DNA Mengen (ca. 2-5 mg) für Transfektion und Lagerung zu gewinnen. Hierzu wurde der Nucleobond AX Kit nach Herstellerangaben verwendet, wobei als Ausgangsmaterial (siehe 3.7.2) 400 ml der Übernachtskultur eingesetzt wurde. Die Plasmid-DNA wurde in 500-1 000 µl TE-Puffer gelöst und bei -20 °C gelagert.

Verwendete Lösungen:

<i>TE-Puffer:</i>	10 mM Tris; pH 7,5 1 mM EDTA
-------------------	---------------------------------

3.7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt. DNA-Lösungen weisen bei 260 nm eine Extinktion auf, die nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz proportional zur Konzentration ist. Hierzu wurde eine DNA-Verdünnung hergestellt, welche bei der photometrischen Messung in einer Quarz-Küvette eine Extinktion im linearen Messbereich des Photometers (0,1-1,0) aufweist. Zusätzlich können durch Messung der Extinktion bei 280 nm Aussagen über die Reinheit der DNA getroffen werden. Der Quotient aus A₂₆₀/A₂₈₀ sollte im Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

4 Ergebnisse

Der Fokus dieser Arbeit lag in der Entwicklung und Testung eines an zwei Positionen modifizierten Antidepressivums, wobei die Antidepressiva-typischen Effekte beibehalten werden sollten. Diesem Konzept folgend ergab sich auch der Begriff des trifunktionellen Antidepressivums (TFA), welcher im Rahmen dieser Arbeit für die modifizierte Substanzen Verwendung findet.

Derartig gestaltete Substanzen ermöglichen es, nicht nur genauere Verteilungsanalysen auf unterschiedlichen Komplexitätsgraden durchzuführen, sondern auch bekannte sowie bisher unentdeckte Interaktionspartner zu identifizieren und näher zu charakterisieren. Zusätzlich ist auch die genaue Charakterisierung der Bindungsstelle in einem bekannten Zielprotein mit dieser Substanz möglich. **Abb. 9** stellt die mit Hilfe des TFA bereits durchgeführten und darüber hinaus möglichen Versuchsreihen im Überblick dar.

Im Folgenden soll zunächst genauer auf die Planung und Funktionsanalysen des TFA, eingegangen werden, um im Anschluss daran erste zelluläre Verteilungs- sowie Interaktionsstudien vorzustellen.

4.1 Design des trifunktionellen Antidepressivums

Das TFA bildet die Kernsubstanz der im Rahmen dieser Arbeit etablierten Methode (**Abb. 10**). Die Strukturen von den Synthesenzwischenprodukten BFA-UV und BFA-Click, welche für Kontrollexperimente zum Einsatz kamen, können von der Struktur des TFA abgeleitet werden. Als UV-Linker wurde ein Arylazid (**Abb. 10**, blau) und als Click-Einheit ein Alkin (**Abb. 10**, grün) verwendet. Für die Syntheseplanung des TFA wurden die Vor- und Nachteile der einzelnen UV-Linker (siehe 1.2.2), ebenso wie die Struktur-Wirkungs-Beziehung der TZA beachtet. Im Rahmen einer hausinternen Kooperation wurde das TFA von Ranganath Gopalakrishnan (Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München; AG Hausch) synthetisiert.

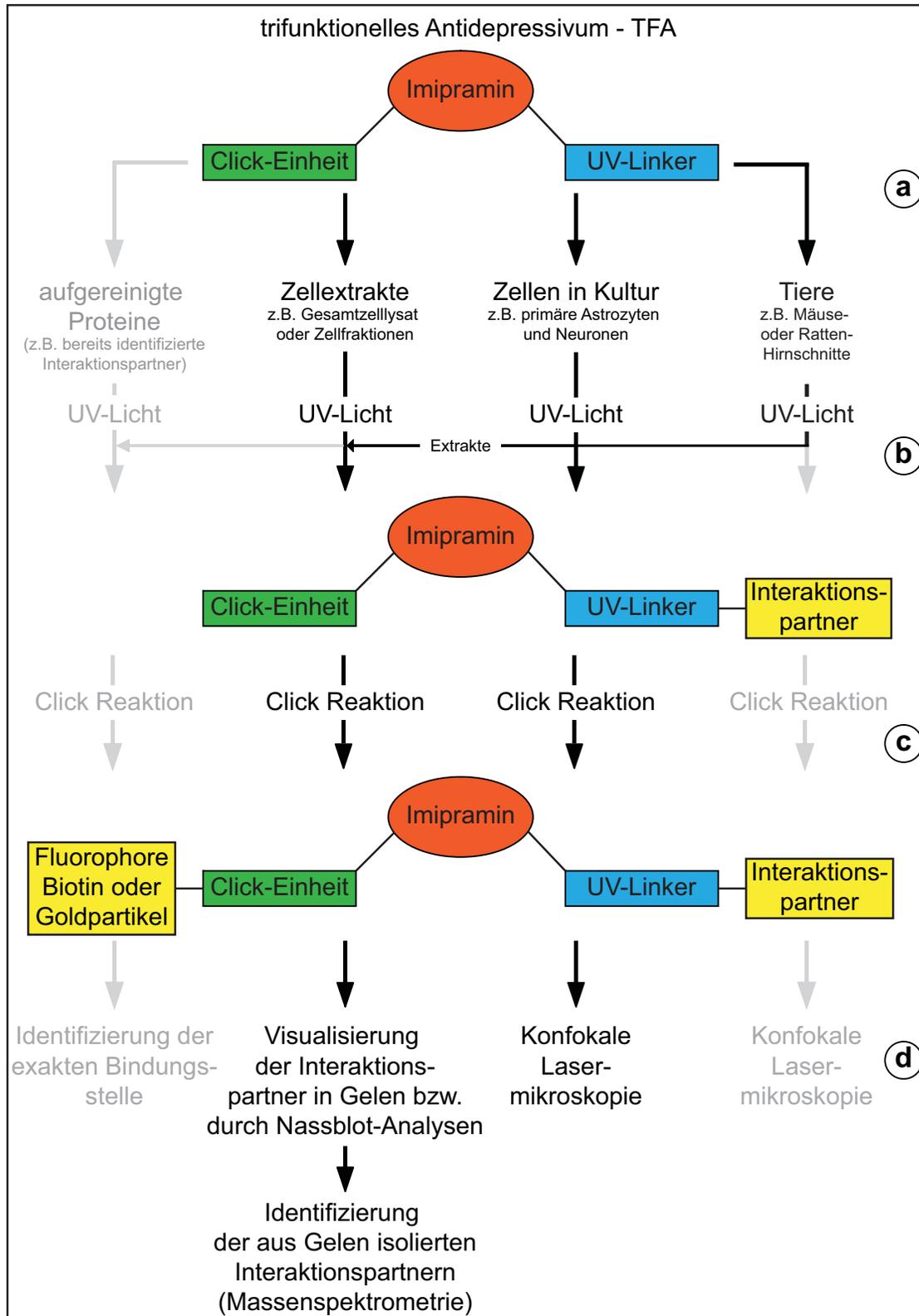


Abb. 9: Arbeitsablauf: Der allgemeine Arbeitsablauf beinhaltet (a) die Inkubation des TFA mit unterschiedlichen biologischen Ausgangsmaterialien, (b) die kovalente Bindung des TFA an die Bindungspartner durch UV-Licht-Exposition und (c) die Bindung der mit TFA kovalent markierten Bindungspartnern in der Click-Reaktion mit Fluorophoren, Biotin oder Goldpartikeln. Am Ende stehen je nach Vorgehensweise unterschiedliche Methoden zur finalen Analyse wie z.B. konfokale Lasermikroskopie, Fluoreszenzgele oder Nassblot-Analysen zur Verfügung (d). grau hinterlegte Arbeitsabläufe wurden im Rahmen dieser Arbeit noch nicht verwendet, stehen aber für zukünftige Experimente zur Verfügung.

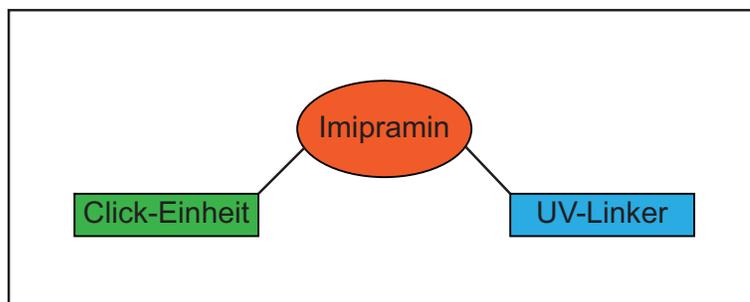


Abb. 10: Trifunktionelles Antidepressivum (TFA): schematische Darstellung
Bifunktionelle Antidepressiva (BFA): BFA-UV = Imipramin + UV-Linker; BFA-Click = Imipramin + Click-Einheit

4.1.1 UV-Linker

Häufig verwendete UV-Linker sind die Benzophenone, Diazirine, Diazoniumsalze und Arylazide (siehe 1.2.2). Dem TFA dient ein Arylazid als UV-Linker. Dieses besitzt zwar im Vergleich mit anderen UV-Linkern einige Nachteile wie die UV-Licht-Aktivierung bei 260 nm, welche zu Proteinschäden führen kann, und das vermehrte Auftreten unspezifischer, UV-Licht induzierter, kovalenter Bindungen, jedoch überwogen in diesem Fall die Vorteile. Zum einen fanden Arylazide, im Gegensatz zu Diazoniumsalzen, welche kaum in der Literatur beschrieben sind, bereits in unterschiedlichen Studien als UV-Linker Verwendung. Arylazide sind des Weiteren deutlich kleiner als Benzophenonen, was unter Berücksichtigung der Struktur-Wirkungs-Beziehung von Bedeutung ist, und können im Vergleich zu Diazirinen leichter synthetisiert werden. Für die Synthese des Arylazids musste ein Azid (**Abb. 10**, blau) an einem der aromatischen Ringe des Imipramins eingebaut werden. Hierfür schien die Position 3 des Rings geeignet, da einige TZA ebenfalls an Position 3 chemisch modifiziert sind. Zu ihnen zählen z.B. Clomipramin, welches eine Chlorsubstitution, und Cyanopramin, welches eine Cyano-Gruppe an Position 3 besitzt. Für diese zwei Substanzen wurden bereits mit anderen Antidepressiva vergleichbare Bindungsaffinitäten zu SERT und antidepressive Wirkung in Patienten nachgewiesen (McClure u. a. 1973; Horn & Trace 1974; Kenny u. a. 1983; Mellsoy u. a. 1985; Gurevich & Joyce 1996). Da bezüglich der Größe eine Cyano-Gruppe mit einer Azid-Gruppe vergleichbar ist, schien der Einbau des UV-Linkers an dieser Position unter Beachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehung unproblematisch.

4.1.2 Click-Einheit

Für die 1,3-dipolare Zykoaddition (Click-Reaktion) sind einerseits ein Alkin und andererseits ein Azid (siehe 1.2.3) notwendig. Eine dieser Gruppen muss dabei in die niedermolekulare Substanz (TFA) und die andere Gruppe in die zur Visualisierung oder Anreicherung verwendete Gruppe, wie z.B. Fluorophore oder Biotin, eingebaut werden. Als Click-Einheit wurde für das TFA das Alkin gewählt, da in der Literatur hierfür eine Verminderung der unspezifischen Bindungs-Reaktionen beschrieben wurde (Speers & Cravatt 2004). Für die Position der Click-Einheit im TFA wurden die Struktur-Wirkungs-Beziehung und die Synthesemöglichkeiten beachtet. Das Alkin wurde schließlich am Stickstoff der Seitenkette eingebaut, wobei eine Ethyl-Gruppe als Abstandhalter verwendet wurde. Diese Position bot sich an, da der Stickstoff der Seitenkette für eine Synthese leicht zugänglich ist. In Hinsicht auf die Struktur-Wirkungs-Beziehung war die Wahl dieser Position jedoch problematisch, da in der Literatur für Substitutionen am Stickstoff der Seitenkette eine Abnahme der Affinität zu SERT und NET bzw. eine Abnahme der antidepressiven Wirksamkeit beschrieben wurde (Bickel & Brodie 1964; Maxwell u. a. 1969). Allerdings ist ein klinisch verwendetes TZA, Lofepamin ebenfalls am Stickstoff der Seitenkette substituiert (**Abb. 15**; (Moon & Vince 1996). Trotz dieser Substitution zeigt Lofepamin eine im Vergleich zu Imipramin gesteigerte Affinität zu NET, wobei die Affinität zu SERT jedoch abnimmt (4.2.2.2; Bolden-Watson & Richelson 1993). Für die pharmakologische Wirksamkeit von Lofepamin als Antidepressivum ist vor allem sein Metabolit Desipramin (**Abb. 15**) verantwortlich (Lancaster & Gonzalez 1989; Sánchez & Hyttel 1999). Trotz des Beispiels Lofepamin war durch Einbau der Click-Einheit am Stickstoff der Seitenkette eine Abnahme der Affinität zu SERT und NET zu erwarten. Da jedoch die Abnahme als für diese Methode tolerierbar eingestuft (siehe 1.2.1) wurde und diese Position für eine Synthese leicht zugänglich ist, wurde die Click-Einheit am Stickstoff der Seitenkette eingeführt.

4.2 Charakterisierung der biochemischen Eigenschaften des TFA

Im Rahmen der TFA-Analyse sollten mögliche Veränderungen des Bindungsverhaltens, an SERT und NET, hervorgerufen durch die Einführung der zusätzlichen chemischen Gruppen, getestet werden. Hierfür wurden radioaktive Bindungstests im Vergleich zu handelsüblichen Antidepressiva an diesen Transportern durchgeführt, die als Zielstrukturen für Antidepressiva bekannt sind. Es sollte getestet werden, in welchem Ausmaß sich die Affinität des TFA von der Referenz-Substanz Imipramin unterscheidet, und ob sich eine potentielle Affinitätsabnahme durch die zusätzlich eingeführten chemischen Gruppen in einem tolerierbaren Bereich bewegt. Zu beachten ist hierbei, dass Affinitätsänderungen zu

anderen trizyklikaspezifischen Interaktionspartnern stärker, aber auch schwächer beeinflusst sein können. Daher dürfen die Bindungstests lediglich als Modellsystem für den Einfluss chemischer Veränderungen auf die Affinitätsverschiebungen zu Interaktionspartnern verwendet werden.

4.2.1 Charakterisierung der stabil SERT und NET überexprimierenden Zelllinien

Für die Bindungstests wurden 3 stabile Zelllinien verwendet. Im Einzelnen sind dies HEK-SERT-, HEK-SERT-FLAG- und HEK-NET-Zellen. Zuerst wurde die Expression der in diesen stabilen Zelllinien enthaltenen membranären Transporter, sowie die Anreicherung dieser Proteine in der Membranfraktion überprüft (siehe **Abb. 11**). Die Expression der Transporter, sowie die Anreicherung der Transporter durch die Membranpräparation, konnte durch Detektion des SERT bzw. NET mittels Nassblot-Analyse gezeigt werden.

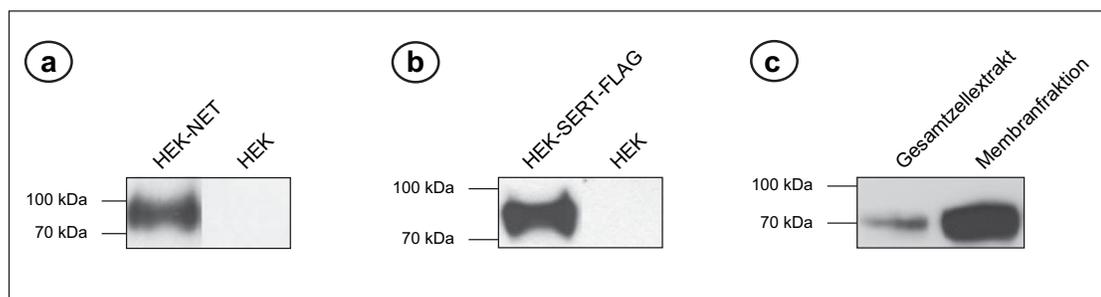


Abb. 11: Überexpression von SERT und NET in HEK-Zellen

a, b: Unter Verwendung von Anti-NET- und Anti-SERT-Antikörpern wurde eine Nassblot-Analyse von Membranpräparationen von HEK-NET-Zellen (1 μ g Protein) bzw. HEK-SERT-FLAG-Zellen (7 μ g Protein) gegen Membranpräparationen nativer HEK-Zellen (1 μ g bzw. 7 μ g Protein) durchgeführt. **c:** Die Anreicherung des SERT aus HEK-SERT-Zellen in der Membranfraktion im Vergleich zum Gesamtzellextrakt konnte durch Nassblot-Analyse bestätigt werden (10 μ g Protein).

4.2.2 Radioaktive Bindungstests

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten radioaktiven Bindungstests beinhalten Sättigungs- sowie Konkurrenzexperimente, mit welchen die Affinitäten unterschiedlicher Antidepressiva zu SERT bzw. NET getestet wurden.

Zur Durchführung dieser Bindungstests dienten Membranpräparationen aller 3 stabilen Zelllinien (HEK-SERT-FLAG-; HEK-SERT- und HEK-NET-Zellen). Als radioaktiv markierter Ligand wurde im Falle der SERT-überexprimierenden Zelllinien [3 H]-Citalopram als SSRI und im Falle der von NET-überexprimierenden Zelllinie [3 H]-Nisoxetin als selektiver Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer verwendet.

4.2.2.1 Bestimmung von B_{\max} und K_d

In Sättigungsexperimenten wurden die Menge der überexprimierten Transporter (B_{\max}) und die Affinität zu Antidepressiva ermittelt. Durch Verwendung von Membranpräparationen von HEK-SERT-FLAG-, HEK-SERT- und HEK-NET-Zellen (siehe **Abb. 12**) wurden die K_d -Werte für [^3H]-Citalopram bzw. [^3H]-Nisoxetin ebenso wie die B_{\max} -Werte der unterschiedlichen Membranpräparationen bestimmt. Der K_d -Wert für [^3H]-Citalopram lag für die HEK-SERT-FLAG-Zellen bei 11,7 +/- 0,6 nM und für die HEK-SERT-Zellen deutlich höher bei 26,0 +/- 0,8 nM, obwohl beiden Zelllinien SERT stabil überexprimieren. Der K_d -Wert für [^3H]-Nisoxetin unter Verwendung von Membranpräparationen der HEK-NET-Zellen wurde als 3,0 +/- 0,8 nM bestimmt. Die B_{\max} -Werte bewegten sich je nach verwendeter Membranpräparation für die HEK-SERT-FLAG-Zellen zwischen 17 und 40 pmol/mg Gesamtprotein, für die HEK-SERT-Zellen zwischen 20 und 30 pmol/mg Gesamtprotein und für die HEK-NET-Zellen zwischen 5 und 9 pmol/mg Gesamtprotein (Daten nicht gezeigt). Die Daten sprechen für eine effiziente, ektopische Expression des SERT bzw. NET in HEK-Zellen. Die K_d - und B_{\max} -Werte der Einzelexperimente wurden durch Sigmaplot oder mit Hilfe eines Rosenthalplots berechnet und anschließend verglichen. Die unterschiedlichen Berechnungsweisen ergaben bei Experimenten mit geringer Streuung übereinstimmende Ergebnisse.

4.2.2.2 Bestimmung der K_i -Werte

Um die Affinität der synthetisierten, modifizierten Antidepressiva (siehe **Abb. 10**) mit handelsüblicher Antidepressiva (siehe **Abb. 15**) zu vergleichen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Hierbei wurde das radioaktiv markierte Antidepressivum durch steigende Konzentrationen des nicht markierten Antidepressivums von der Bindungsstelle am Ziel-Protein verdrängt. Somit kann in den Konkurrenzexperimenten die Affinität der unterschiedlichen Antidepressiva zu SERT und NET bestimmt werden.

In **Abb. 13** sind die ermittelten K_i -Werte der unterschiedlichen Antidepressiva im Vergleich zu sehen. Für die HEK-SERT-FLAG-Zellen lag der K_i -Wert des TFA ($K_i = 704$ nM) im Bereich der handelsüblichen Antidepressiva (Imipramin: $K_i = 12,6$ nM; Desipramin: $K_i = 103$ nM; Lofepramin: $K_i = 994$ nM). Die chemischen Modifikationen des TFA führten, im Vergleich zur Ausgangssubstanz Imipramin, zu einer etwa 60-fach reduzierten Affinität zu SERT. An NET hat das TFA mit einer deutlich verringerten Affinität ($K_i = 950$ nM) im Vergleich zu handelsüblichen Antidepressiva (Imipramin: $K_i = 44$ nM; Desipramin: $K_i = 0,68$ nM; Lofepramin: $K_i = 13,2$ nM) gebunden. Vergleicht man jedoch die Affinität des Imipramin mit der Affinität des TFA, nahm diese durch die chemischen Modifikationen lediglich um den Faktor 22 ab. Wie man an den Affinitäten der bifunktionellen Antidepressiva (BFA-UV und BFA-Click) erkennen kann, bleibt die Affinität im Vergleich zu Imipramin

durch den UV-Linker (BFA-UV: $K_i = 4,5$ nM zu SERT) unverändert. Die Click-Einheit führte jedoch zu einer Reduktion der Affinität im Vergleich zu Imipramin (BFA-UV: $K_i = 2\ 300$ nM zu SERT). Beim Vergleich der K_i -Werte der handelsüblichen Antidepressiva mit Literaturwerten zeigte sich, dass die K_i -Werte für NET mit den Literaturwerten übereinstimmten, für SERT wurden jedoch Abweichungen zu Literaturwerten festgestellt (siehe 9). Um die Literaturwerte weiterer handelsüblicher Antidepressiva für SERT mit den eigenen Messungen zu vergleichen, wurden zusätzlich Konkurrenzexperimente mit Paroxetin, Venlafaxin und Amitriptylin durchgeführt (siehe **Abb. 13-b**). Auch hier kam es, mit Ausnahme von Amitriptylin, zu Abweichungen von den in der Literatur beschriebenen Werten (siehe 9).

Die Konkurrenzexperimente der HEK-SERT-Zellen zeigten im Falle von Imipramin eine 2-Seiten-Konkurrenz (siehe **Abb. 14**, rechts). Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass die HEK-SERT-Zelllinie neben SERT ein weiteres, hoch-abundantes Protein enthält, welches Imipramin bindet. Um das Vorhandensein dieses weiteren Proteins zu überprüfen, wurde die native HEK-Zelllinie, welche zur Herstellung der HEK-SERT-Zellen verwendet wurde, mit den HEK-SERT-Zellen und HEK-SERT-FLAG-Zellen in Konkurrenzexperimenten mit Citalopram und Imipramin verglichen. Präparationen von HEK-SERT-Zellen besaßen einen höheren K_i -Wert für Citalopram ($K_i = 17,7$ nM) als HEK-SERT-FLAG-Zellen ($K_i = 13,4$ nM), obwohl beide Zelllinien SERT überexprimierten. Präparationen aus nativen HEK-Zellen haben ebenfalls mit hoher Affinität Citalopram ($K_i = 39,1$ nM) gebunden, obwohl diese Zellen SERT negativ waren (siehe **Abb. 11**). Für native HEK-Zellen, welche für die Etablierung der HEK-SERT-FLAG-Zellen herangezogen wurden, konnte keine Bindung von Citalopram über der Hintergrundbindung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Die Konkurrenzkurve für Imipramin zeigte im Falle der HEK-SERT-Zellen einen Verlauf, der einer sogenannten 2-Seiten-Konkurrenzkurve (siehe **Abb. 14**; orange durchgezogene Linie) und nicht einer 1-Seiten-Konkurrenzkurve (siehe **Abb. 14**, orange gestrichelte Linie) entspricht. Die HEK-SERT-FLAG-Zellen hingegen zeigten eine 1-Seiten-Konkurrenzkurve, dessen K_i -Wert ($K_i = 12,6$ nM) in etwa dem ersten K_i -Wert der HEK-SERT-Zellen ($K_i = 17,7$ nM) entsprach. Bei den nativen HEK-Zellen war ebenfalls eine 1-Seiten-Konkurrenzkurve, dessen K_i -Wert ($K_i = 26$ μ M) etwa mit dem zweiten K_i -Wert der HEK-SERT-Zellen ($K_i = 28$ μ M) vergleichbar war, messbar. Das Vorhandensein eines hoch-abundanten Proteins in den nativen HEK-Zellen, an welches Citalopram und Imipramin binden, konnte somit bestätigt werden. Die Unterscheidung der 2 Proteine in Konkurrenzexperimenten ist problematisch, daher wurde diese Zelllinie in den radioaktiven Bindungsexperimenten nicht weiter untersucht.

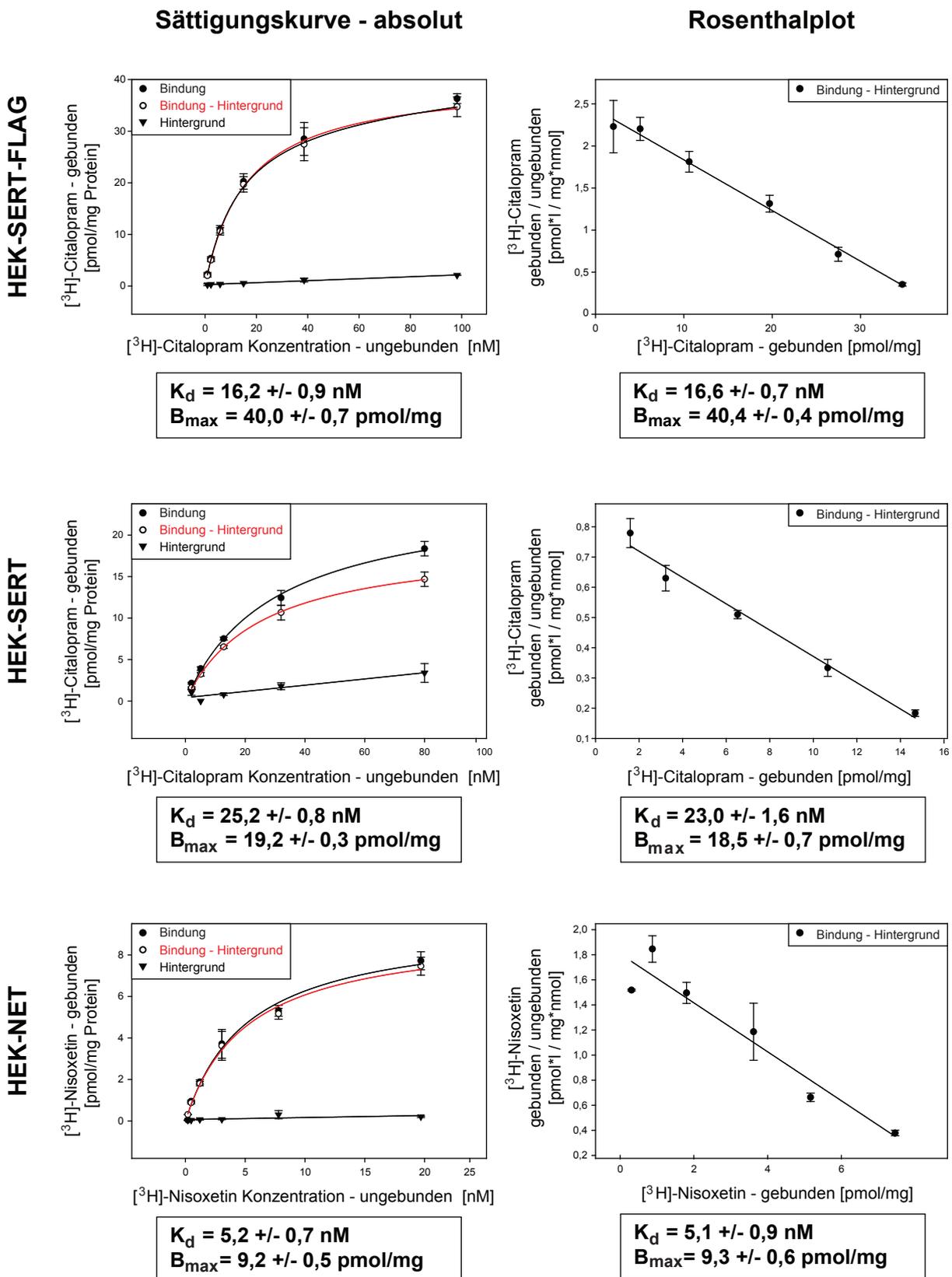


Abb. 12: Bestimmung von K_d - und B_{max} -Werten der unterschiedlichen stabilen Zelllinien

Die Sättigungsexperimente wurden mit $[^3\text{H}]$ -Citalopram als SSRI bzw. $[^3\text{H}]$ -Nisoxetin als selektiven Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer durchgeführt. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen dieser radioaktiven Substanzen mit je 4 μg Membranpräparation der stabilen Zelllinien (HEK-SERT-FLAG, HEK-SERT und HEK-NET) inkubiert. Die Hintergrundbindung wurde durch Konkurrenz mit 1 mM Imipramin (HEK-SERT-FLAG und HEK-SERT) bzw. 5 μM Nisoxetin (HEK-NET) bestimmt. In der Abbildung ist pro Zelllinie jeweils eine Sättigungskurve und ein Rosenthalplot beispielhaft für ein Experiment gezeigt.

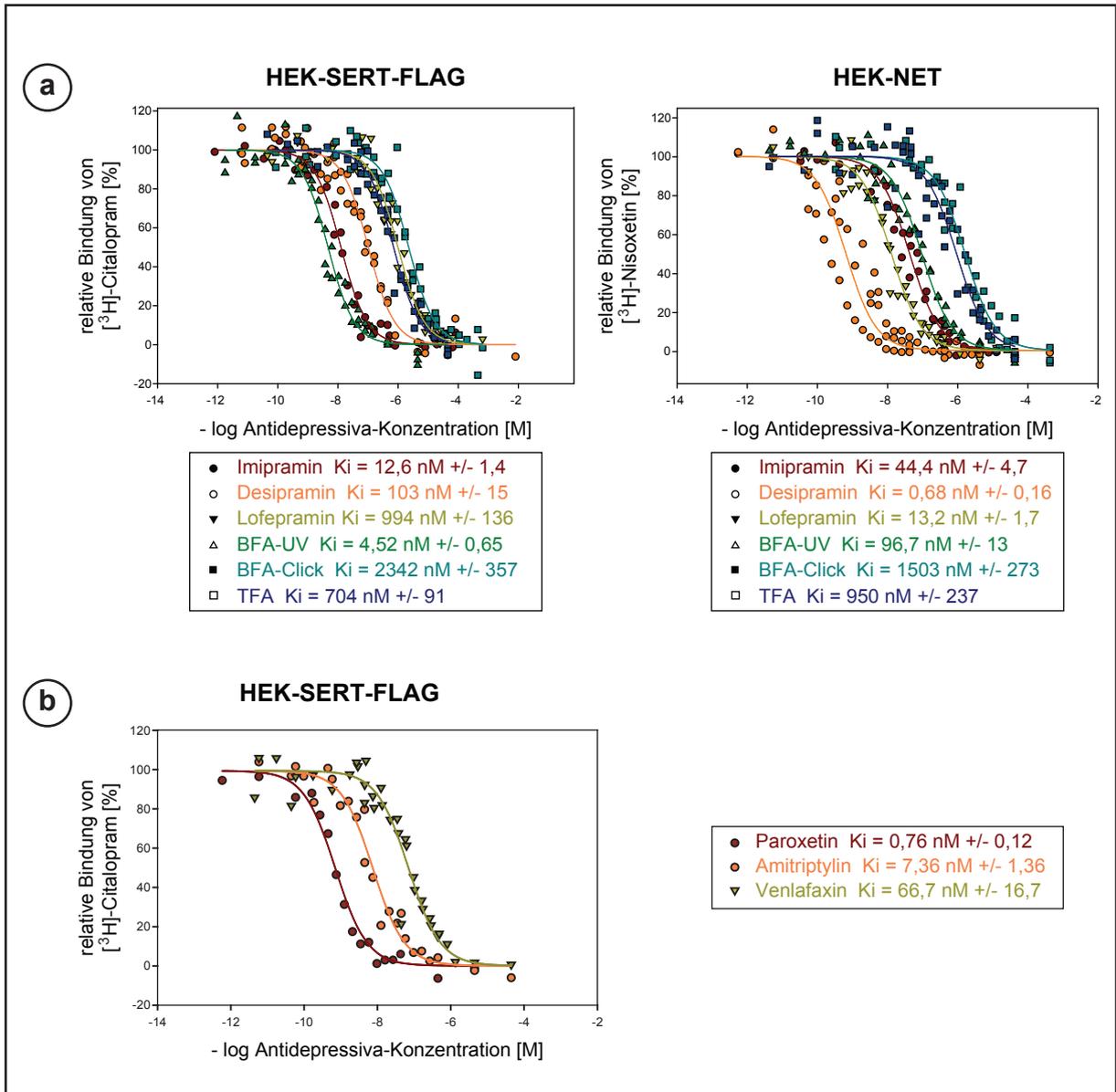


Abb. 13: Ermittlung der K_i -Werte verschiedener Referenz- und modifizierter Antidepressiva

Kompetitionskurven wurden mit steigenden Konzentrationen der synthetisierten, modifizierten Antidepressiva (BFA-UV; BFA-Click; TFA) bzw. der handelsüblichen Antidepressiva ((a) Imipramin, Desipramin, Lofepramin; (b) Paroxetin, Amitriptylin, Venlafaxin) durchgeführt. Diese Antidepressiva wurden jeweils mit 4 μg Membranpräparation von HEK-SERT-FLAG- bzw. HEK-NET-Zellen und einer bestimmten Konzentration der radioaktiv markierten Antidepressiva (15 nM [³H]-Citalopram bzw. 4,75 nM [³H]-Nisoxetin) inkubiert. (n = 3)

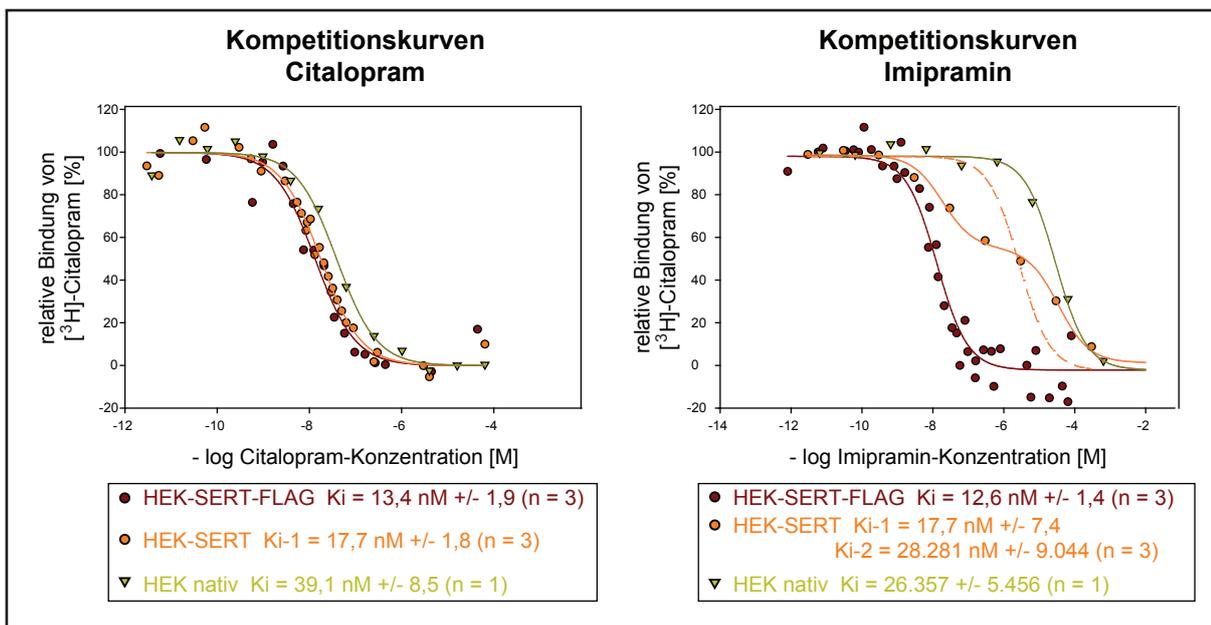


Abb. 14: Kompetitionskurven von Citalopram und Imipramin mit unterschiedlichen Membranpräparationen

Kompetitionskurven wurden mit handelsüblichen Antidepressiva (Citalopram und Imipramin) durchgeführt. Hierzu wurden einerseits Membranpräparationen der beiden den SERT-überexprimierenden Zellen verwendet und andererseits der nativen HEK-Zellen, welche die Ursprungszelllinie der HEK-SERT-Zellen darstellt. Es wurden jeweils $4 \mu\text{g}$ Membranpräparation mit steigenden Konzentrationen der Antidepressiva und 15 nM des radioaktiv markierten Antidepressivums inkubiert.

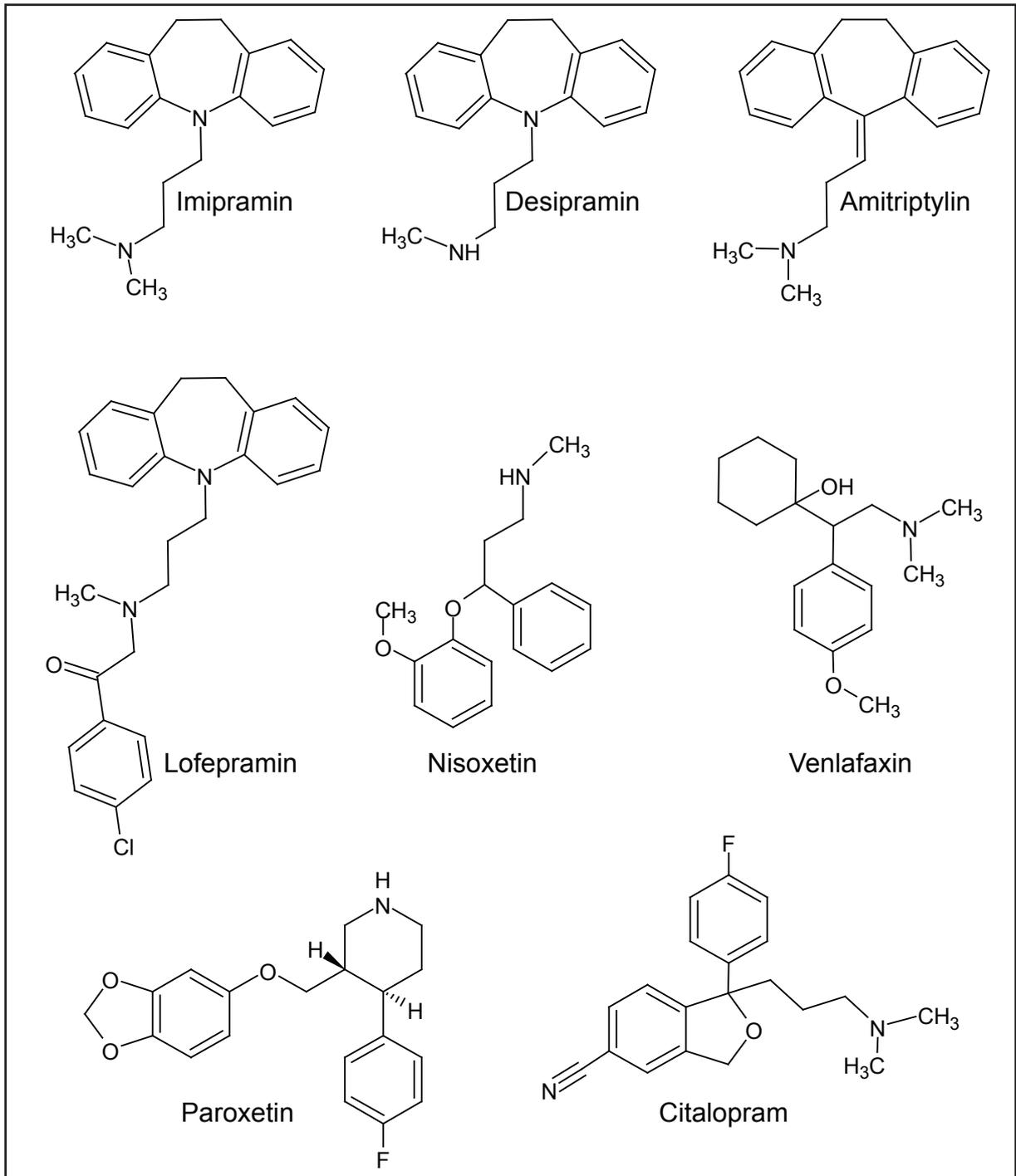


Abb. 15: Chemische Strukturen handelsüblicher Antidepressiva, welche für die Wettbewerbs- und Sättigungsexperimente verwendet wurden. Imipramin, Desipramin, Amitriptylin und Lofepramin gehören zur Gruppe der TZA. Paroxetin und Citalopram werden zu den SSRI gezählt. Nisoxetin ist ein selektiver Norepinephrinwiederaufnahmehemmer. Bei Venlafaxin handelt es sich um einen selektiven Serotonin- und Norepinephrin-Wiederaufnahmehemmer.

4.3 Aufnahme und Verteilung des TFA in lebenden Zellen

Die Verteilung des TFA wurde in unterschiedlichen Zelltypen visualisiert. Neben primären Astrozyten und Neuronen wurden auch HEK-SERT-FLAG-Zellen und native HEK-Zellen verwendet.

4.3.1 Kolokalisation mit Serotonintransporter

SERT-überexprimierende HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) wurden mit TFA inkubiert und nach kovalenter Bindung fand die Markierung der Interaktionspartner mit einem Fluoreszenzfarbstoff mittels Click-Chemie statt. **Abb. 16** zeigt, dass der Großteil des TFA bereits innerhalb von 30 Min. in die Zellen aufgenommen und in zytosolischen Kompartimenten angereichert wurde. Lediglich ein kleiner Anteil des TFA sammelte sich in SERT-positiven, membranären Regionen an. Dies stimmt mit den Ergebnissen der Konkurrenzexperimente (siehe **Abb. 13**) überein, mit denen gezeigt werden konnte, dass TFA an SERT in den hier verwendeten Konzentrationen gebunden hat. Zusätzlich wurden SERT-positive Regionen im Zytosol detektiert, bei denen ebenfalls eine Kolokalisation des TFA erkennbar war.

Um sicherzugehen, dass es sich bei den Färbungen um spezifische TFA-abhängige Interaktionen handelt, wurde die Funktionalität des UV-Linkers und der Click-Einheit kontrolliert. Hierfür wurden primäre Astrozyten mit TFA bzw. mit unterschiedlichen BFA, die entweder einen UV-Linker (BFA-UV) oder eine Click-Einheit (BFA-Click) besitzen, inkubiert. Nach UV-Licht-Bestrahlung erfolgte die Fluoreszenzmarkierung in der Click-Reaktion. Zusätzlich wurde die Färbung ohne UV-Licht-Exposition bzw. ohne Click-Reaktion durchgeführt.

Das TFA bindet über den UV-Linker nach UV-Licht-Bestrahlung kovalent an potentielle Interaktionspartner. Ohne UV-Linker (BFA-Click, siehe **Abb. 10**) oder ohne UV-Licht-Bestrahlung war kaum Fluoreszenz detektierbar, da nicht kovalent gebundenes BFA-Click bzw. TFA ausgewaschen wird (siehe **Abb. 17 I+II**). Bei erhöhter Laserintensität des konfokalen Lasermikroskops (siehe **Abb. 17 I+II** - rechte Spalte) wurde ersichtlich, dass ein kleiner Teil des BFA-Click auch ohne kovalente Bindung mit hoher Persistenz und offensichtlich regionenspezifisch akkumulierte und die Waschschrte nicht zur kompletten Entfernung des BFA-Click führten. Bei erhöhter Laserintensität konnte ebenfalls festgestellt werden, dass der UV-Linker zu einem kleinen Anteil bereits ohne UV-Licht-Exposition durch die erhöhte Temperatur von 37 °C während der Inkubation aktiviert und kovalent an Interaktionspartner gebunden wurde. Das Signal war jedoch unter UV-Licht-Exposition von 1 Min. deutlich höher.

Die Click-Einheit des TFA stellt ein Alkin dar. Alkine kommen in biologischen Materialien nicht vor. Da die Click-Reaktion spezifisch zwischen einem Alkin und einem Azid (am Fluoreszenzfarbstoff) abläuft, ist wenig Hintergrund der Click-Reaktion zu erwarten. In

Zellen, welche mit dem TFA inkubiert wurden, zeigte sich eine spezifische Click-Reaktion, welche durch starke, distinkt auftretende Fluoreszenz charakterisiert ist (**Abb. 17 III**). IMI diente als Negativkontrolle, wobei bei 20-facher Laserintensität des konfokalen Lasermikroskops homogen über die Zelle verteilte Hintergrund-Fluoreszenz detektierbar war (**Abb. 17 III** - rechte Spalte). Die Zellfärbungen, die mit BFA-UV (siehe **Abb. 10**) durchgeführt wurden, entsprachen den Zellfärbungen mit IMI (Daten nicht gezeigt).

4.3.2 Lokalisation in intrazellulären Kompartimenten

Um die intrazellulären Bindungsstellen des TFA näher zu untersuchen, wurde die Zellfärbung in primären Astrozyten durchgeführt. Dieser Zelltyp wurde verwendet, da er einerseits möglicherweise für die Wirkung der Antidepressiva *in vivo* eine Rolle spielt, andererseits können intrazelluläre Kompartimente dieser Zellen aufgrund des großen Zellvolumens gut sichtbar gemacht werden (Hirst u. a. 1998; Czeh u. a. 2005). Für die Zellfärbungen wurden primäre Astrozyten für 10 Min., 6 oder 48 Std. mit TFA in Konzentrationen zwischen 0,05 μM und 5 μM behandelt. Die Resultate sind in **Abb. 18** zusammengefasst.

Bereits in einer Konzentration von 0,05 μM zeigte sich in bestimmten Zellkompartimenten ein TFA-Signal. Die Fluoreszenzintensität stieg jedoch bei zunehmender TFA-Konzentration. Um Überbelichtung in den Zellfärbungen zu vermeiden, wurde für höhere TFA-Konzentrationen eine geringere Laserintensität des konfokalen Lasermikroskops gewählt. Wie bei Betrachtung des Verteilungsmusters des TFA deutlich zu erkennen ist, änderte sich dieses sowohl über die Zeit, als auch bei ansteigender TFA-Konzentration. Bei niedrigen Konzentrationen, sowie bei kurzer Inkubationszeit war das TFA vor allem in fadenförmigen Kompartimenten konzentriert. Bei längeren Inkubationszeiten bis zu 48 Std. konnte neben der Ansammlung in fadenförmigen Kompartimenten vermehrt eine Anreicherung in vesikulären Strukturen beobachtet werden. Längere Inkubationszeiten führten zusätzlich zur Vergrößerung dieser Vesikel.

4.3.2.1 Anreicherung in Mitochondrien

Wie unter 4.3.2 gezeigt wurde, war das TFA in unterschiedlichen Kompartimenten in der Zelle detektierbar. Im nächsten Schritt sollten diese Kompartimente identifiziert werden. In der Literatur wurde bereits die Anreicherung von kationisch amphiphilen Substanzen, zu denen auch die TZA und somit das TFA zählen, in Mitochondrien beschrieben (Fromenty u. a. 1989; Le Dinh u. a. 1988). Daher sollte getestet werden, ob das TFA spezifisch in Mitochondrien konzentriert wird. Hierzu wurden die Bindungsstellen des TFA in primären Astrozyten nach Behandlung mit 5 μM TFA für 30 Min. oder 48 Std. sichtbar gemacht. Die Gegenfärbung der Mitochondrien erfolgte mittels eines Mitochondrien-spezifischen, membranpotentialabhängigen Markers (MitoTracker, Invitrogen).

Wie **Abb. 19** zeigt, gab es einen großen Grad an Überlappung von TFA und mitochondrialem Fluoreszenzsignal. Dies bestätigte, dass das TFA in Mitochondrien von primären Astrozyten angereichert wurde. Außerdem schien sich die Mitochondrien-Struktur während der TFA-Behandlung zu verändern (**Abb. 19-a** – Mitte). Zu Beginn waren die Mitochondrien fadenförmig im Zytosol verteilt, je länger jedoch die Inkubation dauerte, desto mehr schienen sich die Mitochondrien in Kernnähe aufzuhalten. Ähnliche Veränderungen konnten durch die Behandlung von Zellen mit Imipramin (IMI) (Daten nicht gezeigt) hervorgerufen werden. Zusätzlich wurde die Akkumulierung des TFA in Mitochondrien von primären Neuronen, sowie in HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) visualisiert (siehe **Abb. 19-b**). Somit scheint das TFA sich daher unabhängig vom Zelltyp in Mitochondrien anzusammeln.

Die Anreicherung von kationisch amphiphilen Substanzen in Mitochondrien ist laut Literatur vom Membranpotential der Mitochondrien abhängig (Dykens & Will 2008). Um dies in Zellfärbungen zu überprüfen, wurden primäre Astrozyten zusätzlich mit Valinomycin behandelt. Diese Substanz fördert durch Komplexbildung von Kaliumionen deren Aufnahme in die Mitochondrien und führt daher zum entgegengesetzten Transport von H^+ -Ionen. Die Folge ist der Zusammenbruch des Membranpotentials der Mitochondrien. Dies war durch Valinomycin-Behandlung bereits nach 2 Std. durch den MitoTracker, der sich nur bei vorhandenem Membranpotential in Mitochondrien anreichert, zu beobachten (siehe **Abb. 20-a**, unten).

Wie in **Abb. 21-a** zu sehen ist, kam es trotz Valinomycin-Vorbehandlung zur Akkumulierung des TFA in Mitochondrien primärer Astrozyten. Die Aufnahme in die Mitochondrien schien daher unabhängig von deren Membranpotential. Ebenfalls zu erkennen ist, dass sich die Form der Mitochondrien durch die Valinomycin-Behandlung veränderte.

In einem weiteren Experiment konnte gezeigt werden, dass das TFA mit hoher Persistenz innerhalb der Mitochondrien gebunden wurde. Wie in **Abb. 20-b** zu sehen ist, wurde das TFA selbst durch eine Auswaschphase von 48 Std. nicht aus den Mitochondrien entfernt. Das Verteilungsmuster des TFA in primären Astrozyten veränderte sich jedoch durch die verlängerte Kultivierung dieser Astrozyten. Neben Mitochondrien war das TFA nach 48 Std. auch in vesikulären Strukturen angereichert.

Zusammenfassend wurde das TFA unabhängig vom Membranpotential und vom Zelltyp in Mitochondrien angereichert. Außerdem ging es dort offensichtlich stabile Bindungen ein. Bei längerer Behandlung mit dem TFA bzw. IMI veränderte sich die Morphologie der Mitochondrien.

4.3.2.2 Anreicherung in Lysosomen

Wie bereits unter 4.3.2 beschrieben, wurde das TFA in vesikulären Strukturen detektiert, welche sich durch Verlängerung der Inkubationszeit und steigende TFA-Konzentrationen vergrößerten. Bekanntermaßen reichern sich TZA in Lysosomen an und führen bei längerer

Inkubationszeit zur Phospholipidosis. Bei dieser vergrößern sich die Lysosomen durch Einlagerung von nicht abbaubaren Phospholipiden, welche direkt mit TZA interagieren (Lüllmann-Rauch 1976; Reasor & Kacew 2001; Anderson & Borlak 2006). Im Weiteren wurde überprüft, ob es sich bei den beobachteten Vesikeln um Lysosomen handelt. Die Visualisierung erfolgte mit einem Farbstoff, welcher in dem in Lysosomen vorherrschenden sauren Milieu rot fluoresziert (LysoTracker, Invitrogen). **Abb. 21** zeigt die Zellfärbungen für primäre Astrozyten im Überblick. Es wird deutlich, dass das TFA bereits nach 6 Std. in Lysosomen akkumulierte. Jedoch kam es erst nach einer Inkubationszeit von 24 Std. zu einer sichtbaren Vergrößerung der Lysosomen. Eine Verlängerung der Inkubationszeit auf 48 Std. führte zu einer weiteren, jedoch geringfügigen Vergrößerung der Lysosomen. Die Induktion der Lysosomenformation konnte ebenfalls durch die Behandlung mit IMI gezeigt werden (**Abb. 21-b**). Zusätzlich wurden dieses Experiment mit primären Neuronen und HEK-Zellen durchgeführt. Wie **Abb. 22** zeigt, wurde das TFA in diesen Zellen ebenfalls in Lysosomen angereichert.

Um die Frage zu klären, ob das TFA in Lysosomen ausschließlich aufgrund des sauren Milieus in diesen Vesikeln angesammelt wird, wurden primäre Astrozyten zusätzlich mit Bafilomycin behandelt. Dieser Stoff hemmt die Protonen-ATPase der Lysosomen und führt somit zu einem pH-Anstieg in diesen Vesikeln. Aufgrund der Toxizität von Bafilomycin konnten die Astrozyten maximal 24 Std. mit dieser Substanz behandelt werden. Der pH-Anstieg durch die Bafilomycin-Behandlung war bereits nach 2 Std. durch den LysoTracker, der durch den pH-Anstieg diese Vesikel nicht mehr anfärbte, zu beobachten (siehe **Abb. 23-a**, Daten für 2 Std. nicht gezeigt). Wurden primäre Astrozyten zunächst mit Bafilomycin vorbehandelt, und dann mit Bafilomycin und TFA inkubiert, konnte keine Ansammlung des TFA in Vesikeln beobachtet werden (siehe **Abb. 23-a**). Der saure pH der Lysosomen schien daher für die Anreicherung des TFA essentiell zu sein. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TFA in Lysosomen, ebenfalls wie in Mitochondrien, mit hoher Persistenz bindet (siehe **Abb. 23-b**). Weder eine Auswaschphase mit Medium noch mit Bafilomycin für 24 Std. führte zu einer sichtbaren Abnahme der mit TFA angereicherten vesikulären Strukturen.

Zusammenfassend wurde TFA aufgrund des sauren Charakters in Lysosomen unterschiedlicher Zelltypen konzentriert und dort mit hoher Persistenz gebunden. Die Akkumulation des TFA führte des Weiteren zu einer starken Vergrößerung der Lysosomen. Ähnliche Veränderungen konnten durch Behandlung mit IMI gezeigt werden.

4.3.3 Konkurrenzexperimente

Die Spezifität der Zellfärbungen wurde mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten bestimmt. Hierzu wurden einerseits ein reversibles, handelsübliches Antidepressivum (IMI, siehe **Abb. 15**) und andererseits ein irreversibles, modifiziertes Antidepressivum (BFA-UV, siehe **Abb. 10**) verwendet. Der Kompetitor BFA-UV bindet nach UV-Licht-Bestrahlung ebenso wie das TFA kovalent an die Interaktionspartner. **Abb. 24-a** zeigt die Ergebnisse im Überblick.

Die Intensität der Färbung nahm durch die Konkurrenz mit IMI als reversiblen Kompetitor kaum ab. Erstaunlicherweise wurde jedoch mit BFA-UV als irreversiblen Kompetitor eine deutliche Abnahme der Fluoreszenzintensität erreicht.

In einem weiteren Kontrollexperiment sollte ausgeschlossen werden, dass diese sichtbare Abnahme der Fluoreszenz nicht durch eine UV-Licht-induzierte Nebenreaktion des TFA und des BFA-UV, welche die Click-Einheit zerstört, hervorgerufen wird. Hierfür wurden primäre Astrozyten sequentiell mit TFA und BFA-UV bzw. mit IMI oder ohne Antidepressivum inkubiert und mit UV-Licht bestrahlt. **Abb. 24-b** zeigt, dass es durch die sequentielle Behandlung mit BFA-UV zu einer sehr leichten Abnahme der Fluoreszenz kam, diese aber nicht allein für die starke Fluoreszenzabnahme im Konkurrenzexperiment verantwortlich zu machen war.

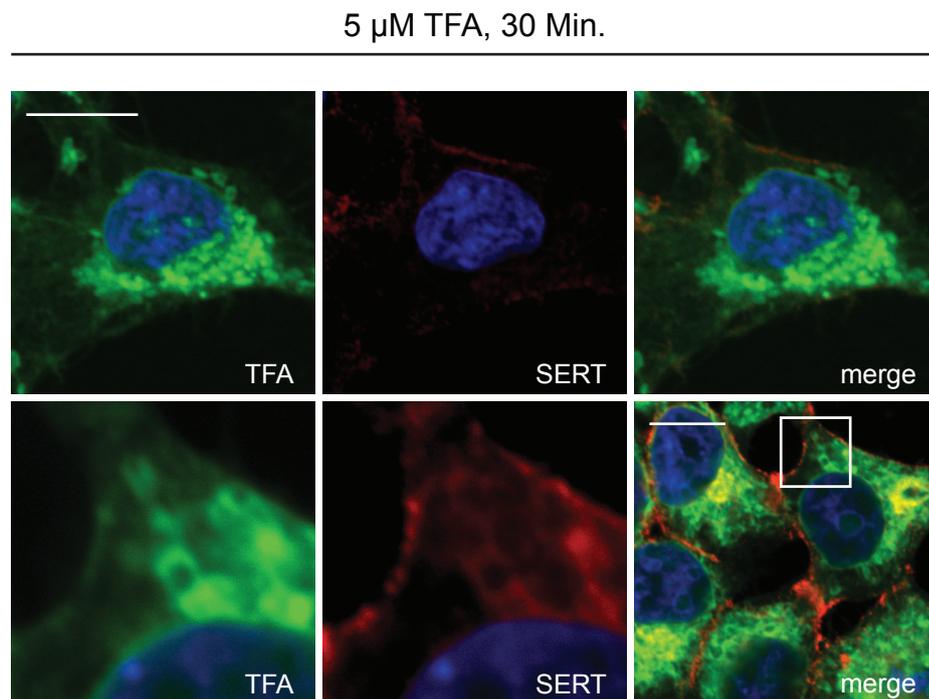


Abb. 16: Kolokalisation der TFA-Interaktionspartner und SERT in überexprimierenden HEK-Zellen
SERT-überexprimierende Zellen wurden mit 5 μM TFA für 30 Min. inkubiert und im Anschluss mit UV-Licht bestrahlt. SERT wurde durch Immunofärbung mit einem Anti-SERT-Antikörper visualisiert und die Bindungsstellen des TFA in der Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** SERT; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** 10 μm

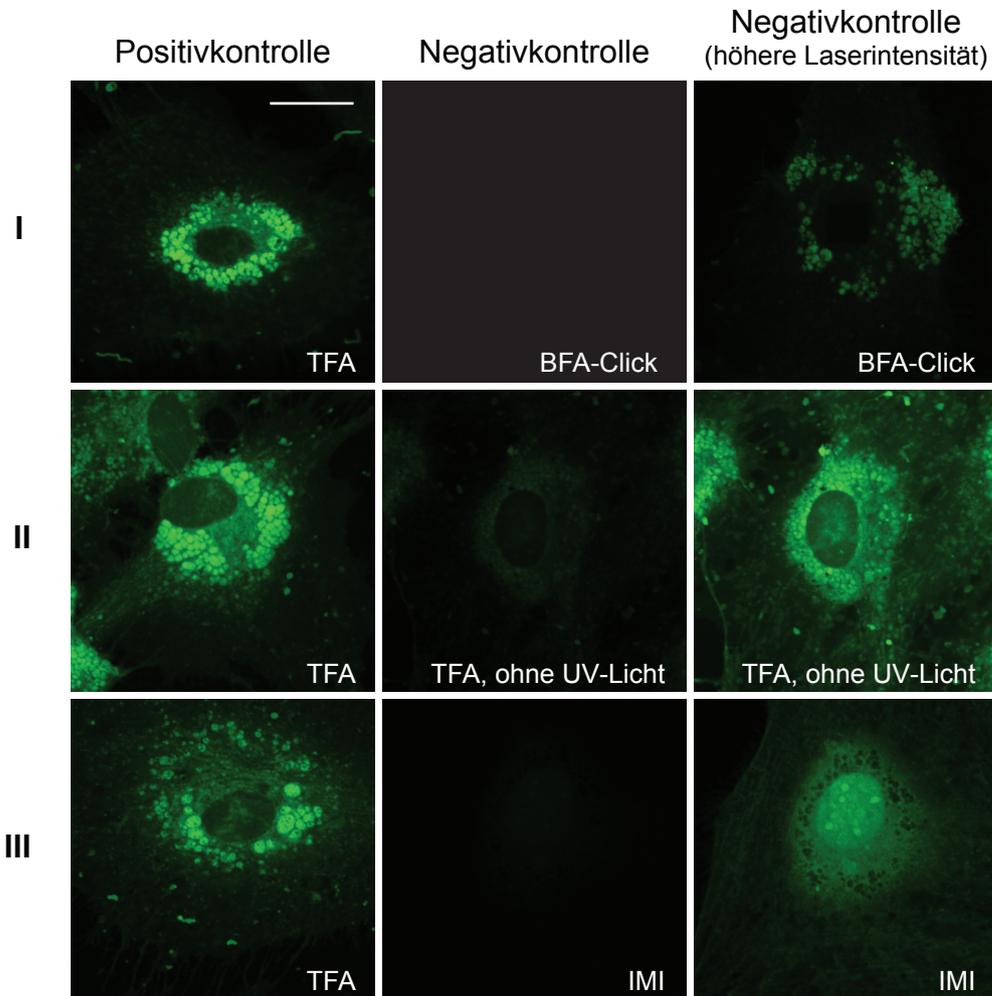


Abb. 17: Kontrolleexperiment zur Spezifität des UV-Linkers und der Click-Einheit

Primäre Astrozyten wurden entweder mit 5 μ M TFA, BFA-Click oder IMI für 48 Std. inkubiert. Nach UV-Licht-Bestrahlung wurden die Interaktionspartner des TFA durch die Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert. II) zeigt die Färbungen ohne UV-Licht-Exposition. **Mittlere Spalte:** Einstellungen des konfokalen Mikroskops wie Einstellungen der Positivkontrolle; **rechte Spalte:** 12-fache (I), 6-fache (II) bzw. 20-fache (III) Laserintensität im Vergleich zur Positivkontrolle **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **Maßeinheit:** 20 μ m

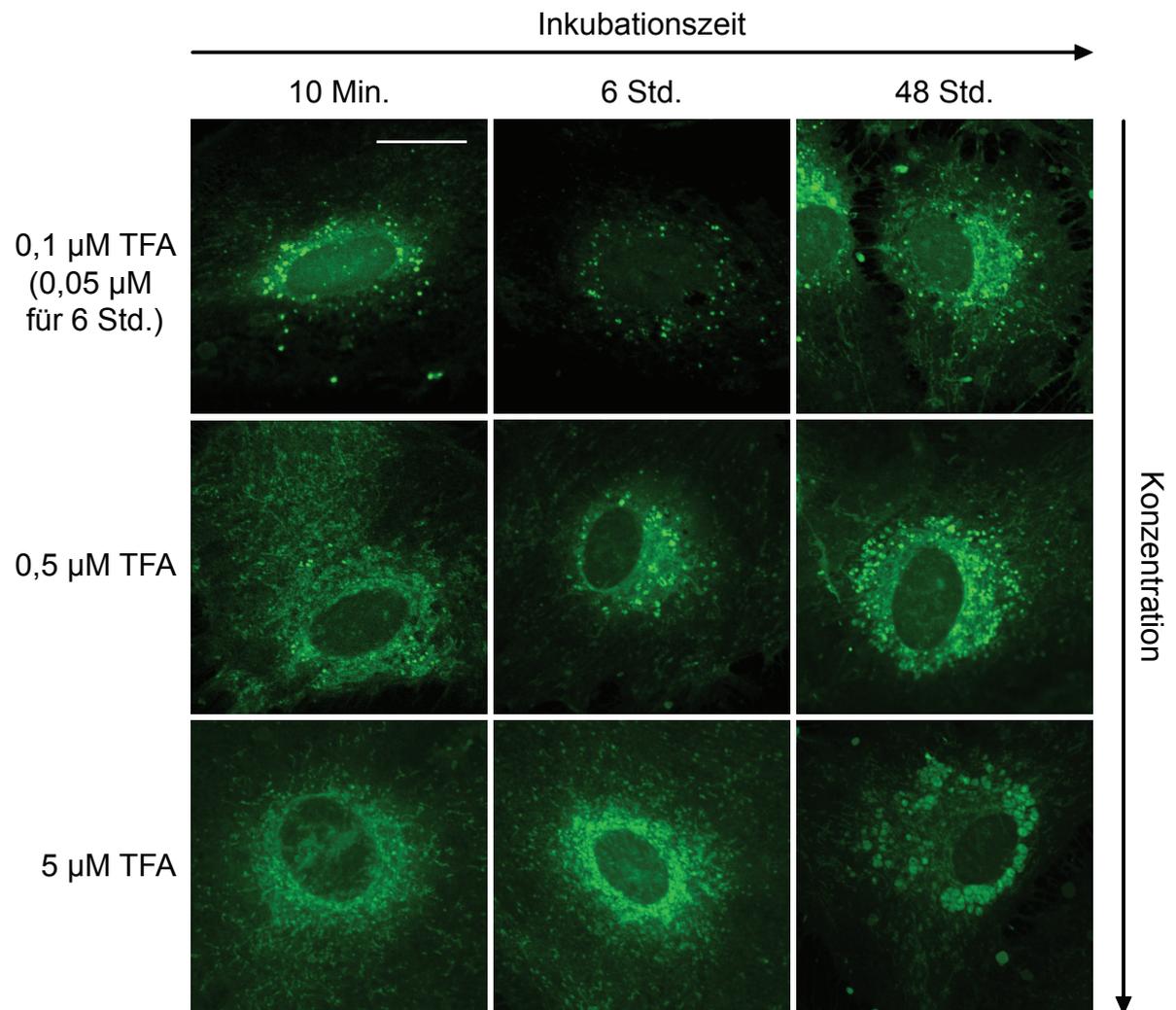


Abb. 18: Visualisierung der TFA-Bindungsstellen in primären Astrozyten

Primäre Astrozyten wurden mit steigenden Konzentrationen des TFA über verschiedene Zeitintervalle inkubiert. Die Zellen wurden mit UV-Licht bestrahlt und die Bindungsstellen des TFA in der Click-Reaktion mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **Maßeinheit:** 20 µm

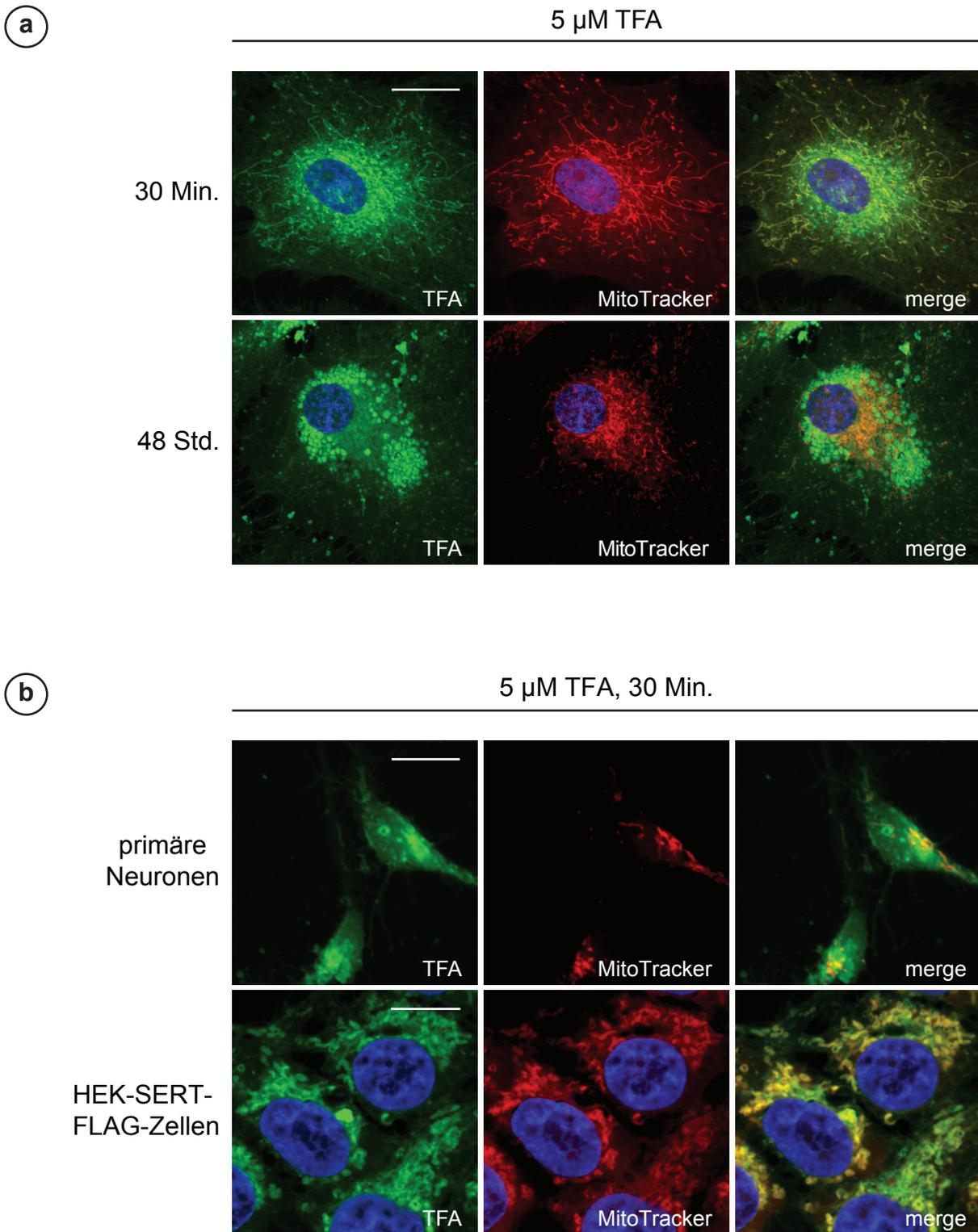


Abb. 19: Kolokalisation des TFA-Signals mit Mitochondrien

HEK-SERT-FLAG-Zellen, primäre Neuronen (b) und primäre Astrozyten (a) wurden mit 5 μ M TFA für 30 Min. bzw. 48 Std. behandelt. Nach UV-Licht-Exposition wurde die Click-Reaktion mit einem Fluorophor durchgeführt. Die Mitochondrien wurden mit einem MitoTracker visualisiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** Mitochondrien; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** a) 20 μ m, b) 10 μ m

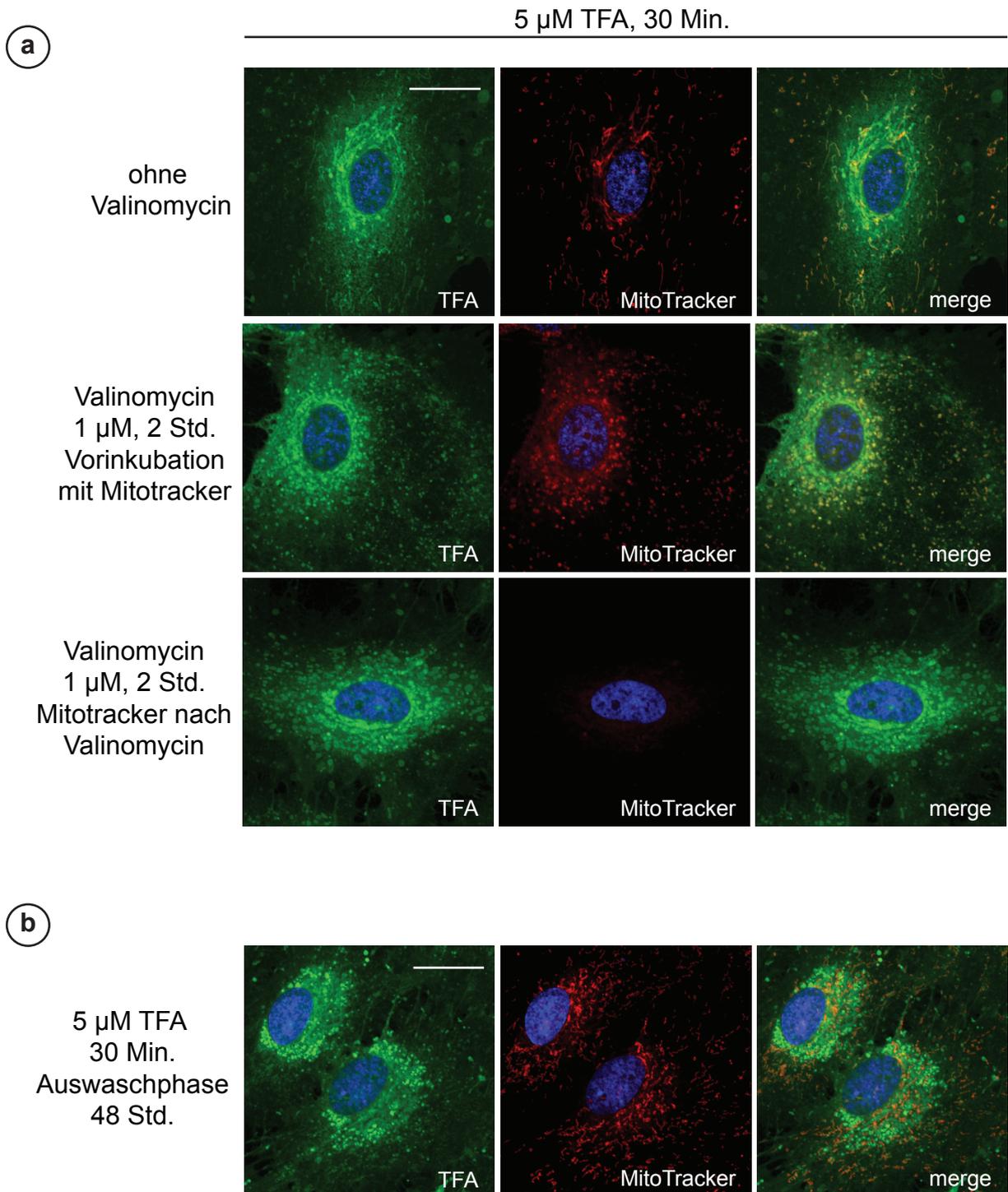


Abb. 20: dauerhafte TFA-Anreicherung in Mitochondrien unabhängig vom Membranpotential

Primäre Astrozyten wurden mit 5 μ M TFA für 30 Min. (a und b) und 1 μ M Valinomycin für 2 Std. (a) inkubiert. In b) wurde anschließend eine Auswaschphase von 48 Std. durchgeführt. Die Mitochondrien wurden mit einem membranpotentialabhängigen MitoTracker gefärbt. TFA wurde durch UV-Licht kovalent gebunden und durch die Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** Mitochondrien; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** 20 μ m

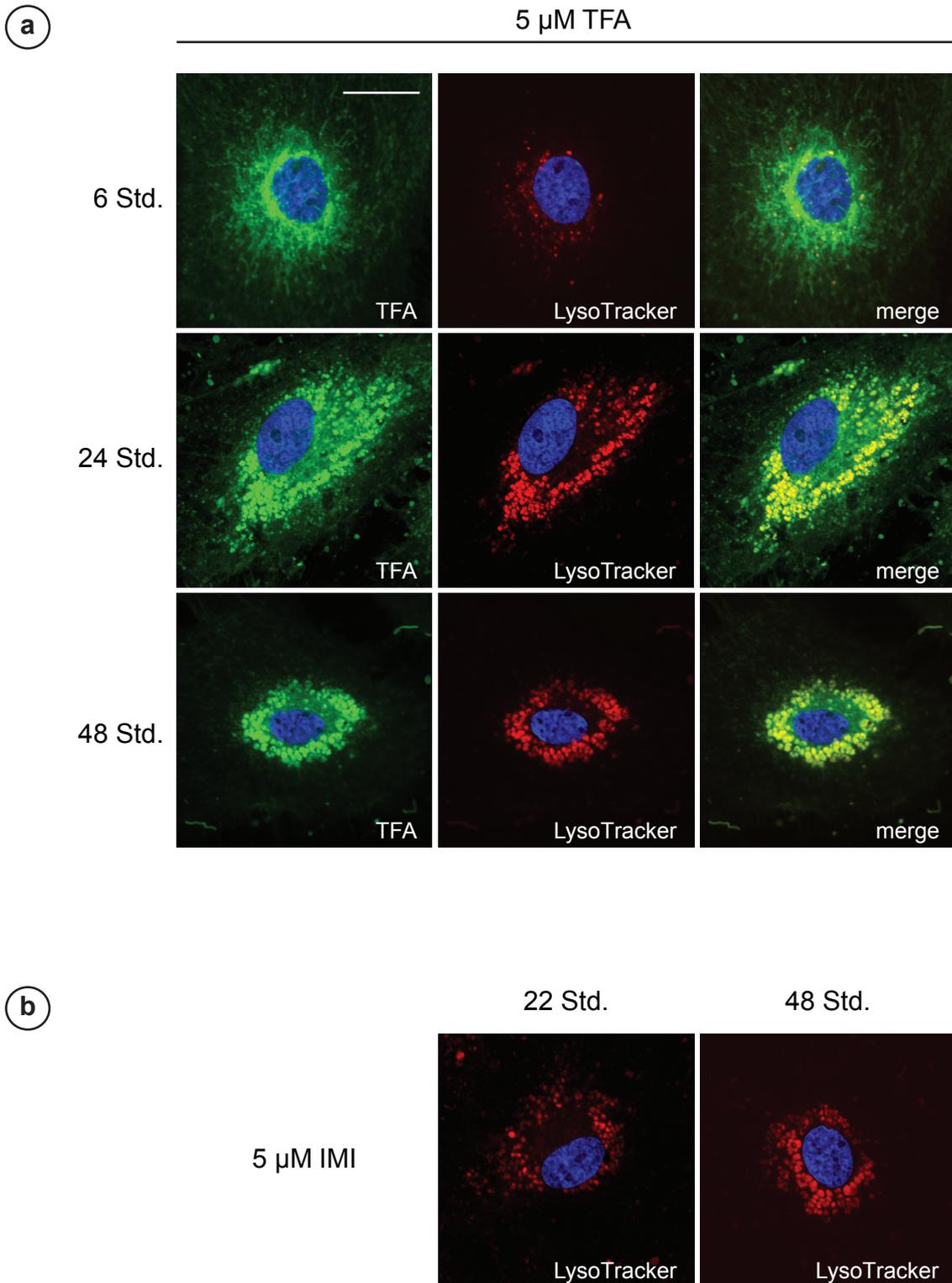


Abb. 21: Kolokalisation des TFA mit Lysosomen

Primäre Astrozyten wurden mit 5 μ M TFA (a) oder IMI (b) 6, 22, 24 oder 48 Std. inkubiert. Durch anschließende UV-Licht-Bestrahlung wurde das TFA kovalent gebunden und die Lokalisation des TFA durch die Click-Reaktion sichtbar gemacht. Die Lysosomen wurden mit einem roten LysoTracker visualisiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** Lysosomen; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** 20 μ m

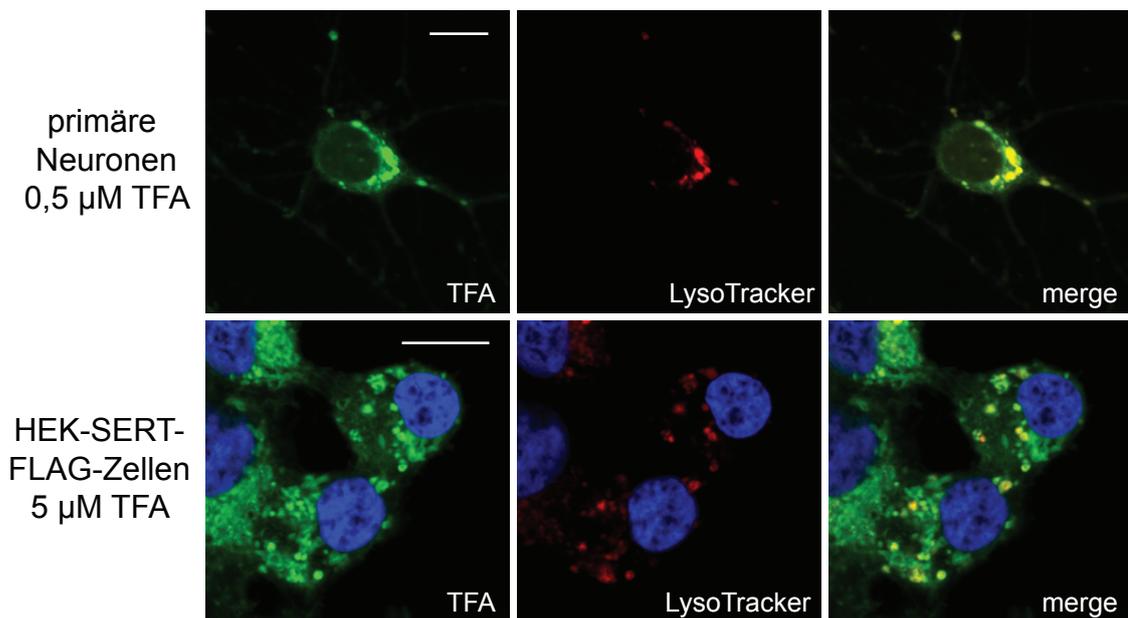


Abb. 22: Kolokalisation des TFA mit Lysosomen in HEK-Zellen und primären Neuronen

Primäre Neuronen bzw. HEK-Zellen wurden mit 0,5 µM bzw. 5 µM TFA für 48 Std. inkubiert und anschließend mit UV-Licht bestrahlt. Die Visualisierung der Lysosomen erfolgte mit einem roten LysoTracker. In der Click-Reaktion wurden die Bindungsstellen des TFA mit einem Fluorophor markiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** Lysosomen; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** 10 µm

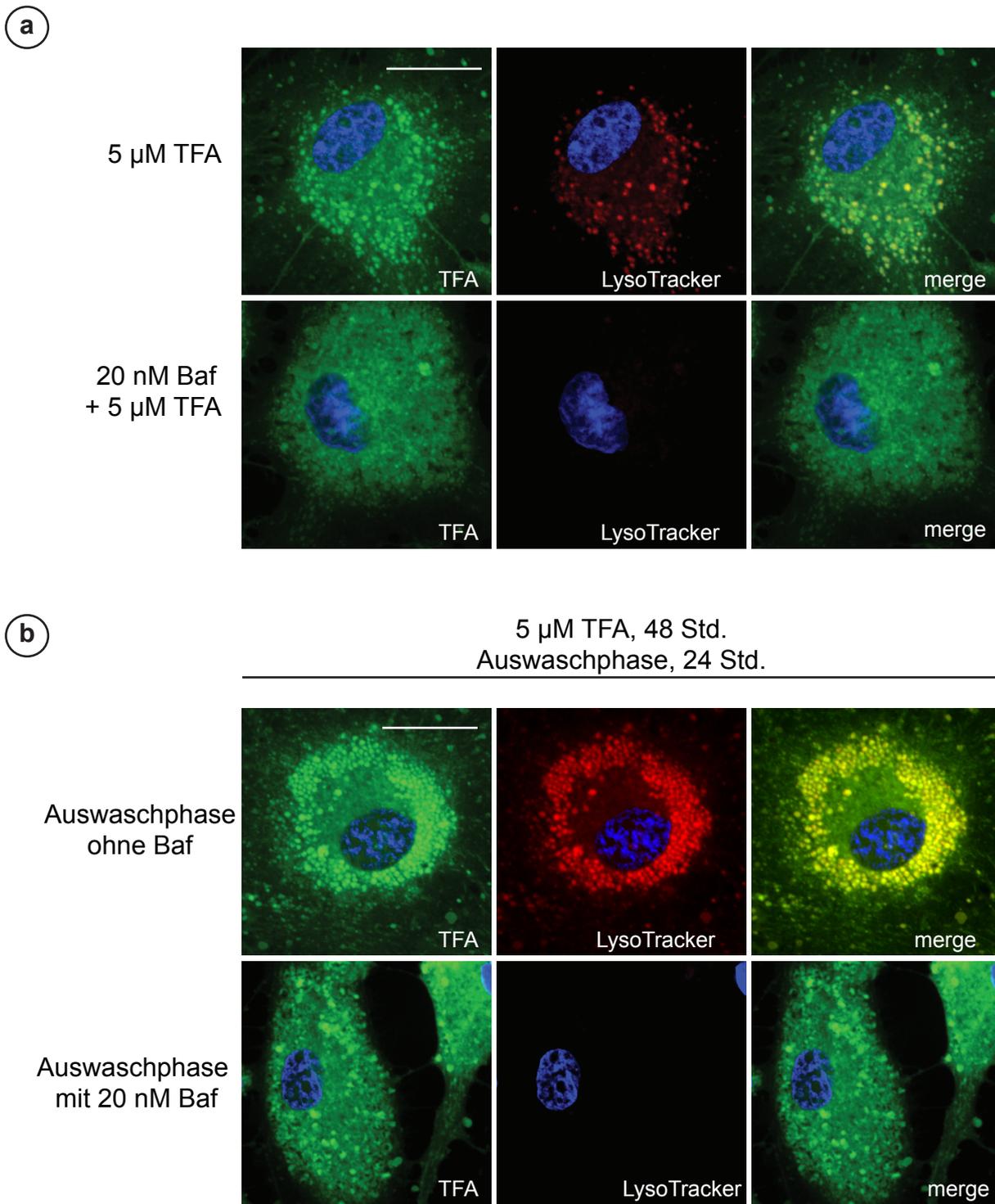


Abb. 23: dauerhafte Anreicherung des TFA in Lysosomen in Abhängigkeit vom lysosomalen pH
Astrozyten wurden teilweise nach Vorbehandlung mit 20 nM Bafilomycin (Baf) für 2 Std., 22 Std. mit 5 μ M TFA behandelt (a) oder wurden nach einer Inkubation von 48 Std. mit 5 μ M TFA für 24 Std. entweder mit Medium oder mit 20 nM Bafilomycin gewaschen (b). Die Lysosomen wurden mit einem pH-abhängigen LysoTracker markiert und die Visualisierung der TFA-Lokalisation erfolgte in der Click-Reaktion mit einem Fluorophor. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **rot:** Lysosomen; **blau:** Kern; **Maßeinheit:** 20 μ m

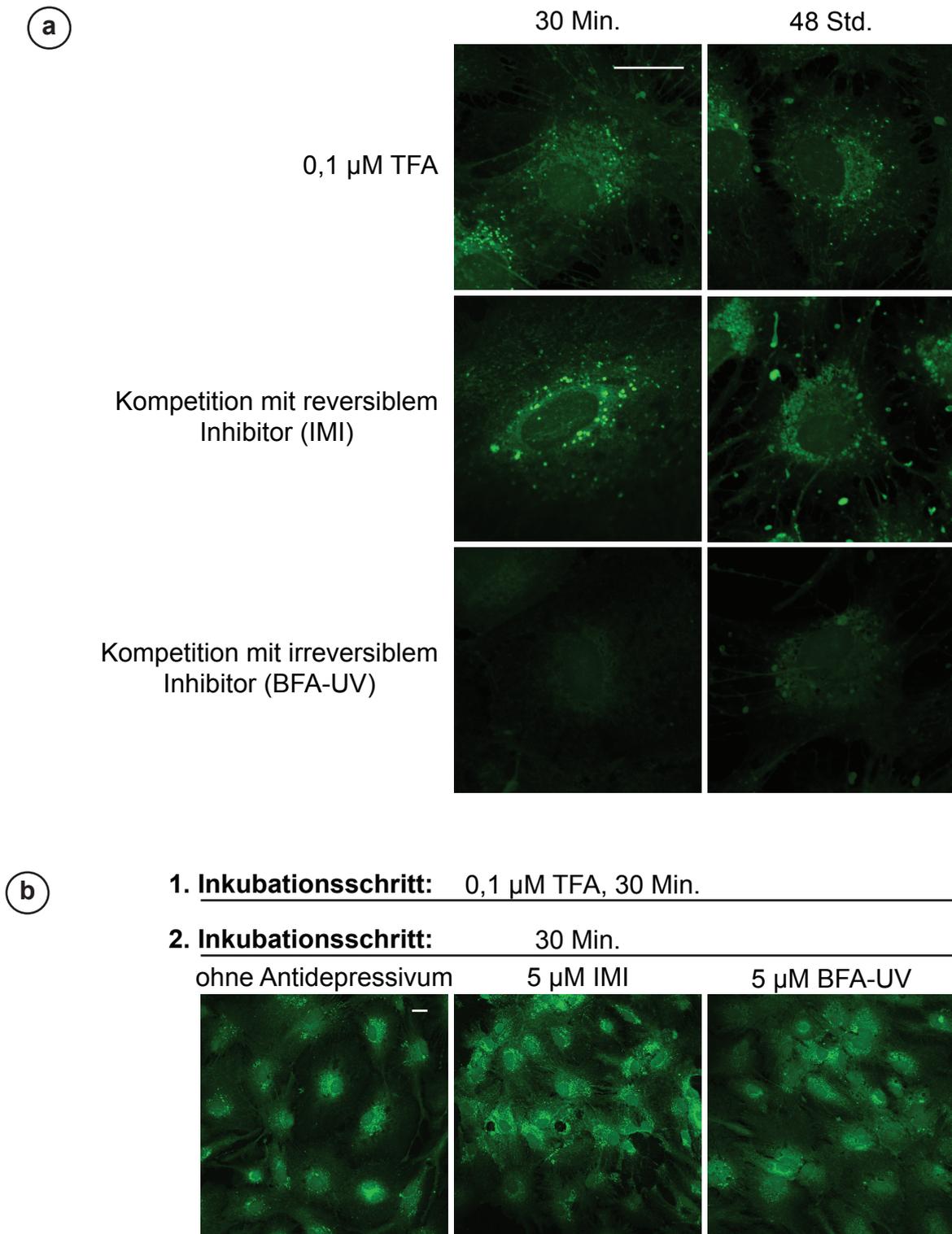


Abb. 24: Wettbewerbsanalyse zwischen TFA und IMI bzw. BFA-UV in primären Astrozyten:

a) Astrozyten wurden mit einem 50-fachen Überschuss an reversiblen (IMI) oder irreversiblen Kompetitor (BFA-UV) und 0,1 μ M TFA für 30 Min. oder 48 Std. inkubiert. Dabei wurden die Astrozyten jeweils 15 Min. mit Kompetitor vorbehandelt. Die Zellen wurden anschließend mit UV-Licht exponiert.

b) Kontrollexperiment: Astrozyten wurden zuerst 30 Min. mit TFA (100 nM) inkubiert, dann mit UV-Licht exponiert und gewaschen. Anschließend wurden die Astrozyten mit 5 μ M IMI, 5 μ M BFA-UV oder ohne Antidepressivum für weitere 30 Min. inkubiert und danach erneut mit UV-Licht bestrahlt. **a, b)** Die freien Alkine des TFA wurden in der Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert. **Aufnahmen:** konfokales Mikroskop; **grün:** Lokalisation des TFA; **Maßeinheit:** 20 μ m

4.4 Analyse proteomischer Bindungspartner

Wie die Zellfärbungen zeigten, wurde das TFA schnell in lebende Zellen aufgenommen, und lag dort vor allem in Mitochondrien und Lysosomen konzentriert vor. Zur Identifizierung der molekularen Interaktionspartner des TFA in Mitochondrien und Lysosomen, ebenso wie in anderen Zellfraktionen (Membran- und Zytosolfraktion), wurde das TFA kovalent durch UV-Licht-Exposition in lebenden Zellen oder Zellfraktionen an diese gebunden. Die markierten Proteine sollten nach Auftrennung und Visualisierung über Gele durch Massenspektroskopie identifiziert werden.

4.4.1 Kovalente Markierung der Bindungspartner – Vergleich zwischen Zellextrakten und lebenden Zellen

Durch die Kompartimentierung in lebenden Zellen sind Konzentrationsunterschiede des TFA innerhalb der Zelle zu erwarten. Dies kann unter anderem für die unterschiedlichen Bindungsprofile in lebenden Zellen im Vergleich zu Zellfraktionen verantwortlich sein. In einer ersten Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob sich das Bindungsprofil des TFA in lebenden Zellen von dem Bindungsprofil in Zellfraktionen unterscheidet. Hierfür wurde zunächst die Bindung in lebenden Zellen sowie in zytosolischen und membranären Präparationen von HEK-SERT-FLAG-Zellen untersucht.

Beiden Bedingungen gemeinsam waren die UV-Licht-Exposition zur kovalenten Bindung des TFA, die Click-Reaktion zur Fluoreszenzmarkierung der TFA-Interaktionspartner und die Auftrennung der Proteine über eine SDS-PAGE. Der entscheidende Unterschied lag aber im Zeitpunkt der kovalenten Bindung des TFA an seine Interaktionspartner. Zur Bestimmung des Bindungsprofils des TFA in lebenden Zellen wurden HEK-SERT-FLAG-Zellen in Kultur über einen gewissen Zeitraum mit TFA behandelt und kurz vor der Materialgewinnung erfolgte an noch lebenden Zellen die UV-Licht-Exposition. Diese Herangehensweise ermöglichte es, die Bindungsexperimente unter Erhaltung eines zellspezifischen Mikromilieus durchzuführen. Hier spielen vor allem Verteilung der Substanz in lebenden Zellen und die damit verbundenen Konzentrationsunterschiede innerhalb der Zelle eine wichtige Rolle. Bei Verwendung von isolierten Zellfraktionen spielt dies jedoch keine Rolle. Für diese Versuche wurden die Zellfraktionen zuerst isoliert und anschließend mit TFA inkubiert.

Wie in **Abb. 25** zu sehen ist, hat das TFA durch UV-Licht-Exposition in Zellfraktionen sowie in lebenden Zellen kovalent an mehrere Interaktionspartner gebunden. Die Fluoreszenzintensität dieser Proteine war jedoch sehr unterschiedlich. Wurde die Zytosol- bzw. Membranfraktion direkt mit TFA inkubiert, war, im Vergleich zur Inkubation und UV-Exposition von lebenden Zellen mit der gleichen TFA-Konzentration, eine deutlich stärkere Fluoreszenzintensität der durch TFA markierten Interaktionspartner zu erkennen. Zusätzlich wurden unterschiedliche Bindungsprofile durch diese beiden Methoden beobachtet, was sich

vor allem durch Verwendung von 2D-Gelelen herausarbeiten ließ (siehe 4.4.2 und 4.4.3.; **Abb. 27 und Abb. 30**). Hierbei stellte für die Zytosolfraktion ein IEF-Gel, und für die Membranpräparation ein 16-BAC-Gel die erste Dimension dar. Die Auftrennung beider Fraktionen in der zweiten Dimension erfolgte über eine SDS-PAGE. In der IEF wurden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt und im 16-BAC-Gel und durch eine SDS-PAGE nach Größe aufgetrennt. Die Notwendigkeit der Verwendung unterschiedlicher Gele in der ersten Dimension lag an der schlechten Kompatibilität von Membranproteinen mit der IEF. Das zentrale Problem stellte dabei der große Verlust an Membranproteinen dar.

Ebenso wie in den Zellfärbungen wurde die Spezifität des UV-Linkers und der Click-Einheit überprüft. Wie **Abb. 26** zeigt, war die Kombination aus UV-Linker (TFA) und UV-Licht-Exposition notwendig, um Interaktionspartner in Membranpräparationen kovalent zu markieren. Dabei wurde der UV-Linker spezifisch durch UV-Licht aktiviert und es war weniger Hintergrundfluoreszenz erkennbar. Die Funktionalität der Click-Reaktion wurde ebenso an Membranpräparationen untersucht. Wie in **Abb. 26** ersichtlich ist, handelte es sich bei der Click-Reaktion um eine sehr spezifische Reaktion, in der ausschließlich Proteine mit kovalent gebundenem TFA mit einem Fluorophor markiert wurden.

4.4.2 Kovalente Markierung der Bindungspartner in Zellfraktionen

Die Verwendung von Zellfraktionen zur Visualisierung und Identifizierung von Interaktionspartnern des TFA birgt Potential auch wenn man weiter von Versuchen *in vivo* entfernt ist, als bei Verwendung lebender Zellen (siehe 4.4.3). Einerseits ist die Bindung an Interaktionspartner in Zellfraktionen unabhängig von der Aufnahme und Verteilung in Zellen. Zusätzlich können diese Zellfraktionen mit höheren Antidepressiva-Konzentrationen inkubiert werden, was aufgrund der toxischen Wirkung dieser Substanzen in hohen Konzentrationen in lebenden Zellen nur bedingt möglich ist. Dies spielt vor allem bei Konkurrenzexperimenten eine wichtige Rolle, in denen das TFA durch einen bis zu 1 000 fachen Überschuss von IMI von den Bindungsstellen verdrängt werden soll.

Die Zytosol- bzw. Membranfraktion wurden mit 10 μ M TFA inkubiert und das TFA durch UV-Licht-Bestrahlung kovalent an Interaktionspartner gebunden. Die Detektion der mit einem Fluorophor markierten Interaktionspartner fand nach der 2D-Elektrophorese statt. Wie in **Abb. 27** zu sehen ist, konnten in beiden Fraktionen unterschiedliche Interaktionspartner beobachtet werden, wobei die Anzahl der Interaktionspartner der Membranfraktion die der Zytosolfraktion übertraf. Hintergrundfluoreszenz war in beiden Gelsystemen nicht zu beobachten. Des Weiteren wurde durch den Vergleich des Fluoreszenzmusters mit der Colloidal-Coomassie-Färbung deutlich, dass die Markierung der Interaktionspartner unabhängig von deren Abundanz war.

Für Konkurrenzversuche wurde die Membranpräparation mit 1 μ M TFA und einem 1 000-fachen Überschuss von IMI inkubiert. Die Abnahme der Fluoreszenzintensitäten durch die Konkurrenz wurde nach Auftrennung über 2D-Gele (16-BAC) visualisiert. In **Abb. 28** ist

eine Wettbewerbsprobe im Vergleich zu einer nicht-kompetierten TFA-Probeprobe gezeigt. Es wird deutlich, dass das TFA von einigen Interaktionspartnern durch einen Überschuss IMI verdrängt werden konnte. Diese sind durch Pfeile in der Abbildung markiert. Bei Wiederholungen dieses Experiments musste allerdings festgestellt werden, dass das Fluoreszenzsignal sehr variabel ist und nicht bei jedem Wettbewerbsexperiment die gleichen Kandidaten identifiziert werden konnten (Daten nicht gezeigt). Ergänzende, weniger variable Möglichkeiten der Wettbewerbsprobe werden in 5.1.2 diskutiert.

4.4.3 Kovalente Markierung der Bindungspartner in lebenden Zellen

Für die kovalente Markierung der TFA-Bindungspartner in lebenden Zellen wurden diese zunächst mit TFA bzw. IMI (Negativkontrolle) inkubiert und die unterschiedlichen Zellfraktionen nach UV-Licht-Exposition gewonnen. Die Interaktionspartner des TFA wurden im Anschluss mit einem Fluorophor markiert. Neben Membran und Zytosol wurden auch Mitochondrien und Lysosomen isoliert. **Abb. 29-a** zeigt die unterschiedlichen Zellfraktionen nach einer 1D-SDS-PAGE. Es wird deutlich, dass vor allem in der Mitochondrienfraktion Interaktionspartner des TFA sichtbar gemacht werden konnten. Dagegen gelang es nicht, in der Lysosomenfraktion Interaktionspartner zu detektieren (Daten nicht gezeigt). Jedoch stellte sich in Kontrollexperimenten heraus, dass die Click-Reaktion im Extraktionspuffer, welcher für die Lysosomenisolation verwendet wurde, nicht funktionierte (siehe 4.4.4). Weitere Experimente zur Visualisierung der Interaktionspartner der Lysosomenfraktion stehen noch aus. Wie man anhand der Negativkontrolle (10 μM IMI) erkennen kann, ist die Hintergrundfluoreszenz sehr gering.

Die Auftrennung der Zytosol-, Membran- und Mitochondrienfraktion erfolgte zur besseren Auflösung der Proteingrößen mittels 2D-Gelen. Für die Zytosolfraktion wurde ein IEF-Gel, für die Membran- und Mitochondrienfraktion, aufgrund der Inkompatibilität membranärer Proteine mit IEF-Gelen, ein 16-BAC-Gel verwendet. **Abb. 30-a** zeigt, dass einige mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierten Interaktionspartner des TFA in der Zytosolfraktion zu erkennen waren. Diese Proteine wurden jedoch mit der Colloidal-Coomassie-Färbung nicht visualisiert, da es sich wahrscheinlich um schwach exprimierte Proteine handelte. In der Membranfraktion (siehe **Abb. 30-b**) waren viele Interaktionspartner sichtbar. In den folgenden Experimenten wurden unterschiedliche TFA-Konzentrationen (10 μM , 1 μM , 0,1 μM) getestet. Das Fluoreszenzsignal in der isolierten Membranpräparation nahm zwischen 1 μM und 0,1 μM TFA stark ab. Auf Wettbewerbsexperimente wurde verzichtet, da für eine TFA-Konzentration von 1 μM , bei welcher Interaktionspartner noch visualisiert werden konnten, eine Wettbewerber-Konzentration von 100 μM notwendig wäre. Diese Konzentration liegt jedoch bereits im toxischen Bereich für die in diesen Versuchen verwendeten primären Astrozyten. Allerdings wurde die Wettbewerbsprobe membranärer Interaktionspartner, wie unter 4.4.2 beschrieben, direkt in Membranpräparationen von HEK-Zellen überprüft.

Abb. 31 zeigt die Auftrennung und Visualisierung der Interaktionspartner des TFA in Mitochondrien. Einige dieser Interaktionspartner sind selbst bei geringen Konzentrationen des TFA (0,1 μM) noch sichtbar (mit Pfeilen markiert: Interaktionspartner a und b). Zusätzlich wurden Konkurrenzexperimente mit 0,1 μM TFA und 10 μM IMI durchgeführt und die Mitochondrienfraktion über ein 2D-Gel (16-BAC) aufgetrennt. Die Ergebnisse sind in **Abb. 32** dargestellt. Der Interaktionspartner a), welcher bei einer TFA-Konzentration von 0,1 μM visualisiert wurde (vergleiche **Abb. 31**), konnte durch einen 100-fachen Überschuss von IMI kompetiert werden. Dass das Verschwinden des entsprechenden Proteinspots in der Fluoreszenzmarkierung nicht durch einen zufälligen Verlust dieses Proteins verursacht wurde, lässt sich durch einen deutlichen Spot an der betreffenden Stelle im mit Coomassie gefärbten Gel erkennen (**Abb. 32**, jeweils die Gele auf der rechten Seite). Für Interaktionspartner b) steht die Bestätigung durch Konkurrenzexperimente noch aus.

4.4.4 Kompatibilität der Click-Reaktion mit unterschiedlichen Puffersystemen

Es wurde bereits gezeigt, dass es sich bei der Click-Reaktion um eine sehr spezifische Reaktion handelt, bei der wenig Hintergrundfluoreszenz auftritt. Ein Problem weist jedoch die Kompatibilität dieser Reaktion mit unterschiedlichen Puffern und Substanzen auf. Wie **Abb. 33** zeigt, war die Click-Reaktion in HEPES-Puffer effektiver als in Tris-Puffer, wobei Sucrose und Extraktionspuffer, welcher für die Lysosomenisolation verwendet wurde, zu einer vollständigen Inhibition der Click-Reaktion führten.

4.4.5 Test zur Spezifität der mit TFA markierten Proteine

Wie nach Auftrennung der TFA-Interaktionspartner über eine SDS-PAGE deutlich wurde, erfolgte die TFA-Immobilisierung an viele unterschiedliche Proteine. Es musste daher überprüft werden, ob es sich bei diesen Interaktionspartnern um unspezifische Bindungen handelte. Diese wurden in der Literatur für den verwendeten UV-Linker, aufgrund der langen Halbwertszeit dieses Linkers nach Aktivierung, beschrieben. Es ist bekannt, dass UV-Linker, wie das verwendete Arylazid, nach UV-Licht-Aktivierung in langlebige Ketenimine umgelagert werden können. Diese führen zu vermehrt unspezifischen Bindungen, die vor allem auf die kovalente Bindung mit Lysinresten von Proteinen zurückzuführen sind. Ein Überschuss an Lysin sollte daher zu einer Verminderung der unspezifischen Bindungen führen. Daher wurden Membranpräparationen nach Inkubation mit TFA und vor UV-Licht-Exposition mit einem Überschuss an Lysin versetzt. **Abb. 34** zeigt aber, dass Lysin weder zu einer allgemeinen Fluoreszenzabnahme noch zu dem Verschwinden der Fluoreszenz einzelner Proteine führte.

4.4.6 Massenspektroskopie - Identifizierung von Interaktionspartnern

Im Rahmen dieser Arbeit wurden bereits Proteinproben für massenspektroskopische Methoden aus 2D-Gelen gewonnen. Die Massenspektroskopie wurde im Rahmen einer hausinternen Kooperation von Frau Dr. Maccarrone (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, AG Turck) durchgeführt. Probleme bei der Massenspektroskopie waren einerseits die Menge an Protein, die in einigen Fällen zu gering war, um über Massenspektroskopie analysiert zu werden und andererseits die Identifizierung mehrerer möglicher Proteinkandidaten (>20) unter jedem Proteinpunkt. Da in diesen Versuchen keine Anreicherung der Interaktionspartner stattgefunden hat, konnte nicht davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Interaktionspartnern um hoch abundante Proteine handelt. Die Identität der Interaktionspartner konnte daher noch nicht mit Sicherheit bestimmt werden.

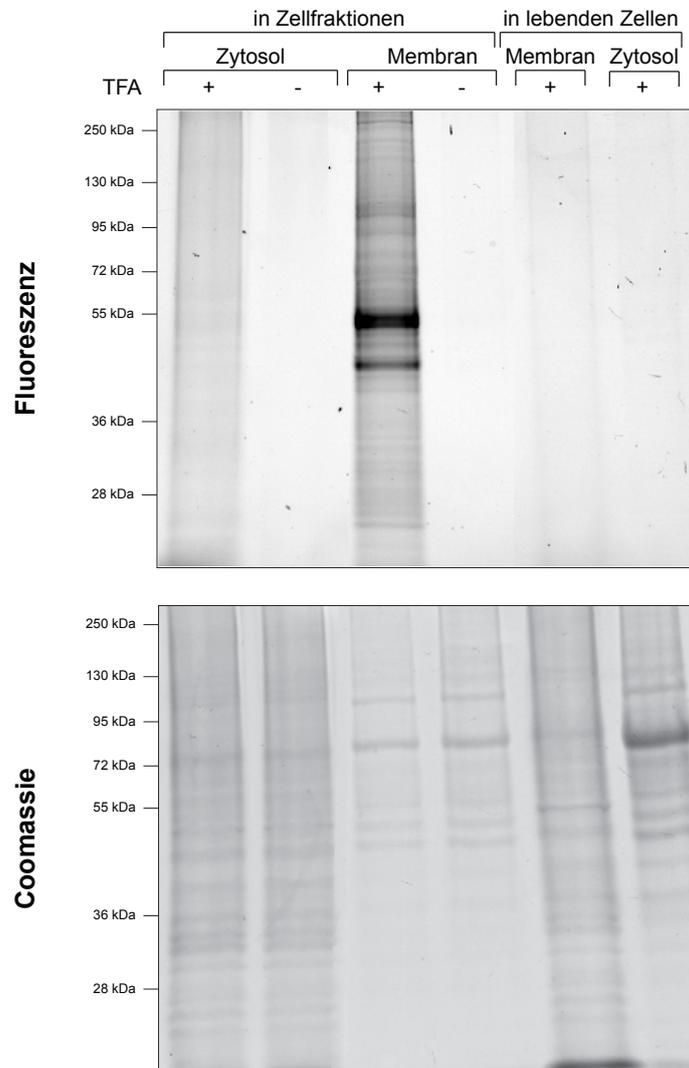


Abb. 25: Vergleich der TFA-Bindung in lebenden Zellen und in Zellfraktionen

HEK-SERT-FLAG-Zellen oder Zytosol- bzw. Membranpräparationen dieser Zellen wurden mit 10 μ M TFA 30 Min. behandelt. Nach anschließender Exposition mit UV-Licht wurden von den lebenden Zellen ebenfalls die Zytosol- und Membranfraktion gewonnen. Nach der Click-Reaktion mit Tamra-Azid wurden jeweils 50 μ g Protein über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und durch einen Fluoreszenzscan und eine Coomassie-Färbung visualisiert.

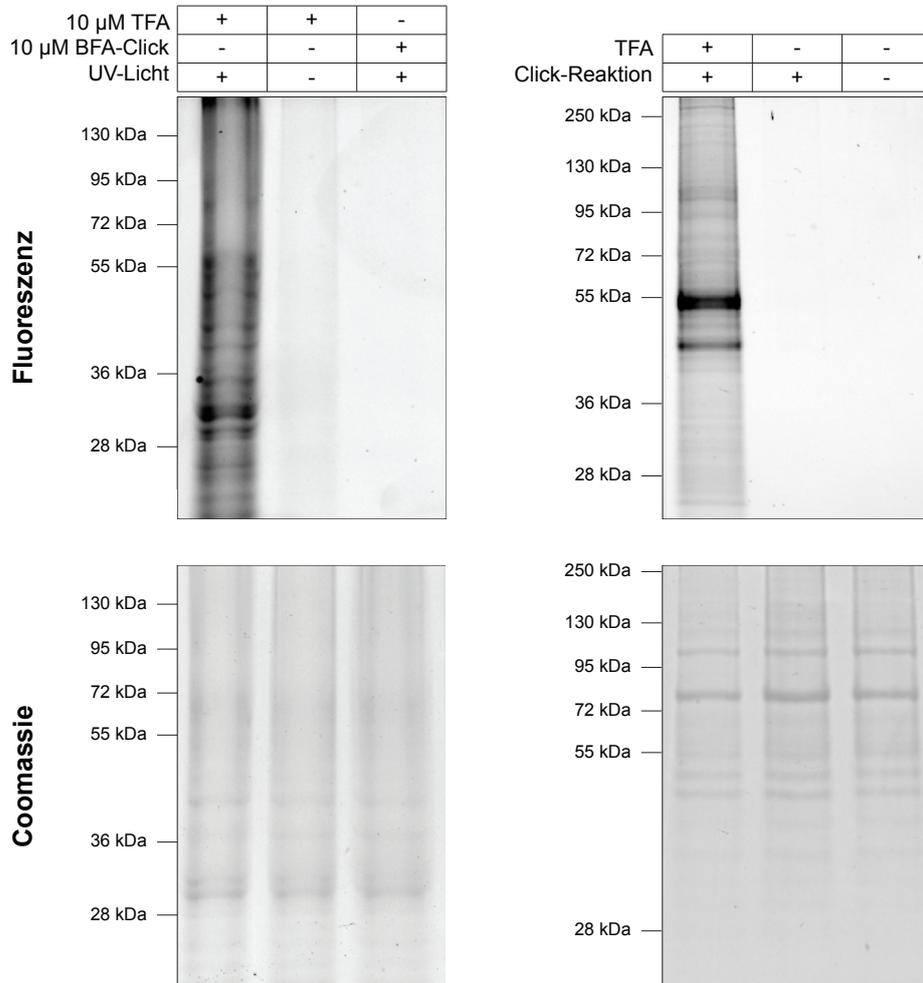


Abb. 26: Bestätigung der Spezifität des UV-Linkers und der Click-Einheit mit Hilfe von Membranpräparationen von HEK-SERT-FLAG-Zellen:

Membranpräparationen von HEK-SERT-FLAG-Zellen wurden entweder mit 10 μ M TFA, IMI oder BFA-Click für 30 Min. inkubiert. Anschließend wurde die Membranpräparation mit UV-Licht für 1 Min. exponiert und durch die Click-Reaktion wurden die Bindungspartner des TFA (bzw. BFA-Click) mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Jeweils 50 μ g Protein wurden über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt und durch einen Fluoreszenzscan oder Coomassie-Färbung detektiert.

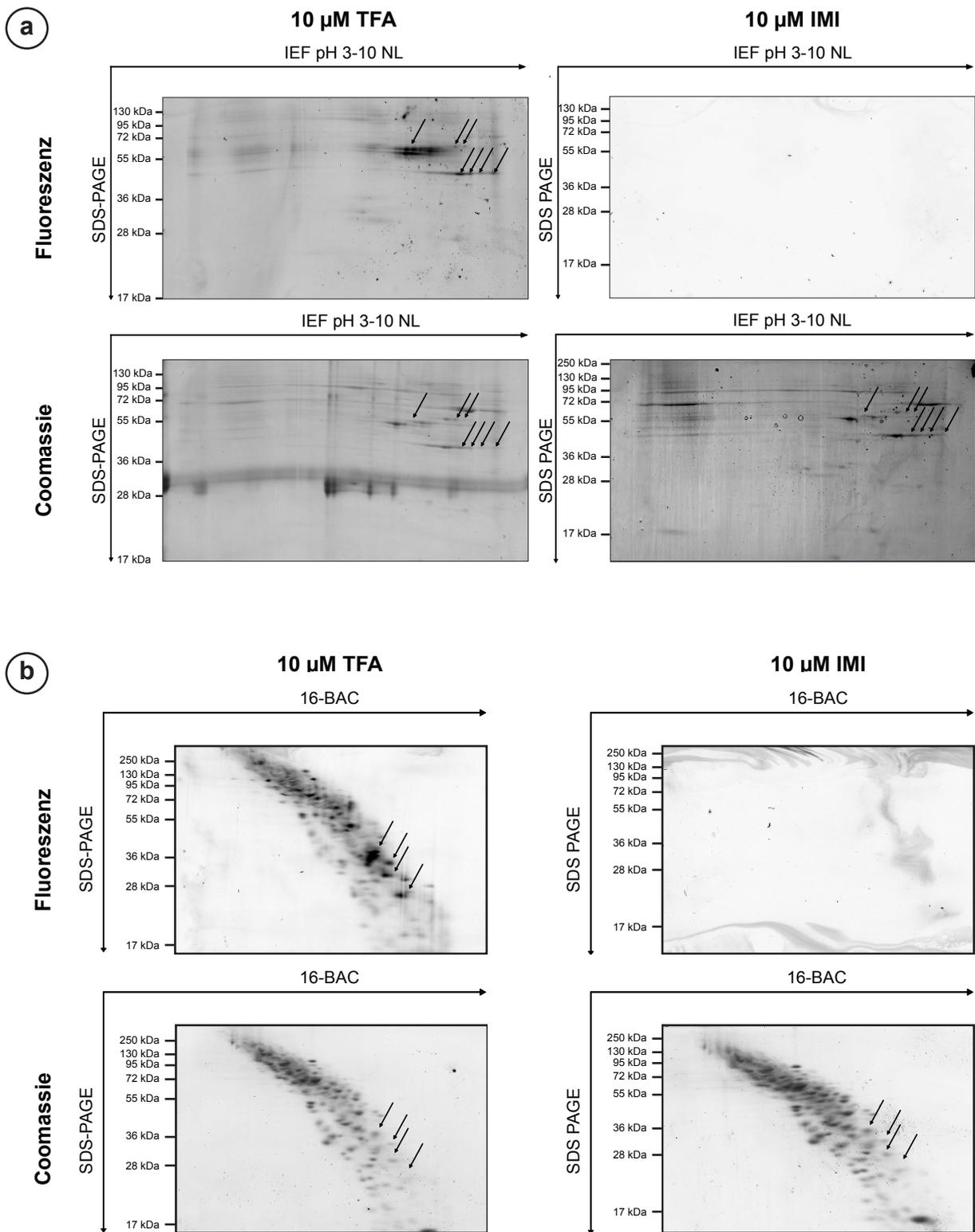


Abb. 27: Detektion fluoreszenzmarkierter Interaktionspartner des TFA aus Zytosol- bzw. Membranfraktionen von HEK-Zellen

Die Zytosol- (a) bzw. Membranfraktion (b) von HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG) wurde 30 Min. mit 10 μ M TFA oder 10 μ M IMI inkubiert. Durch UV-Licht-Exposition wurde das TFA kovalent an Interaktionspartner gebunden und diese in der Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert. Die Auftrennung der Proteine (200 μ g) erfolgte in der ersten Dimension entweder durch eine isoelektrische Fokussierung (Zytosolfraktion) oder durch ein 16-BAC-Gel (Membranfraktion) und in der zweiten Dimension jeweils über eine 12%ige SDS-PAGE. Die fluoreszierenden Proteine wurden durch einen Fluoreszenzscan und das Gesamtprotein durch eine Colloidale-Coomassie-Färbung detektiert. Die Pfeile markieren beispielhaft fluoreszierende Proteinspots sowie deren entsprechenden Spots in der Colloidale-Coomassie-Färbung.

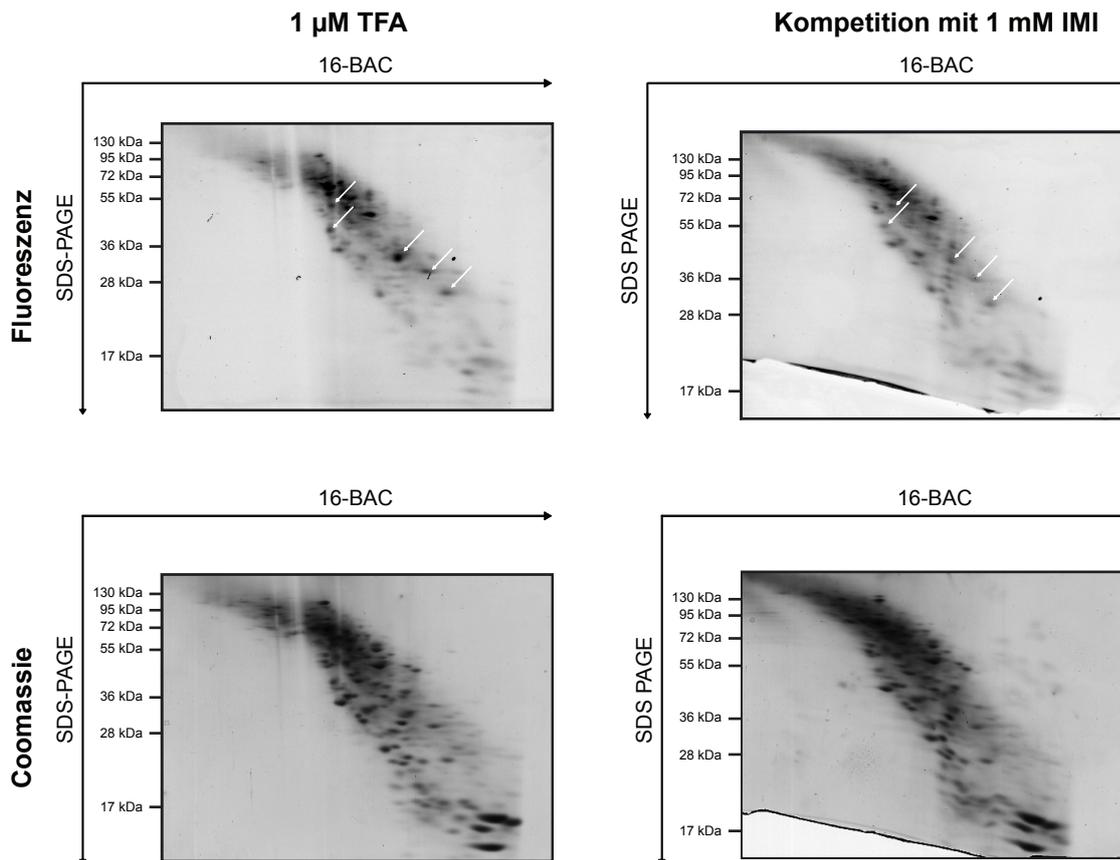


Abb. 28: Analyse der Konkurrenz der TFA-Bindung mit IMI

Membranfraktionen von HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) wurden 30 Min. mit 1 μM TFA und für die Konkurrenz zusätzlich 1 Std. mit 1 mM IMI inkubiert. Nach UV-Licht-Exposition wurden TFA bindende Proteine durch die Click-Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Tamra-Azid) markiert. Mittels Fluoreszenzscan wurden die mit TFA markierten Proteine nach Auftrennung durch ein 2D-Gel (16-BAC-Gel, 12%ige SDS-PAGE) sichtbar gemacht (200 μg Gesamtprotein). Durch eine Colloidale-Coomassie-Färbung wurden die Proteine zusätzlich visualisiert. Die Pfeile markieren Proteinspots bei denen die Konkurrenz mit IMI zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals führte.

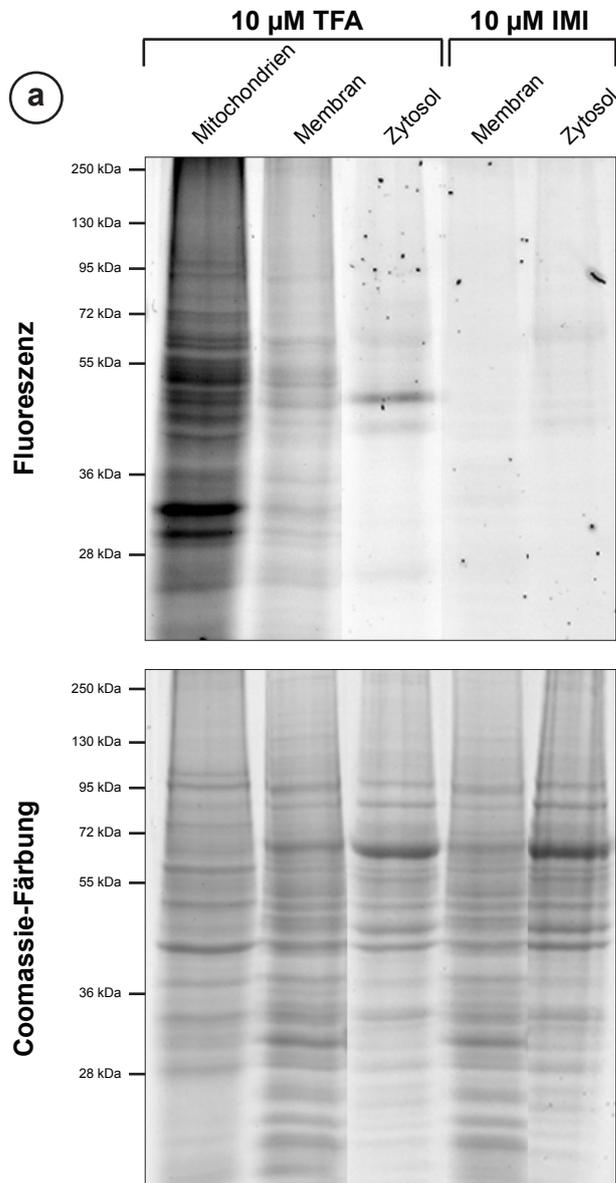


Abb. 29: Vergleich der TFA-Bindung in unterschiedlichen Zellfraktionen nach Behandlung von HEK-Zellen

a) HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) wurden mit 10 μM TFA oder 10 μM IMI inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit UV-Licht exponiert und die unterschiedlichen Zellfraktionen gewonnen. Die Bindungspartner des TFA wurden in der Click-Reaktion mit einem Fluorophor markiert, über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (50 μg Gesamtprotein) und durch einen Fluoreszenzscan und eine Coomassie-Färbung visualisiert.

b) Die Anreicherung eines mitochondrialen Proteins (ATP-Synthase Komplex V) in der Mitochondrienfraktion wurde durch Nassblotanalyse überprüft. Dazu wurden jeweils 10 μg Protein von unterschiedlichen Zellfraktionen (Mitochondrien, Zytosol, Membran) über eine 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt (10 μg Gesamtprotein) und nach Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit Anti-ATP-Synthase Komplex V-Antikörper visualisiert.

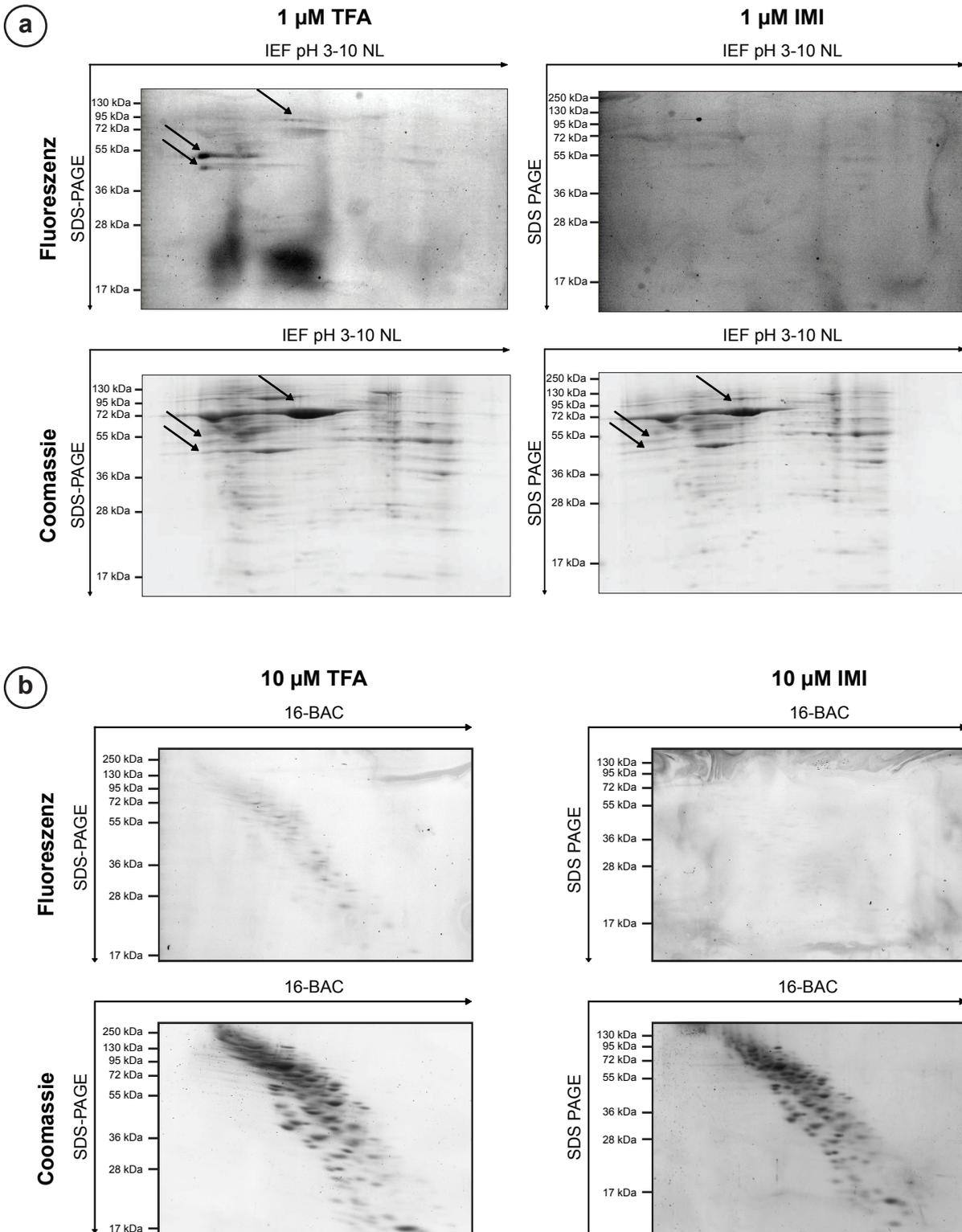


Abb. 30: Visualisierung der TFA-Bindungspartner in unterschiedlichen Zellfraktionen in HEK-Zellen
 HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG) wurden mit TFA oder IMI (1 μM (a) oder 10 μM (b)) für 30 Min. behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit UV-Licht bestrahlt und die Zytosol- bzw. Membranfraktion gewonnen. Die Fluoreszenzmarkierung (Tamra-Azid) der TFA-Bindungspartner erfolgte durch die Click-Reaktion. Jeweils 200 μg Protein wurden über 2D-Gele aufgetrennt. Als erste Dimension wurde für die Zytosolfraktion eine isoelektrische Fokussierung (IEF) und für die Membranfraktion ein 16-BAC-Gel verwendet. Die zweite Dimension wurde schließlich mit einer SDS-PAGE (12%) durchgeführt. Mit Hilfe eines Fluoreszenzscan bzw. eine Colloidal-Coomassie-Färbung wurden die Proteine detektiert. Pfeile markieren beispielhaft fluoreszierende Proteinspots und deren entsprechenden Spots in der Colloidal-Coomassie-Färbung

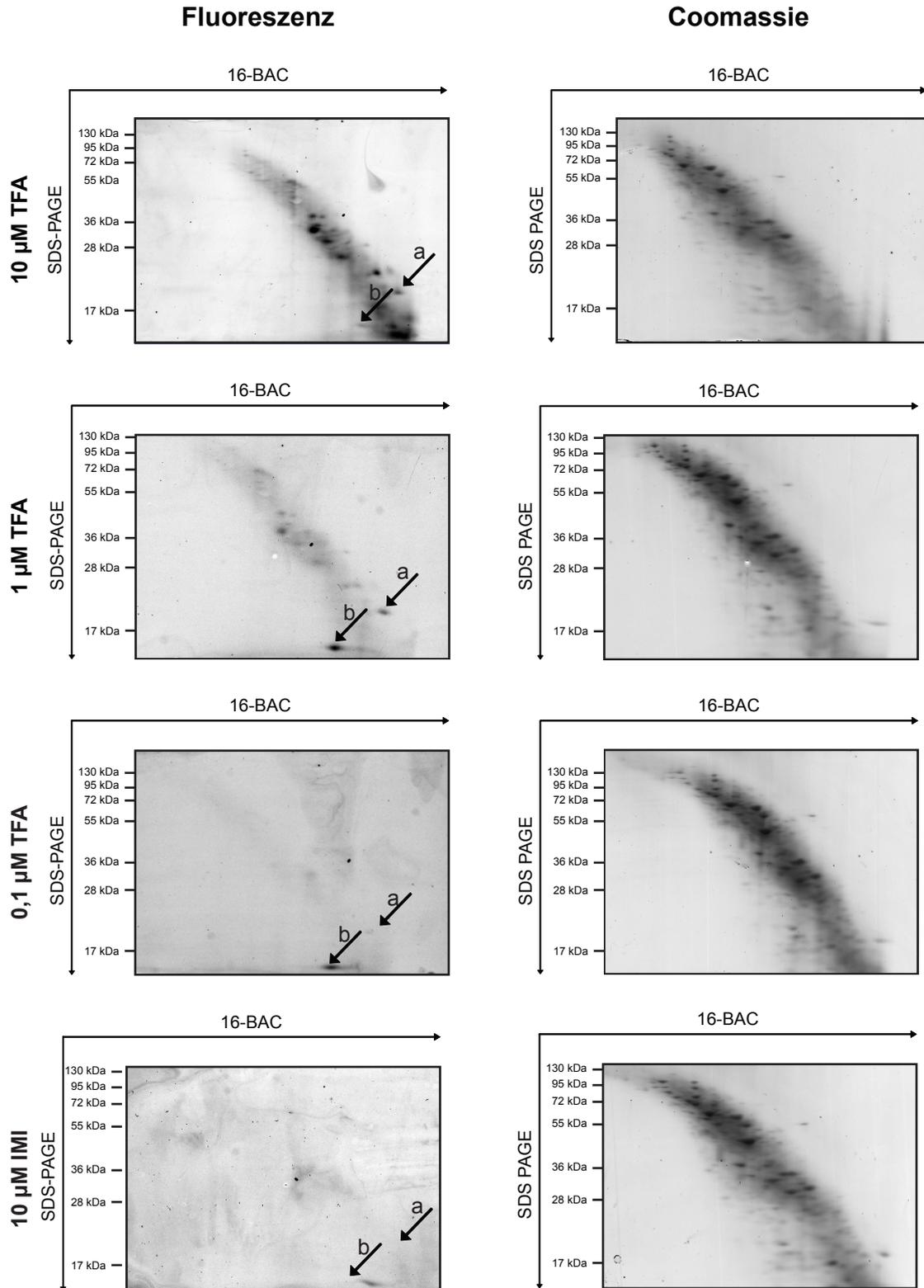


Abb. 32: Visualisierung der TFA-Bindungspartner in Mitochondrien in HEK-Zellen

HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) in Kultur wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen TFA (10 μ M, 1 μ M bzw. 0,1 μ M) oder IMI (10 μ M) für 30 Min. inkubiert. Nach UV-Licht-Exposition wurde die Mitochondrienfraktion isoliert. Die Bindungspartner des TFA wurden in der Click-Reaktion mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Tamra-Azid) markiert und jeweils 200 μ g Protein wurden über ein 2D-Gel (1. Dimension: 16-BAC; 2. Dimension: 12%ige SDS-PAGE) aufgetrennt. Die Detektion erfolgte über einen Fluoreszenzscan und im Anschluss durch eine Colloidal-Coomassie-Färbung. Pfeile markieren 2 fluoreszierende Proteinspots, die in allen verwendeten TFA-Konzentrationen, jedoch nicht durch Behandlung mit IMI visualisiert wurden.

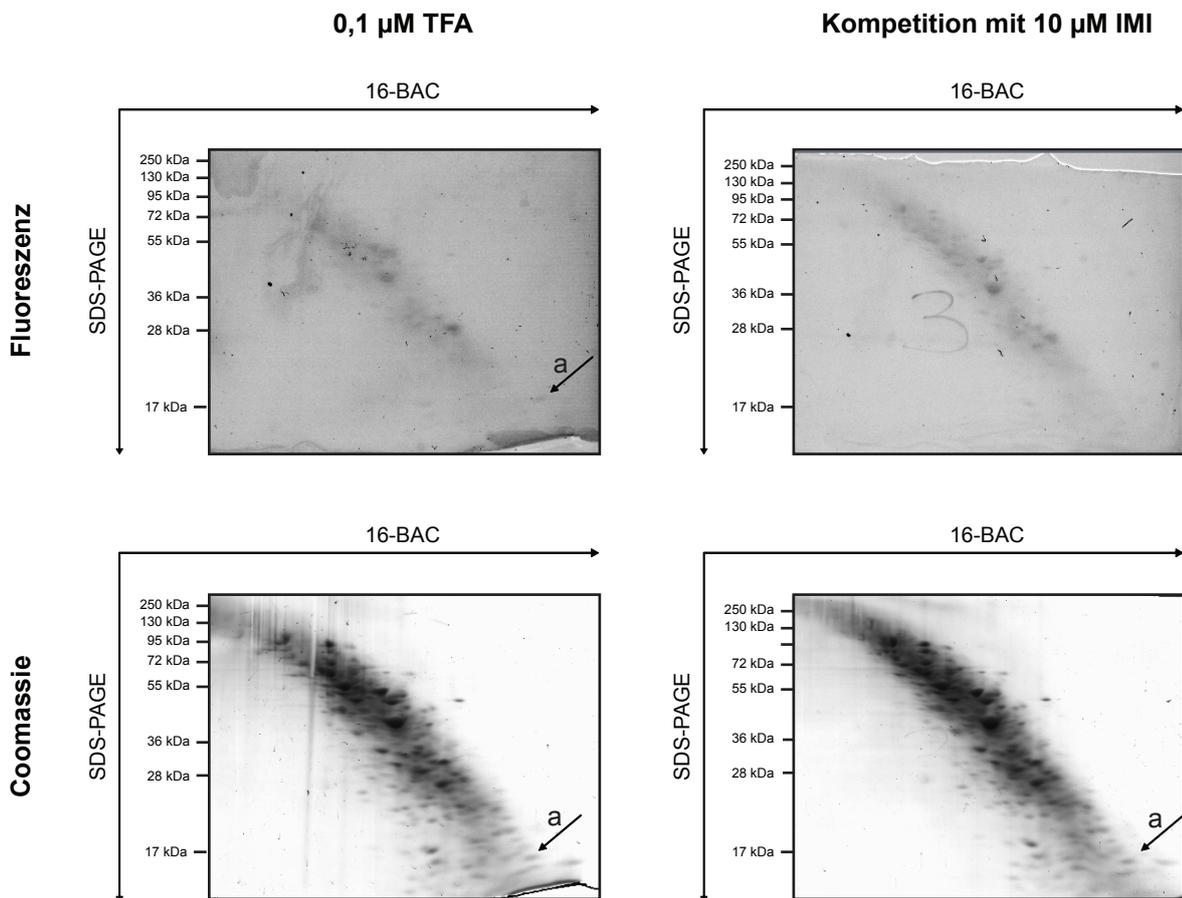


Abb. 32: Wettbewerbsanalyse in Mitochondrienfraktionen nach Inkubation von HEK-SERT-FLAG-Zellen mit TFA und IMI

HEK-Zellen (HEK-SERT-FLAG-Zellen) in Kultur wurden für 40 Min. mit 10 μM IMI und für 30 Min. mit 0,1 μM TFA behandelt. Durch UV-Licht wurde das TFA kovalent an Interaktionspartner gebunden, und nach Isolation der Mitochondrien wurden die mitochondrialen Bindungspartner durch die Click-Reaktion mit einem Fluorophor (Tamra-Azid) markiert. 200 μg Protein wurden über ein 2D-Gel aufgetrennt (16-BAC, SDS-PAGE (12%)) und die fluoreszierenden Proteine durch einen Fluoreszenzscan detektiert. Im Anschluss wurde das Gel mit Colloidal-Coomassie gefärbt. Der Pfeil markiert einen fluoreszierenden Proteinspot, dessen Fluoreszenzintensität durch Konkurrenz mit IMI deutlich vermindert wurde.

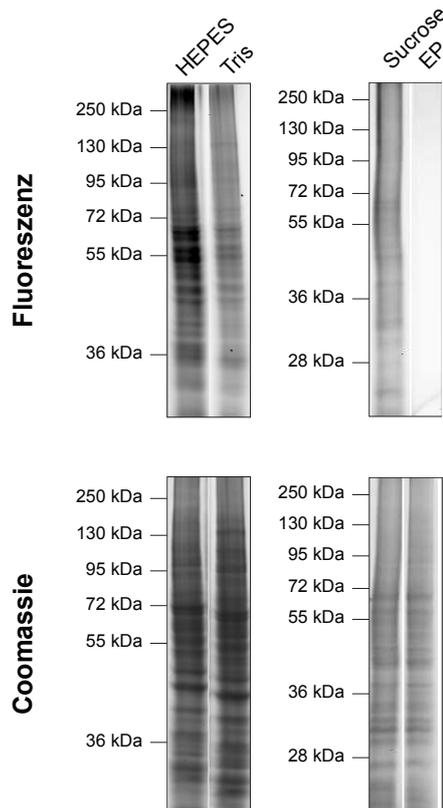


Abb. 33 Überprüfung der Kompatibilität der Click-Reaktion mit unterschiedlichen Puffersystemen

Membranpräparationen von HEK-SERT-FLAG-Zellen wurden mit 10 μ M TFA für 30 Min. inkubiert und anschließend 1 Min. mit UV-Licht bestrahlt. Die Click-Reaktion wurde im Anschluss mit einem Tamra-Azid in unterschiedlichen Puffern (HEPES-, Tris- oder Extraktionspuffer (EP)) und zusätzlich in 320 mM Sucrose in HEPES-Puffer durchgeführt. Die Proteine wurden über eine SDS-PAGE (10%) aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenz-markierten Proteine erfolgte mit einem Fluoreszenzscan. Zusätzlich wurden alle Proteine mit Coomassie gefärbt.

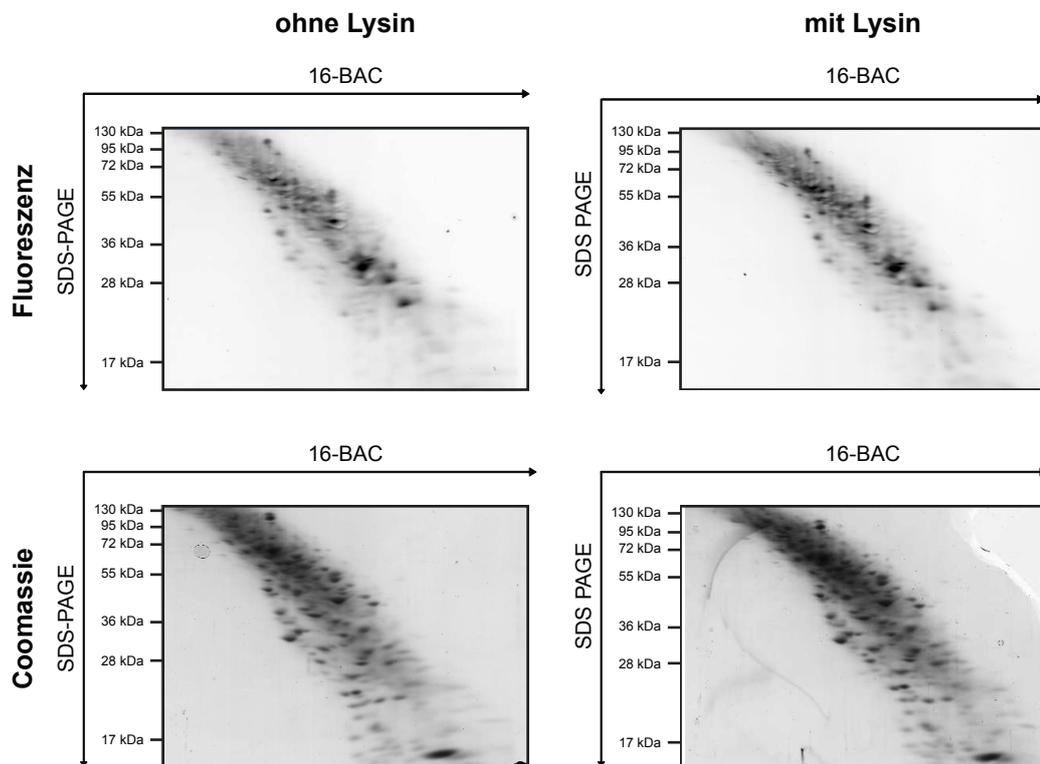


Abb. 34 Überprüfung der Spezifität der Interaktionspartner nach Inkubation der Membranpräparationen mit TFA und anschließender UV-Licht-Exposition

Membranpräparationen von HEK-SERT-FLAG-Zellen wurden mit 10 μ M TFA inkubiert. Kurz vor UV-Licht-Exposition wurde ein Überschuss an Lysin zugegeben, um durch UV-Licht aktiviertes, diffundierendes TFA abzufangen, welches unspezifisch an Proteine binden könnte. Die Interaktionspartner des TFA wurden mit einem Fluorophor markiert und über ein 2D-Gel aufgetrennt (16-BAC, SDS-PAGE (12%)). Die Detektion erfolgte einerseits mit einem Fluoreszenzscan und andererseits mit einer Colloidal-Coomassie-Färbung.

5 Diskussion

Die Entwicklung und Synthese des TFA stellte den Ausgangspunkt für diese Arbeit dar. Die Antidepressiva-spezifischen pharmakologischen Eigenschaften des TFA wurden unter Verwendung radioaktiver Bindungstests bestätigt, ebenso wie die Funktionalität des UV-Linkers und der Click-Einheit. Wie weiterhin erste Studien an lebenden Zellen zeigten, führte eine Behandlung mit TFA nach dessen schneller Aufnahme ins Zellinnere zur Anreicherung dieser Substanz in Mitochondrien und Lysosomen. Erste Interaktionspartner des TFA wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Markierung mit einem Fluorophor visualisiert.

5.1 Bewertung der verwendeten Methoden zur Detektion und Identifizierung der TFA-Interaktionspartner

Mittels Zellfärbetechniken wurde die Aufnahme und Kompartimentierung des TFA in lebenden Zellen untersucht. Fluoreszenzgele und Massenspektroskopie sollten die Detektion der direkten Interaktionspartner des TFA in lebenden Zellen und Zellfraktionen, sowie deren spätere Identifizierung erlauben.

5.1.1 Zellfärbungen

Mit Hilfe von Zellfärbungen wurde demonstriert, dass das TFA rasch ins Zellinnere gelangte und sich dort vor allem in Mitochondrien und Lysosomen anreicherte. Aufgrund der hohen TFA-Mengen, welche in diesen Zellorganellen vorlagen, war die Detektion von eventuell vorhandenen, weniger abundanten Interaktionspartnern des TFA in anderen Zellkompartimenten nur bedingt möglich. Konkurrenzexperimente mit IMI zeigten keine Abnahme des Fluoreszenzsignals. Dies spricht für eine nicht sättigbare Anreicherung der Antidepressiva in Mitochondrien und Lysosomen, die jedoch nicht ausschließt, dass das TFA spezifisch an mitochondriale und lysosomale Interaktionspartner gebunden hatte. Die Ursache für die Fluoreszenzabnahme durch den irreversiblen Kompetitor BFA-UV konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Teilweise scheint eine Kompetitions-unabhängige Nebenreaktion für die Abnahme der Fluoreszenz verantwortlich.

5.1.2 Fluoreszenzgele

Zellfärbungen zeigten eine schnelle Aufnahme des TFA in Zellen und eine Anreicherung dieser Substanz vor allem in Mitochondrien und Lysosomen. Eine Identifizierung der Proteine, welche kovalent mit TFA markiert wurden, könnte einerseits bereits bekannte

Zielproteine bestätigen und andererseits Hinweise für mögliche weitere Interaktionspartner liefern. Mit der Identifikation dieser Zielproteine wäre die Aufdeckung weiterer, neuer Wirkmechanismen der antidepressiv wirkenden Substanzen möglich.

Die Analyse TFA-spezifischer Zielstrukturen erfolgte einerseits durch Inkubation zuvor gewonnener Zellfraktionen oder nach Gewinnung der Zellfraktionen im Anschluss an die TFA-Inkubation lebender Zellen. Es stellte sich heraus, dass bei der direkten Inkubation von Zellfraktionen eine stärkere Fluoreszenzmarkierung von Interaktionspartnern in der Membran- und Zytoplastfraktion auftrat. Außerdem wurden in den Membranfraktionen deutlich mehr Proteine mit TFA markiert als in den Zytoplastfraktionen. Hierbei muss beachtet werden, dass bei der Gewinnung von Membranfraktionen ebenfalls Mitochondrien vorhanden sind. Bei Inkubation lebender Zellen mit dem TFA waren die meisten Interaktionspartner des TFA in der Mitochondrienfraktion detektierbar, wie dies nach Analyse der Zellfärbungen zu erwarten war. Interaktionspartner aus der Lysosomenfraktion zu identifizieren, war bisher aufgrund einer nicht durchführbaren Click-Reaktion erfolglos (siehe 5.3.1).

Im Allgemeinen bergen sowohl die Verwendung von Zellfraktionen als auch die kovalente Bindung des TFA in lebenden Zellen Vor- und Nachteile. Die Verwendung von lebenden Zellen hat den Vorteil, dass weniger wahrscheinlich falsch positive Interaktionspartner identifiziert wurden. Das Problem besteht jedoch darin, dass oftmals toxische Konzentrationen von Antidepressiva eingesetzt werden müssen. Dies trifft vor allem bei Konkurrenzexperimenten zu, bei denen ein 100-1000 facher Überschuss an Kompetitor, wie z.B. IMI, nötig ist. Die Inkubation von Zellfraktionen kann allerdings mit sehr hohen Antidepressiva-Konzentrationen von bis zu 1 mM erfolgen. Konkurrenzexperimente sind vor allem von Wichtigkeit, um die Spezifität der Interaktion zu bestätigen.

Im Falle von Fluoreszenzgelelektrophorese bestand die Schwierigkeit darin, die Fluoreszenzabnahme einzelner Proteinpunkte durch die Konkurrenz mit IMI zu quantifizieren. Durch Variabilität und Inhomogenität der Fluoreszenz-Intensität war die Detektion der Fluoreszenz-Abnahme einzelner Proteinpunkte problematisch. Alternativ könnte man die Interaktionspartner des TFA mit Biotin markieren. Dieses könnte nach einer SDS-PAGE und einem Nasserblotverfahren mit Streptavidinperoxidase detektiert werden.

5.1.3 Massenspektroskopische Methoden

Zur Dekomplexierung der Interaktionspartner des TFA diente wie bereits beschrieben die 2D-Gelelektrophorese. Für die Identifikation dieser Proteine standen anschließend massenspektroskopische Methoden zur Verfügung. Hierzu wurden die Gelproben in einer hausinternen Kooperation mit Frau Dr. Maccarrone (Max-Planck-Institut für Psychiatrie, AG Turck) analysiert. Jeder Proteinpunkt der 2D-Gele repräsentierte jedoch mehrere Proteine, daher war bisher keine eindeutige Identifikation dieser Interaktionspartner möglich. Um eine Identifizierung mit dieser Methode zu realisieren, müssten zunächst Interaktionspartner des TFA, z.B. mit Hilfe einer Biotin-Markierung angereichert werden. Dies könnte man durch

Verwendung eines Biotins anstelle eines Fluorophors in der Click-Reaktion erreichen. Die mit Biotin markierten Proteine werden anschließend mittels Streptavidinbeads von den restlichen Proteinen abgetrennt. Die Analyse dieser Proteine könnte entweder direkt nach Elution von den Beads erfolgen oder nach Auftrennung der eluierten Proteine über eine SDS-PAGE, anschließender Detektion durch einen zusätzlichen, am Biotin-Linker angebrachtes Fluorophor und der Isolation aus dem Gel.

5.2 Anreicherung des TFA in Zell-Kompartimenten

In Zellfärbungen wurde im Rahmen dieser Arbeit in unterschiedlichen Zelltypen die Verteilung des TFA visualisiert. Ein Großteil des TFA gelangte schnell ins Zellinnere und sammelte sich dort in unterschiedlichen Bereichen an. In der Literatur ist dies für Fibroblasten gezeigt, bei denen eine Inkubation mit Desipramin im mikromolaren Konzentrationsbereich zu einer intrazellulären Konzentration an Desipramin im millimolaren Bereich führte (Honegger u. a. 1983; Stoffel u. a. 1987).

5.2.1 Aufnahme der Antidepressiva ins Zellinnere

Die schnelle Aufnahme des TFA ins Zellinnere kann prinzipiell durch unterschiedliche Mechanismen erklärt werden. Einerseits ist eine passive Diffusion der ungeladenen Form der Antidepressiva denkbar, welche immer im Gleichgewicht mit der geladenen Form vorliegt. Andererseits besteht die Möglichkeit der aktiven Aufnahme durch z.B. Endozytose, welche für niedermolekulare Substanzen, die sich in Lysosomen anreichern, beschrieben wurde. Ein von Baciú und Kollegen entwickeltes Modell schlägt einen alternativen Mechanismus vor, wie kationisch amphiphile Substanzen die Zellmembran passieren. Dieser postuliert, dass in Membranen eingelagerte kationische amphiphile Substanzen eine saure Esterhydrolyse von Phospholipiden begünstigen. Die hierbei entstehenden Mono-Fettsäure-Phosphatidylcholine weisen die Eigenschaft auf, sich zu Mizellen zusammen zu lagern, welche sich schließlich von der Membran abspalten und mit neuen Membrankompartimenten fusionieren können. Für die kationisch amphiphilen Substanzen stellen die Mizellen demnach ein Transport-Vehikel zur Überwindung von Phospholipid-Doppelschichten dar (de Duve u. a. 1974; Baciú u. a. 2006).

5.2.2 Zellmembran-SERT

Radioaktive Bindungsassays fanden Verwendung um die Bindung des TFA an SERT im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen. Für die Zellfärbungen wurde das TFA in einer Konzentration eingesetzt, welche über dem berechneten K_i -Wert für SERT lag. Die starke Akkumulation des TFA in Mitochondrien und Lysosomen übertraf die Menge an

Zellmembran-gebundenen TFA bei weitem und machte die Visualisierung in diesen Bereichen problematisch. Im Allgemeinen war es schwer, in Zellfärbungen stark unterschiedliche Fluoreszenzintensitäten innerhalb einer Zelle zu analysieren, da es bei höherer Laserintensität, bei welcher die schwächer fluoreszierenden Kompartimente sichtbar gemacht werden sollten, zu Überstrahleffekten von stark fluoreszierenden Nachbar-Bereichen kam. Des Weiteren führte wahrscheinlich die Anreicherung des TFA im Zellinneren zu niedrigeren Konzentrationen dieser Substanz außerhalb der Zelle, bzw. an der Zellmembran. Dadurch wäre die tatsächliche Konzentration des TFA in der Nähe der membranär gelegenen SERT niedriger als der berechnete K_i -Wert. Dies hätte eine Abnahme der durch das TFA besetzten SERT und somit der Fluoreszenzintensität zur Folge. Trotz der Detektionsschwierigkeiten wurde in Zellfärbungen unter Verwendung von SERT-überexprimierenden HEK-Zellen gezeigt, dass das TFA in SERT-reichen membranären Regionen gebunden vorlag. Diese Färbungen demonstrierten interessanterweise, dass in einigen Zellen ein großer Anteil des SERT im Zytoplasma lokalisiert war. Dabei könnte es sich um durch die Überexpression internalisierten SERT handeln. Auch diese SERT-positiven, intrazellulären Bereiche wiesen eine Kollokalisierung mit der TFA-Färbung auf.

Weiterhin wurden im Rahmen dieser Arbeit Interaktionspartner des TFA aus Membranpräparationen von SERT-überexprimierenden Zellen kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und durch 1D- oder 2D-PAGE aufgetrennt. Wie diese Gele zeigten, interagierte das TFA neben SERT auch mit weiteren membranären Proteinen. Um jedoch die Bindung des TFA an SERT, welche bereits durch die radioaktiven Versuche bestätigt wurde, in diesen Experimenten zu verifizieren, wäre die Anreicherung von SERT nach kovalenter Bindung des TFA und Fluoreszenzmarkierung anhand des Flag-Peptids oder mit Hilfe von Anti-SERT-Antikörpern hilfreich. Weiterhin wäre es möglich, SERT nach Bindung von TFA mit Biotin in der Click-Reaktion zu markieren, über Streptavidinbeads aufzureinigen und durch einen Anti-SERT-Blot zu detektieren.

5.2.3 Mitochondrien

Zellfärbungen und Fluoreszenzgele ließen erkennen, dass ein signifikanter Anteil des TFA in Mitochondrien lokalisiert war und dort unter Umständen Interaktionen mit unterschiedlichen Zielstrukturen eingeht. Mitochondrien sind Zellorganellen, welche durch Synthese von ATP für die Energiebereitstellung der Zelle verantwortlich sind. Daher weisen Zellen mit hohem Energieverbrauch, wie z.B. Muskel- und Nervenzellen, eine deutlich höhere Anzahl an Mitochondrien auf als andere Körperzellen. Mitochondrien sind von 2 Membranen umschlossen, der äußeren und der inneren Membran. Der Raum zwischen äußerer und innerer Membran wird als Intermembranraum bezeichnet. Die mitochondriale Matrix beschreibt das von der inneren Membran umschlossene Kompartiment. Die äußere Membran ist für viele Substanzen und Ionen durchlässig. Die weniger durchlässige innere Membran wird durch zahlreiche Einstülpungen (Cristae) stark vergrößert, in welchen sich spezielle Protein-

Funktionseinheiten befinden. Die wichtigsten Proteine der inneren Membran sind die 5 Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung, welche für die Synthese von ATP verantwortlich sind (siehe **Abb. 35**). Für die oxidative Phosphorylierung sind des Weiteren die Kofaktoren NADH und FADH_2 von Bedeutung, da sie Elektronen auf Komplex I und II übertragen. Dies führt zu einem Elektronenfluss, der entlang eines elektrochemischen Gradienten, durch Komplex III und IV, sowie durch Ubiquinon und Cytochrom läuft. Die dabei entstehende Energie wird durch Komplex I, III und IV genutzt, um Protonen von der Matrix in den Intermembranraum zu pumpen, in welchem ein saures pH-Milieu aufgebaut wird. Die Verlagerung von Protonen führt neben einem pH-Gradienten ebenfalls zur Ausbildung eines Membranpotentials. Die hierdurch gespeicherte Energie wird von der F_0F_1 -ATPase im Proteinkomplex V der oxidativen Phosphorylierung verwendet, um durch den Rücktransport von Protonen in die Matrix ATP zu synthetisieren (Chen 1988; Gardner & Boles 2005; Graw 2010).

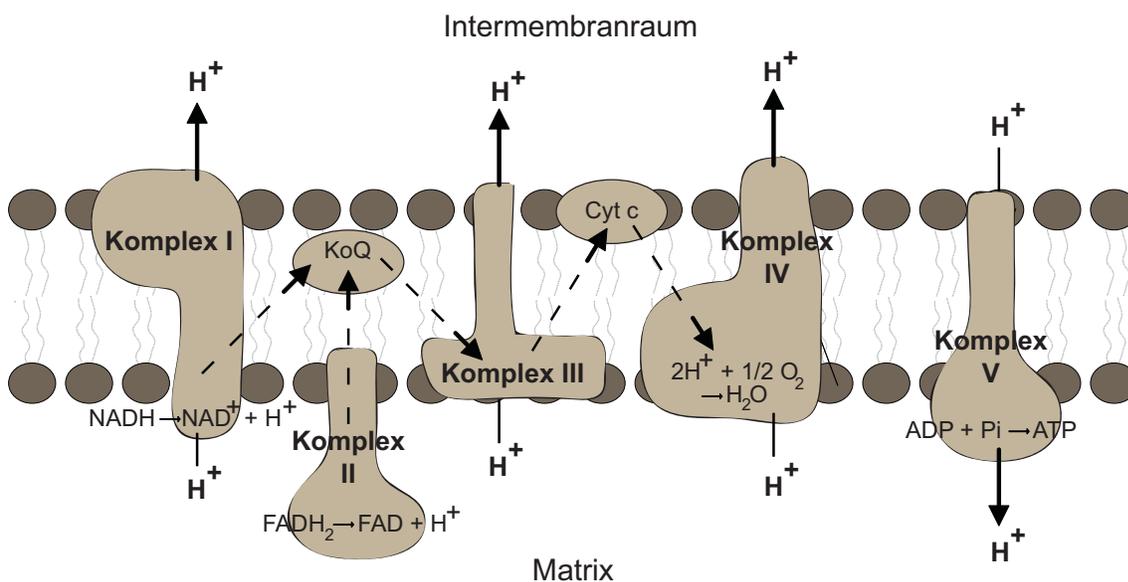


Abb. 35: ATP-Synthese durch die 5 Komplexe der oxidativen Phosphorylierung in der inneren Mitochondrienmembran: Kofaktoren (NADH und FADH_2) übertragen Elektronen auf Komplex I bzw. II der oxidativen Phosphorylierung. Diese Elektronen werden entlang der Komplexe I-IV und mittels Ubiquinon (Koenzym Q, KoQ) und Cytochrom C (Cyt c) transportiert. Durch die dabei entstehende Energie werden Protonen in den Intermembranraum gepumpt. Das dabei gebildete Membranpotential führt zur Synthese von ATP durch Komplex V (modifiziert nach Gardner & Boles 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst in Zellfärbungen von HEK-Zellen und primären Astrozyten und Neuronen eine Anreicherung des TFA in Mitochondrien beobachtet. In der Literatur wurde ebenfalls bereits eine Anreicherung von IMI nach Inkubation von Rattenlungenmitochondrien innerhalb weniger Minuten beschrieben (Hori u. a. 1987; Stoffel u. a. 1987). Kationisch amphiphile Substanzen, zu denen unter anderem die Antidepressiva zählen, kommen im physiologischen pH-Bereich in einem Gleichgewicht von positiv geladener und ungeladener Form vor. Die ungeladene Form diffundiert, im Gegensatz zur

geladenen Form, leichter durch biologische Membranen. Erreichen diese Substanzen ein saures Kompartiment, wie z.B. den Intermembranraum der Mitochondrien, wird das Gleichgewicht zwischen geladener und ungeladener Form stark auf die Seite der geladenen Form verschoben. In dieser positiv geladenen Form kann die Substanz kaum über die Membran ins Zytosol der Zelle gelangen. Des Weiteren werden die amphiphilen Substanzen aufgrund dieser positiven Ladung durch das elektrochemische Potential in die Mitochondrien-Matrix befördert und dort angereichert (de Duve u. a. 1974; Dykens & Will 2008).

Zusammenfassend werden TZA einerseits aufgrund des sauren pH-Werts des Intermembranraums, und andererseits aufgrund des elektrochemischen Potentials in der Matrix der Mitochondrien konzentriert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde Valinomycin verwendet, um zu untersuchen, ob das TFA trotz Hemmung des elektrochemischen Potentials in Mitochondrien angereichert wird. Valinomycin, ein Entkoppler der Atmungskette, fördert als Ionophor die Aufnahme von Kalium-Ionen in die Mitochondrien-Matrix. Dies führt zum Zusammenbruch des elektrochemischen Potentials mit der Folge einer Verringerung der ATP-Synthese. Dadurch wird der Elektronentransfer beschleunigt und es kommt zum Anstieg des Protonengradienten. Die hohe Kalium-Ionen-Konzentration in der mitochondrialen Matrix bewirkt des Weiteren den Einstrom von Anionen und, durch den entstehenden osmotischen Druck, ebenfalls von Wasser. Dies hat ein Anschwellen der Mitochondrien zur Folge, welches ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde (siehe 4.3.2.1; Bernardi 1999; Malka u. a. 2005; D. Nelson u. a. 2005; Safiulina u. a. 2006). Ebenfalls war in Zellfärbungen trotz Valinomycin-Behandlung eine hohe Konzentration von TFA in Mitochondrien detektierbar. Dies bestätigte, dass diese Substanzen ebenfalls durch das saure Milieu im Intermembranraum angereichert werden. Eine absolute Quantifizierung ist durch Aufnahmen am konfokalen Mikroskop jedoch nicht möglich. Diese Methode erlaubt lediglich eine Abschätzung der fluoreszierenden TFA-Mengen. Zur Detektion kleiner Konzentrationsveränderungen, wie sie möglicherweise durch die Behandlung mit Valinomycin verursacht werden, ist die Verwendung anderer Methoden erforderlich. Unter Verwendung eines In-Cell-Imaging-Systems, kann die Fluoreszenzintensität des TFA in Mitochondrien mit Hilfe einer Referenzfluoreszenz, z.B. durch einen MitoTracker, quantifiziert werden. Weiterhin ist aufgrund der nicht ausreichenden Auflösung des konfokalen Mikroskops nicht zu erkennen, in welchen Bereichen der Mitochondrien sich das TFA befindet. Nach Valinomycin-Behandlung sollte das TFA nicht mehr in der Matrix, sondern ausschließlich im Intermembranraum angereicht werden. Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie können die unterschiedlichen Kompartimente der Mitochondrien, wie Matrix, Intermembranraum, innere und äußere Membran aufgelöst werden. In der Elektronenmikroskopie werden unter anderem Goldpartikel verwendet, um die gewünschten Strukturen zu visualisieren. Die Interaktionspartner des TFA können in der Click-Reaktion ebenfalls mit Goldpartikeln markiert werden. Somit wäre die genaue Lokalisation des TFA durch elektronenmikroskopische Methoden möglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde somit die in der Literatur beschriebene Anreicherung von Antidepressiva in Mitochondrien bestätigt. Der Einfluss dieser Substanzen auf die Mitochondrien-Physiologie wurde bereits in unterschiedlichen Studien untersucht. Je nach Aufbau der Studien sowie Art des verwendeten Antidepressivums waren unterschiedliche Effekte detektierbar, wobei meist eine Beeinflussung der Proteinkomplexe der oxidativen Phosphorylierung auftrat. Lithium und die Elektrokrampftherapie (EKT) steigerten die ATP-Synthese in den Mitochondrien, im Gegensatz zu Fluoxetin, welches in hohen Dosen die ATP-Synthese verminderte. Dies scheint für die toxische Wirkung von Fluoxetin in hohen Konzentrationen verantwortlich zu sein (Curti u. a. 1999; Búriago u. a. 2006; Maurer u. a. 2009). Ähnliche Widersprüchlichkeiten sind im Zusammenhang mit dem apoptotischen Zelltod zu finden. Einige Antidepressiva hemmten die durch Calcium oder Sauerstoff- bzw. Glucose-Deprivation ausgelöste Apoptose, wobei andere selbst Apoptose induzierten. Der apoptotische Zelltod sollte dabei vor allem durch Superoxide gefördert werden, welche durch Inhibition des Komplex III der oxidativen Phosphorylierung entstehen. Dies trat jedoch in gesunden Zellen erst bei hohen Antidepressiva-Konzentrationen auf. In Tumorzellen, welche eine verminderte Mitochondrienfunktion aufweisen, war dies bereits durch niedrigere Antidepressiva-Konzentrationen erreichbar. Daher steht zurzeit die Verwendung von Antidepressiva als Anti-Tumor-Mittel zur Diskussion. Zusätzlich führte die Hemmung des Komplex III der oxidativen Phosphorylierung zu einer Verminderung des mitochondrialen Membranpotentials, was das Anschwellen der Mitochondrien zur Folge hatte. Wie durch Daley und Kollegen gezeigt, trat durch die Behandlung von isolierten Herzmitochondrien mit Clomipramin eine Vergrößerung dieser Zellorganellen auf (Eto u. a. 1985; Xia, Lundgren, Bergstrand, J. DePierre, u. a. 1999; Daley u. a. 2005; Nahon u. a. 2005; Zhang u. a. 2008; Abdel-Razaq u. a. 2011).

Eine Veränderung der Mitochondrien-Morphologie wurde ebenfalls in Zellfärbungen im Zuge der Antidepressiva-Behandlung festgestellt. Nach 48-stündiger Behandlung von primären Astrozyten mit TFA oder IMI gruppierten sich Mitochondrien um den Zellkern. Die Mitochondrien verloren dabei meist ihre Faden-ähnliche Form. Vergleichbare mitochondriale Veränderungen traten nach einer kurzen Inkubationszeit mit TFA und einer anschließenden, längeren Auswaschphase auf. Um jedoch präzisere Aussagen über die Veränderung der Mitochondrien-Morphologie zu treffen, wären elektronenmikroskopische Aufnahmen notwendig, mittels derer die Größe der Mitochondrien bestimmt werden können. In einer weiteren, von Safiulina und Kollegen beschriebenen Methode, welche die Form- und Größen-Bestimmung von Mitochondrien erlaubt, werden Mitochondrien durch Färbung mit einem MitoTracker visualisiert und anschließend unter Benutzung eines konfokalen Mikroskops 3D-Bilder einzelner Mitochondrien aufgenommen. Die Auswertung dieser Aufnahmen erfolgt mit Hilfe einer speziellen Software (AutoQuant Imaging; Safiulina u. a. 2006). Interessant in diesem Zusammenhang scheint zu erwähnen, dass für Patienten mit anderen psychischen Erkrankungen, wie affektive Störungen oder Schizophrenie, bereits das Vorhandensein einer

Volumenreduktion der Mitochondrien in bestimmten Hirnzellen gezeigt werden konnte (Uranova u. a. 2001; Cataldo u. a. 2010).

Welche Auswirkung eine Vergrößerung der Mitochondrien auf die Zelle hat, wurde bereits von Kaasik und Kollegen untersucht. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass eine Vergrößerung der Mitochondrien den Transport von anderen Organellen sterisch behindert (Kaasik u. a. 2007). Des Weiteren scheint der Transport der vergrößerten Mitochondrien in Neuriten selbst gehemmt, was eine verringerte Bereitstellung von ATP in den Ausläufern und Synapsen zur Folge hätte. Für die äußere Form der Mitochondrien sind neben Fusion und Knospung bestimmte Faktoren verantwortlich. Einige Proteine koppeln Mitochondrien an das Zytoskelett oder dienen als Verbindung zwischen innerer und äußerer Mitochondrien-Membran. Die Interaktion von Mitochondrien mit dem Zytoskelett spielt für den Transport der Mitochondrien eine wichtige Rolle (Jensen 2005).

Weitere Versuche im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass das TFA aus Mitochondrien durch Auswaschexperimente nicht entfernt wurde. Dies lässt vermuten, dass das TFA mit hoher Persistenz in Mitochondrien akkumulierte. Dieses Phänomen wurde von Weinbach und Kollegen bereits für die Antidepressiva Imipramin und Clomipramin beschrieben. Sie zeigten, dass diese Substanzen nach Akkumulation in Rattenlebermitochondrien selbst nach 5 Waschschritten kaum wieder zu entfernen waren (Weinbach u. a. 1986).

Ein Teil der bisher geschilderten Effekte scheint durch eine Interaktion von Antidepressiva mit mitochondrialen Proteinen erklärbar zu sein. Da das TFA unter anderem Verwendung findet, um potentielle Interaktionspartner zu identifizieren, wurden auch weiterführende Experimente durchgeführt. Zusätzlich zur Anreicherung des TFA in Mitochondrien war die Bindung unterschiedlicher Interaktionspartner detektierbar. TFA ging mit mindestens 2 mitochondrialen Proteinen eine hoch affine Bindung ein. Dies wurde durch die Visualisierung von Interaktionspartnern bei niedrigen TFA-Konzentrationen von 0,1 μM gezeigt. Für die spezifische Bindung eines dieser Proteine spricht ein Versuch, in welchem gezeigt wurde, dass die Fluoreszenzmarkierung des TFA an diesem Protein mit IMI (10 μM) kompetierbar war. Eine Identifizierung dieses Proteins wird nach Bestätigung dieser Experimente erfolgen.

5.2.4 Lysosomen

Lysosomen stellen ein weiteres wichtiges Zellorganell dar, in dem das TFA stark konzentriert vorlag. In Lysosomen findet durch hydrolytische Enzyme ein kontrollierter intrazellulärer Abbau von Makromolekülen statt. Es sind etwa 40 unterschiedliche lysosomale Enzyme, wie z.B. Proteasen, Nukleasen, Glycosidasen, Lipasen, Phospholipasen, Phosphatasen und Sulfatasen bekannt. All diese Enzyme gehören zur Gruppe der sauren Hydrolasen, die ihre optimale Aktivität bei pH 5 in den Lysosomen entfalten. Eine H^+ -Pumpe in der Lysosomenmembran, welche Protonen ins Innere der Lysosomen transportiert, erhält den sauren pH unter ATP-Verbrauch aufrecht. (Alberts u. a. 2007).

Die Anreicherung des TFA in Lysosomen unterschiedlicher Zelltypen wurde in Zellfärbungen dieser Arbeit gezeigt. Dies ist ebenfalls durch die amphiphilen Eigenschaften dieser Substanzen zu erklären, welche, wie bereits unter 5.2.3 beschrieben, zu einer Konzentrierung in sauren Kompartimenten, zu denen ebenfalls die Lysosomen zählen, führt. Wie die in dieser Arbeit durchgeführten Zellfärbungen zeigten, stieg der Anteil des Antidepressivums in den Lysosomen mit Verlängerung der Inkubationszeit rasch an, bis nach etwa 24 Stunden keine weitere Zunahme mehr stattfand. Der Zeitverlauf der Anreicherung von kationisch amphiphilen Substanzen in Lysosomen ist vor allem von deren pK_s -Wert abhängig und liegt für das TFA mit einem pK_s von etwa 9,4 in dem Bereich, der von de Duve und Kollegen für Substanzen mit diesem pK_s -Wert beschrieben wurde (de Duve u. a. 1974).

Wie ebenfalls gezeigt, führte die Behandlung der Zellen mit Antidepressiva zur Vergrößerung der Lysosomen. Diese geht mit einer strukturellen Veränderung der Lysosomen einher, welche in der Literatur unter dem Begriff Phospholipidosis bekannt ist. In Lysosomen bilden sich nach der Behandlung mit kationisch amphiphilen Substanzen elektronenmikroskopisch sichtbare multilamellare Strukturen. Diese strukturellen Veränderungen sind durch die lysosomale Anreicherung von Phospholipiden erklärbar. Der Abbau von Phospholipiden wird einerseits aufgrund einer Inhibition der lysosomalen Phospholipasen durch kationisch amphiphile Substanzen gehemmt. Andererseits verhindert die direkte Bindung dieser Substanzen an Phospholipide deren Degradation. Der positiv geladene Stickstoff der kationischen amphiphilen Substanz interagiert hierbei mit der negativ geladenen Phosphatgruppe der Phospholipide und das aromatische Ringsystem der kationischen amphiphilen Substanz mit dem hydrophoben Rest der Phospholipide. Beide Faktoren führen zu einer lysosomalen Anreicherung von Phospholipiden, welche für die strukturellen Veränderungen verantwortlich gemacht wurden (Lüllmann-Rauch & Scheid 1975; Seydel & Wassermann 1976; Hostetler 1984; Hein u. a. 1990; Halliwell 1997; Xia u. a. 2000; Reasor & Kacew 2001; Anderson & Borlak 2006).

Der Bindung von TZA an Phospholipide ist für deren zelluläre Verteilung, neben dem pH-Gradienten, große Bedeutung zuzuschreiben (Daniel 2003). Dies erklärt, warum sich die Verteilung des TFA nach einer 48-stündigen Inkubation selbst dann nicht verändert, wenn der pH-Wert der Lysosomen durch Bafilomycin, einen Inhibitor der lysosomalen H^+ -ATPase, erhöht wird. Das TFA scheint eine starke Interaktion innerhalb der Lysosomen einzugehen, welche unabhängig vom lysosomalen pH beständig ist und möglicherweise auf eine Bindung an Phospholipide zurückzuführen ist.

Des Weiteren war im Rahmen dieser Arbeit in Zellfärbungen keine Konkurrenz der TFA-Bindungsstellen in Lysosomen durch einen Überschuss an IMI detektierbar. Dies spricht für nicht sättigbare Interaktionen, welche z.B. aufgrund von Phospholipid-Wechselwirkungen zustande kamen.

Die Anreicherung des TFA in Lysosomen war durch die Zellfärbung erkennbar. Da TZA stark mit Phospholipiden interagieren, wäre eine kovalente Bindung des TFA an diese

wahrscheinlich. Die Auftrennung und Detektion der Phospholipide wäre über die im Rahmen dieser Arbeit etablierten Fluoreszenzgele nicht möglich. Dazu müssen in Zukunft weitere Methoden, wie z.B. die Dünnschichtchromatographie, etabliert werden. Würde jedoch das TFA in Lysosomen an bestimmte Proteine binden, wäre die Visualisierung mit den bereits erwähnten Fluoreszenzgele durchführbar. Bisher war dies noch nicht erfolgreich, da die Click-Reaktion im Lysosomen-Isolationspuffer nicht zu bewerkstelligen ist und daher erst unterschiedliche Bedingungen getestet werden müssen, welche eine effiziente Umpufferung der Lysosomen erlauben. Eine Aceton-Fällung wäre für die Isolierung der lysosomalen Proteine und deren Aufnahme in einem mit der Click-Reaktion kompatiblen Puffer ebenso denkbar wie z.B. eine Umpufferung durch Dialyse.

5.3 Abschließende Bewertung zur Funktionalität des TFA

Die Synthese TFA wurde nach der Auswahl des passenden UV-Linkers unter Berücksichtigung der Struktur-Wirkungs-Beziehungen geplant und durchgeführt.

5.3.1 Click-Einheit

Wie die Zellfärbungen und Fluoreszenzgele zeigten, war durch die sehr spezifische Click-Reaktion kaum Hintergrundsignal vorhanden. Ein Nachteil der Click-Reaktion ist deren Inkompatibilität mit bestimmten Puffersystemen oder Puffer-Zusätzen. Unter anderem inhibierte der Lysosomen-Isolationspuffer die Click-Reaktion vollständig (siehe 5.2.4).

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Click-Reaktion ist nicht im lebenden System durchführbar, da das dabei verwendete Kupfer eine sehr hohe Zytotoxizität aufweist. Die Möglichkeit einer Kupfer-freien Click-Reaktion, welche auch im lebenden System durchführbar ist, wurde von Baskin und Kollegen beschrieben (Baskin u. a. 2007). Für diese Methode findet ein Fluorophor, welches als Click-Einheit ein sehr reaktives Alkin besitzt, Verwendung. Daher müsste für eine Kupfer-freie Click-Reaktion IMI mit einem Azid anstelle eines Alkins funktionalisiert werden. Für die Verwendung eines Azids als Click-Einheit in der niedermolekularen Substanz geht jedoch eine größere Gefahr von unerwünschten Nebenreaktionen aus (Speers & Cravatt 2004). Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde auf die Methode von Baskin verzichtet.

5.3.2 UV-Linker

Wie Zellfärbungen und Fluoreszenzgele zeigten, fanden eine Aktivierung des UV-Linkers und die kovalente Bindung an Interaktionspartner durch UV-Licht-Bestrahlung von 1 Min. statt. Der UV-Linker wurde auch durch UV-Licht des Tageslichts oder durch erhöhte Temperatur während der Inkubationsphase im Brutschrank bei 37 °C teilweise aktiviert.

Jedoch ist diese basal ablaufende Reaktion im Vergleich zur gezielten UV-Licht-Exposition sehr gering ausgeprägt.

Die Aktivierung des UV-Linkers erfolgte bei einer Wellenlänge von 254 nm. Auch wenn bei dieser Wellenlänge das Auftreten von Proteinschäden wahrscheinlich ist, waren in unseren Experimenten bei einer UV-Licht-Bestrahlung von 1 Min. keine offensichtlichen Schäden auf zellulärer Ebene zu beobachten. Ebenso deutete der Effekt distinkter Proteinbanden im Gel auf eine geringe Degradation der Proteine hin.

Durch die verwendeten Methoden war die Visualisierung sehr vieler Interaktionspartner des TFA möglich. Daher lag die Vermutung nahe, dass einige dieser Proteine unspezifisch gebunden hatten. Dies könnte z.B. durch aktiviertes, frei diffundierendes TFA geschehen. Dies scheint beim TFA deshalb möglich, weil der verwendete UV-Linker nach Aktivierung in ein Ketenimin überführt wird, welches bekanntermaßen eine längere Halbwertszeit besitzt. Andere UV-Linker besitzen hingegen eine sehr kurze Halbwertszeit und reagieren daher nur mit Proteinen in der nächsten Nähe, d.h. mit direkten Interaktionspartnern. Bei dem TFA ist es jedoch denkbar, dass es in aktivierter Form frei diffundiert und somit eine unspezifisch kovalente Bindung an Proteine stattfindet. Es wurde im Rahmen dieser Arbeit angestrebt, diese unspezifischen Bindungen mit einem Überschuss an Lysin zu kompetieren. Für Ketenimine ist bekannt, dass sie vor allem an diese Aminosäure kovalent binden. In unseren Experimenten war jedoch keine Konkurrenz mit Lysin sichtbar. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt, ob es sich bei den mit TFA-markierten Proteinen, welche aufgrund des verwendeten UV-Linkers kovalent gebunden hatten, wirklich um direkte Interaktionspartner handelt. Ein alternativer UV-Linker, welcher ebenfalls wie das Arylazid sehr klein ist und daher die Struktur-Wirkungs-Beziehung der Antidepressiva wenig beeinflussen sollte, ist das Diazirin. Die Synthese der Diazirine ist zwar komplizierter, aber dafür wäre die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten unspezifischer Bindungen wesentlich geringer.

5.3.3 Vergleichende Analyse des TFA mit Referenzsubstanzen

Durch radioaktive Sättigungs- und Konkurrenzexperimente wurden die Affinitäten des TFA, des BFA-UV und des BFA-Click mit unterschiedlichen Referenzsubstanzen verglichen. Diese wurden ihrerseits mit Literaturwerten abgeglichen. Eine Gegenüberstellung der K_d -, B_{max} - und K_i -Werte der 3 stabilen Zelllinien und unterschiedlicher Antidepressiva unter Angabe der Literaturwerte befindet sich im Anhang dieser Arbeit.

Die chemischen Modifikationen des TFA führten zu einer Abnahme der Affinität des TFA zu SERT und NET im Vergleich zu der Referenzsubstanz IMI. Wie in der Literatur wurde bereits beschrieben, war es unter Verwendung einer Substanz, bei der die Affinität um den Faktor 1 000 reduziert ist, mit dieser Methode möglich Interaktionspartner zu visualisieren (S.-Y. Han & Hwan Kim 2007). Je weniger sich jedoch die Affinität zu bereits bekannten Zielproteinen ändert, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine Identifizierung

weiterer interessanter Interaktionspartner gelingt. Die Affinität des TFA zu SERT und NET war maximal um den Faktor 60 reduziert und ist daher prinzipiell für die Identifizierung von Interaktionspartnern einsetzbar. Die Abnahme der Affinität muss jedoch nicht für alle Interaktionspartner gleichermaßen gelten. Die chemischen Modifikationen können die Affinitäten zu anderen Interaktionspartnern stärker beeinflussen oder sogar dazu führen, dass das TFA an Proteine bindet, die nicht mit IMI interagieren. Deshalb ist es wichtig, positive Interaktionspartner mit Kompetitionsexperimenten zu überprüfen und zu bestätigen.

Die Affinität des TFA zu SERT und NET nahm hauptsächlich durch den Einbau der Click-Einheit ab, die als Butinyl-Rest am Stickstoff der Seitenkette angebracht wurde. Durch die Verwendung eines Ketons in der Seitenkette im TFA wäre eine Erhöhung der Affinität zum NET denkbar, da ebenfalls Lofepamin, welches eine Keton-Seitenkette am Stickstoff besitzt, zu NET eine höhere Affinität als das TFA aufweist. Eine weitere Möglichkeit wäre, die Click-Einheit ebenfalls an der Ringstruktur als Ethinylrest einzubauen. In der Literatur findet man ein 2-substituiertes TZA, 2,8-Dinitroimipramin, welches ebenfalls an SERT bindet (Paul u. a. 1981). Die Größe der Nitrogruppe weicht kaum von der Größe des Azids oder einer Ethinylgruppe ab. Die Positionen 2 und 8 scheinen daher für eine Doppelsubstitution geeignet zu sein.

Die chemische Veränderung durch den UV-Linker führte kaum zu einer Veränderung der Affinität zu den Transportern. Die Affinität zu SERT wurde sogar durch den UV-Linker erhöht. Unter Betrachtung der Struktur-Wirkungs-Beziehung scheint das Arylazid als UV-Linker, ebenso wie die Position dieses UV-Linkers richtig gewählt zu sein.

5.4 Ausblick

In den letzten Jahrzehnten kam es neben der Monoamin-Mangel-Hypothese zur Entwicklung weiterer Hypothesen der Depression, da sich zeigte, dass Antidepressiva auch weitere Systeme beeinflussen, welche sehr wahrscheinlich für die antidepressive Wirkung mitverantwortlich zu machen sind. Die vorliegende Arbeit bekräftigt diese Vermutung.

Nachdem die Funktionalität des TFA bestätigt und die subzelluläre Verteilung in unterschiedlichen Zelltypen visualisiert wurde, wird die Markierung und Visualisierung von SERT bzw. NET als bekannte Interaktionspartner des TFA folgen. Dies wird den Beweis erbringen, dass diese Methode ebenfalls die Identifizierung unbekannter Interaktionspartner erlaubt. Diese liefert möglicherweise Hinweise für zusätzliche Wirkmechanismen von Antidepressiva und trägt dazu bei, die Grundlagen der Depression besser zu verstehen. Zusätzlich wäre durch die Funktionalisierung weiterer Antidepressiva-Klassen eine Aufklärung zentraler Wirkmechanismen der Antidepressiva möglich, was zur Entwicklung von Antidepressiva mit neuem Wirkungsprofil führen könnte.

6 Zusammenfassung

Die Entschlüsselung der molekularen Wirkmechanismen herkömmlicher Antidepressiva ist eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Pathogenese der Depression sowie für die Entwicklung therapeutisch effizienterer Wirkstoffe. Neben der Beeinflussung zahlreicher Neurotransmittersysteme verdichten sich die Hinweise, dass Antidepressiva über die Einflussnahme auf weitere, bislang unbekannte Zielstrukturen ihre therapeutische Wirksamkeit entfalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine neuartige Methode etabliert und evaluiert, mit dem langfristigen Ziel der Identifizierung neuer Interaktionspartner von Antidepressiva. Zunächst wurde eine Antidepressiva-homologe Substanz entworfen und von einem Kollaborationspartner chemisch synthetisiert, mit deren Hilfe zum einen die subzelluläre Lokalisation des Antidepressivums, zum anderen die Markierung potentieller Bindungspartner realisiert wurde. Das trizyklische Antidepressivum Imipramin (IMI) wurde mit einem UV-Linker und einer sogenannten Click-Einheit versehen. Die eingeführten funktionellen Gruppen des entstandenen trifunktionellen Antidepressivums (TFA) erlaubten einerseits die kovalente Bindung an Interaktionspartner und andererseits deren Visualisierung über einen Fluoreszenzfarbstoff.

Nach erfolgter Synthese des TFA wurde überprüft, ob die pharmakologischen Eigenschaften dieser Substanz mit der Ausgangssubstanz IMI übereinstimmen. Radioaktive Bindungsanalysen wurden herangezogen, um die Affinität des TFA für den Serotonin- bzw. Norepinephrin-Transporter mit handelsüblichen Antidepressiva zu vergleichen. Die Bindungstests zeigten, dass die in das TFA eingeführten chemischen Gruppen die Affinität zu den jeweiligen Transporter-Typen nicht erheblich störten. Des Weiteren wurde die Funktionalität des UV-Linkers sowie der Click-Einheit bestätigt. Das TFA ist somit prinzipiell ein geeignetes Werkzeug für die Markierung und Anreicherung potentieller Interaktionspartner.

Färbungen lebender Zellen unter Verwendung des TFA bestätigten eine Kollokalisation des TFA- mit membranständigem SERT. Darüber hinaus wurde eine rasche Aufnahme des TFA ins Zellinnere beobachtet, wo es sich konzentrations- und zeitabhängig in mitochondrialen und lysosomalen Kompartimenten anreicherte. Wurde pharmakologisch der pH-Wert der Lysosomen angehoben oder das elektrochemische Potential der Mitochondrien-Membran gestört, hatte dies eine Umverteilung des TFA zur Folge. Diese Befunde weisen auf das Vorhandensein zusätzlicher intrazellulärer Angriffsstrukturen des TFA hin. Außerdem lassen sich daraus bereits bestimmte biophysikalische Ursachen für die Akkumulation des TFA in den entsprechenden Zellorganellen ableiten.

Aufbauend zu den Zellfärbungen fanden Fluoreszenzgele Verwendung, um potentielle Interaktionspartner des TFA aus membranären, zytoplasmatischen und lysosomalen Zellfraktionen biochemisch darzustellen. Es zeigte sich, dass das TFA mit vielen Proteinen unterschiedlicher Größe interagiert, wobei in der mitochondrialen Fraktion der größte Anteil

potentieller Interaktionspartner detektiert wurde.

Die Mehrzahl der handelsüblichen Antidepressiva wurde basierend auf der Monoamin-Mangel-Hypothese entwickelt, in welcher die Erhöhung der Monoaminspiegel als zentraler Wirkmechanismus der Antidepressiva angesehen wird. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit deuten daraufhin, dass Antidepressiva zusätzlich weitere Systeme beeinflussen, welche für die Wirkung der Antidepressiva mitverantwortlich sein könnten. Zusätzlich stellt das TFA ein vielversprechendes Werkzeug dar, neue Interaktionspartner der Antidepressiva zu entdecken. Die Identifikation dieser Zielstrukturen wird zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen der Antidepressiva, sowie der Pathogenese der Depression führen. Auf Basis dieser Erkenntnisse könnten in Zukunft Substanzen mit neuen Wirkmechanismen die Behandlungserfolge von Patienten mit Depressionen verbessern.

7 Literaturverzeichnis

- Abdel-Razaq, W., Kendall, D.A. & Bates, T.E., 2011. The effects of antidepressants on mitochondrial function in a model cell system and isolated mitochondria. *Neurochemical Research*, 36(2), S.327-338.
- Alberts, B. u. a., 2007. *Molecular Biology of the Cell* 5. Aufl., Taylor & Francis.
- Almeida, A. & Medina, J.M., 1998. A rapid method for the isolation of metabolically active mitochondria from rat neurons and astrocytes in primary culture. *Brain Research. Brain Research Protocols*, 2(3), S.209-214.
- Anderson, N. & Borlak, J., 2006. Drug-induced phospholipidosis. *FEBS Letters*, 580(23), S.5533-5540.
- Apparsundaram, S. u. a., 2008. Antidepressants targeting the serotonin reuptake transporter act via a competitive mechanism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327(3), S.982-990.
- Baciu, M. u. a., 2006. Degradative transport of cationic amphiphilic drugs across phospholipid bilayers. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Sciences*, 364(1847), S.2597-2614.
- Barbee, J.G. & Jamhour, N.J., 2002. Lamotrigine as an augmentation agent in treatment-resistant depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 63(8), S.737-741.
- Bardeleben, U. & Holsboer, F., 1989. Cortisol response to a combined dexamethasone-human corticotrophin-releasing hormone challenge in patients with depression. *Journal of Neuroendocrinology*, 1(6), S.485-488.
- Barker, E.L., Kimmel, H.L. & Blakely, R.D., 1994. Chimeric human and rat serotonin transporters reveal domains involved in recognition of transporter ligands. *Molecular Pharmacology*, 46(5), S.799-807.
- Baskin, J.M. u. a., 2007. Copper-free click chemistry for dynamic in vivo imaging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(43), S.16793-16797.
- Ben-Shachar, D. & Karry, R., 2008. Neuroanatomical pattern of mitochondrial complex I pathology varies between schizophrenia, bipolar disorder and major depression. *PloS One*, 3(11), S.e3676.
- Berman, R.M. u. a., 2000. Antidepressant effects of ketamine in depressed patients. *Biological Psychiatry*, 47(4), S.351-354.
- Bernardi, P., 1999. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological Reviews*, 79(4), S.1127-1155.
- Bickel, M.H. & Brodie, B.B., 1964. Structure and antidepressant activity of imipramine analogues. *International Journal of Neuropharmacology*, 3(6), S.611-621.

- Board, F., Wadeson, R. & Persky, H., 1957. Depressive affect and endocrine functions; blood levels of adrenal cortex and thyroid hormones in patients suffering from depressive reactions. *A. M. A. Archives of Neurology and Psychiatry*, 78(6), S.612-620.
- Bolden-Watson, C. & Richelson, E., 1993. Blockade by newly-developed antidepressants of biogenic amine uptake into rat brain synaptosomes. *Life Sciences*, 52(12), S.1023-1029.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Biondi, M., u. a., 2002. Depression induced by treatment with interferon-alpha in patients affected by hepatitis C virus. *Journal of affective disorders*, 72(3), S.237-241.
- Bonaccorso, S., Marino, V., Puzella, A., u. a., 2002. Increased depressive ratings in patients with hepatitis C receiving interferon-alpha-based immunotherapy are related to interferon-alpha-induced changes in the serotonergic system. *Journal of clinical psychopharmacology*, 22(1), S.86-90.
- Bonaccorso, S. u. a., 2001. Immunotherapy with interferon-alpha in patients affected by chronic hepatitis C induces an intercorrelated stimulation of the cytokine network and an increase in depressive and anxiety symptoms. *Psychiatry research*, 105(1-2), S.45-55.
- Braceland, F.J., 1957. Kraepelin, his system and his influence. *The American Journal of Psychiatry*, 113(10), S.871-876.
- Braun, R.J. u. a., 2007. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389(4), S.1033-1045.
- Breinbauer, R. & Köhn, M., 2003. Azide-alkyne coupling: a powerful reaction for bioconjugate chemistry. *Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology*, 4(11), S.1147-1149.
- Brunner, J., 1993. New Photolabeling and Crosslinking Methods. *Annual Review of Biochemistry*, 62(1), S.483-514.
- Bubl, E. u. a., 2010. Seeing gray when feeling blue? Depression can be measured in the eye of the diseased. *Biological Psychiatry*, 68(2), S.205-208.
- Búrigo, M. u. a., 2006. Effect of electroconvulsive shock on mitochondrial respiratory chain in rat brain. *Neurochemical Research*, 31(11), S.1375-1379.
- Carlsson, A., Fuxe, K. & Ungerstedt, U., 1968. The effect of imipramine on central 5-hydroxytryptamine neurons. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 20(2), S.150-151.
- Cataldo, A.M. u. a., 2010. Abnormalities in mitochondrial structure in cells from patients with bipolar disorder. *The American Journal of Pathology*, 177(2), S.575-585.
- Chen, L.B., 1988. Mitochondrial Membrane Potential in Living Cells. *Annual Review of Cell Biology*, 4(1), S.155-181.

- Coppen, A., Shaw, D.M. & Farrell, J.P., 1963. Potentiation of the antidepressive effect of a monoamine-oxidase inhibitor by tryptophan. *Lancet*, 1(7272), S.79-81.
- Curti, C. u. a., 1999. Fluoxetine interacts with the lipid bilayer of the inner membrane in isolated rat brain mitochondria, inhibiting electron transport and F1F0-ATPase activity. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 199(1-2), S.103-109.
- Czeh, B. u. a., 2005. Astroglial Plasticity in the Hippocampus is Affected by Chronic Psychosocial Stress and Concomitant Fluoxetine Treatment. *Neuropsychopharmacology*, 31(8), S.1616-1626.
- Daley, E. u. a., 2005. Chlorimipramine: A novel anticancer agent with a mitochondrial target. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 328(2), S.623-632.
- Daniel, W.A., 2003. Mechanisms of cellular distribution of psychotropic drugs. Significance for drug action and interactions. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 27(1), S.65-73.
- Delgado, P.L. u. a., 1990. Serotonin function and the mechanism of antidepressant action. Reversal of antidepressant-induced remission by rapid depletion of plasma tryptophan. *Archives of General Psychiatry*, 47(5), S.411-418.
- Le Dinh, T. u. a., 1988. Amineptine, a tricyclic antidepressant, inhibits the mitochondrial oxidation of fatty acids and produces microvesicular steatosis of the liver in mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 247(2), S.745 -750.
- Dormán, G. & Prestwich, G.D., 1994. Benzophenone photophores in biochemistry. *Biochemistry*, 33(19), S.5661-5673.
- Dormán, G. & Prestwich, G.D., 2000. Using photolabile ligands in drug discovery and development. *Trends in Biotechnology*, 18(2), S.64-77.
- Duman, R.S. & Monteggia, L.M., 2006. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biological Psychiatry*, 59(12), S.1116-1127.
- Duman, R.S., Heninger, G.R. & Nestler, E J, 1997. A molecular and cellular theory of depression. *Archives of General Psychiatry*, 54(7), S.597-606.
- de Duve, C. u. a., 1974. Commentary. Lysosomotropic agents. *Biochemical Pharmacology*, 23(18), S.2495-2531.
- Dykens, J.A. & Will, Y., 2008. *Drug-Induced Mitochondrial Dysfunction*, John Wiley and Sons.
- Engstrom, E.J., Weber, M.M. & Burgmair, W., 2006. Emil Wilhelm Magnus Georg Kraepelin (1856-1926). *The American Journal of Psychiatry*, 163(10), S.1710.
- Eto, K. u. a., 1985. Effect of tricyclic drugs on mitochondrial membrane. *Acta Medica Okayama*, 39(4), S.289-295.

- Fournier, J.C. u. a., 2010. Antidepressant drug effects and depression severity: a patient-level meta-analysis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 303(1), S.47-53.
- Franke, B., Figiel, M. & Engele, J., 1998. CNS glia are targets for GDNF and neurturin. *Histochemistry and Cell Biology*, 110(6), S.595-601.
- Fromenty, B. u. a., 1989. Tianeptine, a new tricyclic antidepressant metabolized by [beta]-oxidation of its heptanoic side chain, inhibits the mitochondrial oxidation of medium and short chain fatty acids in mice. *Biochemical Pharmacology*, 38(21), S.3743-3751.
- Gaillard, C. & Strauss, F., 1990. Ethanol precipitation of DNA with linear polyacrylamide as carrier. *Nucleic Acids Research*, 18(2), S.378.
- Galli, A. u. a., 1995. Sodium-dependent norepinephrine-induced currents in norepinephrine-transporter-transfected HEK-293 cells blocked by cocaine and antidepressants. *The Journal of Experimental Biology*, 198(Pt 10), S.2197-212.
- Gardner, A. & Boles, R.G., 2010. Beyond the serotonin hypothesis: Mitochondria, inflammation and neurodegeneration in major depression and affective spectrum disorders. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20691744> [Zugegriffen August 18, 2010].
- Gardner, A. & Boles, R.G., 2005. Is a „Mitochondrial Psychiatry“ in the Future? A Review. *Current Psychiatry Reviews*, 1, S.255-271.
- Glowinski, J. & Axelrod, J., 1964. Inhibition of uptake of tritiated-Noradrenaline in the intact rat brain by Imipramine and structurally related compounds. *Nature*, 204, S.1318-1319.
- Graw, J., 2010. *Genetik*, Springer.
- Gubbens, J. u. a., 2009. Photocrosslinking and click chemistry enable the specific detection of proteins interacting with phospholipids at the membrane interface. *Chemistry & Biology*, 16(1), S.3-14.
- Gurevich, E.V. & Joyce, J.N., 1996. Comparison of [3H]paroxetine and [3H]cyanoimipramine for quantitative measurement of serotonin transporter sites in human brain. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 14(5), S.309-23.
- Halliwell, W.H., 1997. Cationic amphiphilic drug-induced phospholipidosis. *Toxicologic Pathology*, 25(1), S.53-60.
- Han, S.-Y. & Hwan Kim, S., 2007. Introduction to chemical proteomics for drug discovery and development. *Archiv Der Pharmazie*, 340(4), S.169-177.
- Hatanaka, Y. & Sadakane, Y., 2002. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2(3), S.271-288.

- Hein, L., Lüllmann-Rauch, R. & Mohr, K., 1990. Human accumulation potential of xenobiotics: potential of catamphiphilic drugs to promote their accumulation via inducing lipidosis or mucopolysaccharidosis. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 20(11), S.1259-1267.
- Heuser, I., Yassouridis, A. & Holsboer, F., 1994. The combined dexamethasone/CRH test: a refined laboratory test for psychiatric disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 28(4), S.341-356.
- Hirschfeld, R.M., 2000. History and evolution of the monoamine hypothesis of depression. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 61 Suppl 6, S.4-6.
- Hirst, W.D. u. a., 1998. Serotonin transporters in adult rat brain astrocytes revealed by [3H]5-HT uptake into glial plasmalemmal vesicles. *Neurochemistry International*, 33(1), S.11-22.
- Holsboer, F., 2000. The corticosteroid receptor hypothesis of depression. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 23(5), S.477-501.
- Holsboer, F. u. a., 1987. Serial assessment of corticotropin-releasing hormone response after dexamethasone in depression. Implications for pathophysiology of DST nonsuppression. *Biological Psychiatry*, 22(2), S.228-234.
- Honegger, U.E., Roscher, A.A. & Wiesmann, U.N., 1983. Evidence for lysosomotropic action of desipramine in cultured human fibroblasts. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 225(2), S.436-441.
- Hori, R., Okumura, K. & Yoshida, H., 1987. Binding of basic drugs to rat lung mitochondria. *Pharmaceutical Research*, 4(2), S.142-146.
- Horn, A.S. & Trace, R.C., 1974. Structure-activity relations for the inhibition of 5-hydroxytryptamine uptake by tricyclic antidepressants into synaptosomes from serotonergic neurones in rat brain homogenates. *British Journal of Pharmacology*, 51(3), S.399-403.
- Hostetler, K.Y., 1984. Molecular studies of the induction of cellular phospholipidosis by cationic amphiphilic drugs. *Federation Proceedings*, 43(11), S.2582-2585.
- Huber, T.J., Dietrich, D.E. & Emrich, H.M., 1999. Possible use of amantadine in depression. *Pharmacopsychiatry*, 32(2), S.47-55.
- Huisgen, R., 1963. 1,3-Dipolar Cycloadditions. Past and Future. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 2(10), S.565-598.
- Insel, T.R. & Wang, P.S., 2009. The STAR*D trial: revealing the need for better treatments. *Psychiatric Services (Washington, D.C.)*, 60(11), S.1466-1467.
- Jao, C.Y. & Salic, A., 2008. Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), S.15779-15784.

- Jensen, R.E., 2005. Control of mitochondrial shape. *Current Opinion in Cell Biology*, 17(4), S.384-388.
- Jewett, J.C. & Bertozzi, C.R., 2010. Cu-free click cycloaddition reactions in chemical biology. *Chemical Society Reviews*, 39(4), S.1272.
- Kaasik, A. u. a., 2007. Mitochondrial swelling impairs the transport of organelles in cerebellar granule neurons. *Journal of biological chemistry*, 282(45), S.32821-32826.
- Kenis, G. & Maes, M., 2002. Effects of antidepressants on the production of cytokines. *The International Journal of Neuropsychopharmacology / Official Scientific Journal of the Collegium Internationale Neuropsychopharmacologicum (CINP)*, 5(4), S.401-412.
- Kenny, M. u. a., 1983. Effects of a single oral dose of 3-cyano-imipramine on serotonin uptake and content of platelets in healthy volunteers. *Psychopharmacology*, 79(4), S.304-7.
- Kirsch, I. u. a., 2008. Initial severity and antidepressant benefits: a meta-analysis of data submitted to the Food and Drug Administration. *PLoS Medicine*, 5(2), S.e45.
- Kolb, H.C. & Sharpless, K.B., 2003. The growing impact of click chemistry on drug discovery. *Drug Discovery Today*, 8(24), S.1128-1137.
- Kolb, H.C., Finn, M.G. & Sharpless, K.B., 2001. Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 40(11), S.2004-2021.
- Kotzyba-Hibert Florence, Kapfer Isabelle & Goeldner Maurice, 1995. Recent Trends in Photoaffinity Labeling - Kotzyba-Hibert - 2003 - Angewandte Chemie International Edition in English - Wiley Online Library. , 34, S.1296.
- Kudoh, A. u. a., 2002. Small-dose ketamine improves the postoperative state of depressed patients. *Anesthesia and Analgesia*, 95(1), S.114-118, table of contents.
- Kugaya, A. & Sanacora, G., 2005. Beyond monoamines: glutamatergic function in mood disorders. *CNS Spectrums*, 10(10), S.808-819.
- Kuhn, R., 1958. The treatment of depressive states with G 22355 (imipramine hydrochloride). *The American Journal of Psychiatry*, 115(5), S.459-464.
- Lancaster, S.G. & Gonzalez, J.P., 1989. Lofepamine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic efficacy in depressive illness. *Drugs*, 37(2), S.123-140.
- Link, A.J. & Tirrell, D.A., 2003. Cell surface labeling of Escherichia coli via copper(I)-catalyzed [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(37), S.11164-11165.
- Lôo, H. u. a., 1999. Efficacy and safety of tianeptine in the treatment of depressive disorders in comparison with fluoxetine. *Journal of Affective Disorders*, 56(2-3), S.109-118.

- López-Muñoz, F. & Alamo, C., 2009. Monoaminergic neurotransmission: the history of the discovery of antidepressants from 1950s until today. *Current Pharmaceutical Design*, 15(14), S.1563-1586.
- Luft, R., 1994. The development of mitochondrial medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(19), S.8731-8738.
- Lüllmann-Rauch, R., 1976. Alterations in the neurohypophysis of rats treated with chlorphentermine or tricyclic antidepressants. *Cell and Tissue Research*, 169(4), S.501-514.
- Lüllmann-Rauch, R. & Scheid, D., 1975. Intraalveolar foam cells associated with lipidosi-like alterations in lung and liver of rats treated with tricyclic psychotropic drugs. *Virchows Archiv. B: Cell Pathology*, 19(3), S.255-268.
- MacKinnon, A.L. & Taunton, J., 2009. Target Identification by Diazirine Photo-Cross-Linking and Click Chemistry. , 1, S.55.
- Maes, M., 1995. Evidence for an immune response in major depression: a review and hypothesis. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 19(1), S.11-38.
- Maes, M. u. a., 2001. Lowered serum dipeptidyl peptidase IV activity is associated with depressive symptoms and cytokine production in cancer patients receiving interleukin-2-based immunotherapy. *Neuropsychopharmacology*, 24(2), S.130-140.
- Maes, M. u. a., 2009. The inflammatory & neurodegenerative (I&ND) hypothesis of depression: leads for future research and new drug developments in depression. *Metabolic Brain Disease*, 24(1), S.27-53.
- Malka, F. u. a., 2005. Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Reports*, 6(9), S.853-859.
- Maltese, T.M., 1999. Adjunctive lamotrigine treatment for major depression. *The American Journal of Psychiatry*, 156(11), S.1833.
- Marshall, E.F. u. a., 1960. The effect of iproniazid and imipramine on the blood platelet 5-hydroxytryptamine level in man. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 15, S.35-41.
- Maurer, I.C., Schippel, P. & Volz, H.-P., 2009. Lithium-induced enhancement of mitochondrial oxidative phosphorylation in human brain tissue. *Bipolar Disorders*, 11(5), S.515-522.
- Maxwell, R.A. u. a., 1969. Molecular features affecting the potency of tricyclic antidepressants and structurally related compounds as inhibitors of the uptake of tritiated norepinephrine by rabbit aortic strips. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 166(2), S.320-329.
- McClure, D.J., Low, G.L. & Gent, M., 1973. Clomipramine HCL--a double-blind study of a new antidepressant drug. *Canadian Psychiatric Association Journal*, 18(5), S.403-408.

- Mellsop, G.W., Burgess, C.D. & Vijayasenan, M.E., 1985. A controlled trial of amitriptyline and cianopramine in major depression. *Clinical Therapeutics*, 7(6), S.699-703.
- Montgomery, S.A., 1989. The efficacy of fluoxetine as an antidepressant in the short and long term. *International Clinical Psychopharmacology*, 4 Suppl 1, S.113-119.
- Moon, C.A. & Vince, M., 1996. Treatment of major depression in general practice: a double-blind comparison of paroxetine and lofepramine. *The British Journal of Clinical Practice*, 50(5), S.240-244.
- Moses, J.E. & Moorhouse, A.D., 2007. The growing applications of click chemistry. *Chemical Society Reviews*, 36(8), S.1249-1262.
- Muller, J.C. u. a., 1955. Depression and anxiety occurring during Rauwolfia therapy. *Journal of the American Medical Association*, 159(9), S.836-839.
- Murphy, D.L. u. a., 1970. Imipramine and lithium effects of biogenic amine transport in depressed and manic-depressed patients. *The American Journal of Psychiatry*, 127(3), S.339-345.
- Nahon, E. u. a., 2005. Fluoxetine (Prozac) interaction with the mitochondrial voltage-dependent anion channel and protection against apoptotic cell death. *FEBS Letters*, 579(22), S.5105-5110.
- Nelson, D., Cox, M. & Cox, M.M., 2005. *Lehninger Biochemie*, Springer.
- Normann, C. u. a., 2002. Lamotrigine as adjunct to paroxetine in acute depression: a placebo-controlled, double-blind study. *The Journal of Clinical Psychiatry*, 63(4), S.337-344.
- Nothwang, H.G. & Schindler, J., 2009. Two-dimensional separation of membrane proteins by 16-BAC-SDS-PAGE. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 528, S.269-277.
- Nunes, S. u. a., 2002. Immune and hormonal activity in adults suffering from depression. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35(5), S.581-587.
- Owens, M.J. u. a., 1997. Neurotransmitter receptor and transporter binding profile of antidepressants and their metabolites. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(3), S.1305-1322.
- Paul, S.M. u. a., 1981. Does high affinity [3H] imipramine binding label serotonin reuptake sites in brain and platelet? *Life Sciences*, 28(24), S.2753-2760.
- Pletscher, A. & Tranzer, J.P., 1967. Action of reserpine and imipramine on intracellular storage of 5-hydroxytryptamine in blood platelets. *Experientia*, 23(4), S.289-291.
- Potter, L.T. & Axelrod, J., 1963. Studies on the storage of norepinephrine and the effect of drugs. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 140, S.199-206.
- Prescher, J.A. & Bertozzi, C.R., 2005. Chemistry in living systems. *Nature Chemical Biology*, 1(1), S.13-21.

- Ramamoorthy, S. u. a., 1993. Antidepressant- and cocaine-sensitive human serotonin transporter: molecular cloning, expression, and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(6), S.2542-2546.
- Randrup, A. & Braestrup, C., 1977. Uptake inhibition of biogenic amines by newer antidepressant drugs: relevance to the dopamine hypothesis of depression. *Psychopharmacology*, 53(3), S.309-314.
- Reasor, M.J. & Kacew, S., 2001. Drug-induced phospholipidosis: are there functional consequences? *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, 226(9), S.825-830.
- Rostovtsev, V.V. u. a., 2002. A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective „ligation“ of azides and terminal alkynes. *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 41(14), S.2596-2599.
- Rybakowski, J.K. & Twardowska, K., 1999. The dexamethasone/corticotropin-releasing hormone test in depression in bipolar and unipolar affective illness. *Journal of Psychiatric Research*, 33(5), S.363-370.
- Sadakane, Y. & Hatanaka, Y., 2006. Photochemical fishing approaches for identifying target proteins and elucidating the structure of a ligand-binding region using carbene-generating photoreactive probes. *Analytical Sciences: The International Journal of the Japan Society for Analytical Chemistry*, 22(2), S.209-218.
- Safiulina, D. u. a., 2006. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: Physiological role in neurons. *Journal of Cellular Physiology*, 206(2), S.347-353.
- Salzer, H.M. & Lurie, M.L., 1953. Anxiety and depressive states treated with isonicotinyl hydrazide (isoniazid). *A. M. A. Archives of Neurology and Psychiatry*, 70(3), S.317-324.
- Sánchez, C. & Hyttel, J., 1999. Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(4), S.467-89.
- Schiepers, O.J.G., Wichers, M.C. & Maes, Michael, 2005. Cytokines and major depression. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*, 29(2), S.201-217.
- Schildkraut, J.J., 1967. The catecholamine hypothesis of affective disorders. A review of supporting evidence. *International Journal of Psychiatry*, 4(3), S.203-217.
- Seydel, J.K. & Wassermann, O., 1976. NMR-studies on the molecular basis of drug-induced phospholipidosis--II. Interaction between several amphiphilic drugs and phospholipids. *Biochemical Pharmacology*, 25(21), S.2357-2364.
- Shao, L. u. a., 2008. Mitochondrial involvement in psychiatric disorders. *Annals of Medicine*, 40(4), S.281-295.

- Siuciak, J.A. u. a., 1997. Antidepressant-like effect of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 56(1), S.131-137.
- Speers, A.E. & Cravatt, B.F., 2004. Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chemistry & Biology*, 11(4), S.535-46.
- Speers, A.E., Adam, G.C. & Cravatt, B.F., 2003. Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), S.4686-7.
- Steffens, D.C., Krishnan, K.R. & Helms, M.J., 1997. Are SSRIs better than TCAs? Comparison of SSRIs and TCAs: a meta-analysis. *Depression and Anxiety*, 6(1), S.10-18.
- Stoffel, P. u. a., 1987. Subcellular distribution of the antidepressant drug desipramine in cultured human fibroblasts after chronic administration. Drug-effect on the subcellular distribution of accumulated phospholipids. *Biochemical Pharmacology*, 36(5), S.655-662.
- Stryjer, R. u. a., 2003. Amantadine as augmentation therapy in the management of treatment-resistant depression. *International Clinical Psychopharmacology*, 18(2), S.93-96.
- Tanaka, Y., Bond, M.R. & Kohler, J.J., 2008. Photocrosslinkers illuminate interactions in living cells. *Molecular bioSystems*, 4(6), S.473-480.
- Tanti, A. & Belzung, C., 2010. Open questions in current models of antidepressant action. *British Journal of Pharmacology*, 159(6), S.1187-1200.
- Tatsumi, M. u. a., 1997. Pharmacological profile of antidepressants and related compounds at human monoamine transporters. *European Journal of Pharmacology*, 340(2-3), S.249-258.
- Tornøe, C.W., Christensen, C. & Meldal, M., 2002. Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. *The Journal of Organic Chemistry*, 67(9), S.3057-3064.
- Tsankova, N.M. u. a., 2006. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nature Neuroscience*, 9(4), S.519-525.
- Twarog, B.M. & Page, I.H., 1953. Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination. *The American Journal of Physiology*, 175(1), S.157-161.
- Udenfriend, S., Weissbach, H. & Bogdanski, D.F., 1957. Effect of iproniazid on serotonin metabolism in vivo. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 120(2), S.255-260.
- Uranova, N. u. a., 2001. Electron microscopy of oligodendroglia in severe mental illness. *Brain Research Bulletin*, 55(5), S.597-610.
- Wang, Q. u. a., 2003. Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3 + 2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(11), S.3192-3193.

- Weinbach, E.C. u. a., 1986. Effects of tricyclic antidepressant drugs on energy-linked reactions in mitochondria. *Biochemical Pharmacology*, 35(9), S.1445-1451.
- Winokur, G., 1997. All roads lead to depression: clinically homogeneous, etiologically heterogeneous. *Journal of Affective Disorders*, 45(1-2), S.97-108.
- Xia, Z., Lundgren, B., Bergstrand, A., DePierre, J., u. a., 1999. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-XL. *Biochemical Pharmacology*, 57(10), S.1199-1208.
- Xia, Z., Lundgren, B., Bergstrand, A., DePierre, J.W., u. a., 1999. Changes in the generation of reactive oxygen species and in mitochondrial membrane potential during apoptosis induced by the antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram and the effects on these changes by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Biochemical Pharmacology*, 57(10), S.1199-1208.
- Xia, Z. u. a., 2000. Antidepressant-induced lipidosis with special reference to tricyclic compounds. *Progress in Neurobiology*, 60(6), S.501-512.
- Yung-Chi, C. & Prusoff, W.H., 1973. Relationship between the inhibition constant (KI) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I50) of an enzymatic reaction. *Biochemical Pharmacology*, 22(23), S.3099-3108.
- Zarate, C.A. u. a., 2006. A randomized trial of an N-methyl-D-aspartate antagonist in treatment-resistant major depression. *Archives of General Psychiatry*, 63(8), S.856-864.
- Zeller, E.A. u. a., 1952. Influence of isonicotinic acid hydrazide (INH) and 1-isonicotinyl-2-isopropyl hydrazide (IIH) on bacterial and mammalian enzymes. *Experientia*, 8(9), S.349-350.
- Zhang, W.-hua u. a., 2008. Nortriptyline protects mitochondria and reduces cerebral ischemia/hypoxia injury. *Stroke; a Journal of Cerebral Circulation*, 39(2), S.455-462.
- Zobel, A.W. u. a., 1999. Prediction of medium-term outcome by cortisol response to the combined dexamethasone-CRH test in patients with remitted depression. *The American Journal of Psychiatry*, 156(6), S.949-951.
- Zschocke, J., Bayatti, N. & Behl, C., 2005. Caveolin and GLT-1 gene expression is reciprocally regulated in primary astrocytes: association of GLT-1 with non-caveolar lipid rafts. *Glia*, 49(2), S.275-287.

8 Abkürzungen

16-BAC	Benzyltrimethyl-n-hexadecylammonium-chlorid
ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninsäure
BDNF	brain derived neurotrophic factor
BFA	Bifunktionelles Antidepressivum
cAMP	cyclic adenosine-mono-phosphate
cDNA	Complementary DNA
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CRH	Corticotropin releasing hormon
DEX	Dexamethason
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dT	Deoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FBS	Fötale Kälber-Serum
GABA	γ -Aminobuttersäure
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HEK	Human embryonic kidney
HT22	Hippokampale, neuronale Zelllinie
IC50	Mittlere Inhibitorische Konzentration
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IMI	Imipramin
MEM	Minimum essential media
MTT	Dimethylthiazolyl-diphenyl-tetrazolium-bromid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
NET	Norepinephrintransporter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
rcf	Relative centrifugal force (relative Zentrifugalkraft)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodium dodecylsulfat
SERT	Serotonintransporter
SSRI	Selektive Serotonin Reuptake Inhibitoren
Tamra	Tetramethylrhodamin
TBTA	Tris(Benzylthiazolylmethyl)amin
TCEP	Tris-Carboxyethylphosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifunktionelles Antidepressivum
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TZA	Trizyklische Antidepressiva

9 Anhang

Die K_d -, B_{max} - und K_i -Werte der stabilen Zelllinien (HEK-SERT-FLAG), HEK-SERT und HEK-NET) wurden mittels radioaktiver Bindungstests bestimmt und mit Literaturwerten verglichen. Die K_i - bzw. K_d -Werte der NET-überexprimierende Zelllinie stimmte weitgehend mit den in der Literatur gefundenen Werte überein (siehe Tab. 9-1 und Tab.). Für die SERT-überexprimierenden Zelllinien kam es zur Verschiebung der K_i - und K_d -Werte im Vergleich zu Literaturwerten (siehe Tab. 9-1 und Tab.). Der Grund hierfür konnte nicht geklärt werden. Für die Bewertung der chemisch modifizierten Antidepressiva (TFA, BFA-UV, BFA-Click) war vor allem die relative Abnahme der Affinität zur Referenzsubstanz IMI entscheidend, welche trotzdem bestimmt werden konnte.

Zelllinie	K_d [nM]	K_d [nM] Literaturwert	B_{max} [pmol/mg]	B_{max} ähnlicher in der Literatur beschriebener Zelllinien [pmol/mg]
HEK-SERT-FLAG	11,7	1,06	17 – 40	16,4
HEK-SERT	28,0	1,06	20 - 30	16,4
HEK-NET	3,0	1,24	5 - 9	2,5

Tab. 9-1: Vergleich der K_d - und B_{max} -Werte mit Literaturwerten (Apparsundaram u. a. 2008; Owens u. a. 1997): In Sättigungsexperimenten wurden die K_d - bzw. B_{max} -Werte der stabilen Zelllinien bestimmt. Dazu wurden Membranpräparationen mit steigenden Konzentrationen von [3 H]-Citalopram (HEK-SERT-FLAG- und HEK-SERT-Zellen) bzw. [3 H]-Nisoxetin (HEK-NET-Zellen) inkubiert. K_d - bzw. B_{max} -Werte wurden durch die Messung der an die Membranfraktion gebundenen Radioaktivität abzüglich der Hintergrundbindung berechnet.

Antidepressiva	HEK-SERT-FLAG	Literaturwerte für SERT			HEK-NET	Literaturwerte für NET	
	K_i [nM]	K_i [nM] (Barker u. a. 1994)	K_i [nM] (Owens u. a. 1997)	K_i [nM] (Tatsumi u. a. 1997)	K_i [nM]	K_i [nM] (Owens u. a. 1997)	K_i [nM] (Tatsumi u. a. 1997)
Amitriptylin	7,36 ± 1,36	8,4 ± 3,4	2,8 ± 0,1	4,3 ± 0,12	n.d.		
Desipramin	103 ± 15	54 ± 4,2	22 ± 1	17,6 ± 0,7	0,68 ± 0,16	0,63 ± 0,03	0,83 ± 0,05
Imipramin	12,6 ± 1,4	8,2 ± 3,4	1,3 ± 0,04	1,4 ± 0,03	44,4 ± 4,7	20 ± 0,54	37 ± 2
Lofepramin	994 ± 136			70 ± 4	13,2 ± 1,7		5,4 ± 0,4
Paroxetin	0,76 ± 0,12	0,05 ± 0,01	0,065 ± 0,006	0,13 ± 0,01			
Venlafaxin	66,7 ± 16,7		7,5 ± 0,4	8,9 ± 0,3			

Tab. 9-2: K_i -Werte unterschiedlicher Antidepressiva zu SERT bzw. NET im Vergleich zu Literaturwerten: Membranpräparationen der stabilen Zelllinien wurden mit [3 H]-Citalopram (HEK-SERT-FLAG- und HEK-SERT-Zellen) bzw. [3 H]-Nisoxetin (HEK-NET-Zellen) und steigenden Konzentrationen der zu bestimmenden, handelsüblichen Substanzen inkubiert. Messungen der gebundenen Radioaktivität erlaubten die Erstellung von Kompetitionskurven mit deren Hilfe die K_i -Werte bestimmt werden konnten.