

1	Einleitung	1
<b>1.1</b>	<b>Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie</b>	<b>3</b>
1.1.1	Prinzip der FCS	5
1.1.2	Theoretischer Hintergrund	7
1.1.3	Geräteaufbau	10
1.1.4	Voraussetzungen für FCS Messungen	11
1.1.4.1	Hintergrundfluoreszenz	11
1.1.4.2	Farbstoffe	12
1.1.4.3	Konstruktion von Liganden	14
1.1.5	FCS und Zellmessungen	15
<b>1.2</b>	<b>Mobilität von membranständigen Rezeptoren</b>	<b>16</b>
1.2.1	Membranmodell und Funktion	16
1.2.2	Rezeptorenmodelle	20
1.2.2.1	Der Benzodiazepinrezeptor des zentralen Chloridkanals	20
1.2.2.2	Der $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor	23
1.2.2.2.1	Klassifizierung	23
1.2.2.2.2	Funktion des $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors in den Atemwegen	26
1.2.2.2.3	Effektvermittlung und Regulation	26
1.2.2.2.4	Surfactant der Lunge	29
1.2.2.3	Der Insulinrezeptor	33
2	Zielsetzung	37
3	Experimenteller Teil	38
<b>3.1</b>	<b>FCS-Untersuchungen zur Mobilität von Ionenkanälen am Beispiel des Benzodiazepinrezeptors</b>	<b>38</b>
3.1.1	Voraussetzungen für einen geeigneten Liganden	38
3.1.2	Strukturfindung	38
3.1.3	Synthese von fluoreszenzmarkierten N-Desdiethylfluorazepam-Derivaten	40
3.1.4	Reinigung und Analytik der fluoreszenzmarkierten N-des-diethylfluorazepam-Derivate	40
3.1.5	Charakterisierung der Benzodiazepin-Bindungseigenschaften	41
3.1.5.1	FCS-Bindungsstudien am Antikörper	42
3.1.5.2	Radiorezeptor-Bindungsstudien	47
3.1.6	FCS-Bindungsstudien an hippocampalen Neuronen	49
3.1.6.1	Charakterisierung der hippocampalen Neurone	49
3.1.6.2	Rezeptor Bindungsstudien	51
3.1.7	Diskussion	56
<b>3.2</b>	<b>Untersuchungen zur Regulation des <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptors</b>	<b>60</b>
3.2.1	Der $\beta_2$ -adrenerge Rezeptor	60

3.2.2	Synthese fluoreszenzmarkierter Liganden für den $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor	61
3.2.3	Der Antagonist CGP12177a	62
3.2.3.1	Strukturanalyse des CGP12177a	62
3.2.3.2	Synthese des Oregon Green <sup>®</sup> -CGP12177a	63
3.2.3.3	Reinigung und Analytik des fluoreszenzmarkierten CGP12177a	63
3.2.3.4	Charakterisierung des OG-CGP12177a	64
3.2.3.5	FCS-Bindungsstudien an hippocampalen Neuronen	64
3.2.4	Das agonistische Catecholamin (-)Arterenol	68
3.2.4.1	Synthese eines fluoreszenzmarkierten (-)Arterenols	69
3.2.4.2	Reinigung und Analytik des fluoreszenzmarkierten (-)Arterenol	69
3.2.4.3	Bindungsstudien mit Alexa-NA	70
3.2.4.3.1	Bindungseigenschaften von Alexa-NA an hippocampalen Neuronen	70
3.2.4.3.2	Bindungseigenschaften des Alexa-NA an A549 Zellen	75
3.2.5	Nachweis der Internalisierung des Alexa-NA	80
3.2.6	Diskussion	81
<b>3.3</b>	<b>Saponine aus <i>Hedera helix</i> L. mit Wirkung auf die Regulation der <math>\beta_2</math>-adrenergen Rezeptoren</b>	<b>86</b>
3.3.1	<i>Hedera helix</i> L.	86
3.3.1.1	Systematik	86
3.3.1.2	Morphologie	86
3.3.1.3	Inhaltstoffe	87
3.3.1.3.1	Saponine	87
3.3.1.3.1.1	Polyine	90
3.3.1.3.1.2	Phenolische Inhaltstoffe	90
3.3.1.3.1.3	Weitere Inhaltsstoffe	90
3.3.1.4	Pharmakologie der Hederasaponine	91
3.3.2	Untersuchungen am $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor	92
3.3.2.1	Eigenschaften der eingesetzte Substanzen	93
3.3.2.2	Eignung der Substanzen für FCS-Versuche	93
3.3.2.3	Untersuchung des Einflusses der Hederinhaltsstoffe auf den $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors	94
3.3.2.3.1	FCS-Bindungsstudien am $\beta_2$ -adrenergen Rezeptor	94
3.3.2.3.1.1	Einfluss des $\alpha$ -Hederins	95
3.3.2.3.2	Detektion der Internalisierung über Laser Scanning Mikroskopie	99
3.3.3	Diskussion	101
<b>3.4</b>	<b>Untersuchungen zur Rezeptormobilität des Insulinrezeptors und Bindungsstudien</b>	<b>104</b>
3.4.1	Markierung von Insulin mit Alexa <sup>®</sup> 532	105
3.4.2	Reinigung	105
3.4.3	Bindungsstudien an A549 Zellen	106
3.4.4	Kompetitionsstudien am Insulinrezeptor	107
3.4.5	Untersuchung zur Mobilität des Insulinrezeptors	109

3.4.6	Diskussion	111
4	Zusammenfassung und Ausblick	115
5	Material und Methoden	121
<b>5.1</b>	<b>Geräte</b>	<b>121</b>
5.1.1	HPLC-Ausstattung	121
5.1.2	FCS	121
5.1.3	Spektroskopie und Spektrometrie	121
5.1.3.1	UV/Vis-Spektroskopie	121
5.1.3.2	Massenspektrometrie	122
5.1.3.3	NMR-Spektroskopie	122
<b>5.2</b>	<b>Synthese und Analytik der fluoreszenzmarkierten Liganden</b>	<b>122</b>
5.2.1	Fluorezenzmarkierung des N-Des-diethylfluorazepam (Ro 7-1986/602)	122
5.2.2	Analytik und Reinigung der fluoreszenzmarkierten Ro 7-1986/602-Derivate	123
5.2.3	Synthese von Oregon Green-CGP12177a	123
5.2.4	Analytik und Reinigung des Oregon Green <sup>®</sup> -CGP12177a	123
5.2.5	Synthese und Analytik des fluoreszenzmarkierten Alexa-Noradrenalin	124
5.2.6	Synthese des fluoreszenzmarkierten Alexa-Insulin	124
5.2.7	FCS-Bindungsstudien am Antikörper	125
5.2.8	Radiorezeptor-Bindungsstudien am Antikörper	125
5.2.9	Datenauswertung der Antikörperbindungsstudien	125
<b>5.3</b>	<b>Zellkulturen</b>	<b>125</b>
5.3.1	Kultur postnataler hippocampaler Neurone	125
5.3.2	Kultur pränataler hippocampaler Neurone	126
5.3.3	A549 Zellen	126
5.3.4	Immunzytochemische Färbemethoden	127
5.3.4.1	Differenzierung der hippocampalen Neuronenmischkultur	127
5.3.4.2	Konfokale Laser Scanning Mikrosokopie	128
5.3.4.2.1	Bindungsversuch mit Alexa-NA	128
5.3.4.2.2	Immunzytochemische Lokalisation der $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren	128
<b>5.4</b>	<b>FCS-Bindungsstudien an der Zellkultur</b>	<b>129</b>
5.4.1	Vorbereitung der Zellen	129
5.4.2	Bindung des Alexa-Ro an pränatalen hippocampale Neurone	130
5.4.3	Bindung von OG-CGP12177a an pränatale hippocampale Neurone	130
5.4.4	Bindung von Alexa-NA an pränatale hippocampale Neurone und A549 Zellen	130
5.4.4.1	Untersuchung der Inhaltsstoffe aus Hedera helix L.	131
5.4.5	Bindungsstudien mit Alexa-Insulin an A549 Zellen	131
5.4.6	Kompetitionsstudien mit Alexa-Insulin an A549 Zellen	131
5.4.7	Statistische Auswertung	132

---

<b>5.5</b>	<b>Lösungen</b>	<b>132</b>
<b>5.6</b>	<b>Verwendete Substanzen</b>	<b>133</b>
6	Danksagung	136
7	Literaturverzeichnis	138
8	Anhang	155
<b>8.1</b>	<b>Spektren der verwendeten Fluorophore</b>	<b>155</b>
<b>8.2</b>	<b>Poster, Publikationen, Vorträge</b>	<b>156</b>
8.2.1	Publikationen	156
8.2.2	Poster	157
8.2.3	Vorträge	158
<b>8.3</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>159</b>