

2. Material und Methoden

2.1. Theoretische Grundlagen

Der Begriff "Rezeptor" wurde durch Paul Ehrlich (1913), als der Wirkungsort pharmakologisch wirksamer Substanzen, geprägt. Der heutige Rezeptorbegriff hat eine genaue Form gefunden: Der Rezeptor ist bei einer therapeutischen Konzentration des Pharmakons ein einziger Bindungsort. Dieser ist eine spezifische Bindungsstelle, da die Dissoziationskonstante dieses Rezeptor-Liganden-Komplexes deutlich unterhalb der Dissoziationskonstanten anderer Bindungsstellen liegt. Letztere heißen unspezifische Bindungsstellen. Der Rezeptor ist ein körpereigener Zielort für endogene Liganden; diese Rezeptor-Liganden-Wechselwirkung ist Grundlage einer endogenen Regulatorfunktion. Diese Regulatorfunktion kann durch exogen zugeführte Liganden in Form von Pharmaka gezielt beeinflusst werden. Membranrezeptoren sind Membranproteine die Teil eines endogenen Signalweiterleitungssystems an der Zellmembran sind (Repke, Liebman, 1987).

Es wurde eine Radioligandenbindungsstudie durchgeführt. Der Typ der Bindungsexperimente war das Sättigungsexperiment. Das gebräuchlichste Transformationsverfahren zur Ermittlung der Bindungsdaten (Rezeptordichte (B_{\max}), Dissoziationskonstante (K_D)) von Sättigungsexperimenten ist die lineare Regression nach Scatchard (1949).

Bei einem Sättigungsexperiment wird der in der Membranpräparation enthaltene Rezeptor (R) mit systematisch steigenden Konzentrationen des radioaktiven Liganden (A) inkubiert. Die gebildeten Rezeptor-Ligandenkomplexe (RA) werden vom freien Liganden durch Filterung abgetrennt. Die Radioaktivität des im Filter zurückgebliebenen Liganden wird bestimmt (Gesamtbindung). Parallel wird die unspezifische Bindung mit einem nichtmarkierten, rezeptorspezifischen, chemisch unterschiedlichen Liganden bestimmt. Die unspezifische Bindung ist nicht sättigbar und steigt linear an. Die sättigbare, spezifische Bindung wird durch Subtraktion der unspezifischen Bindung von der Gesamtbindung bestimmt. Am Anfang befinden sich zwei Reaktanden in Lösung: die Bindungsstellen (Rezeptoren, R) und die Liganden (A). Die Bildungsgeschwindigkeit von Rezeptor-Ligandenkomplex ist um so größer, je größer die Rezeptorkonzentration und die

Ligandenkonzentration ist. Die Zunahme der Rezeptor-Ligandenkomplexe $+\Delta[RA]_{\text{on}}$ ist also proportional der Konzentration noch freier Rezeptoren $[R]$, noch freier Liganden $[A]$ und der Beobachtungsdauer Δt :

$$(1) \Delta[RA]_{\text{on}} \sim [A] * [R] \Delta t$$

Die Indizierung "on" ist notwendig, da jeder Rezeptor-Ligandenkomplex nur eine bestimmte Lebensdauer hat. Neben der Entstehung von Rezeptor-Ligandenkomplexen muß auch deren Zerfall berücksichtigt werden. Die Anzahl der Rezeptor-Ligandenkomplexe, die spontan in Rezeptor und Ligand zerfallen, ist proportional zur Konzentration der vorhandenen Rezeptor-Ligandenkomplexe und zur Beobachtungsdauer Δt .

$$(2) -\Delta[RA]_{\text{off}} \sim [RA] * \Delta t$$

Proportionalität besagt, daß der Quotient der linken und rechten Seite der Beziehungen (1) bzw. (2) eine Konstante ist; diese heißt Geschwindigkeitskonstante der Hin- (k_{on}) und der Rückreaktion (k_{off}).

Beide Konstanten unterscheiden sich in ihrer Dimension. Mit der Einführung dieser Konstanten erhalten wir die folgenden Gleichungen

(3) und (4):

$$(3) \Delta[RA]_{\text{on}} / \Delta t = k_{\text{on}} * [A] * [R]$$

$$(4) \Delta[RA]_{\text{off}} / \Delta t = k_{\text{off}} * [RA]$$

Da der Zerfall der Rezeptor-Ligandenkomplexe proportional zur Konzentration der entstehenden Komplexe zunimmt, muß sich ein Zustand ausbilden, bei dem genau so viele Rezeptor-Ligandenkomplexe pro Zeiteinheit zerfallen, wie entstehen. Die Summe aus $\Delta[RA]_{\text{on}}$ und $\Delta[RA]_{\text{off}}$ muß dann Null ergeben.

$$(5) \Delta [RA]_{\text{on}} / \Delta t + \Delta [RA]_{\text{off}} / \Delta t = 0$$

$$k_{\text{on}} * [A] * [R] - k_{\text{off}} * [RA] = 0$$

Umgeformt ergibt sich das Massenwirkungsgesetz. Es besagt, daß im Gleichgewicht pro Zeiteinheit genausoviel Rezeptor-Ligandenkomplexe gebildet werden wie zerfallen.

$$(6) \Delta [RA]_{\text{on}} / \Delta t = \Delta [RA]_{\text{off}} / \Delta t$$

Dieser Zustand des kinetischen Gleichgewichts heißt Equilibrium. Die charakteristische Gleichung des Equilibriums lautet:

$$(7) K_d = k_{\text{off}} / k_{\text{on}} = [A] * [R] / [RA]$$

Der Quotient aus k_{off} und k_{on} heißt Equilibrium-Dissoziationskonstante.

Aus der Gleichung (7) ist die Zeit Δt verschwunden, da wir nicht mehr die differenziellen Vorgänge betrachten, sondern nur noch die Konzentration der Rezeptor-Ligandenkomplexe in der Gesamtbilanz.

Die Gesamtzahl der Rezeptoren (ihre Konzentration) ist im Experiment begrenzt und jeder Rezeptor kann nur im freien $[R]$ oder besetzten $[RA]$ Zustand vorliegen. Unter diesen Berücksichtigungen erhält man die Massenbilanz:

$$(8) R_T = [R] + [RA]$$

R_T steht für die Gesamtkonzentration (totale Konzentration) der Rezeptoren. Ab jetzt wird für R_T der häufigere Terminus B_{max} benutzt.

$$(9) B_{\text{max}} = [R] + [RA]$$

Setzt man in die Gleichung (7) für $[R]$ die Differenz aus B_{\max} und $[RA]$ ein, so erhält man nach weiteren Umformungen die Sättigungsisotherme:

$$K_d * [RA] = [A] * [R]$$

$$K_d * [RA] = [A] * (B_{\max} - [RA])$$

$$K_d * [RA] = [A] * B_{\max} - [A] * [RA]$$

oder

$$[RA] * (K_d + [A]) = B_{\max} * [A]$$

$$(10) \quad [RA] = B_{\max} * [A] / (K_d + [A])$$

$$(10a) \quad [RA] = B_{\max} / (1 + K_d / [A])$$

$$(11) \quad [RA] / B_{\max} = 1 / (1 + K_d / [A])$$

Gleichung (10) beschreibt die Konzentration der Rezeptor-Ligandenkomplexe $[RA]$ in Abhängigkeit von der Konzentration der noch freien Liganden $[A]$ nach Einstellung des Equilibriums. In praktischer Anwendung sagt die Gleichung aus, daß die Konzentration gebundener Liganden oder besetzter Rezeptoren $[RA]$ im Konzentrationsbereich von $0,1 * K_d$ bis $10 * K_d$ für $[A]$ (im Bereich zweier Zehnerpotenzen) von 9,1% auf 91% der maximal möglichen Bindung B_{\max} ansteigt. (Wenn diese Bedingung erfüllt wird, resultiert eine "Gerade" in der Scatchard-Transformation. = "gerader Scatchard")

Betrachtet man den Fall, daß die Anzahl der gebundenen Rezeptoren gerade die Hälfte der Rezeptoren ausmacht, die maximal eine Bindung eingehen können ($[RA] = \frac{1}{2} B_{\max}$), dann ist auch die Anzahl der gebundenen Liganden gerade die Hälfte der maximal bindbaren Liganden. Die dafür erforderliche freie Ligandenkonzentration heißt $[A]50\%$. Daraus ergibt sich nach Einsetzen in die Gleichung (10):

$$(12) [RA] = 1/2 B_{\max} = B_{\max} * [A]_{50\%} / (K_d + [A]_{50\%})$$

Daraus folgt durch Umstellung:

$$(13) K_d + [A]_{50\%} = 2 * [A]_{50\%}$$

$$(14) K_d = [A]_{50\%}$$

Das bedeutet: Die Dissoziationskonstante entspricht der Konzentration des Liganden bei der die Hälfte der Rezeptoren besetzt sind.

Die Dissoziationskonstante kann graphisch aus einer Sättigungskurve, oder aus der linearen Transformation nach Scatchard (Scatchard 1939) ermittelt werden.

In der Scatcharddarstellung wird die Menge des gebundenen Liganden $[RA] = B$ (auf der X-Achse) gegen den Quotienten des gebundenen Liganden $[RA]$ dividiert durch den freien Liganden $[A]$,

also $[RA] / [A] = B/F$ (auf der Y-Achse), aufgetragen. Durch Umformung der Gleichung (10a) entsteht:

$$(15) [RA] / [A] = 1/ K_d * (B_{\max} - [RA])$$

Die Voraussetzungen für eine lineare Scatcharddarstellung sind:

- der Ligand darf nur an einen Rezeptor binden,
- Rezeptor und Ligand müssen mit einer konstanten Affinität binden,
- es dürfen keine Kooperationsphänomene auftreten.

Bindung an einen Rezeptor mit unterschiedlichen Affinitäten ergebe eine Scatcharddarstellung mit zwei oder mehr Tangenten.

2.2. Probanden

Es wurden 38 männliche, junge Probanden rekrutiert. Ihr Alter betrug zu Beginn der Studie 21 bis 28 Jahre. Ihr mittleres Alter betrug 23,9 Jahre. Psychiatrische oder internistische Vorerkrankungen waren bei keinem der Probanden bekannt. Eine bestimmte Diät wurde von keinem Probanden während der Zeit der Blutabnahmen eingenommen. Keiner der Probanden erhielt eine medikamentöse Therapie. Während der Studiendauer wurden von keinem Probanden Drogen eingenommen. Die Probanden unterschrieben nach einer entsprechenden Aufklärung über die Studie eine Einverständniserklärung.

2.2.1. Probengewinnung

Jedem Probanden wurden insgesamt zwölf Blutproben entnommen. Jeden Monat wurde jedem Probanden eine Blutprobe entnommen. Der Abnahmezeitraum erstreckte sich von März 1993 bis Mai 1994. Die Probanden waren in Gruppen eingeteilt. Jede Gruppe erschien einmal im Monat zur Blutabnahme. Somit war aufgrund der kleinen Gruppenstärke eine Verarbeitung der Proben innerhalb von zwei Stunden nach der Blutabnahme gewährleistet. In der ersten, zweiten und vierten Gruppe befanden sich 9, in der dritten Gruppe 11 Personen. Das Blut wurde morgens (8 Uhr bis 10 Uhr) abgenommen. Die Probanden mußten nüchtern erscheinen. Jedem Probanden wurden sitzend, bei geschlossenem Stauschlauch, 50 ml venöses Blut langsam abgenommen. Das Blut wurde in Sarstedt-Monovetten^R abgenommen und bis zur Zentrifugation bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.2.2. Thrombozytengewinnung

Das Blut wurde innerhalb zwei Stunden nach der Blutabnahme bei 180 g und 18°C für 15 min zentrifugiert. Die Zentrifugenbremse war dabei abgeschaltet. Das mit Plättchen angereicherte Plasma wurde mit deutlichem Abstand zum Lymphozytenkonus abpipettiert, dann bei 1500 g und 4°C zentrifugiert (Megafuge 2. OR, Heräus). Das so gewonnene Thrombozytenpellet wurde unverzüglich bei -75°C eingefroren und bis zur Verwendung bei dieser Temperatur gelagert.

Fortsetzung der Tabelle 10, Abnahmetabelle

	Y3/4	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/5	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/6	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/7	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/8	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/9	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/10	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y3/11	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y4/1	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
ausgeschieden	Y4/2	0	0	x	x	x	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ausgeschieden	Y4/3	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	0	0	x	0	0
	Y4/4	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
	Y4/5	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	0
ausgeschieden	Y4/6	0	0	x	x	0	x	x	x	0	x	0	0	x	0	0
ausgeschieden	Y4/7	0	0	x	x	x	x	0	x	x	x	x	x	x	0	0
	Y4/8	0	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
	Y4/9	0	0	0	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

Die oben stehende Tabelle gibt Übersicht über den Zeitpunkt der einzelnen Blutabnahmen bei jedem einzelnen Probanden. Ein "x" steht für eine stattgefundene Blutabnahme. Eine "0" steht für eine nichtstattgefundene Blutabnahme. Von den ursprünglich 38 Probanden gelangten 32 in die Endauswertung. Bei diesen 32 konnten 12 Proben ohne Lücke gewonnen werden. 6 Probanden schieden wegen unvollständigem Datensatz für die Auswertung aus.

2.3. Membranpräparation für Bindungsexperimente

Um den Abbau der Rezeptoren durch endogene Proteasen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeitsschritte bei 4°C auf Eis durchgeführt. Das Thrombozytenpellet wurde langsam in Eiswasser (1/2 h) aufgetaut. Dann wurde es in 5 ml hypotonem Homogenisationspuffer (5 mmol/l, EDTA 1,0 g/l, Tris-Base 0,067 g/l, Tris-HCl 0,702 g/l, pH 7,4 bei 4°C; (Geaney et

al.,1984) resuspendiert. Die Suspension wurde 20 mal mit einem Handhomogenisator(B. Braun, enghalsig, 10 ml) vorsichtig homogenisiert. Das Homogenisat wurde dann bei 45.000 g, 4°C für 10 min in der Ultrazentrifuge (Centricon, T124, Du Pont) zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde dreimal ausgeführt. Das Pellet wurde im dritten Durchgang abschließend im Inkubationspuffer I (50 mmol/l, pH 7,3 bei 24°C, Tris HCl 6,61 g/l, Tris Base 0,97 g/l, NaCl, 7,013 g/l, KCl, 0,3728 g/l, MgCl₂ 0,4066 g/l) resuspendiert und homogenisiert. Vor den Bindungsexperimenten wurde die Proteinmenge auf eine Konzentration von 0,3-0,5 mg/ml verdünnt, um ein Verstopfen der Whatmen-GF/B-Filter zu verhindern. Dazu wurde die Proteinbestimmung nach Bradford et al. (1976) benutzt. Steckler et al. (1993) hatte in diesem Labor gezeigt, daß bei einer Proteinkonzentration von 0,3 bis 0,5 mg/ml stabile K_d und B_{max}-Werte zu ermitteln sind.

2.4. Durchführung der Radioligandenbindungsexperimente

Die 5-HT₂-Rezeptoren wurden mit der Substanz (N-Methyl-³H)-Lysergsäurediäthylamid, (spezifische Aktivität: , 65,2 Ci/mmol, Fa. NEN Research Products) markiert. Die Reinheit der Substanz wurde durch dünnschichtchromatische Tests verifiziert. ³H-LSD ist ein hochspezifischer, nicht selektiver Ligand für 5-HT-Rezeptoren. Er hat eine niedrige unspezifische Bindung und eine stabile Tritium-Markierung. ³H hat eine Halbwertszeit von 12,3 Jahren.

Der 5-HT₂-Rezeptor wird durch die Verdrängung des ³H-LSD's durch den hochspezifisch an den 5-HT₂-Rezeptor bindenden 5-HT₂-Antagonisten Spiroperidol von den 5-HT₁-Rezeptoren unterschieden (Peroutka, Snyder, 1979), (Hartig, 1989). Es wurden vier Verdünnungen ³H-LSD (im Bereich von 0,5-4 nM) für die Bindungsexperimente eingesetzt. Weitere Arbeitsgruppen haben LSD und/oder Spiroperidol als Liganden eingesetzt: (McBride et al., 1983), (Geaney et al., 1984), (Cowen et al. 1987), (Elliot und Kent, 1989).

Dem Protokoll von (Geaney et al., 1984) folgend: wurden 400 mikroliter Membransuspension (0,12-0,25 mg Protein) und 50 mikroliter ³H-LSD (0,25-2 nM), für die TB mit 50 mikroliter Inkubationspuffer II (mit Ascorbinsäure), für die NSB mit 300 nM

Spiroperidol (in 50 Mikroliter Inkubationspuffer II gelöst), in 96`er Mikrotiterplatten, mit einem Fassungsvermögen von einem ml/well, für 3 h bei 37°C in einem Gesamtansatz von 500 Mikrolitern inkubiert. Die Inkubation wurde mit 500 Mikroliter 4°C kaltem Stoppuffer unterbrochen. Die Thrombozytenmembranen wurden unverzüglich mit einem Cell Harvester mittels Unterdruck geerntet. Als Filter dienten Whatmen-GF/B-Streifen die zuvor 1h in 0.3% PEI vorbehandelt wurden. Nach dem Ernten wurden die Filter zweimal mit dem Stoppuffer gewaschen, für eine Stunde getrocknet, mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit überschichtet, geschüttelt, und bei einer Effizienz von 55% im β -Counter ihre radioaktive Aktivität gemessen. Die totale ^3H -LSD-Bindung an die Membranen überschritt dabei nie 5% der Gesamtaktivität. Die Aktivität der SB betrug 40-75% der TB. Diese Bedingungen erlaubten die vollständige Äquilibration des Radioliganden mit dem Rezeptorkomplex. Jeder Meßpunkt wurde dreifach bestimmt.

2.4.1. Kurzfassung der Methodik der Radioligandenbindungsexperimente

Material:

Protein: 0,12-0,25 mg/well

Tracer: ^3H -LSD (0,5-4 nM), 65,2 Ci/mmol

Competitor: Spiroperidol 300 nM

Inkubationspuffer I: Tris-HCl 6,61 g/l, Tris-Base 0,97 g/l, NaCl, 120 mM, KCl, 5 mM, MgCl₂, 2 mM

Inkubationspuffer II: Tris-HCl 6,61 g/l, Tris-Base 0,97 g/l, NaCl, 120 mM, KCl, 5 mM, MgCl₂, 2 mM, Ascorbinsäure 5,0 g/l

Stoppuffer: Tris-Base 0,67 g/l, Tris-HCl 7,02 g/l

Durchführung:

- 1 Gesamtvolumen je well: 500 mikroliter (400 mikroliter Membransuspension, 50 mikroliter ^3H -LSD, für TB 50 mikroliter Inkubationspuffer II ohne Spiroperidol, für NSB 50 mikroliter Inkubationspuffer II mit Spiroperidol)
- 2 Inkubationsbedingungen: 3h, 37°C
- 3 Filturvorkubation: 1h, Raumtemperatur
- 4 Stoppen der Bindungsreaktion mit Stoppuffer, 500 mikroliter, 4°C
- 5 Vakuum-Filtration
- 6 Zweimaliges Waschen der Filter mit dem Stoppuffer durch das Vakuumfiltrationsgerät
- 7 Lufttrocknen der Filter für 1h bei Raumtemperatur
- 8 Überschichten der Filter mit Szintillationsflüssigkeit
- 9 Messung der gebundenen Radioaktivität

2.5 Proteinbestimmung

2.5.1 Proteinbestimmung nach Bradford et al. (1976)

Das in einer sauren Lösung vorliegende Coomassie Brillant Blau G 250 verändert sein Extinktionsmaximum von 464 nm auf 595 nm, wenn es an Proteine bindet. Die Färbung der Lösung ist dann annähernd proportional zur Proteinkonzentration. Diese Methode ermöglicht

eine schnelle Feststellung von Proteinmengen, liefert jedoch bei der Proteinbestimmung von Membranproteinen sehr ungenaue Daten.

Die Extinktion wurde in einem Spektralphotometer (PCP 6121) der Firma Eppendorf bei 578 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Dieses wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,05-1,0 mg/ml verdünnt und eingesetzt. Dieser Test wurde benutzt um die vorhandene Proteinmenge des Thrombozytenpellets auf eine Konzentration verdünnen zu können, bei der die Whatmen-GFB-Filter nicht verstopfen. Jede Proteinbestimmung wurde dreifach durchgeführt.

2.5.2 Proteinbestimmung mit Pierce BCA-Reagenz

Die Proteinbestimmung nach Pierce (Pierce et al. 1977, Smith et al. 1985) besteht aus zwei Schritten. Der erste Schritt ist die bekannte Biuret-Reaktion (Protein reduziert Cu^{2+} in alkalischem Medium zu Cu^{1+}). Im zweiten Schritt reagiert das Cu^{1+} mit zwei BCA-Molekülen. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 562 nm. Die Extinktion wurde in einem Spektralphotometer (Spectrophotometer I -3) der Firma Syva bei 562 nm gemessen. Als Standard diente Rinderserumalbumin. Dieses wurde in einem Konzentrationsbereich von 0,05-1,0 mg/ml verdünnt und eingesetzt.

Diese Methode ermöglicht eine sehr genaue Feststellung von Proteinmengen, ist jedoch zeitaufwendig.

Dieser Test wurde benutzt um die Proteinmenge die in den Radioligandenbindungstests eingesetzt wurde, endgültig zu bestimmen. Jede Proteinbestimmung wurde dreifach durchgeführt. Der Mittelwert der drei Messungen wurde zur weiteren Berechnung der Bindungsdaten verwandt.

2.6. Auswertung und graphische Darstellung

Anhand des Datensatzes des Probanden Y1/6 und seiner siebenten Probe (die am 14.10.1993 abgenommen wurde) wird das angewendete Verfahren der graphischen Auswertung nach Scatchard dargestellt.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die im Bindungsassay ermittelten Daten.

Tabelle 11, Beispiel eines aus einem Radioligandenbindungsexperiment gewonnenen Datensatzes

Ansatz	³H-LSD (nmol)	freies ³H-LSD (cpm)	TB (cpm)	NSB (cpm)	SB (cpm)
1	0,5	15510	415 409 412	161 132 132	270
2	1	43304	817 824 820	304 366 335	485
3	2	91460	1147 1210 1273	591 563 577	632
4	4	225910	2271 2207 2152	1342 1386 1297	868

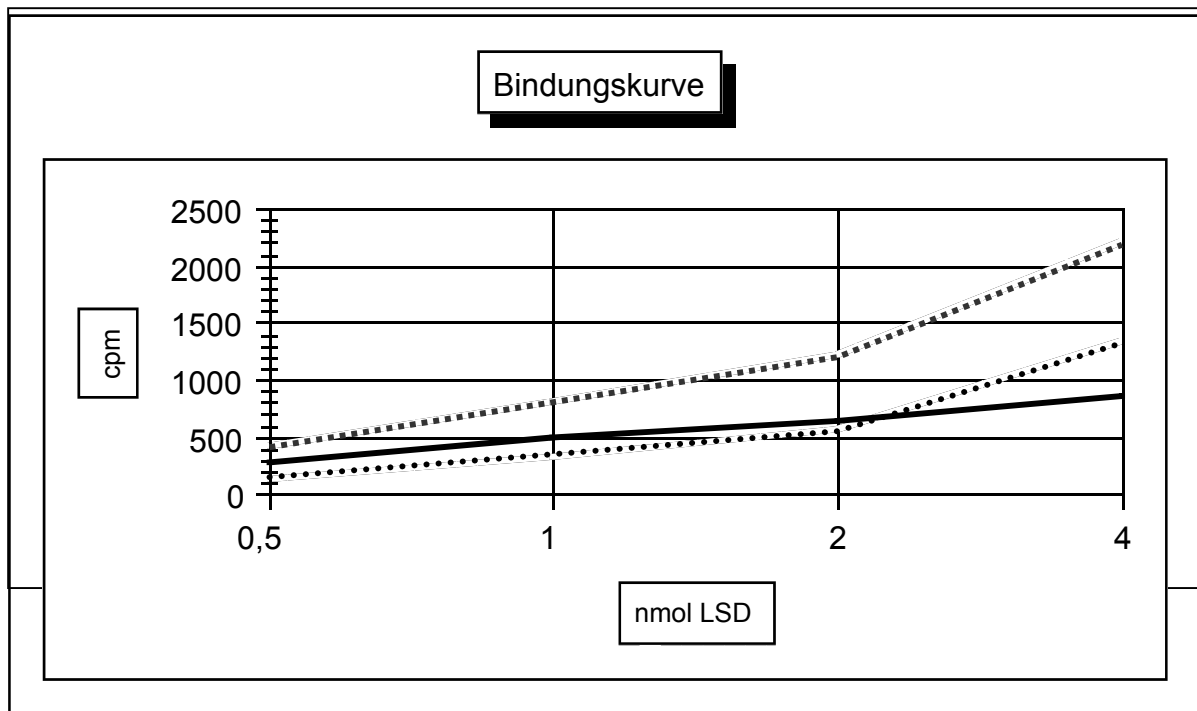
[TB = totale Bindung]

[NSB = unspezifische Bindung]

[SB = spezifische Bindung]

Die folgende Abbildung zeigt die Sättigungskurven für die totale Bindung (TB, Quadrate), die nichtspezifische Bindung (NSB, Kreise), die spezifische Bindung (SB, schwarze Linie).

Abbildung 1, Bindungskurven eines Radioligandenbindungsexperiments

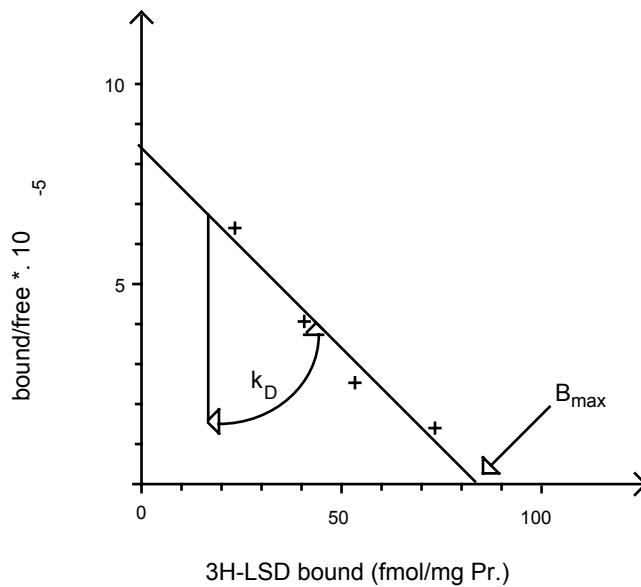


(Dargestellt sind Bindungskurven, die in ihrer Form von der erwarteten Form von Sättigungskurven aufgrund der nichtlinearen Einteilung der Abszisse abweichen.)

Für jeden Ansatz (1-4) wurde aus der dreifach bestimmten TB und NSB der jeweilige Mittelwert (cpm) errechnet. Aus diesen errechnete sich die SB. Die eingesetzte Proteinkonzentration betrug in diesem Test 0,348 mg/ml (0,1392 mg/Ansatz).

Es wurde die graphische Darstellung einer linearen Regression nach Scatchard (Scatchard et al. 1949) erstellt (siehe auch Kapitel 2.1.1). Der gebundene Anteil des $^3\text{H-LSD}$ ($[\text{RA}]$) wurde auf der Abszisse gegen den Quotienten gebunden/frei ($[\text{RA}] / [\text{A}]$) auf der Ordinate aufgetragen. Die durch lineare Regression ermittelte Gerade zeigt im Schnittpunkt mit der Abszisse die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) an; der negative Kehrwert der Steigung der Geraden entspricht ihrer Dissoziationskonstante (K_d).

Abbildung 2, Graphische Darstellung einer linearen Regression nach Scatchard



X-Achse:	$[RA]$
Y-Achse:	$[RA] / [A]$
Intercept mit der X-Achse:	B_{\max}
Slope:	$-1 / K_d$

Der Schnittpunkt mit der Abszisse liegt bei 82,8 fmol/mg Protein. Der aus der Steigung ermittelte K_d -Wert beträgt 0,9846 nmol/l; der Korrelationskoeffizient der Geraden-0,9816.

Die folgende Tabelle zeigt einen vollständigen Datensatz für die Bindungsdaten eines Probanden (Y1/1). Es wurden 12 Blutabnahmen vorgenommen. Es wurden daher 12 Tests durchgeführt. In jedem Test wurden 4 Ansätze gemessen (0,25 bis 2). Für jeden Test wurde die Menge an total eingesetztem ^3H -LSD bestimmt (totale Counts). Angegeben werden in der Tabelle die Mittelwerte (in cpm) der TB, NSB, SB der 12 Proben für alle Ansätze und die in den Tests eingesetzten totalen Counts. Die TB und NSB wurden dreifach bestimmt. Daher ergibt sich bei 12 Messungen eine jeweilige Anzahl von 36. Die SB wurde aus TB und NSB errechnet, ergibt also 12.

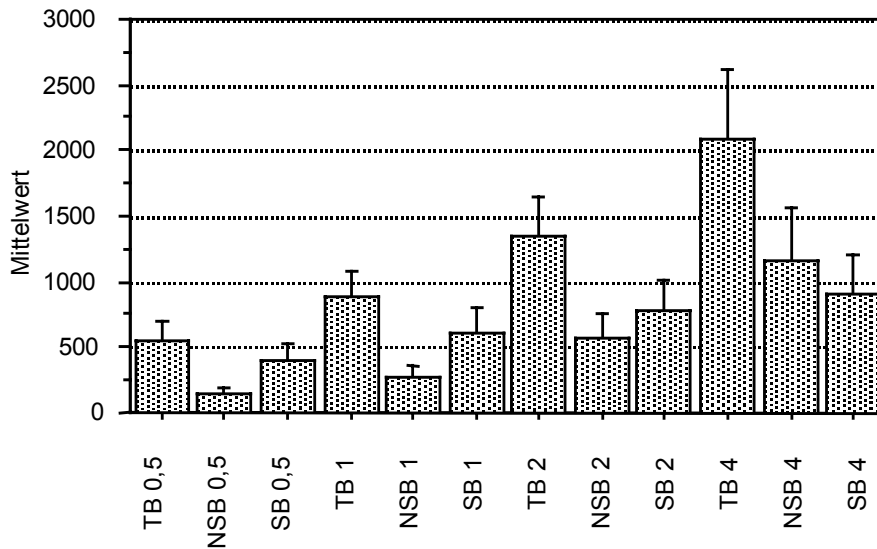
Tabelle 12, Beispielhafte Übersicht über alle Bindungsdaten eines Probanden

[cpm]	Mittelwert	Anzahl	Standard.Abweichung
TB-0,5	557	36	133
NSB-0,5	152	36	46
SB-0,5	405	12	129
TB-1	892	36	188
NSB-1	282	36	87
SB-1	610	12	182
TB-2	1360	36	297
NSB-2	575	36	192
SB-2	787	12	236
TB-4	2088	36	530
NSB-4	1172	36	402
SB-4	917	12	282
³ H-LSD-0,5	17034	12	1874
³ H-LSD-1	37152	12	4900
³ H-LSD-2	78484	12	14077
³ H-LSD-4	157928	12	11737

(TB = totale Bindung, NSB = unspezifische Bindung, SB = spezifische Bindung)

Das folgende Balkendiagramm zeigt graphisch die Mittelwerte (cpm) und Standardabweichung der totalen Bindung (TB), der nichtspezifischen Bindung (NSB), der spezifischen Bindung (SB) der Tests aller 4 Konzentrationen des Probanden Y1/1.

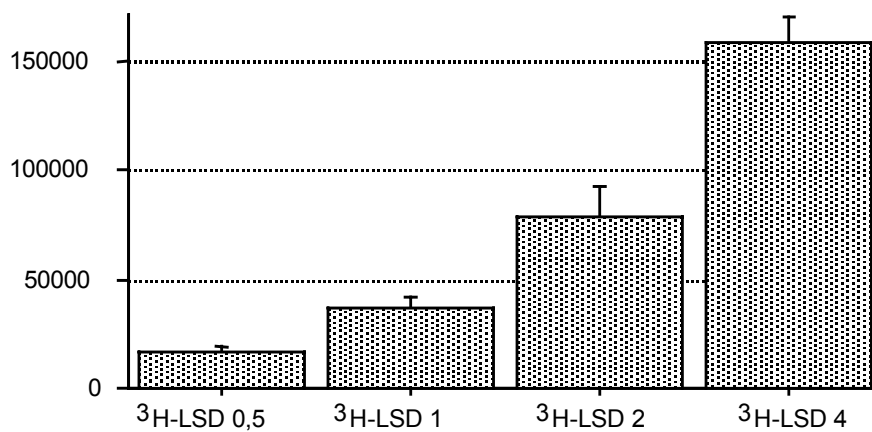
Abbildung 3, Beispielhafte Balkendiagrammdarstellung der Bindungsdaten des Probanden Y1/1



(TB = totale Bindung, NSB = unspezifische Bindung, SB = spezifische Bindung)

(Cell Mean = Mittelwert im jeweiligen Balken)

Abbildung 4, Balkendiagrammdarstellung der Mittelwerte (cpm) und Standardabweichung der eingesetzten totalen Counts in den 4 Ansätzen



(Ordinate zeigt den Mittelwert im jeweiligen Balken)

2.7. Statistik

Die Daten der Monatswerte der Rezeptordichten (B_{\max} und K_d) werden als Mittelwerte \pm Standardabweichung der Mittelwerte angegeben. Die statistische Signifikanz, ob ein Unterschied zwischen den Monatsmittelwerten besteht, wurde mit einer Meßwiederholungs-Varianzanalyse (ANOVA) für verbundene Stichproben bestimmt. Als signifikant wurde ein p-Wert kleiner 0,05 angesehen.

Die sich unterscheidenden Jahreszeiten wurden mit einem gepaarten T-Test für verbundene Stichproben ermittelt. Es wurde das multiple Vergleichsverfahren nach Bonferroni und Dunn für den Vergleich aller paarweisen Unterschiede für p Mittelwerte implementiert. Als signifikant wurde also ein p-Wert von $< 0,0083$ angesehen.

2.8. Ethik

Diese Studie wurde von der Ethikkommission der Freien Universität Berlin beurteilt und für unbedenklich angesehen.

Stoppuffer (50 mmol/l, pH 7,7 bei 4°C):

Tris-Base	0,67	g/l	Fa. Sigma, München
Tris-HCl	7,02	g/l	Fa. Sigma, München

BCA-Protein-Assay

Fa. PIERCE, Illinois, USA

Reagenz A	Na-Carbonat
	Na-Bicarbonat
	BCA-Reagenz
	Na-Tartrat in 0,2 N NAOH
Reagenz B	4% CuSO ₄
Reagenz C	50 Teile A und 1 Teil B

Scintillationsflüssigkeit

Ready protein scintillation fluid	Fa. Beckman
-----------------------------------	-------------

Proteinbestimmung nach Bradford: Fa. BIO-RAD, München

150 mg G 250
 107 ml Perchlorsäure (70-72%)
 ad 2,5l

Es kam ausschließlich deionisiertes und bidestilliertes Wasser zur Anwendung.

Geräte:

Homogenisator	Fa. B. Braun
Zentrifuge Megafuge 2. OR	Fa. Hereus

Ultrazentrifuge Centricon, T-124

Schüttler Easyshaker, EAS 2/4

Cell-Counter Thrombocounter C

β-Counter LS-1801

Vakuum-Filtrationsgerät, Cell Harvester

Filterplatten, (Whatmen-GFB-Filter)

Photometer PCP 6121

Photometer Spectrophotometer, I-3

Inkubator

pH-Meter SA 230

Fa. Kontron Instruments

Fa. Labinstruments

Austria

Fa. Coulter Counter

Fa. Beckmann

Fa. Cambridge Technology, .Inc.

Fa. Whatmen

Fa. Eppendorf

Fa. Syva

Fa. Köttermann

Fa. Orion Research