

# **Molekulare Mechanismen der Opioidrezeptor-vermittelten Signaltransduktion unter Entzündungsbedingungen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Mohammed Shaqura**

aus Palästina

Berlin, Februar 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von April 2000 bis Februar 2004 an der Klinik für Anaesthesiologie und operative Intensivmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin Campus Benjamin Franklin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Christoph Stein angefertigt, und wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 276/2 „Signalerkennung und –umsetzung“ (Sprecher: Prof. Dr. Bertram Wiedenmann) von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Ferdinand Hucho  
**2. Gutachter:** Prof. Dr. med. Christoph Stein

**Tag der Disputation:** 17. März 2004

**Für meine Familie**

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Liganden-Opioidrezeptor-Interaktionen.....	2
1.2. Struktur und Signaltransduktion der Opioidrezeptoren.....	4
1.3. Periphere Opioidanalgesie.....	8
1.4. Periphere Opioidanalgesie und Entzündung.....	9
<b>2. Problemstellung</b> .....	<b>11</b>
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>12</b>
3.1. Materialien.....	12
3.1.1. Chemikalien.....	12
3.1.2. Radioaktiv markierte Substanzen.....	13
3.1.3. Antikörper.....	13
3.1.4. Geräte und sonstige Materialien.....	13
3.2. Methoden.....	14
3.2.1. Tiere und Tierhaltung.....	14
3.2.2. Freund's complete Adjuvants (FCA)-induzierte Entzündung.....	14
3.2.3. Autoradiographie.....	15
3.2.3.1. Präparation des N.ischiadicus.....	15
3.2.3.2. Aufbereitung des Gewebes.....	15
3.2.3.3. Prinzip der Autoradiographie.....	15
3.2.3.4. Autoradiographie der $\mu$ -Opioidrezeptoren (MOR).....	16
3.2.4. Radioligand - Rezeptor – Bindungsstudien.....	17
3.2.4.1. Aufreitung des Gewebes.....	17
3.2.4.2. Präparation des N.ischadicus.....	17
3.2.4.3. Prinzip der Bindungsstudien.....	17
3.2.4.4. [ $^3\text{H}$ ]-Ligandenbindung der $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	18
3.2.4.5. Proteingehaltsbestimmung.....	18
3.2.4.6. Versuchsdurchführung.....	18
3.2.5. Verdrängungsexperimente.....	19
3.2.5.1. Prinzip der Verdrängungsexperimente.....	19
3.2.5.2. Versuchsdurchführung.....	19
3.2.6. Immunhistochemie.....	20
3.2.6.1. Prinzip der Immunhistochemie.....	20
3.2.7. Immunhistochemische Anfärbung der $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	21
3.2.8. [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S-Bindungsstudien.....	22
3.2.8.1. Prinzip des [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S-Bindungsassays.....	22
3.2.8.2. Bestimmung der Agonist-induzierten G-Proteinaktivität an $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	23
3.2.9. [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S-Sättigungsbindungsstudien.....	24
3.2.9.1. Prinzip des [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S-Sättigungsbindungsassays.....	24
3.2.9.2. [ $^{35}\text{S}$ ]-GTP $\gamma$ S-Sättigungsbindungsassay an $\mu$ -Opioidrezeptoren.....	24
3.2.10. Algesiometrie.....	24
<b>4. Quantitative Analyse der Ligand-Bindungsstudien</b> .....	<b>26</b>
4.1. Sättigungsexperimente:.....	26
4.1.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_d$ ) und der Rezeptorenanzahl ( $B_{\text{max}}$ ).....	26
4.1.2. Spezifische und unspezifische Bindung.....	28
4.2. Hemmungsexperiment.....	30
4.2.1. Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante des Inhibitors ( $K_i$ ) und der ( $\text{IC}_{50}$ ).....	30
4.2.2. Bestimmung von ( $E_{\text{max}}$ ) und ( $\text{EC}_{50}$ ).....	31

<b>5. Ergebnisse</b> .....	<b>34</b>
5.1. Autoradiographie: .....	34
5.2. Bindungsstudien: .....	39
5.2.1. Bestimmung von Ligandenbindungsaffinität ( $K_d$ ) und MOR-Anzahl ( $B_{max}$ ) in Hypothalamus, Rückenmark und Spinalganglien .....	39
5.2.2. Bestimmung von [ $^3H$ ]DAMGO-Bindungsstellen in DRG nach einer Ligatur des N. ischiadicus unter entzündlichen Bedingungen .....	42
5.2.3. Bestimmung von [ $^3H$ ]DAMGO-Bindungsstellen in Membranpräparationen des N. ischiadicus unter entzündlichen Bedingungen .....	44
5.3. Immunhistochemie .....	45
5.4. Bestimmung von ( $E_{max}$ ) und ( $EC_{50}$ ) der DAMGO-stimulierten [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung .....	46
5.5. Bestimmung der Affinität ( $K_d$ G-Protein) und der maximalen Anzahl ( $B_{max}$ G-Protein) von G-Protein .....	49
5.6. Vergleich der maximalen Antwort ( $E_{max}$ ) und effektiven Konzentration 50 ( $EC_{50}$ ) der [ $^{35}S$ ]GTP $\gamma$ S-Bindung des partiellen Opioidrezeptoragonisten Buprenorphin zum vollen Opioidrezeptor-agonisten DAMGO unter entzündlichen Bedingungen .....	52
5.7. Affinität ( $K_D$ G-Protein) und maximale Anzahl ( $B_{max}$ G-Protein) der BUP und DAMGO-stimulierten G-Protein Kopplung .....	54
5.8. Bestimmung von $K_i$ (Inhibitionskonstanten) von BUP im Vergleich zu DAMGO in DRG-Membransuspensionen .....	55
5.9. In-vivo Untersuchungen der analgetischen Wirksamkeit von i.pl. appliziertem BUP bei Kontrolltieren und Tieren mit FCA-induzierter Entzündung. ....	56
<b>6. Diskussion</b> .....	<b>58</b>
6.1. Autoradiografische Untersuchungen im ZNS und PNS .....	59
6.2. Bindungsstudien und Entzündung .....	62
6.3. G-Protein Kopplung und Entzündung .....	66
6.4. Buprenorphin vermittelte Analgesie unter Entzündungs-bedingungen .....	68
<b>7. Zusammenfassung</b> .....	<b>70</b>
<b>8. Summary</b> .....	<b>72</b>
<b>9. Literaturverzeichnis</b> .....	<b>74</b>
<b>10. Publikationen</b> .....	<b>82</b>
<b>11. Danksagung</b> .....	<b>83</b>
<b>12. Lebenslauf</b> .....	<b>84</b>