

3. Material und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Bio-Rad-Reagens	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Buprenorphin Hydrochlorid (BUP)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly ⁵ -olenkephalin (DAMGO)	Sigma
Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Dibutylphthalat-Polystyren-Xylen (DPX)	Merck
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂ (CTOP)	Sigma
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Sigma
Freund's komplette Adjuvant (FCA)	Calbiochem, San Diego, USA
Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat) (GTP _γ S)	Sigma
Guanosindiphosphat (GDP)	Sigma
Halothan	Willy Rüsck, Böblingen, Deutschland
Kochsalz-Lösung (NaCl-Lösung)	Merck
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma
Naloxon	Sigma
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Picrinsäure	Sigma
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma
Szintillationflüssigkeit	PerkinElmer, Turku, Finnland
Tissue-Tek compound	O.C.T. Miles Inc. Elkhart, Indiana
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Sigma

3.1.2. Radioaktiv markierte Substanzen

[³⁵ S]GTP γ S	Guanosine-5`-O-(3-[³⁵ S]thio)-Triphosphat(Neu-England Nuclear Corp, Boston, USA)
[³ H]DAMGO	[³ H]-[D-Ala2, N-MePhe4, Gly5-ol]enkephalin (Amersham, Buckinghamshire, England)

3.1.3. Antikörper

anti NGF Antiserum	Sigma
MOR Antiserum	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. S. Schulz und V. Höllt
Synthetischer Peptid für MOR	Gramsch; Schwabhausen, Deutschland

3.1.4. Geräte und sonstige Materialien

Analgesymeter	Ugo Basile, Comerio, Italien
Flüssigszintillationszähler (1414)	PerkinElmer Wallac Turku, Finnland
GBX- Entwickler	Kodak, Stuttgart, Deutschland
GBX- Fixiermittel	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Glasfieberfiltern (Whatman GF/B)	Brandel, Gaithersburg, USA
Kryostaten (Microm HM 560)	Microm Laborgeräte, Wolldorf, Deutschland
Ratten-Mäusediät	Ssniff R/M-H, 10 mm, Soest-Deutschland
Tritium-Hyperfilm	Amersham , Buckinghamshire, England
Ultra-Turrax T8	Kinematica AG, Littau, Switzerland
Zell-Filtergerät (M24R)	Brandel, Gaithersburg, USA
Zentrifuge (Avanti TM J-25)	Beckman, München, Deutschland

3.2. Methoden

3.2.1. Tiere und Tierhaltung

Die Versuche wurden an männlichen Wistar Ratten (180-200 g) (Institut für medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie, Freie Universität Berlin) durchgeführt. Die Tiere wurden einzeln in Käfigen bei einer Temperatur von $22 \pm 0,5$ °C und einer 60 % Luftfeuchtigkeit gehalten. Mittels einer Zeitschaltuhr wurde ein künstlicher 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus eingehalten. Futter und Wasser standen den Tieren über die gesamte Versuchsdauer zur freien Verfügung. Alle Experimente wurden am Tage durchgeführt. Alle Untersuchungen an Tieren hielten sich an die Richtlinien zur Einhaltung der ethischen Normen (Zimmermann, 1983) für experimentelle Tieruntersuchungen und waren in Übereinstimmung mit den Richtlinien des Landesamtes für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin (LAGETSI).

3.2.2. Freund's complete Adjuvants (FCA)-induzierte Entzündung

Dieses Modell wird seit vielen Jahren von unserer Gruppe und anderen Forschergruppen eingesetzt (Stein et al., 1988; Barber and Gottschlich 1992). Wistar Ratten erhalten unter Halothannarkose eine intraplantare (i.pl.) Injektion von 0,15 ml Freund's complete Adjuvants (FCA), einer Suspension aus Hitze-inaktivierten *Mycobacterium butyricum*, in die Fußsohle der rechten Hinterpfote. Zur Narkose werden die Ratten in ein ausreichend großes Glasgefäß gesetzt, das unter einem Laufgitter mit Halothan getränkte Kompressen enthält, der Eintritt der Narkose wird beobachtet, das Tier bei ausreichender Narkosetiefe herausgenommen und die intraplantare Injektion verabreicht. Innerhalb von 6-24 Stunden kommt es zu einer entzündlichen Gewebereaktion mit Rötung, Schwellung und vermehrter Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie). Dieser Prozess bleibt auf die injizierte Pfote beschränkt und kann bis 6 Tage dauern. Zu diesem Zeitpunkt bestehen keine signifikanten Unterschiede in der Nahrungsaufnahme, dem Gewicht, der Körperkerntemperatur oder allgemeiner Aktivitäten im Vergleich zu unbehandelten Tieren (Stein et al., 1988) Kontrolltiere erhielten eine intraplantare (i.pl.) Injektion von 0,15 ml NaCl.

3.2.3. Autoradiographie

3.2.3.1. Präparation des N.ischiadicus

48 Stunden nach i.pl. FCA- oder NaCl-Injektion werden die Ratten mit Halothan narkotisiert. Der rechte N. ischiadicus wird chirurgisch dargestellt, von dem umgebenden Gewebe befreit und mittels einer Naht in der mittleren Position (5 mm unterhalb der Nervnute) ligiert. Mit Wundklemmen wird die Wunde verschlossen und anschließend desinfiziert. Die Tiere werden unter den o.g. Bedingungen für zwei weitere Tage beobachtet.

3.2.3.2. Aufbereitung des Gewebes

Vier Tage nach intraplantarer FCA- oder NaCl-Injektion werden die Ratten unter Halothannarkose getötet. Das Gehirn, das subkutane Pfortengewebe, das lumbale Rückenmark und die lumbalen Spinalganglien (L3-L5) werden entnommen. Bei Ratten mit Nervenligatur wird der N.ischiadicus (ca. 2 cm) zwei Tage nach der Ligatur und vier Tage nach i.pl. FCA- bzw. NaCl-Injektion entnommen. Das Gewebe wird schnell in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Die tiefgefrorenen Proben werden in Tissue-Tek compound eingebettet, mittels Kryostaten geschnitten (Schnittdicke 20µm), und die Gewebeschnitte auf Gelatine beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Proben werden über Nacht in einem Glasexsikator bei 4 °C getrocknet und anschließend bei -80°C gelagert.

3.2.3.3. Prinzip der Autoradiographie

Der autoradiographische Nachweis von Rezeptoren *in vitro* erfolgt mittels der Markierung der Rezeptoren durch hochselektiv bindende, radioaktive Liganden. Die Markierung erfolgt durch Inkubation von 10-20 µm dicken Gewebeschnitten in Pufferlösungen, die Bestimmung der unspezifischen Bindung erfolgt in Analogie zu Bindungsstudien an Membranfraktionen bzw. Homogenaten durch hohe Konzentrationen eines unmarkierten Liganden in der Inkubationsflüssigkeit. Ein entscheidendes methodisches Problem besteht in der Fixierung der Schnitte auf dem Objektträger während der Inkubation. Dies kann z.B. durch die Verwendung Gelatinebeschichteter Objektträger verbessert werden (Mousa et al., 1996).

Nicht spezifisch gebundenen Anteile werden durch mehrmaliges Waschen mit Tris-Puffer entfernt. Ein hochsensitiver Spezialfilm (z.B. [³H]Hyperfilm) wird durch die Präparate belichtet.

Zur Markierung der Liganden wird meistens Tritium (³H) eingesetzt, weil dieser schwache β -Strahler die geringste Streustrahlung aufweist und andererseits die Herstellung von Radioliganden mit hoher spezifischer Aktivität erlaubt. Die Expositionszeiten derartiger Autoradiogramme liegen zwischen 30 und 150 Tagen. Durch eine ausreichende lange Inkubationszeit wurde eine relativ homogene Verteilung der Filmschwärzung erreicht.

3.2.3.4. Autoradiographie der μ -Opioidrezeptoren (MOR)

Zur Durchführung der Autoradiographie werden die zu bestimmenden Schnitte auf Raumtemperatur gebracht und ca. 1 Stunde in einem Glasexsikator mit Kieselgel getrocknet. Der erste Präinkubationsschritt erfolgt bei 4 °C für 10 min in einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl, 0,2 mM EGTA, 100nM NaCl und 0,2% BSA (pH 7,4). Diese Lösung dient als Grundlage der weiteren Inkubationsschritte. Pro Objektträger werden dann ca. 800 μ l [³H]DAMGO (56 Ci/mmol) in einer Konzentration von 2 nM auf die liegenden Objektträger aufgebracht. Für die notwendige Kontrolle wird bei einigen Schnitten 10 μ M Naloxon hinzugegeben. Dieser Inkubationsschritt erfolgte bei Raumtemperatur für 60 Minuten. Durch zweimaliges vorsichtiges Waschen in 4 °C kaltem 50 mM Tris-HCl (jeweils 3 Minuten) wird ungebundenes [³H]DAMGO entfernt. Nach Trocknung der Schnitte über Nacht wird ein [³H]-sensitiver Film ([³H]Hyperfilm) aufgelegt und für 6-8 Wochen exponiert. Der Film wird für 1 Min. in GBX-Lösung entwickelt, mit Wasser gewaschen, in einem GBX Fixiermittel für 5 min. fixiert, und dann erneut mit Wasser für 20 min bei 20 °C gewaschen, und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

3.2.4. Radioligand - Rezeptor – Bindungsstudien

3.2.4.1. Aufbereitung des Gewebes

Zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.pl. FCA- oder NaCl-Injektion werden Ratten unter Halothannarkose getötet. Das Gehirn, das lumbale Rückenmark, und die Spinalganglien (L3-L5) werden entnommen, (bei Tieren mit Pfotenentzündung werden das lumbale Rückenmark und die lumbalen Spinalganglien (L3-L5) nur von der ipsilateralen Seite der Entzündung entnommen), in eisgekühlter Pufferlösung (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) und für 3 x 15 Sekunden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Das Homogenisat wird bei 4°C und 48.000 g für 20 min zentrifugiert, resuspendiert und für 10 min bei 37°C in einem Schüttelwasserbad präinkubiert. Unter den vorher beschriebenen Bedingungen wird die Gewebesuspension zentrifugiert, resuspendiert und bei –80°C gelagert.

3.2.4.2. Präparation des N.ischadicus

Unter tiefer Halothananaesthesie wird der rechte Nervus ischiadicus der Ratten auf mittlerer Oberschenkelhöhe mit einem nichtabsorbierbaren Seidenfaden ligiert. Die Ligatur des N. ischiadicus erfolgt sowohl in unbehandelten Kontrolltieren als auch in Ratten mit einer Pfoten-Entzündung. Zu verschiedenen Zeitpunkten der FCA-Entzündung und der Ligatur des N. ischiadicus werden die Tiere aller Gruppen durch Halothaneuthanasierung getötet und der proximale Teil des N. ischiadicus (0,5 cm) entnommen. Die Gewebepräparation wird nach den vorher beschriebenen Schritten durchgeführt.

3.2.4.3. Prinzip der Bindungsstudien

Die Eigenschaft einer Substanz, mit einem bestimmten Rezeptorprotein zu interagieren, kann mit Hilfe von Radioligand–Rezeptor-Bindungsstudien ermittelt werden. Die zu testende Substanz wird mit einer Gewebepräparation und einem radioaktiv markierten Liganden in Puffermedium inkubiert. Beide Substanzen konkurrieren um die Bindungsstelle am Rezeptor. Nach einer gewissen Zeit stellt sich ein Gleichgewicht zwischen radioaktiv gebundenen und nicht gebundenen Liganden ein. Nach Einstellung des Sättigungsgleichgewichtes muss der gebundene radioaktiv markierte Ligand nun

vom nicht gebundenen radioaktiv markierten Liganden getrennt werden. Die gebräuchlichste Methode ist die Filtration unter Vakuum. Die Filter enthalten nach beendigter Filtration das Gewebe mit den gebundenen Radioligandmolekülen. Die Radioaktivität des radioaktiv markierten Liganden wird im Flüssigszintillationszähler gemessen.

3.2.4.4. [³H]-Ligandenbindung der μ -Opioidrezeptoren

3.2.4.5. Proteingehaltsbestimmung

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Membransuspension wird die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) angewendet. 200 μ l Bio-Rad-Reagens, 790 μ l Aqua bidest. und 10 μ l der Membransuspension werden für 5 min bei RT inkubiert. Photometrisch wird der Proteingehalt bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen einen Leerwert (800 μ l Aqua bidest. und 200 μ l BIO-RAD-Reagens) gemessen. Für den Standard wird Rinderserumalbumin (BSA) eingesetzt. Mittels einer Standardkurve (Absorption (A) gegen BSA-Proteinmenge (μ g) Standard) konnte die Proteinmenge bestimmt werden.

Die Bestimmung von Proteinmenge der Membransuspension ist wichtig zur Berechnung der Anzahl der Bindungsstellen in fmol/mg.

3.2.4.6. Versuchsdurchführung

Zur Durchführung von Sättigungsbindungsstudien werden die Membransuspensionen aufgetaut, bei 4°C und 48.000 g für 20 min zentrifugiert und mit Tris/HCl-Puffer (50 mM, pH 7,4) resuspendiert. 800 μ l Membransuspension (50-100 μ g Protein) werden mit 100 μ l [³H]DAMGO (56 Ci/mmol) und 100 μ l Tris /HCl - Puffer (50 mM, pH 7,4) in einem Volumen von 1000 μ l für 1 Stunde bei 24°C inkubiert. Zur Bestimmung der nichtspezifischen Bindung wurde 10 μ M Naloxon zum Versuchansatz zugegeben.

3.2.5. Verdrängungsexperimente

3.2.5.1. Prinzip der Verdrängungsexperimente

Im Gegensatz zu Sättigungsexperimenten werden in Verdrängungsexperimenten in den einzelnen Versuchsansätzen einer konstanten Menge an Protein und einer konstanten Menge an radioaktiv markiertem Liganden steigende Mengen eines nicht radioaktiv markierten Liganden zugesetzt. Hieraus resultiert ein konkurrierendes Verhalten von radioaktiv markiertem und nicht radioaktiv markiertem Liganden um die Bindungsstellen des Rezeptors, d.h. der radioaktiv markierte Ligand wird durch steigende Mengen des nicht radioaktiv markierten Liganden von den Rezeptorenbindungsstellen „verdrängt“ (Verdrängungsprinzip).

3.2.5.2. Versuchsdurchführung

Zur Durchführung des Experiments werden 800 µl Membransuspension (50- 100 Protein) mit 100 µl [³H]DAMGO (2nM) und 100 µl Testsubstanz (0.02-3nM) eingesetzt, und für 1 Stunde bei 24°C inkubiert. Die nichtspezifische Bindung wird in Abwesenheit des Agonisten ermittelt.

Bei allen Bindungsstudien wird die Reaktion durch eine rasche Filtration der Suspension durch Whatman GF/C Glasfieberfiltern mit einem Zell-Filtergerät terminiert. Die Filter werden viermal mit 5 ml eiskalter Pufferlösung (50 mM Tris/HCl, pH 7,4) gewaschen. Die Filter werden über Nacht in 3 ml Szintillationsflüssigkeit inkubiert, und anschließend wird die membrangebundene [³H]-Radioaktivität in einem Wallac 1414 Flüssigszintillationszähler bei 70% Detektionseffizienz gemessen.

Zur Bestimmung der spezifischen Bindung werden von der Gesamtbindung der nichtspezifisch gebundene Anteil subtrahiert.

3.2.6. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie nutzt man die Spezifität von Antikörpern, um die Verteilung von bestimmten Antigenen am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Dazu eignen sich besonders Antigene, die spezifisch nur in bestimmten Zelltypen oder nur in bestimmten Geweben auftreten.

3.2.6.1. Prinzip der Immunhistochemie

Wenn man einen histologischen Gewebeschnitt mit Primärantikörpern inkubiert, werden diese Antikörper dort binden, wo sich das passende Antigen befindet. Um diese Bindung nachzuweisen, muß man die Primärantikörper sichtbar machen. Im Prinzip geht das dadurch, daß man biotinylierte "sekundäre" Antikörper verwendet (Abb. 3). Das sind Antikörper, die gegen das Fc-Fragment der Tierart gerichtet sind, in dem der Primärantikörper hergestellt wurde. Wenn man nun die gesuchten Antigene im Schnitt mit einem primären Antikörper aus der Maus inkubiert hat, kann man die dann in zweiten Schritt mit biotinylierten Anti-Maus-Ig-Antikörpern amplifizieren und dann mit einem Streptavidin-gekoppelten Enzym z.B. Meerrettichperoxidase (HRP) inkubieren, das an das Biotinmolekül bindet (ABC-Methode siehe Abb. 3). An das Biotin kann Avidin binden, das seinerseits drei weitere Biotinbindungsstellen besitzt. Dadurch entsteht eine Amplifikation des Ausgangssignals. Bei Inkubation mit einem entsprechenden Farbstoff wie DAB wandelt dann die Peroxidase diesen in eine sichtbare Farbe (hier braun) um. Der sekundäre Antikörper kann für alle primären Antikörper aus der Maus verwendet werden. Solche Antikörper sind kommerziell erhältlich.

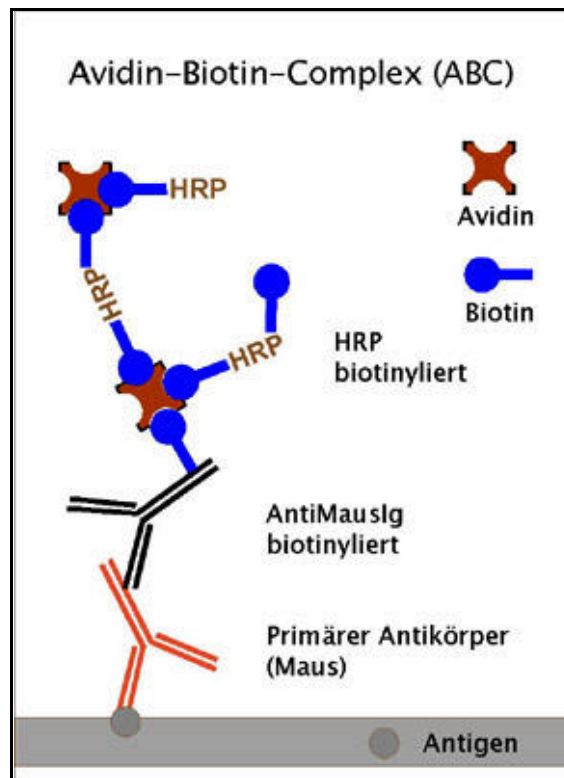


Abbildung 3. Mechanismus der immunhistochemischen Färbung

3.2.7. Immunhistochemische Anfärbung der μ -Opioidrezeptoren

Vier Tage nach FCA- bzw. NaCl-Inokulation wurden die Ratten in tiefer Halothannarkose trankskardial mit 60 ml NaCl-Lösung (37°C) perfundiert, gefolgt von 300 ml 4% (W/V) Paraformaldehyd und 0,2% (V/V) Picrinsäure in einer 0,16 M Phosphatpufferlösung (pH 6,9). Die ipsilateralen L5 Spinalganglien wurden entnommen, für 3 Stunden im gleichen Fixiermedium nachfixiert und bei 4°C über Nacht in 10% Saccharoselösung inkubiert. Das Gewebe wurde in Tissue Tek compound eingebettet, im Kryostat geschnitten (14 μ m) und auf Gelatine-beschichtete Objektträger aufgezogen. Die Gewebeschnitte wurden mit einem primären Antiserum (MOR 1:100) bei 4°C über Nacht und danach mit einem geeigneten biotinylierten sekundären Antikörper für 90 min inkubiert. Schließlich wurden die Objektträger für 45 min mit Avidin-Biotin-konjugierter Peroxidase und danach für 3-5 min in 3', 3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung (DAB) mit 0,01% H₂O₂ in Tis-HCl-Bufferlösung (pH 7,6)

inkubiert. Danach wurde mit Alkohol dehydriert, in Xylen gewaschen und mit DPX aufgezogen. Um die Spezifität der Färbungen zu demonstrieren, wurden folgende Kontrollen durchgeführt: 1) Prä-Adsorption des primären Antiserums mit einem Überschuss an synthetischem Peptid für MOR (Gramsch Laboratories, Schwabhausen, Deutschland) bei 4°C für 24 Stunden; 2) Elimination entweder des primären oder sekundären Antikörpers, oder des Avidin-Biotin-Komplexes. Die Kontrollexperimente zeigten keine MOR-Färbung.

Zur Quantifizierung der MOR-Färbung wurde die von Mousa SA et al. beschriebene Methode verwendet (Mousa et al., 2001). Die DRG wurden in 14 µm dicken Schichten geschnitten. Jeder 4. Schnitt wurde immunohistochemisch untersucht. Die Gesamtzahl der MOR positiven Neurone wurde von einem Untersucher gemäß dem experimentellen Protokoll bestimmt. Die Anzahl der Neuronen mit MOR wurde durch die Gesamtzahl aller Neurone eines jeden DRG- Schnittes geteilt und der prozentuale Anteil der MOR-immunreaktiven Neuronen berechnet. Nun wurden die gewonnenen Prozentwerte aus jeweils 4 Schnitten eines jeden DRG gemittelt.

Pro Gruppe (entzündet/nicht-entzündet) wurden 5 Ratten für diese Analyse benötigt.

Um den Durchmesser der Zellkörper bestimmen zu können wurde der Zellkern als Fixpunkt gewählt und von diesem ausgehend die Länge und Breite der Zelle mittels eines kalibrierten Mikrometers gemessen. In jedem Tier konnte eine Gesamtzahl von 30 immunreaktiven Zellen nachgewiesen werden.

3.2.8. [³⁵S]-GTPγS-Bindungstudien

3.2.8.1. Prinzip des [³⁵S]-GTPγS-Bindungsassays

Mittels dieser Bindungsstudien ist es möglich die G-Proteinaktivität zu messen. Grundlage dieses Verfahrens ist der Einsatz von verändertem und radioaktiv markiertem GTP ([³⁵S]GTPγS), welches nicht hydrolysiert werden kann. Nach Aktivierung der Rezeptoren durch einen geeigneten selektiven Agonisten, bindet [³⁵S]GTPγS irreversibel an das G-Protein (G_α). Durch die Bestimmung des radioaktiv gebundenen GTP kann indirekt über die Kopplung/Aktivität des G-Proteins rückgeschlossen werden. Entscheidend für die Durchführung dieses Assays ist der Einsatz von GDP in relativ

hohen Konzentrationen. Diese relativ hohe Konzentration ist nötig um alle G-Proteine in den Ruhezustand zu versetzen und damit eine spezifische Stimulation durch Zugabe eines selektiven Agonisten zu erzielen.

3.2.8.2. Bestimmung der Agonist-induzierten G-Proteinaktivität an μ -Opioidrezeptoren

Für die [35 S]GTP γ S-Bindungsstudien wurden die Membransuspensionen bei 4°C und 48,000 g für 20 min erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in GTP γ S Bindungsbuffer (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 4.5mM MgCl₂ und 1mM DTT) mit einer finalen Proteinmenge von 25-50 μ g pro 200 μ l Lösung resuspendiert. In Reaktionsgefäßen (Endvolumen der Reaktionslösung: 800 μ l) werden 200 μ l mit 50 μ M GDP, 200 μ l mit 0,05 nM [35 S]GTP γ S (1250 Ci/mmol) und 200 μ l verschiedene Konzentrationen von Agonisten inkubiert. Anschließend wird die Bindungsreaktion durch Zugabe von 200 μ l Membransuspension mit 25-50 μ g Protein gestartet und für 2 Stunden bei 30°C im Wasserbad inkubiert. Die basale Bindung wurde in der Abwesenheit des Agonisten ermittelt. Die unspezifische Bindung wurde in einem dritten Ansatz durch Zugabe von nicht-radioaktiv markiertem GTP γ S im Überschuß bestimmt (200 μ l Bindungspuffer mit final 10 μ M GTP γ S).

Die Bindungsreaktion wurde durch Zugabe von einem Eiswasser-gekühlten Waschpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gestoppt. Die Trennung von Protein-gebundener und freier Radioaktivität erfolgte mittels Filtration durch Mikroglassfilter (GF/C, Whatman). Diese wurde dreimal mit kaltem Waschpuffer gewaschen, trockengesaugt und anschließend in Szintillationsgefäß überführt und mit Szintillationsflüssigkeit überschichtet. Die Filter wurden über Nacht inkubiert und anschließend in einem Flüssigszintillationsspektrometer gezählt.

3.2.9. [³⁵S]-GTP γ S-Sättigungsbindungsstudien

3.2.9.1. Prinzip des [³⁵S]-GTP γ S-Sättigungsbindungsassays

Zur Bestimmung der Anzahl ($B_{\max \text{ G-Protein}}$) und der Affinität des aktivierten G-Proteins ($K_d \text{ G-Protein}$) wurden [³⁵S]GTP γ S-Sättigungsbindungsexperimente durchgeführt. Die Membransuspension wurde mit verschiedenen Konzentrationen des radioaktiv markierten [³⁵S]GTP γ S in Gegenwart von GDP nach einer Aktivierung des Rezeptors mit einer hohen Konzentration eines selektiven Agonisten inkubiert. Diese Konzentration ist wichtig, um die gesamten Rezeptoren zu stimulieren, und dadurch das G-Protein zu aktivieren.

3.2.9.2. [³⁵S]-GTP γ S-Sättigungsbindungsassay an μ -Opioidrezeptoren

Für die Durchführung des Sättigungsassays wurden Membransuspensionen bei 4°C und 48.000 g für 20 min erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in GTP γ S Bindungsbuffer (50 mM Tris-HCl, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, 4.5 mM MgCl₂ und 1 mM DTT) mit einer finalen Proteinmenge von 25-50 μ g pro 200 μ l Lösung resuspendiert. In Reaktionsgefäßen (Endvolumen der Reaktionslösung: 800 μ l) wurden 200 μ l mit GDP (50 μ l), 200 μ l mit [³⁵S]GTP γ S (0,05-2 nM) und 200 μ l Agonisten (10 μ M) eingesetzt. Anschließend wurde die Bindungsreaktion durch Zugabe von 200 μ l von Membransuspensionen mit final 25-50 μ g Protein gestartet und für 2 h bei 30°C im Wasserbad unter schütteln inkubiert. Die unspezifische Bindung wurde in einem dritten Ansatz durch Zugabe von nicht-radioaktiv markiertem GTP γ S im Überschuß bestimmt (200 μ l Bindungspuffer mit final 10 μ M GTP γ S). Die Filtration wurde wie unter Punkt (3.2.4.6) beschrieben durchgeführt. Die [³⁵S]GTP γ S spezifische Bindung errechnete sich aus der Differenz zwischen der gebundenen Radioaktivität in Gegenwart und Abwesenheit eines selektiven Agonisten (10 μ M).

3.2.10. Algesiometrie

Für die Messung der Schmerzschwelle wurde eine Modifikation des (Randall-Selitto Tests) verwendet. Vor dem eigentlichen Versuch wurden die Tiere mehrmals aus dem Käfig genommen und an die Testsituation gewöhnt. Dabei wurden sie vorsichtig unter

einer Lage Zellstoff gehalten und mittels eines stupfen, keilförmigen Kolbens wurde von dorsal zunehmender Druck auf die Hinterpfote ausgeübt, indem ein Gewicht über einen Hebelarm gleitet ("Analgesymeter", Ugo Basile)(siehe Abb. 4). Bei Erreichen der Druckschwelle (paw pressure threshod, PPT) (durchschnittlich 50-100 g) zieht das Tier die Pfote zurück. Der maximale Druck ist auf 250 g beschränkt um Gewebeschäden zu vermeiden, wenn die Schmerzempfindung durch stark wirksame Analgetika ausgeschaltet ist (Stein et al., 1988).



Abbildung 4. Messung der Pftendruckschwelle

Die analgetische Testung erfolgte nach vier Tagen in Ratten mit und ohne FCA-Entzündung. Nach Messung der Ausgangswerte wurde das Opiat i.pl. (Injektionsvolumen 100µl) unter Halothankurzarkose verabreicht. Die PPT wurden dreimal im Abstand von 10 Sekunden durchgeführt und der Mittelwert gebildet (Stein et al., 1988). Die Antagonisten wurden zusammen mit den Agonisten in einem Gesamtvolumen von 200 µl i.pl. appliziert. Den Kontrolltieren wurde eine NaCl- Lösung gleichen Volumens injiziert. Die Tiere wurden am Ende des Experiments euthanasiert.