Untersuchungen zur Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Oeßel, Andre
aus Hildesheim

Gießen 2003

Aus dem Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie

Direktor/Leiter: Prof. Dr. H. Schmidt
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H. Teschemacher
Gutachter: PD Dr. S. Niepmann

Tag der Disputation: 03.11.2003

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Opioiderge Systeme: Komponenten 1

1.1.1 Opioidrezeptorliganden 1

1.1.1.1 Exogene Opioide: Opiate 1

1.1.1.2 Endogene Opioide: Opioidpeptide 2

1.1.2 Opioidrezeptoren 3

1.1.2.1 Einteilung der Opioidrezeptoren 3

1.1.2.2 Struktur und Interaktionen 5

1.1.3 δ-Opioidrezeptoren und ihre Liganden 6

1.1.3.1 δ-Opioidrezeptoren 6

1.1.3.2 δ-Opioidrezeptorliganden 7

1.2 Opioiderge Systeme: Vorkommen 8

1.2.1 Opioiderge Systeme im Endokrinium, im Nervensystem und im Immunsystem 8

1.2.2 Opioiderge Systeme in der Haut 9

1.3 Melanozyten 10

1.3.1 Native Melanozyten 10

1.3.2 Melanozytenzellinie G-361 11

2 Aufgabenstellung 12

3 Material 13

3.1 Geräte und Materialien 13

3.2 Substanzen, Peptide, Enzyme 14

3.3 Lösungen 15

3.4 Zellinie 16

3.5 Computerprogramme 17

4 Methoden 18

4.1 Zellkultur 18

4.2 Untersuchungen zur Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol

an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 18
4.2.1 Liganden: markierte und nicht-markierte Opioidrezeptorliganden 18
4.2.1.1 Radioaktiv markierte Liganden 18
4.2.1.2 Nicht markierte Liganden 19
4.2.2 Binder: Membranen der Melanozytenzellinie G-361 19
4.2.2.1 Herstellung von Membransuspensionen 19
4.2.2.2 Proteinbestimmung 20
4.2.3 Durchführung des Bindungsversuchs 21
4.2.3.1 Inkubationsansätze 21
4.2.3.2 Trennmethode: Filtration 22
4.2.3.3 Bestimmung der Radioaktivität 23
4.2.4 Auswertung der Bindungsdaten 23
4.2.5 Bestimmung der Bindungscharakteristika 24
4.2.5.1 Abhängigkeit von der Konzentration des Binders 25
4.2.5.2 Zeitabhängigkeit 25
4.2.5.3 Reversibilität 26
4.2.5.4 Sättigbarkeit 26
4.2.5.5 Bindungsparameter K_D und B_{MAX} 27
4.2.5.6 Strukturspezifität der Bindungsstelle 27
4.2.5.7 Ionenabhängigkeit 28
4.2.6 Untersuchungen zur Bestimmung des δ-Opioidrezeptor Subtyps 28

5 Ergebnisse 29

5.1 Nachweis der Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 29
5.2 Charakteristika der Bindung des ä-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 31
5.2.1 Abhängigkeit von der Konzentration des Binders 31
5.2.2 Zeitabhängigkeit 33
5.2.3 Reversibilität 34
5.2.4 Sättigbarkeit 35
5.2.5 Bindungsparameter K_D und B_{MAX} 36

5.2.6 Strukturspezifität der Bindung 37
5.2.7 Ionenabhängigkeit 42
5.3 Untersuchungen zur Identifizierung des δ-Opioidrezeptor-Subtyps, δ_1 bzw. δ_2, auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 44

6 Diskussion 47
6.1 Methodik 47
6.1.1 Wahl der Zellinie: Melanozyten 47
6.1.2 Bindungsversuche 47
6.1.2.1 Liganden 48
6.1.2.2 Membranpräparation 48
6.1.2.3 Inkubationsansätze 49
6.1.2.4 Filtration 49
6.1.2.5 Bestimmung der Radioaktivität 49
6.2 Ergebnisse 50
6.2.1 Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle 50
6.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstanten K_D 51
6.2.3 Berechnung der Bindungskapazität B_{MAX} 52
6.2.4 Strukturspezifität der Bindungsstelle 52
6.2.4.1 Strukturspezifität der Bindungsstelle: Endogene Opioide 53
6.2.4.2 Strukturspezifität der Bindungsstelle: Exogene Opioide 54
6.2.5 Ionenabhängigkeit 56
6.2.6 Nachweis von δ_2-Opioidrezeptoren 57

7 Zusammenfassung 59

8 Literaturverzeichnis 61

9 Danksagungen 73

10 Lebenslauf 75

VERZEICHNIS DER VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

â	beta
ä	delta
å	epsilon
ê	kappa
ì	mu, mikro
Abb.	Abbildung
ACTH	Adreno-Corticotropes Hormon
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Bl-Wert	Blank-Wert
B_{MAX}	Maximale Konzentration an Bindungsstellen
BSA	Bovines Serum-Albumin
c-AMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CT-Wert	Insgesamt eingesetzte Radioaktivität pro Ansatz
d.h.	das heißt
DAMGO	[D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]-Enkephalin
DPDPE	[D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin
dpm	desintegrations per minute
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
fm	femtomol
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GLY	Glycin
HGP	Homogenisationspuffer
IKP	Inkubationspuffer
K_D	Dissoziatonskonstante
l	Liter
m	milli-
M	Molar (Molare Konzentration)
m^2	Quadratmeter

Min	Minute
ml	Milliliter
MP	Membranpuffer
mRNA	messenger RNA
MSH	Melanozyten-Stimulierendes-Hormon
PCR	Polymerase Chain Reaction
POMC	Proopiomelanocortin
RBA	Radio-Binding-Assay
THR	Thyrosin
Tris-(HCL)	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
U69593	((5á, 7á, 8â) – (+) - N-Methyl-N-(7-[1-Pyrrolidinyl]-1-Oxaspiro[4,5] Dec-8-yl)-Benzeneaceteamide)

1 Einleitung

1.1 Opioiderge Systeme: Komponenten

1.1.1 Opioidrezeptorliganden

1.1.1.1 Exogene Opioide: Opiate

Opium, der aus unreifen Fruchtkapseln des Schlafmohns *Papaver somniferum* gewonnene, an der Luft getrocknete Milchsaft, wurde bereits im 3.Jahrtausend v.Chr. von den Sumerern im Zweistromland zwischen Euphrat und Tigris eingesetzt. In der „De Materia medica“, dem pharmakologischen Lehrbuch des Arztes Pedanicus Dioscorides (1.Jhd.n.Chr.), wurde es zum erstenmal beschrieben. Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim, auch Paracelsus benannt, machte das Opium als Bestandteil des „Laudanum“ bekannt. Erst Anfang des 19.Jhd. wurde der wichtigste Wirkstoff des Opiums, das Morphin, als erstes Alkaloid von dem Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner isoliert (Sertürner,1805). 1923 erfolgte die Aufklärung der chemischen Strukur des Morphins (Gulland and Robinson,1923) und 1952 die erste de-novo-Synthese (Gates and Tschudi,1952).

Opium enthält insgesamt 25 Alkaloide, von denen die pharmakologisch bedeusamsten die Phenanthrene (Morphin, Codein, Thebain) und Benzylisochinoline (Papaverin, Noscapin) sind. Je nach erwünschter Wirkung wurden sie zur Schmerzstillung, als Relaxantien der glatten Muskulatur oder als Antitussiva eingesetzt. Opium konnte als Pulver (Opii pulvis normatus; 10% Morphin) oder als Tinktur (Opii tinctura normata; 1% Morphin) verabreicht werden.
Zur Klasse der exogenen Opioide gehören auch die synthetischen Opiate, wie Heroin, Pethidin und Methadon. Aufgrund der Vielzahl der Wirkungen und Nebenwirkungen (z.B. Atemdepression, Obstipation, Übelkeit, Erbrechen) der exogenen Opioide wurde in den fünfziger Jahren der erste Opioidantagonist Nalorphin entwickelt und als Antidot bei Morphinvergiftungen verwendet.

1.1.1.2 Endogene Opioide: Opioidpeptide

Die Entdeckung der ersten Opiatrezeptoren 1973 (Pert and Snyder, 1973; Simon et al.; 1973; Terenius; 1973) induzierte die Suche nach den dazugehörigen Liganden, den endogenen Opioiden. Im tierischen Organsmus entdeckten John Hughes und Hans Kosterlitz 1975 die ersten Vertreter dieser Substanzklasse, identifizierten sie als Peptide und benannten sie nach ihrer Herkunft aus dem Gehirn „Enkephaline“ (Hughes; 1975). Weitere Opioidpeptide wurden nur wenig später entdeckt: 1976 das ß-Endorphin (Li et al.;1976) und 1979 das Dynorphin (Goldstein et al.; 1979).

Opioidpeptide sind im Organismus weit verbreitet und sind offenbar unter anderem an der Steuerung des Immunsystems beteiligt (Sibinga and Goldstein, 1988; Teschemacher et al., 1990).
Sie werden allesamt aus nur drei Vorstufen, dem Prä-Pro-Opiomelanocortin (Prä-POMC), dem Prä-Pro-Enkephalin (Prä-PENK) und dem Prä-Pro-Dynorphin (Prä-PDYN) durch graduelle Proteolyse gebildet. ß-Endorphin, sowie auch Nicht-Opioide wie das adrenocorticotrope Hormon (ACTH), das ß-Lipotropin (ß-LPH) und die Melanozyten-stimulierenden Hormone (MSH), entstehen aus POMC. Aus dem PENK entstehen u.a. Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, aus dem PDYN die Dynorphine und die Neo-Endorphine.
POMC und seine Spaltprodukte kommen außerhalb des Gehirns hauptsächlich in der Adenohypophyse vor; Pro-Enkephalin und seine Derivate sind u.a. in Zellen des Nebennierenmarks, in Nervenzellen der Darmwand und des ZNS enthalten, und Pro-Dynorphin und seine Derivate kommen u.a. in der Darmwand und in Interneuronen im ZNS vor. Alle typischen Opioidpeptide besitzen die N-terminale Sequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-X, wobei X entweder Methionin oder Leucin ist. Mit dieser Sequenz treten die endogenen Opioide mit den Opioidrezeptoren in Wechselwirkung.
Eine weitere Möglichkeit, mit Opioidrezeptoren zu interagieren, ist der Kontakt über eine abgeänderte N-terminale Sequenz (Tyr-X-X-X); atypische Opioidpeptide wie die α- und β-Casomorphine, Spaltfragmente des Milchproteins β-Casein (Brantl and Teschemacher, 1983), oder die Dermorphine, die in der Haut von Amphibien entdeckt wurden, (Broccard et al., 1981) interagieren mit Opiatrezeptoren über diese Terminalsequenz.

Die Ergebnisse von in-vivo Studien auf dem Gebiet der Opiat-Rezeptor-Pharmakologie (Martin et al.,1976) wurden von nachfolgenden Bindungsversuchen und Bioassays komplementiert und führten zur Klassifizierung der Opioidrezeptoren in die drei Subtypen: μ, κ und δ (Lord et al., 1977).

1.1.2 Opioidrezeptoren

1.1.2.1 Einteilung der Opioidrezeptoren

Obwohl spezifische Rezeptoren für Opioide lange vermutet wurden (Beckett and Casy, 1954), wurden die Opioidrezeptoren erst anfang der 70er Jahre identifiziert (Pert and Snyder, 1973; Simon et al., 1973; Terenius, 1973). Chemiker und Pharmakologen nahmen die Existenz multipler Opioidrezeptoren an (Portoghese, 1965; Gilbert and Martin, 1976, Martin et al., 1976) und durch die Ergebnisse von Radioligand – Bindungsversuchen konnten die Opioidrezeptoren in drei verschiedene Typen eingeteilt werden (Goldstein, 1987; Pasternak, 1993). Molekulare Klonierungstechniken ermöglichten die Identifizierung der Nukleotidsequenzen von drei unterschiedlichen Opioidrezeptoren, den μ-, κ- und δ-Opioidrezeptoren (Minami and Satoh, 1995). Da die Diskussion um die Neubezeichnung dieser drei Rezeptoren, basierend auf der Reihenfolge, in der diese zum ersten Mal kloniert wurden, in OP1, OP2 und OP3 (Dharwan et al.,1996) noch nicht abgeschlossen ist, wird in dieser Arbeit die etablierte Nomenklatur der μ-, κ- und δ-Opioidrezeptoren beibehalten. Aufgrund neuer Erkenntnisse durch pharmakologische Studien sind die μ-, κ- und δ- Opioidrezeptoren in Rezeptorsubtypen weiter unterteilt und klassifiziert worden (Zukin et al., 1988; Paul et al.,1989; Sofuoglu et al.,1991; Mattia et al., 1991, Satoh and Minami, 1995); dennoch ist die molekulare Klonierung von Opioidrezeptorsubtypen bisher nicht gelungen.

Ein vierter Opioidrezeptor, der ε-Opioidrezeptor, wurde postuliert, um die ß-Endorphin-vermittelte Hemmung einer elekrisch induzierten Kontraktion des Vas deferens der Ratte zu erklären (Wüster et al., 1979; Schulz et al., 1981). Ein ß-Endorphin-bindender Rezeptor im Vas deferens der Ratte, nicht identisch mit δ- und

μ-Opioidrezeptoren, war vermutet worden. Als mögliche Bindungsstelle des ß-Endorphins im Vas deferens der Ratte entfiel nämlich der κ-Opioidrezeptor, da verschiedene Benzomorphane, κ-selektive Agonisten, kompetitiv antagonistisch wirkten (Gillan et al., 1981). Die ß-Endorphin-Aktivität im Vas deferens der Ratte konnte durch Naloxon, einem generellen Antagonisten an allen Opioidrezeptoren, antagonisiert werden (Huidobro-Toro et al., 1982). Weitere ß-Endorphin-Bindungsstellen wurden im Gehirn beobachtet (Law et al., 1979; Johnson et al., 1982) und eine Bindung des ß-Endorphins an Bindungsstellen, die sich von denen des Morphins und des Enkephalins unterschieden, vermutet (Chang et al, 1984). Im Gegensatz zu Agonisten an anderen Opioidrezeptoren, wird ß-Endorphin-vermittelte Analgesie nicht durch Pertussistoxin-sensitive G-Proteine vermittelt (Tseng and Collins, 1996). Andere Versuchsdaten weisen auf eine Beteiligung von δ-Opioidrezeptoren an der ε-Opioidrezeptor vermittelten Analgesie hin (Suh and Tseng, 1990). Eine mögliche cDNA des ε-Opioidrezeptor wurde durch Klonierung aus der menschlichen Genombibliothek gefunden (O`Dowd et al., 1995). Der ε-Opioidrezeptor bleibt Gegenstand der pharmakologischen Forschung (Narita and Tseng, 1998).

Im Rahmen der Suche nach Opioidrezeptoren wurde auch eine Opioidrezeptor-ähnliche Spezies kloniert, der „opioid–receptor–like protein$_1$"- (ORL_1-) Rezeptor (Bunzow et al., 1994; Chen et al., 1994; Fukuda et al., 1994; Mollereau et al., 1994; Nishi et al., 1994; Wang et al., 1994; Wick et al., 1994; Halford et al., 1995; Lachowicz et al., 1995). Der klonierte ORL_1-Rezeptor ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptor mit sieben transmembranären Domainen genauso wie die μ-, κ- und δ-Opioidrezeptoren, zu denen eine 50-60% Sequenzhomologie besteht. Dieser natürlich vorkommende Rezeptor ist im Gehirn weit verbreitet und reagiert auf das neu-entdeckte Peptid Orphanin FQ, auch Nociceptin genannt (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Rossi et al., 1997). Weitere Untersuchungen zeigten, das der ORL_1-Rezeptor sowohl Analgesie, die durch Opiodantagonisten antagonisierbar ist, wie auch Hyperalgesie, die nicht durch Opioide antagonisierbar ist, vermitteln kann (Rossi et al., 1996; Meunier, 1997).

1.1.2.2 Struktur und Interaktionen

Die μ-, κ- und δ-Opioidrezeptoren zeigen einen hohen Grad an Homologie und alle drei interagieren mit heterotrimären G-Proteinen (Gilman, 1987; Childers, 1991). Die Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die sowohl Neurotransmitter- wie auch Hormonrezeptoren beinhaltet, weist eine gemeinsame drei-dimensionale Strukur auf, die die Zellmembran siebenmal durchzieht und dabei drei intrazelluläre und drei extrazelluläre Schleifen formt. Das Amino-terminale Ende ragt in den Extra-, das Carboxy-terminale Ende in den Intrazellulärraum (Strosberg, 1991). Die Aminosäuresequenzen der drei Opioidrezeptoren sind hochgradig homolog. Die transmembranären Strukturen und die intrazelluären Schleifen zeigen einen hohen Grad an Homologie, während die extrazellulären Schleifen und die Amino-und Carboxyl-Enden die Regionen darstellen, die sich am meisten unterscheiden (Reisine and Bell, 1993; Probst et al., 1992).

Die Opioidrezeptoren werden an inhibitorische G-Proteine (G_i) gekoppelt und hemmen somit die Adenylatcyclase und sekundär die cAMP-aktivierte Proteinkinase A, was zur Hemmung von Phosphorylierungsreaktionen führt (Childers, 1991). Andere Effekte, wie die Öffnung von K^{+}-Kanälen oder die Schließung von Ca^{2+}-Kanälen, werden ebenfalls durch G-Proteine vermittelt (North, 1993). Die daraus resultierenden Änderungen der Ionenströme vermindern die Erregbarkeit von Neuronen und die Transmitterfreisetzung aus Nervenendigungen.

Durch die Aktivierung von μ-Rezeptoren entstehen Analgesie, überwiegend auf supraspinaler Ebene, Euphorie, Abhängigkeit, Miosis, Atemdepression, Hustendämpfung und Obstipation. Für die Vermittlung von Analgesie (μ_1) könnte ein anderer Rezeptor-Subtyp verantwortlich sein als für die anderen Effekte (μ_2). κ-und δ-Rezeptoren vermitteln Analgesie vorwiegend auf Rückenmarksebene. Durch die Aktivierung von κ-Rezeptoren entsteht zudem Sedierung und Dysphorie.

1.1.3 δ-Opioidrezeptoren und ihre Liganden

1.1.3.1 δ-Opioidrezeptoren

Die δ-Opioidrezeptoren wurden das erste Mal in Erwägung gezogen als man die unterschiedlichen Effekte des Morphins und des gerade entdeckten Enkephalins auf die elektrisch-induzierten Kontraktionen des Meerschweinchenileums und des Vas deferens der Maus beobachtete. Die größere Wirkung des Morphins im erstgenannten Bioassay und die stärkere Wirkung des Enkephalins im letztgenannten Testsystem schienen auf verschiedene Opioidrezeptoren hin zu weisen (Hughes et al., 1975). Den Opioidrezeptoren des Vas deferens der Maus wurde die Bezeichnung „δ-Opioidrezeptoren“ gegeben. Somit entwickelte sich der Name der δ-Opioidrezeptoren aus unterschiedlichen Opioidwirkungen in isolierten Geweben in vivo (Lord et al., 1977), während die Namensgebung der κ- und μ-Opioidrezeptoren auf unterschiedlichen Wirkungen von Opioiden in vivo beruht (Gilbert and Martin, 1976; Martin et al., 1976). Autoradiographische Untersuchungen zeigten deutliche Unterschiede in der Verteilung der Opioidrezeptoren im Gehirn (Sharif and Hughes, 1989; Mansour et al., 1995). Die Dichte der δ-Opioidrezeptoren variierte zwischen den verschiedenen Regionen des Gehirns, wobei die höchsten Konzentrationen im Bereich des Bulbus olfactorius entdeckt wurden (Kitchen et al., 1997).
Verglichen mit den anderen Opioidrezeptoren und dem „opioid receptor-like protein“-Rezeptor (ORL_1) stellen die δ-Opioidrezeptoren ein herausforderndes Ziel für die Entwicklung neuer Schmerzmedikamente dar. Die κ-Opioidrezeptoren vermitteln Dysphorie (Pfeiffer et al., 1986), ORL1-Rezeptoren vermittleln Hyperalgesie zusätzlich zur Analgesie (Rossi et al., 1997) und ε-Opioidrezeptoren sind noch unzureichend charakterisiert. Neue δ-selektive Medikamente könnten deutliche klinische Vorteile gegenüber den zur Zeit angewandten μ-selektiven Analgetika besitzen. Diese Vorteile könnten bestehen in einer besseren Schmerzminderung von neuropathischen Schmerzen (Dickenson, 1997), verminderter Atemdepression (Cheng et al., 1993), geringerer Obstipation (Sheldon et al., 1990), sowie in einer minimierten Wahrscheinlichkeit der Entwicklung körperlicher Abhängigkeit (Cowan et al., 1988).

1.1.3.2 δ-Opioidrezeptorliganden

Met-enkephalin und Leu-enkephalin zählen zu den endogenen Liganden der δ-Opioidrezeptoren seit deren Entdeckung (Hughes et al., 1975). Durch die Entdeckungen und Entwicklungen neuer Substanzen mit zunehmender Selektivität, z.B. [D-Ala^2,D-Leu^5] DADLE (Beddell et al., 1977; Belluzzi et al., 1978) zyklischem [D-PEN^2,D-PEN^5) (DPDPE) (Mosberg et al., 1983), den Deltorphinen (Erspamer et al., 1989; Kreil et al., 1989) und anderer neuer synthetischer Liganden (Chang et al., 1993; Calderon et al., 1994) konnte der Befund der δ-Opioidrezeptor-vermittelten Analgesie weiter erhärtet werden. Mit der Entwicklung von selektiven δ-Opioidrezeptorantagonisten, z.B.Naltriben (Portoghese et al., 1988) und Naltrindole (Takemori and Portoghese, 1992) konnten die δ-Opioidrezeptoren weiter charakterisiert werden und durch den pharmakologischen Nachweis distinkter Subtypen, $\delta_1$und δ_2 (Vaughn et al., 1990; Negri et al., 1990), konnten δ-Opioidrezeptoragonisten und –antagonisten mit erhöhter Subtyp-Selektivität entwickelt werden (Portoghese et al., 1992).
Aufgrund verschiedener pharmakolgischer Studien und der Klonierung der δ-Opioidrezeptoren sind mehrere δ-spezifische Liganden bekannt (Masamichi and Masabumi, 1995). DPDPE, DADLE, [D-Ala^2, Leu^5, Cys^6]enkephalin and 7-benzylidenenaltrexon binden mit hoher Affinität an δ_1-Bindungsstellen, während [D-Ser^2, Leu^5, Thr^6]enkephalin (DSLET), [D-Ala^2]deltorphin II, naltrindol 5`-isothiocyanat (NTII), [D-Ala2,Glu4]-deltorphin und Naltriben mit hoher Affinität an δ_2-Opioidrezeptoren binden (Malmberg, 1992, Portoghese et al.,1990; Takemori and Portoghese,1992, Vanderah et al.,1994).
Naltrindol (NTI) ist ein nicht-selektiver δ_1-/δ_2-Opioidrezeptorantagonist (Malmberg, 1992).

1.2 Opioiderge Systeme: Vorkommen

1.2.1 Opioiderge Systeme im Endokrinium, im Nervensystem und im Immunsystem

Opioidpeptide und Opioidrezeptoren des Organismus können als opioiderge Systeme aufgefaßt werden. Einige dieser System seien hier erwähnt.
Seit dem Nachweis von Opioidrezeptoren 1973 gelang es im Laufe der darauffolgenden Jahre, viele verschiedene endogene Opioide nachzuweisen, zu klassifizieren und zu lokalisieren. Die Verteilung der drei großen Gruppen der endogenen Opioide - Endorphine, Enkephaline und Dynorphine - ist unterschiedlich. Endorphine befinden sich in besonders hohen Konzentrationen in der Hypophyse (Vorderlappen und, soweit vorhanden, im Bereich des Zwischenlappens) und im Zentralnervensystem (Hypothalamus). Enkephaline befinden sich im ZNS hauptsächlich im Striatum und im Hypothalamus und in der Peripherie vorwiegend im Gastrointestinaltrakt (im Plexus myentericus bzw. submucosus) und im Nebennierenmark. Dynorphine sind vorwiegend im Hypothalamus lokalisiert.
Eine Reihe von Befunden spricht dafür, daß bestimmte Opioidpeptide die Rolle von Hormonen oder Neurotransmittern spielen. Ein Beispiel hierfür ist die Elektrostimulationsanalgesie, bei der analgetischen Effekte nach direkter elektrischer Stimulation bestimmter Bereiche des Gehirns durch spezifische Opiatantagonisten (z.B. Naloxon) blockiert werden können. Der physiologische Stimulus zur Freisetzung von ß-Endorphin ist „Streß“. Durch körperliche, intelektuelle oder emotionale Belastung können aus der Hypophyse und offenbar auch aus bestimmten Bereichen des ZNS Proopiomelanocortinderivate wie ß-Endorphin freigesetzt werden (Teschemacher et al., 1985). Die Funktion des ß-Endorphins und anderer Opioidpeptide in der Perpherie ist nicht bekannt, jedoch ist es inzwischen bewiesen, daß eine Vielfalt von Opioid-Effekten auf Zellen des Immunsytem besteht. Folgende Wirkungen endogener Opioide via Opioidrezeptoren sind bekannt: Chemotaxis polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten, erhöhte Superoxidproduktion durch Monozyten, eine erhöhte Bindung von Kalzium an Plasmamembranen von Mastzellen, eine Hemmung der Antikörperproduktion in Lymphozyten und eine

erhöhte zytotoxische Zellaktivität (Sibinga and Goldstein, 1988). Opioidpeptide werden jedoch auch von Zellen des Immunsystems selbst gebildet (Teschemacher et al., 1990).

1.2.2 Opioiderge Systeme in der Haut

Die Haut ist ein Flächenorgan des menschlichen Körpers, das die Außenseite des Organismus überzieht und schützt. Die Gesamtfläche der Haut des Erwachsenen beträgt ca.1,6 - 2m^2, die Dicke liegt zwischen 1,5 und 4mm. Die Haut besteht aus drei Hauptschichten: der Epidermis (mehrschichtig verhornendes Plattenepithel), der Dermis (faserreiches Bindegewebe) und der Subkutis (subkutanes Fettgewebe). Die Epidermis besteht zu etwa 90% aus Keratinozyten, die sich in Hornzellen umwandeln. Zusätzlich enthält die Epidermis die melaninbildenden Zellen des Pigmentsystems (Melanozyten), dendritische Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen) und Zellen des peripheren Nervensystems (Merkel-Zellen).
Die Dermis, eine fibroelastische Schicht aus kollagenem Bindegewebe, verleiht der Haut mechanische Festigkeit und ist Trägerin des Gefäß- und Nervensystems der Haut. Die Subkutis besteht aus Fettzellen und Bindegewebe.
Die Funktionen des Hautorgans sind vielseitig: Schutz gegen Infektionen, Schutz gegen mechanische, chemische und thermische Noxen, Schutz gegen Strahlungsschäden, Abgrenzung gegenüber dem Körperinneren, sensorische Funktionen für Wärme, Schmerz und Tastreiz und Speicher- und Stoffwechselfunktion sowie thermoregulatorische Funktionen.
In den letzten Jahren sind die Funktion von Neuropeptiden und die Expression ihrer Rezeptoren in humanen Keratinozyten untersucht worden, z.B. von Substanz P (Eedy et al., 1991) oder von POMC-Fragmenten (Slominski et al., 1993). Neurotransmitterrezeptoren, wie die für die Substanz P (Pincelli et al., 1993), Adrenocorticotropin (Slominski et al., 1996) und α-MSH (Chakraborty and Pawelek, 1993) und nicotinerge, cholinerge Rezeptoren (Grando et al., 1995) wurden in normalen und pathologischen Hautzellen gefunden. Nachdem bereits das Vorläufermolekül POMC des ß-Endorphins in normaler, menschlicher Haut entdeckt worden war, entdeckte man ß-Endorphin in kultivierten Epidermiszellen (Keratinozyten) (Nagahama et al., 1998; Slominski et al., 1998) und beschrieb dessen Freisetzung aus diesen (Wintzen et al., 1996). Weiterhin wurden der μ-

Opioidrezeptor (Bigliardi et al., 1998) sowie spezifische Bindungsstellen für ß-Endorphin auf Keratinozyten nachgewiesen (Egeling et al., 1999). In Melanozyten der Melanomzellinie G-361 wurden mittels RT-PCR und Bindungsversuchen ein δ-Opioidrezeptor nachgewiesen und eine Mutante dieses Rezeptors entdeckt (Mayer et al., 2000).

1.3 Melanozyten

1.3.1 Native Melanozyten

Das Pigmentsystem der Haut wird von der Gesamtheit der Hautmelanozyten mit ihren funktionellen Beziehungen und Regulationsmechanismen gebildet. Lebensraum der Hautmelanozyten ist das Stratum basale der Epidermis. Eine der wichtigsten Eigenschaften der Melanozyten ist die kontinuierliche Synthese von Melaninen, die als Melaningranula an umgebende Keratinozyten abgegeben werden. Ein Melanozyt und 36 Keratinozyten bilden eine epidermale Melanineinheit. Weitere Eigenschaften sind Mitose-und Wanderungsfähigkeit auf der Basalmembran. Die wichtigste bekannte Aufgabe der Hautmelanozyten ist der Lichtschutz der Haut.

Zur Pathologie: Da die Entwicklung des Melaninsystems der Haut und seine Funktion durch zahlreiche Einzelgene kontrolliert wird, sind entsprechende genetische Störungen möglich. Nicht-genetische Krankheitsursachen sind vor allem spezifische Lichtreize, chemische Noxen, humorale Faktoren und unspezifische Einbeziehung in krankhafte lokal-epidermale Prozesse. Dabei können adaptive Veränderungen wie Bräunung und Hypermelanosen durch Melaninsynthesesteigerung entstehen. Zellschädigungen können zur Störung der Melaninsynthese, bei starker Schädigung zum Untergang der Melanozyten führen. Bösartige Wachstumsstörungen sind meist UV-bedingt. Bis heute sind die Möglichkeiten der konservativen, lokal-medikamentösen Behandlung gering und daher ist die operative Therapie häufig die einzige Alternative.

1.3.2 Melanozytenzellinie G-361

Die Melanozytenzellinie G-361 ist eine humane, melaninproduzierende, maligne Melanomzellinie. Melanozyten sind häufiger Gegenstand verschiedenster Forschungsansätze, besonders in der Melanomforschung (Krull et al., 1997; Oka et al.,1996).
Mittels RT-PCR und Bindungsstudien wurde in der Melanomzellinie G-361 der bisher bekannte δ-Opioidrezeptor und eine bislang unbekannte Mutante dieses Rezeptors nachgewiesen (Mayer et al., 2000). Der Mutante fehlte die dritte intrazelluläre Schleife des Rezeptorproteins, die für die G-Protein-Kopplung und somit Signaltransduktion verantwortlich ist. Während andere Melanomzellinien die Mutante ebenfalls aufwiesen, wurde sie in normalen Melanozyten nicht exprimiert.

2 Aufgabenstellung

Die Melanozyten der Melanomzellinie G-361 exprimieren sowohl den bereits bekannten („wild type“) δ-Opioidrezeptor als auch eine Mutante davon (Mayer et al., 2000). Beide wurden gentechnologisch nachgewiesen und mit Bindungsversuchen ihre Expression und Membranlokalisation unter Beweis gestellt. Hierzu wurde ein δ_1-selektiver Agonist, DPDPE, eingesetzt, mit dem sich jedoch aufgrund geringer Affinität keine detaillierte Bindungscharakeristik erstellen ließ.
Versuche, wild-type und Mutante getrennt, in für Bindungsversuche ausreichenden Mengen in NIH-3T3-Zellen hineinzuklonieren, schlugen bisher fehl.

In dieser Arbeit sollte versucht werden, die Bindungseigenschaften des δ-Opioidrezeptors und seiner Mutante auf Melanozyten der Melanomzellinie G-361 durch Bindungsversuche mit einem hochaffinen, nicht-selektiven δ_1/δ_2-Antagonisten (Naltrindol) zu charakterisieren.

3 Material

3.1 Geräte und Materialien

Beta-Counter Wallac 1410	Pharmacia, Turku, Finnland
Brutschrank	Heraeus Instruments, Inc.
Dispenser-Tips	Nerbe plus Gmbh, Winsen, Luhe
(0,5; 2,5; 5; 12,5 ml)	
Glasfaserfilter	Whatman, Biometra
Glashomogenisationskolben	Braun, Melsungen
Glasmaterialien:	
Meßkolben	Schott, Mainz
Erlenmeyerkolben	Schott, Mainz
Glasbecher	Schott, Mainz
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Heidolph, Kehlheim
Mikroproberöhrchen (400 µl)	Beckmann, Palo Alto
Mikroskop Wilovert S	Hund, Wetzlar
Mischer 5432	Eppendorf, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen (100er; 145er)	Greiner, Frickenhausen
Neubauer-Zählkammer	Kalensee, Giessen
pH-Meter 761 Calimatic	Knick, Berlin
Pipetten verstellbar	Abimed, Düsseldorf
Pipettenspitzen	Radiolab, Dreieich
Pipettierhilfe Pipetus Akku	Hirschmann Laborgeräte
Polypropylen	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäß (1,5; 2,0ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedtröhrchen (3,5; 4,5; 13ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttelinkubator Varishaker AM169	Dynatech, Denkendorf, BRD
Spannungsquelle	Elektrowerkstatt, MZI, Giessen
Taumler	Heidolph, Kehlheim
Teflonschaber	Greiner, Frickenhausen

Tischrührer (Vortexer) REAX 1 DR	Heidolph, Kehlheim
Ultraschallbad Sonorex RK 102	Bandelin
Varishaker	Dynatech, Denkendorf
Waagen:	
Feinwaage M5	Mettler, Zürich
Tischwaage AT 250	Mettler, Zürich
Wasserbad	Köttermann, Hänigsen
Zentrifugen:	
Sorvall RC-5C PLUS	Du Pont, Bad Homburg
Heraeus Labofuge 400e	Heraues Instruments, Inc.
Microfuge B	Beckmann, Palo Alto

3.2 Substanzen, Peptide, Enzyme

Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma, München
Aquasafe 300 plus	Zinsser, Frankfurt
Enzymhemmer:	
Aprotinin	Bayer, Leverkusen
Bacitracin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg
Leupeptin N-1000	Bachem, Heidelberg
PEFA-Block SC	Biomol Feinchemikalien, Hamburg
Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)	Boehringer, Mannheim
Trypsininhibitor T-9003	Sigma, München
Ethanol (70%)	Merk, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	PAA, Cölbe/Marburg
Glukose	Merck, Darmstadt
Naltrindol	RBI,Natick, MA, USA
(^{3}H)Naltrindol	NEN, Boston, MA, USA
(^{3}H)(D-Pen^2, D-Pen^5) enkephalin (^{3}H) (DPDPE)	NEN, Boston, MA, USA
Peptide:	
Met-Enkephalin	Sigma, Deisenhofen
Dynorphin A (1-13)	Bachem, Heidelberg

ß-Endorphin (1-31)	Novabiochem, Läufelingen, CH
(D-Ala^2,N-Me-Phe^4,glycinol^5)-Enkephalin	
(DAMGO)	Bachem, Heidelberg
(D-Pen^2, D-Pen^5) enkephalin	
(DPDPE)	Bachem, Heidelberg
Naltriben	Sigma, Deisenhofen
U 69593	Sigma, Deisenhofen
Polyethylenimin	Sigma, Deisenhofen
Saccharose	Merck, Darmstadt
Sodium-Dodeocylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg
Tris-HCl	Boehringer, Mannheim
Triton X-100	Serva, Heidelberg

3.3 Lösungen

Lösungen für Membranbindungsversuche:

PBS defic:

2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH_2HPO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4

Membranpuffer (MP):

10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4; 320 mM Saccharose

Homogenisationspuffer (HGP):

10 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,4, 320 mM Saccharose, 0,01% Aprotinin, 1 mM PMSF, 10 ìg/ml Leupeptin, 10 ìg/ml Trypsininhibitor, 50 ìg/ml Bacitracin

Inkubationspuffer (IKP):

0.5 mM $MgCl_2$, 2,7 mM KCL, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2P0_4, 0,1% BSA, 1 mM PMSF, 10 ìg/ml Leupeptin, 10 ìg/ml Trypsininhitor 50 ìg/ml Bacitracin

Kompensationspuffer (KOP):

1 mM $MgCl_2$, 5,4 mM KCl, 280 mM NaCl, 3 mM KH_2P0_4, 16,2 mM Na_2HPO_4,

0,1% BSA, 0,02% Aprotinin, 2 mM PMSF, 20 ìg/ml Leupeptin, 20 ìg/ml Trypsininhibitor, 100 ìg/ml Bacitracin

Waschpuffer 1 (WP1):
0,5 mM $MgCl_2$, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4

Waschpuffer 2 (WP 2):
0,5 mM $MgCl_2$, 2,7 mM KCl, 140 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4, 8,1 mM Na_2HPO_4
0,01% Triton X-100

Polyethylenimin-Lösung:
0,1% Polyethylenimin

Lösungen für Proteingehaltbestimmung in Membranpräparaten:

Lösung A:
2% Na_2CO_3 in 0,1n NaOH

Lösung B:
0,5% $CuSO_4$ x $5H_2O$ in 1% Natrium-oder Kalium-Tartrat

Folinlösung:
2ml Folin + 2ml H_20_{dest}

3.4 Zellinie

Humane Melanomzellinie:

G-361	ATCC-CRL 1424 (American Type Culture Collection) bezogen über ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbury, UK

3.5 Computerprogramme:

Ligand	Elsevier-Biosoft, Cambridge
ORIGIN 3.5 und 5.0	Microcal (Microsoft)
Word for Windows 97	Microsoft

4 Methoden

4.1 Zellkultur

Die Zellen der humanen Melanomzellinie G-361 wurden in McCoy`s 5A Medium mit 10% fetalem Kälberserum (FCS), 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bei 5% CO_2 und 37°C kultiviert. Sechs Tage vor dem Experiment wurden die Zellen mit einer Dichte von 250000 Zellen in 20ml Medium auf einer Zellkulturschale von 145mm Durchmesser ausgesät. An den letzten beiden Tagen vor einem Versuch wurden 10ml Medium pro Schale pro Tag hinzugefügt. Am Versuchstag wurden die Zellen einer Schale in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Im Durchschnitt wurden 3 x 10^6 Zellen in einem Mediumvolumen von 4ml bestimmt.

4.2 Untersuchungen zur Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361

4.2.1 Liganden: markierte und nicht-markierte Opioidrezeptorliganden

4.2.1.1 Radioaktiv markierte Liganden

Bei den Versuchen zur Charakterisierung der δ-Opioidrezeptoren der Zellinie G-361 sind zwei mit Tritium markierte Liganden eingesetzt worden: Der δ-selektive Agonist (^{3}H)DPDPE und der δ-selektive Antagonist (^{3}H)Naltrindol.
Die markierten Liganden wurden mit Inkubationspuffer (IKP) verdünnt.
Die spezifische Aktivität von (^{3}H)DPDPE betrug 45 Ci/mmol. Die Originallösung mit 50µCi/50µl (^{3}H)DPDPE und wurde auf Aliquots à 0,5µCi/500 ìl IKP-Puffer verdünnt. Ein Aliquot von 500µl wurde pro Versuch verwendet. Pro Versuchsansatz wurden davon 10µl eingesetzt, dies entsprach gemessenen Werten von ca. 22000 dpm. Die Konzentration im Inkubat betrug 2,2 nM.

Die spezifische Aktivitat von (^{3}H)Naltrindol betrug 33 Ci/mmol. Es wurde 1µl von der Originallösung (25µCi/25µl) mit 5ml IKP verdünnt. Diese auf 5ml verdünnte Orginallösung wurde auf 10 Aliquots à 0,5 ml aufgeteilt. Pro Versuchsansatz wurden von einem Aliquot 10µl eingesetzt; dies entsprach gemessenen Werten von ca. 3600dpm. Die Konzentration von (^{3}H)Naltrindol im Inkubat betrug 0,6nM.

4.2.1.2 Nicht markierte Liganden

Die bei den Versuchen als Verdränger eingesetzten Liganden Naltrindol, Naltriben, DPDPE, DAMGO, U 69593, ß-Endorphin, Dynorphin A, [Met]Enkephalin wurden in einer Konzentration von 10^{-4} M als Aliquots von 20 µl 0,1/% BSA eingesetzt, was einer Konzentration von 2 x 10^{-5} M im Inkubat entsprach.

4.2.2 Membranen der Melanozytenzellinie G-361

4.2.2.1 Herstellung von Membransuspensionen

Bei der Herstellung der Membransuspensionen wurden bereits publizierte Verfahren mit Modifikation eingesetzt (Repp, 1993; Woods et al., 1997; Wheatley et al., 1997). Die G-361-Zellen wurden am Versuchstag dem 37°C Brutschrank entnommen. Das Nährmedium wurde Schale für Schale mit Hilfe der Pipettierhilfe Pipetus Akku abpipettiert. Anschließend wurde jede Schale einmal mit 10ml PBSdefic bei Raumtemperatur gespült. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C vollzogen. Zunächst wurden alle Schalen 7ml Membranpuffer (MP) zugesetzt, die Schalen sanft bewegt und der MP wieder abpipettiert. Dieser Vorgang wurde ein Mal mit MP wiederholt. Im Anschluß wurde jeder Schale 1,0 ml Homogenisationspuffer (HGP) hinzugefügt und durch Schalenbewegung auf der Schale verteilt. Nun wurden die Zellen mit einem Teflonschaber von der Schale abgeschabt und in einen Homogenisationskolben transferiert. Um die noch an der Schale klebenden Zellen zu gewinnen, wurde anschließend die Schale mit 1,5 ml HGP gespült und das gewonnene Volumen wurde ebenfalls dem Homogenisationskolben hinzugefügt.

Die so gewonnenen Zellsuspensionen von je 10 Schalen wurde bei 800 Umdrehungen/min mit einem rotierendem Teflonstempel, der langsam 20mal auf und ab bewegt wurde, im Homogenisationskolben homogenisiert. Das Homogenat wurde in 50ml Sarstedt-Röhrchen transferiert und 5 Minuten bei 200 x g in der Sörvallzentrifuge mit einem SS34-Rotor abzentrifugiert.
Der Überstand wurde abpipettiert auf 13ml Sarstedt-Röhrchen gleichmäßig verteilt und 20 Minuten bei ca. 38000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Pellets in HGP resuspendiert, gepoolt und nochmals 20 Minuten bei ca. 38000 x g zentrifugiert.
Das so gewonne Membranpellet wurde entweder sofort in Inkubationspuffer (IKP) resuspendiert und bei einer Proteinkonzentration von ca.13 mg/ml in Radioligand-Bindungsversuchen eingesetzt, oder sofort bei –80°C eingefroren und aufbewahrt, um es an einem anderen Versuchstag einzusetzen.
Pro Ansatz wurden Membranen von 3 x 10^7 Zellen eingesetzt.

4.2.2.2 Proteinbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Membransuspensionen wurde die Methode nach Lowry angewandt (Lowry et al., 1951).
Die Reste der zu Versuchen genutzten Membransuspensionen wurden bei –80°C gelagert. Zur Proteinbestimmung wurden sie aufgetaut und es wurden Verdünnungen à 200µl von 1:50, 1:100, 1:200 und 1:400 mit $Aqua_{dest}$ hergestellt. Anschließend wurde diesen Verdünnungen 1000µl eines Gemisches, welches aus 3,0ml Lösung A und 0,3ml Lösung B bestand, zugefügt und 10 Minuten geschüttelt. Nach Hinzufügung von 100µl Folinlösung wurden die Verdünnungen kurz geschüttelt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem Photometer wurden die einzelnen Ansätze nun bei 750nm gegen einen Leerwert (IKP) gemessen. Der Leerwert wurde dabei von jedem Einzelwert abgezogen.
Zusätzlich wurden Proteinverdünnungen (Ovalbumin) von 2,5 µg/ml bis 400µg/ml angefertigt. Aus diesen Verdünnungen wurden Extinktionswerte bei 750nm ermittlelt und ein Standardkurve hergestellt. Anhand dieser Standardkurve konnten den Extinktionswerten der Testlösungen und damit den Membransuspensionen Proteinkonzentrationen zugeordnet werden.

Der Proteingehalt der einzelnen eingesetzten Membransuspensionen lag bei 12-13,5mg/ml.

4.2.3 Durchführung des Bindungsversuchs

Alle Bindungsversuche wurden bei 4°C im Kühlraum oder auf Eis und mit auf 4°C gekühlten Lösungen durchgeführt. Die Inkubationsansätze wurden in normalen Laborräumen fertiggestellt, der radioaktiv-markierte Ligand wurde als letztes unter Einhaltung der erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen im Isotopen-Labor hinzugefügt.

4.2.3.1 Inkubationsansätze

Beim Radioliganden-Bindungsversuch mit Zellmembranen wurden 100µl Inkubationsansätze in 2ml Eppendorfgefäßen bei 4°C für 180 Minuten inkubiert. Direkt nach der Zugabe des radioaktiv-markierten Liganden (^{3}H)Naltrindol („Tracer“) , bzw. (^{3}H)DPDPE, wurden die Inkubationsansätze für 10sec auf einem Eppendorf-Rüttler geschüttelt. Während der gesamten Inkubationszeit wurden die Inkubationsansätze auf einem Varishaker bei 4°C in einem Kühlschrank bewegt. Alle Ansätze wurden zweifach oder dreifach angesetzt. Die einzelnen Ansätze wurden nach folgendem Schema pipettiert:

	BO	VD	BL	CT
Membransuspension (in IKP)	50µl	50µl	-	-
Inkubationspuffer (IKP)	-	-	50µl	-
0.1% BSA	20µl	-	20µl	-
Verdränger (unmarkierter Ligand) (in 0,1% BSA)	-	20µl	-	-
Kompensationspuffer	20µl	20µl	20µl	-
Tracer (in Inkubationspuffer)	10µl	10µl	10µl	10µl

Tab.1: Inkubationsansätze des Zellmembranbindungsversuch

Die in der Tabelle verwendeten Abkürzungen werden nachfolgend erläutert:

- **Standard(kontroll)ansätze (BO):**
  Zur Bestimmung der (spezifischen und unspezifischen) Gesamtbindung des Tracers an die Zellmembranen
- **Kompetitions-/Verdrängungsansatz (VD):**
  Zur Bestimmung des Anteils des Tracers, der sich durch Zugabe eines nicht radioaktiv-markierten Liganden von seiner Bindungsstelle verdrängen ließ. Waren radioaktiv markierter und nicht markierter Ligand bis auf die Markierung identisch, so konnte bei Zugabe einer extrem hohen Konzentration an kaltem Liganden der verdrängte Anteil als Maß für die spezifische Bindung des Tracers angesehen werden, der nicht verdrängte Anteil repräsentierte die unspezifische Bindung des Tracers.
- **Blank-Ansätze (BL):**
  Zur Bestimmung der an den Filter (s.u.) gebundenen Menge an Tracer in Ansätzen ohne Zellen, die aber sonst genau wie Standardansätze behandelt worden waren. Auch der Geräte-Leerwert des Beta-Counters konnte hiermit erfaßt werden.
- **Total-Counts-Ansätze (CT):**
  Zur Bestimmung der für jeden Einzelansatz zur Verfügung stehenden Gesamt-Radioaktivität. 10µl Tracervolumen (wie in allen anderen Inkubationsansätzen) wurden wie die anderen Proben im Beta-Counter gemessen.

4.2.3.2 Trennmethode: Filtration

Nach der Inkubation wurden die Ansätze in einer Filtrationanlange weiterverarbeitet. Dabei wurde der membrangebundene von dem freien radioaktiv markierten Liganden getrennt.
In jeden Ansatz wurde 1 ml eisgekühlter Waschpuffer 1 (WP1) schnell einpipettiert und für ca. 3 Sekunden auf einem Tischrührer (Vortexer) durchmischt. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde anschließend sofort auf einen Glasfilter GFB, der zuvor 3

Stunden lang bei Raumtemperatur in 0,1% Polyethyleniminlösung inkubiert und der direkt vor der Filtration einmal mit 3 ml eisgekühltem Waschpuffer 2 (WP2) gewaschen worden war, dekantiert (Bruns et al., 1983). Die beiden zuletzt genannten Schritte wurden zweimal ohne Vortexen wiederholt. Anschließend wurden alle Filter zweimal mit 3 ml eisgekühltem WP2 nachgewaschen. Die GFB-Filter wurden in 20 ml Szintillationsröhrchen transferiert, denen 2 ml 0,1% Triton X-100 hinzugefügt wurde und die über Nacht bei Raumtemperatur auf einem Rundschüttler geschüttelt wurden. Nach Zugabe von 10 ml Aquasafe 300 plus am nächsten Tag wurden die Röhrchen erneut über Nacht auf dem Rundschüttler bei Raumtemperatur geschüttelt.

4.2.3.3 Bestimmung der Radioaktivität

Am darauffolgenden Tag wurden die Proben in den Beta-Counter gestellt. Die Radioaktivität (dpm) wurde 10 Minuten pro Probe gemessen. Externe Eichung und zuvor erstellte Quenchkurve ermöglichten die Ausgabe der Daten in dpm.

4.2.4 Auswertung der Bindungsdaten

Bei der Auswertung wurden die gemessenen Daten mit verschiedenen Formeln ausgewertet, mit dem Ziel, die Bindung des Tracers an die Zellmembranen in Abwesenheit und in Anwesenheit von Verdrängern zu quantifizieren.
Der Wert Bindung (B) des Tracers in Abwesenheit von Verdrängern errechnete sich aus dem Wert des Standardansatzes (BO) abzüglich des Blank-Wertes (BL), der den Wert der Filteradsorption des Tracers ohne Zellmembransuspension angab.

$$B = BO - BL \quad [dpm]$$

In den meisten Experimenten war nicht die Bindung des Tracers in Abwesenheit, sondern in Anwesenheit von Verdrängern, von Interesse, und zwar jeweils bezogen auf den BO als Kontrollwert. Berechnet wurde dann der Wert der Bindung (B_{VD}) des Verdrängungsansatzes (VD) in % des Standardwertes (BO) („*in Prozent des Kontrollwertes*“).

$$B_{VD} = [(VD – BL)/(BO – BL)] \times 100 \quad [\%]$$

Bei einigen anderen Experimenten, z.B. den On/Off-Kinetiken, wurden die Bindungsdaten auf eine andere Art berechnet: Die im Versuchsansatz gemessenen Werte (BO oder VD) wurden als prozentuale Anteile (BO/CT oder VD/CT) der Gesamtmenge des in den Inkubationsansatz eingebrachten Tracers dargestellt (ausgedrückt als; „*in % von (^{3}H)Naltrindol im Ansatz*“).

$$BO/CT = [(BO – BL)/(CT – BL)] \times 100 \quad [\%]$$

$$VD/CT = [(VD – BL)/(CT – BL)] \times 100 \quad [\%]$$

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwerte +/- Standardabweichungen angegeben. Die meisten der einzelnen Versuche wurden dreifach, in wenigen Ausnahmen, auf die gesondert hingewiesen wird, zweifach durchgeführt.

4.2.5 Bestimmung der Bindungscharakteristika

Die Charakteristika der Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanozytenzellinie G-361 wurden nach den in der Literatur postulierten Kriterien einer spezifischen Ligand-Binder-Interaktion in Radioligand Binding Assays (RBAs) untersucht (Burt, 1978). Neben Strukturspezifität, Sättigbarkeit, Zeitabhängigkeit und Reversibilität wurden zusätzlich die Abhängigkeit von der Konzentration des Binders, die Bindungsparameter K_D und B_{MAX} und die Ionenabhängigkeit bestimmt.
Charakteristisch für „spezifische“ Bindungsstellen sind eine begrenzt hohe Konzentration, eine hohe Affinität des Liganden zu dieser Bindungsstelle und demnach die „Sättigbarkeit“ dieser Bindungsstellen. Hieraus resultiert ein innerhalb eines begrenzten Beobachtungszeitraums ablaufender Bindungs- und Assoziationsprozeß („ON-Kinetik“), ein ebenso zeitgebundener Lösungs- und Dissoziationsprozeß („OFF-Kinetik“) und die Möglichkeit der Verdrängung eines Liganden aus dieser Bindungsstelle durch einen zweiten Liganden. Solche Bindungsstellen finden sich auf Rezeptoren. Liganden, welche nicht nur binden, sondern aufgrund der Bindung über eine Konfigurationsänderung ein Wirkung

erzielen, bezeichnet man als Agonisten; Liganden, welche keine oder eine Konfigurationsänderung im Sinne einer Inaktivierung des Rezeptors erzielen, bezeichnet man als Antagonisten.
(^{3}H)Naltrindol ist ein Antagonist an δ-Opioidrezeptoren.

4.2.5.1 Abhängigkeit von der Konzentration des Binders

Bei konstanter Menge des markierten Liganden werden ansteigende Mengen des Binders (Membransuspension) eingesetzt. Wenn es sich um eine spezifische Bindungsstelle handelt, nimmt ab einer bestimmten Konzentration des Binders die spezifische Bindung des Liganden nicht mehr linear proportional zur Konzentration des Binders zu. Die Bindungskurve verläuft demnach nicht schon ab Einsatz kleinster Binderkonzentrationen linear, sondern nicht linear.
Die Membransuspension aus Zellen wurde so verdünnt, daß aufsteigende Konzentrationen entsprechend 5.6 x 10^6 bis 1.2 x 10^8 Zellen in 50µl Membransuspension pro Ansatz erreicht wurden.

4.2.5.2 Zeitabhängigkeit

Der Bindungs-oder Assoziationsprozeß („ON-Kinetik“) ist zeitgebunden, d.h. daß innerhalb eines Beobachtungszeitraums die Bindung des Liganden an den Rezeptor mit der Zeit zunimmt. Bei einer spezifischen Bindung läßt sich dieser Prozeß in Form einer asymptotisch auf einen Grenzwert zulaufenden Kurve darstellen, da nach einer gewissen Zeit bei einer begrenzten Menge des Liganden ein dynamisches Gleichgewicht erreicht wird, bei dem Bindungs- und Ablösungprozesse des Liganden an den Rezeptor mit der gleichen Geschwindigkeit ablaufen.
Über die Dauer von 180 Minuten wurden Membransuspensionen der Zellen der Melanomzellinie G-361 mit (^{3}H)Naltrindol inkubiert. Einzelne Proben wurden zu Beginn, nach 10, 30, 60, 120 und 180 Minuten entnommen und die Menge an gebundenem tritiierten Liganden gemessen. Allen gemessenen Werten wurde der gemessene Leerwert „Blank“ (Menge an gebundenem Tracer ohne Zellmembranen, s.o.) abgezogen.

4.2.5.3 Reversibilität

Die Reversibilität der Bindung des Liganden an seinen Rezeptor ist Bestandteil der Charakteristik einer spezifischen Bindung. Hiermit ist die Möglichkeit eines zeitgebundenen Loslösungs-oder Dissoziationsprozesses gemeint, bei dem der Ligand aus der Bindung an einen Rezeptor durch Zugabe eines zweiten Liganden verdrängt werden kann.
Bei dem Versuch wurde zunächst eine konstante Menge an Membransuspension mit einer konstanten Menge an Tracer über 180 Minuten inkubiert, bis das pharmakokinetische Gleichgewicht sich eingestellt hatte (s.o.). Anschließend wurde durch Zugabe eines 2×10^{-5} M kalten Liganden versucht, den Tracer aus seiner Bindung zu verdrängen. Über einen bestimmten Zeitraum wurden regelmäßig Proben entnommen und die Abnahme der Bindung des markierten Liganden festgehalten.

4.2.5.4 Sättigbarkeit

Die Sättigbarkeit einer spezifischen Bindungsstelle kann durch Sättigungsexperimente - unter Vorgabe konstanter Binderkonzentrationen werden variable Konzentrationen an markiertem Liganden eingesetzt – oder durch Verdrängungsexperimente – unter Vorgabe konstanter Binderkonzentrationen und konstanter Konzentration an markiertem Liganden werden variable Konzentrationen an nicht-markiertem Liganden eingesetzt - bestimmt werden. Im Rahmen der Arbeit wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt: Trägt man steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Liganden gegen die jeweils erhaltenen Konzentrationen an gebundenem markiertem Liganden in einem Graphen auf, so bekommt man eine Verdrängungskurve, bei der die Konzentration an gebundenem markiertem Liganden mit steigender Konzentration an kaltem Liganden sinkt.
Es wurden Konzentrationen von 2×10^{-6} M – 2×10^{-11} M im Inkubat an kaltem Naltrindol (NTI) bei gleichbleibender Konzentration an (^{3}H)Naltrindol (0.6nM) eingesetzt.

4.2.5.5 Bindungsparameter K_D und B_{MAX}

Aus den Daten der Sättigungsexperimente wurden die Bindungsparameter K_D (Dissoziationskonstante K_D, Gleichgewichts- oder Equilibrium-Konstante des Bindungsprozesses) und B_{MAX} (Bindungskapazität) bestimmt. Bei einer spezifischen Bindung hat der Ligand in der Regel eine hohe Affinität zu seiner Bindungsstellle. Der K_D - Wert ist dementsprechend niedrig. K_D und B_{MAX} wurden im Computerprogramm LIGAND (Munson and Rodbard, 1980, in EBDA, McPherson, 1986) durch iterative Anpassung des jeweilig gewählten Bindungsmodells an die gemessenen Daten der Verdrängungsexperimente bestimmt. Es erlaubt zusätzlich den statistischen Vergleich der Wahrscheinlichkeit von Modellen unterschiedlicher Komplexität, z.B. mit mehreren Bindungsstellen.

4.2.5.6 Strukturspezifität der Bindungsstelle

Die Strukturspezifität der Bindungsstelle wurde bestimmt: Als markierter nicht-selektiver δ_1-/δ_2-Opioidrezeptor-Ligand wurde (^{3}H)Naltrindol eingesetzt. In Radioligand Binding Assays (RBAs) wurde versucht, diesen Liganden von seinem Rezeptor durch verschiedene kalte Liganden zu verdrängen. Hierbei wurden als kalte Liganden der μ-selektive Opioidrezeptoragonist [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] enkephalin DAMGO, der κ-selektive Opioidzrezeptoragonist U 69593, der δ_1-selektive Opioidrezeptoragonist [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin (DPDPE), der δ_2-selektive Opioidrezeptorantagonist Naltriben und der nicht-selektive δ_1-/δ_2-Opioidrezeptorantagonist Naltrindol (NTI) verwendet. Des weiteren wurde versucht, den tritiierten Liganden durch die endogenen Opioide ß-Endorphin(1-31), Dynorphin A(1-13) und Met-Enkephalin aus der Bindungsstelle zu verdrängen.
Im Rahmen der Arbeit wurden Verdrängungsexperimente durchgeführt: unter Vorgabe konstanter Binderkonzentrationen und konstanter Konzentration an markiertem Liganden wurden variable Konzentrationen an nicht-markiertem Liganden eingesetzt. Als markierter, mit konstanter Konzentration eingesetzter Ligand wurde 0,6nM (^{3}H)Naltrindol verwendet. Die eingesetzten nicht-markierten Liganden U69593, [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] enkephalin DAMGO; [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin DPDPE, Naltriben, Dynorphin A (1-13), Met-Enkephalin und ß-Endorphin(1-31)

dienten der Bestimmung der δ-, μ- und κ-Selektivität der Bindungsstellen. Die eingesetzten δ_1-bzw. δ_2-selektiven Liganden DPDPE und Naltriben sowie der im Vergleich dazu eingesetzte nicht-selektive Opioidrezeptorligand Naltrindol dienten der Bestimmung der δ_1-/δ_2-Selektivität der Bindungsstellen. Die nicht-markierten Liganden wurden in Konzentrationen von 2×10^{-11} M bis 2×10^{-6} M eingesetzt. Trägt man steigende Konzentrationen an nicht-markiertem Liganden gegen die jeweils erhaltenen Konzentrationen an gebundenem markiertem Liganden in einem Graphen auf, so bekommt man eine Verdrängungskurve, bei der die Konzentration an gebundenem markiertem Liganden mit steigendender Konzentration an kaltem Liganden sinkt.
Aus den Daten dieser Verdrängungsexperimente wurden die Bindungsparameter K_D für die eingsetzten Liganden im Computerprogramm LIGAND durch iterative Anpassung des jeweils gewählten Bindungsmodells an die gemessenen Daten bestimmt.

4.2.5.7 Ionenabhängigkeit

Verschiedene RBAs wurden durchgeführt, um eine Ionenabhängigkeit der Bindung von (^{3}H)Naltrindol an die Membranen von Melanozyten der Zellinie G-361 zu überprüfen. So wurden RBAs mit markiertem Naltrindol bei verschiedenen Konzentrationen von K^+ und Ca^{2+} durchgeführt. Die Ionen wurden in Konzentrationen von 2×10^{-1} bis 2×10^{-4}M (Ca^{2+}) bzw. in Konzentrationen von 2×10^{-1} M, $2{,}4 \times 10^{-2}$ M und $6{,}2 \times 10^{-3}$ M (K^+) eingesetzt.

4.2.6 Untersuchungen zur Bestimmung des δ-Opioidrezeptor-Subtyps

Um zu prüfen, inwieweit es sich bei den auf den Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 lokalisierten δ-Opioidrezeptoren um δ_1-und/oder δ_2-Rezeptoren handelte, wurden Verdrängungsexperimente mit einem hochselektiven δ_1-Rezeptorliganden (DPDPE) und einem hochselektiven δ_2-Rezeptorliganden (Naltriben) durchgeführt.Der nicht-selektive δ_1-/δ_2-Rezeptorligand Naltrindol wurde

zum Vergleich ebenfalls eingesetzt. Die Konzentrationen der Opioide lagen zwischen 2×10^{-6} M und 2×10^{-11} M.

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis der Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361

Der δ-Opioidrezeptor der Melanomzellinie G-361 ist bereits durch PCR und Radioligandbindingassays erfasst worden (Mayer et al., 2000). Bei dieser Arbeit konnten jedoch nur Werte für die spezifische Bindung gemessen werden, die bei 1% der Gesamtradioaktivität im Ansatz lagen. Abweichend von dem in dieser Arbeit verwendeten Liganden (^{3}H)DPDPE wurde versucht, die Rezeptoren durch einen Liganden wesentlich höherer Affinität, nämlich Naltrindol (NTI), genauer zu charakterisieren.

(^{3}H)Naltrindol ist von verschiedenen Arbeitsgruppen zum Nachweis von δ-Opioidrezeptoren in Membranhomogenaten, z.B: von Nerven- und Intestinalgeweben, eingesetzt worden (Lever and Scheffel, 1998). Die in den Veröffentlichungen angegebenen Konzentrationen von (^{3}H)Naltrindol befanden sich im Bereich 0.1 – 3.0 nM. Da es noch keine Erfahrung bei der Anwendung dieses Liganden bei Membransuspensionen von Hautzellen gab, waren Vorversuche zur Sondierung der optimalen Konzentration von (^{3}H)Naltrindol notwendig.
Im Vergleich zu (^{3}H)DPDPE ergaben sich für (^{3}H)Naltrindol wesentlich höhere Werte für die spezifische Bindung (siehe Abb.1). Um eine vollständige Verdrängung des spezifisch gebundenen markierten durch den nicht-markierten Liganden zu gewährleisten, wurde das nicht markierte Naltrindol in einer Konzentration von 2×10^{-5} M eingesetzt. Im Vergleich zu 3.0nM (^{3}H)Naltrindol konnten mit 0.6nM (^{3}H)Naltrindol wesentlich höhere Werte für die spezifische Bindung erzielt werden (siehe Abb.1).

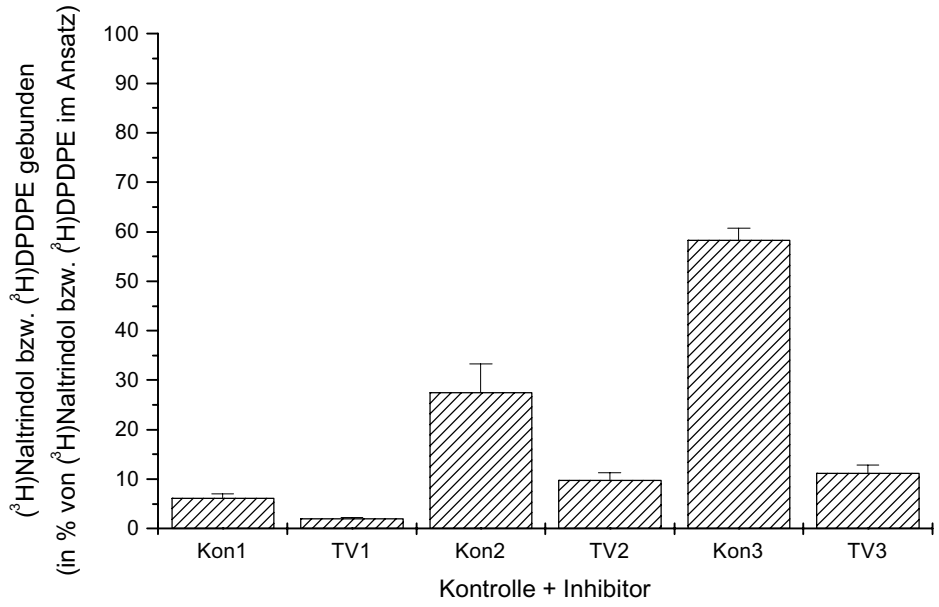

Abb.1: Bindung von (^{3}H)DPDPE bzw. (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361. Die Konzentration der Verdränger im Inkubat betrug 2 x 10^{-5} M. Die Konzentration von (^{3}H)DPDPE betrug 2.2 nM, die von (^{3}H)Naltrindol 3.0 bzw. 0.6nM im Inkubat. Angabe in Prozent der Gesamtmenge des jeweils eingesetzten Tracers im Ansatz. Mittelwerte und Standardwerte aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

Kon1 = (^{3}H)DPDPE **TV1= (^{3}H)DPDPE + DPDPE**

Kon2 = 3.0nM (^{3}H)Naltrindol **TV2= 3.0nM (^{3}H)Naltrindol + Naltrindol**

Kon3 = 0.6nM (^{3}H)Naltrindol **TV3= 0.6nM (^{3}H)Naltrindol + Naltrindol**

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei allen Versuchen zur Charakterisierung der δ-Opioidrezeptoren (^{3}H)Naltrindol in einer Konzentration von 0.6nM eingesetzt.

1.2 Charakteristika der Bindung des ä-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361

Nach μ- oder κ-Opioidrezeptoren auf den Membranen der G-361-Zellen wurde aufgrund früherer Arbeiten nicht mehr gesucht (Mayer et al., 2000). Die Charakterisierung der Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 erfolgte unter Berücksichtigung der Kriterien einer spezifischen Liganden-Binder-Interaktion nach Burt (1978). Zusätzlich wurde die Strukturspezifität der Bindung und ihre Ionenabhängigkeit untersucht.

5.2.1 Abhängigkeit von der Konzentration des Binders

Bei den Versuchen zur Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Binders wurde die Menge des markierten Liganden konstant gehalten und die Menge des Binders variiert (siehe Abb.2).

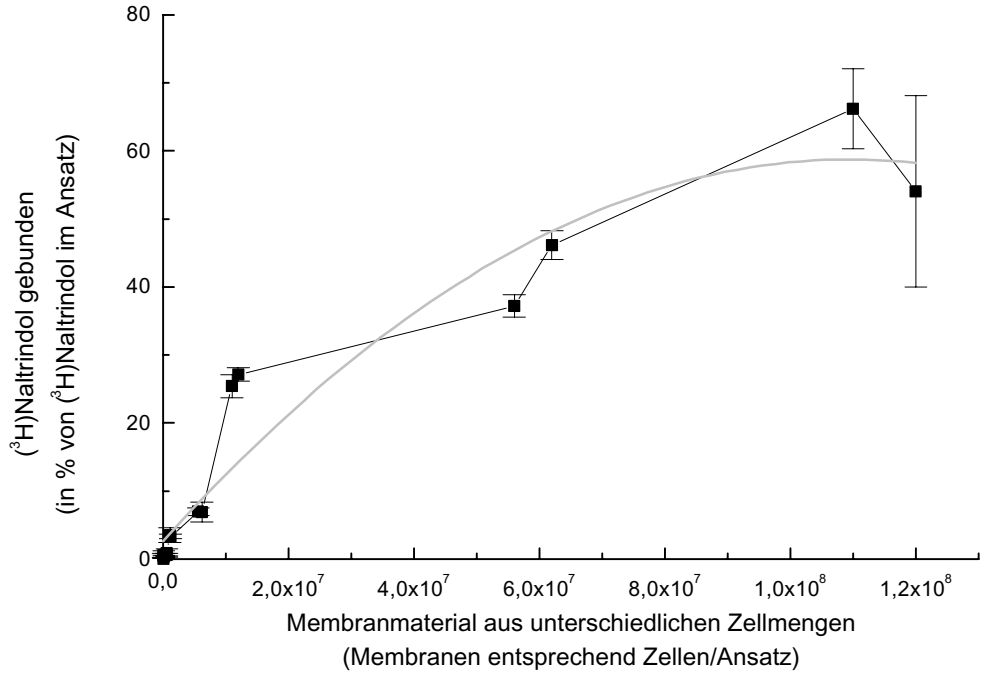

Abb.2: Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration des Binders: (^{3}H)Naltrindol (gebunden) bei steigenden Konzentrationen an Membranmaterial. Die Menge an eingesetzten Zellen bewegte zwischen 5.6 x 10^6 und 1.2 x 10^8 Zellen. Angaben in Prozent der Gesamtmenge von (^{3}H)Naltrindol (0.6nM) im Ansatz. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

Die Membransuspension aus Zellen wurde so verdünnt, daß aufsteigende Konzentrationen entsprechend 5.6 x 10^6 bis 1.2 x 10^8 Zellen in 50µl Membransuspension pro Ansatz erreicht wurden. Es konnte festgestellt werden, daß die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 abhängig von der Konzentration des Binders war. Die Menge des eingesetzten Tracers war begrenzt und so näherte sich die Menge an gebundenem (^{3}H)Naltrindol mit zunehmender Menge an Binder einem Grenzwert (siehe Abb.2).

5.2.2 Zeitabhängigkeit

Die Bindung des δ-selektiven Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 erwies sich als zeitabhängig. Über einen Zeitraum von 180 Minuten stieg die in Abständen gemessene, gebundene Menge des tritiierten Liganden an, um sich schließlich dem Grenzwert eines Assozistions-Dissoziationsgleichgewichts anzunähern. Nach 180 Minuten betrug die Menge an gebundenem (^{3}H)Naltrindol ca. 37 Prozent der gesamten Menge des eingesetzten Tracers (Abb.3).

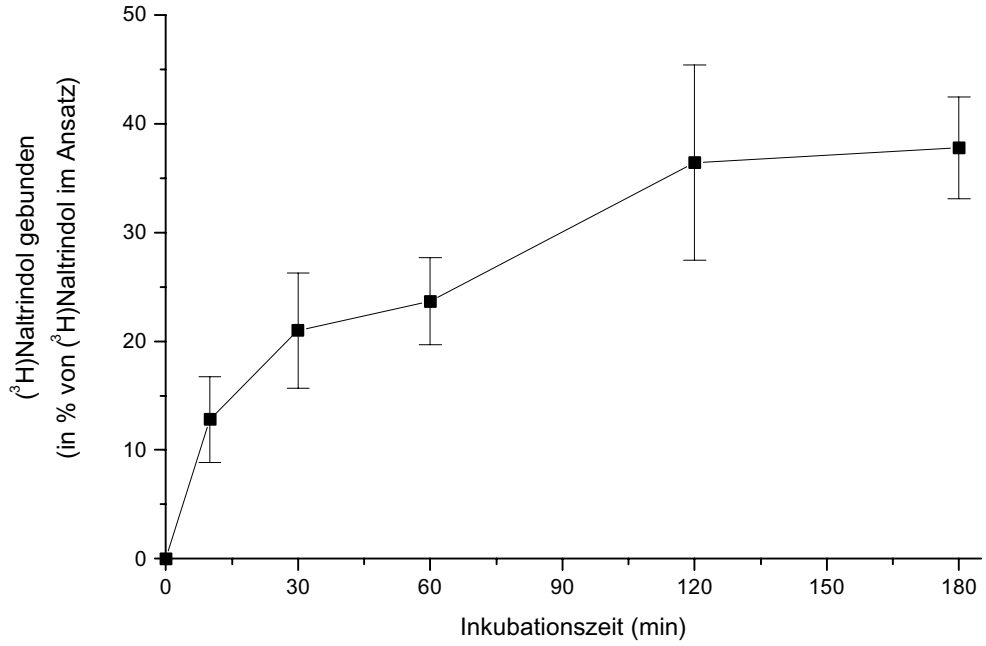

Abb.3: Zeitabhängigkeit der Bindung: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 in Abhängigkeit von der Zeit (ON-KINETIK). Angabe der Bindungen als Prozent der Gesamtmenge des zugefügten Tracers. Die Konzentration des Tracers im Inkubat betrug 0.6nM. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

5.2.3 Reversibilität

Über die Dauer von 180 Minuten wurden Membransuspensionen der Zellen der Melanomzellinie G-361 mit (^{3}H)Naltrindol inkubiert. Nach 180 Minuten wurde ein Überschuß an kaltem Naltrindol hinzugefügt. Die Proben wurden dann über unterschiedlich lange Zeiträume inkubiert. Anhand der gemessenen Ergebnisse ließ sich feststellen, daß die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an die Bindungsstellen partiell reversibel war. Dies bedeutete, daß der markierte gebundene Ligand nicht vollständig durch einen Überschuß an kaltem Liganden aus der Bindung verdrängt werden konnte. Die Menge an gebundenem (^{3}H)Naltrindol wurde jedoch so weit reduziert, daß man von einer partiellen Reversibilität der Bindung sprechen konnte. Der Anteil an gebundenem (^{3}H)Naltrindol an der Gesamtmenge des eingesetzten Tracers fiel von ca. 37 % nach 180 Minuten auf ca. 25 % nach 360 Minuten (Abb.4).

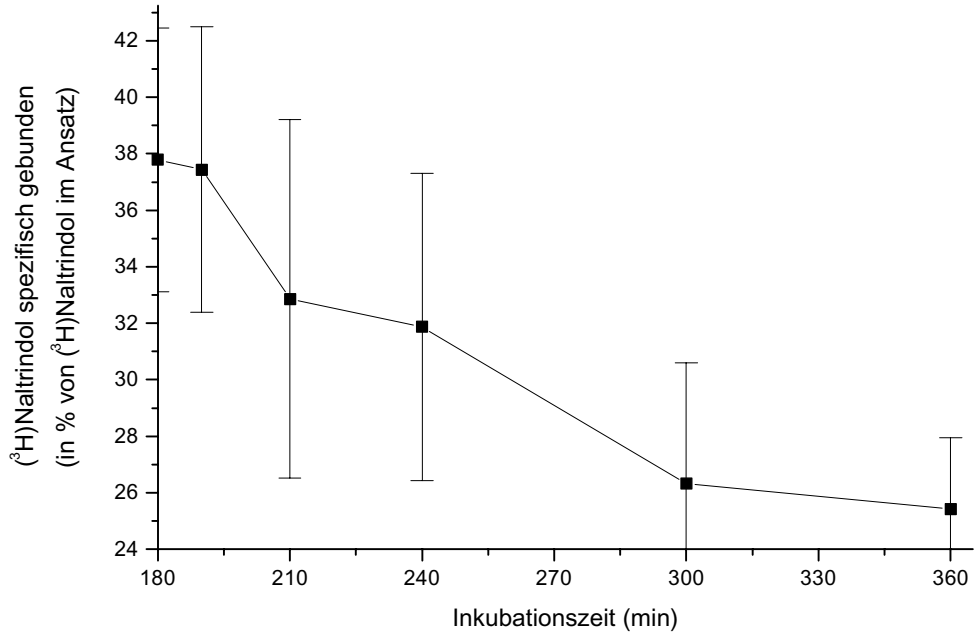

Abb.4: Reversibilität der Bindung: Bindung von (über 180 Minuten vorinkubiertem) (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 nach Zugabe von 2 x 10^{-5} M nicht-markiertem Naltrindol (OFF-KINETIK). Die Konzentration von (^{3}H)Naltrindol im Inkubat betrug 0.6/nM. Angabe in Prozent der Gesamtmenge an eingesetztem Tracer im Ansatz. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

5.2.4 Sättigbarkeit

Zur Überprüfung der Sättigbarkeit der Bindung wurde ein Verdrängungsversuch durchgeführt. Bei konstant gehaltenen Konzentrationen an Binder und markiertem Liganden wurden lediglich die Konzentrationen an unmarkiertem Liganden variiert. Die graphische Darstellung des Ergebnisses entsprach einer Verdrängungskurve, d.h. die Konzentration an gebundenem markiertem Liganden sank mit steigender Konzentration an kaltem Liganden. Es wurden Konzentrationen von 2×10^{-6} M – 2×10^{-11} M im Inkubat an kaltem Naltrindol (NTI) bei gleichbleibender Konzentration an (^{3}H)Naltrindol (0.6nM) eingesetzt. Durch Erhöhen der Konzentration an NTI konnte die prozentuale Bindung von (^{3}H)NTI bezogen auf die Gesamtmenge des im Ansatz eingesetzten Tracers von ca. 47 % bei 2×10^{-11} M NTI auf ca. 12 % bei 2×10^{-6} M NTI verdrängt werden (siehe Abb.5).

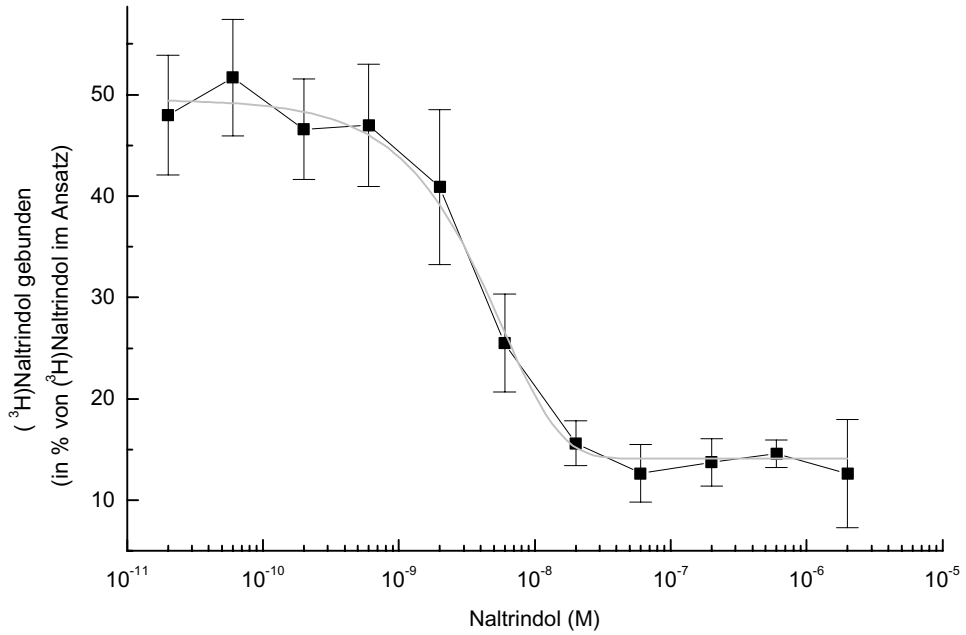

Abb.5 Sättigbarkeit der Bindung: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen (2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M) von nicht-markiertem Naltrindol. Inkubationszeit 180min. Die Konzentration von (^{3}H)Naltrindol betrug 0.6nM im Inkubat. Angabe in Prozent der Gesamtmenge an (^{3}H) NTI im Ansatz. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

5.2.5 Bindungsparameter K_D und B_{MAX}

Die mit dem Computerprogramm LIGAND aus den Daten der Verdrängungsexperimente berechneten Bindungsparameter waren:
K_D= 7.7 x 10^{-10} M und B_{MAX}= 1.0 x 10^{-9} M. Der somit erhaltene K_D-Wert lag im Bereich der aus der Literatur zu entnehmenden Werte zwischen 0,5 x 10^{-10} M und 5,0 x 10^{-10} M überein (Kieffer, 1995).

5.2.6 Strukturspezifität der Bindung

Zur Bestimmung der Strukturspezifität der Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 wurde die Bindung von (^{3}H)Naltrindol in Anwesenheit verschiedener, nicht markierter endogener (ß-Endorphin(1-31), Dynorphin A (1-13), Met-Enkephalin) und exogener (Naltrindol (NTI), Naltriben, [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO), U 69593) Opioide in einem Konzentrationsbereich von 2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M gemessen (siehe Abb.6).
Die Verdrängerversuche erbrachten lückenlose, detaillierte Information zur Strukturspezifität der Bindung über den gesamten geprüften Konzentrationsbereich der Verdränger hinweg – einschließlich K_D, B_{MAX} und Anzahl der Bindungsstellen, von denen das (^{3}H)Naltrindol verdrängt werden könnte. Die Verdrängbarkeit des (^{3}H)Naltrindols durch Verdränger in 10^{-5} M Konzentration ergab den Überblick über die Strukturspezifität der Bindung.
Zur Darstellung der letztgenannten Ergebnisse wurde die Bindung des markierten Liganden in Abwesenheit von Verdrängern gleich 100% gesetzt. Die Bindung des markierten Liganden in Anwesenheit verschiedener Verdränger wurde als prozentualer Anteil der Kontrolle aufgetragen (Abb.6).

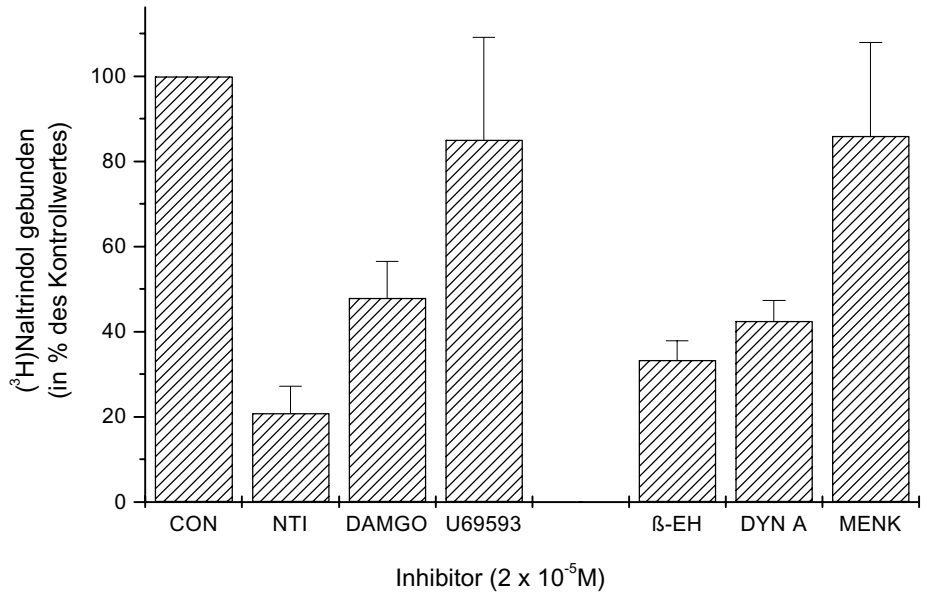

Abb.6: Strukturspezifität der Bindung: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 in Abwesenheit (Kontrolle: CON) und in Anwesenheit verschiedener endogener (ß-Endorphin(1-31), Dynorphin A (1-13), Met-Enkephalin) und exogener (Naltrindol (NTI), [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO), U 69593) Opioide. Im Inkubat betrug die Konzentration des Tracers 0.6nM und die der Opioide 2 x 10^{-5} M. Angabe der Bindung in Prozent der Kontrolle. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

Die eingesetzten Opioide konnten (^{3}H)Naltrindol großenteils aus der Bindung an die Membranen verdrängen, der δ-selektive Opioidrezeptorligand Naltrindol natürlich am meisten. Da Naltrindol nicht nur an δ-Opioidrezeptoren, sondern auch an – mit geringer Affinität- μ-Rezeptoren bindet (Kieffer, 1995), konnte auch der hochselektive μ-Opioidrezeptorligand DAMGO einen Verdrängungseffekt erzielen. Dies würde allerdings bedeuten, daß (^{3}H)Naltrindol an μ-Rezeptoren gebunden hatte, die auf G-361-Zellen überhaupt nicht vorhanden sind – es sei denn, die δ-Opioidrezeptormutante auf diesen Zellen verhielte sich gegenüber Naltrindol und DAMGO wie ein μ-Rezeptor. Der Verdrängungseffekt durch DAMGO ist jedenfalls nicht wegzudiskutieren.

Der hochselektive κ-Opioidrezeptorligand U69593 verdrängte nicht, was sich mit der Tatsache deckt, daß Naltrindol nicht an κ-Rezeptoren bindet. Auch die starke Verdrängung des (^{3}H)Naltrindols durch β-Endorphin wäre mit einer Vedrängung des (^{3}H)Naltrindols von μ-Rezeptoren kompatibel. Auch β-Endorphin hat, ebenso wie Naltrindol, hohe Affinität zu μ- und δ-Rezeptoren. Dynorphin A (1-13) verdrängt das (^{3}H)Naltrindol weniger als β-Endorphin, was damit übereinstimmt, daß es nur Affinität zu κ- und δ-Rezeptoren, dagegen keine zu μ-Rezeptoren hat. Met-Enkephalin hat, wenn auch geringere, so doch Affinität zu μ- und δ-Rezeptoren wie β-Endorphin – warum es in diesen Versuchen so wenig inhibitorisch wirksam war, bleibt zu klären.

Wie beschrieben wurden auch Verdrängungsexperimente mit den endogenen Opioiden ß-Endorphin(1-31), Dynorphin A (1-13) und Met-Enkephalin als nicht markierte Liganden in Konzentrationen von 2×10^{-6} M bis 2×10^{-11} M eingesetzt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse entsprach Verdrängungskurven, d.h. die Konzentration an gebundenem markiertem Liganden sank mit steigender steigender Konzentration an kaltem Liganden (siehe Abb.7).

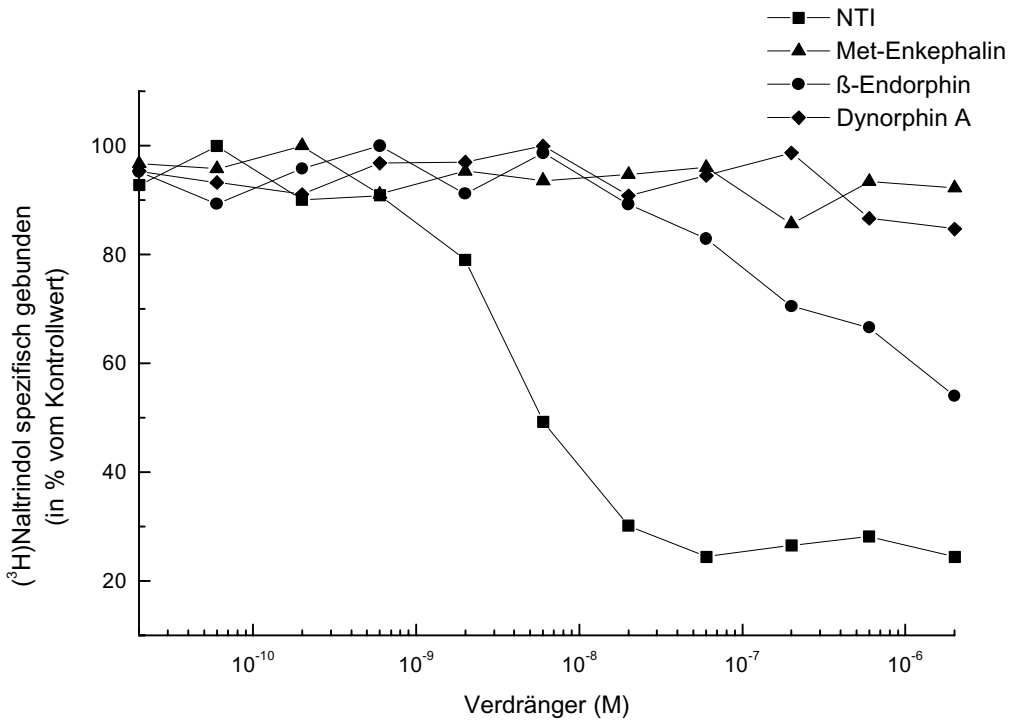

Abb.7: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 in Anwesenheit von Naltrindol (NTI), Met-Enkephalin, Dynorphin A (1-13) und ß-Endorphin(1-31). Im Inkubat betrug die Konzentration des Tracers 0.6nM und die der nicht-markierten Liganden im Bereich von 2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M. Angaben in % der Kontrolle, die als Bindung von (^{3}H)Naltrindol in Abwesenheit von Verdrängern definiert war. Mittelwerte aus Mittelwerten der Daten aus drei Experimenten mit Zweifachwerten.

Die mit dem Computerprogramm Ligand aus den Daten der Verdrängungs-experimente berechneten Bindungsparameter waren:
Naltrindol (NTI) K_D: 7.7 x 10^{-10} M und ß-Endorphin(1-31) K_D: 8.77 x 10^{-9} M.
Für Met-Enkephalin und Dynorphin A (1-13) konnte aus den Daten der Verdrängungsexperimente keine K_D-Werte berechnet werden.

Weiterhin wurden auch Verdrängungsexperimente mit den exogenen Opioiden [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] enkephalin (DAMGO), einem μ-selektiven Opioidrezeptorliganden und U 69593, einem hochselektiven κ-Opioidrezeptorliganden, durchgeführt. Naltrindol (NTI), ein nicht-selektiver δ_1/δ_2-

Opioidrezeptorligand, wurde zum Vergleich mitgeführt. Die nichtmarkierten Liganden wurden in aufsteigenden Konzentrationen von 2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M eingesetzt. Die graphische Darstellung der Ergebnisse entsprach wiederum Verdrängungskurven, d.h. die Konzentation an gebundenem markiertem Liganden sank mit steigender steigender Konzentration an kaltem Liganden (siehe Abb.8).

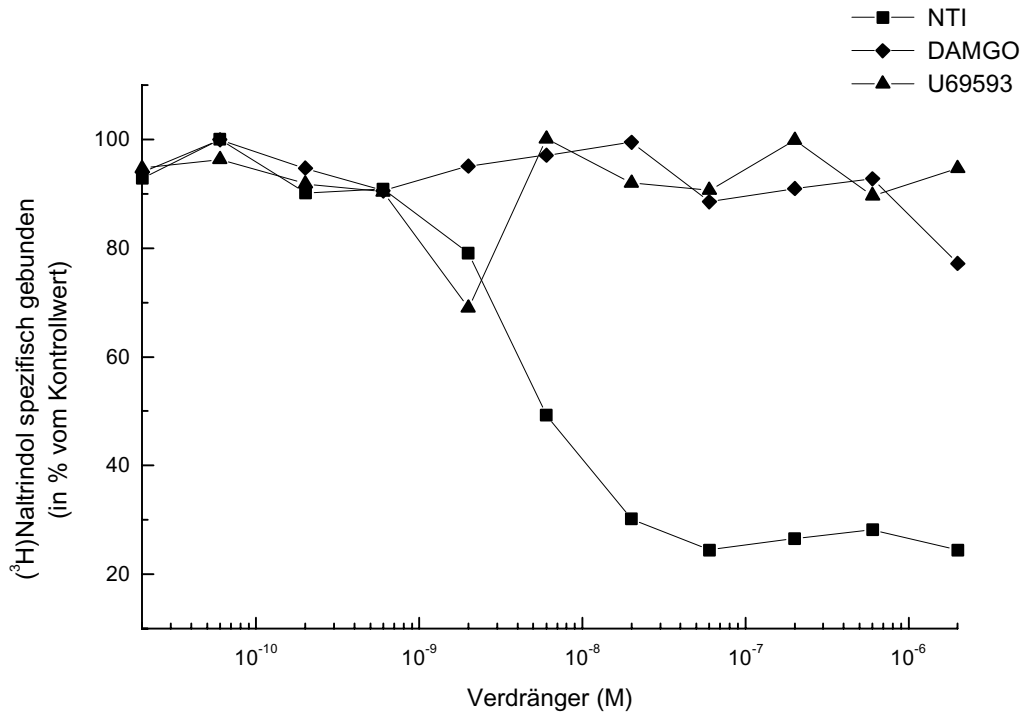

Abb.8: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 in Anwesenheit von Naltrindol (NTI), [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO) und U 69593. Im Inkubat betrug die Konzentration des Tracers 0.6nM und die der nichtmarkierten Liganden lag im Bereich von 2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M. Angaben in % der Kontrolle, die als Bindung von (^{3}H)Naltrindol in Abwesenheit von Verdrängern definiert war. Mittelwerte aus Mittelwerten der Daten aus drei Experimenten mit Zweifachwerten.

Die mit dem Computerprogramm LIGAND aus den Daten der Verdrängungs-Experimente berechneten Bindungsparameter waren:

Naltrindol (NTI): 7.7 x 10^{-10} M und [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] Enkephalin (DAMGO) K_D: 1.47 x 10^{-6} M. Für den κ-selektiven Opioidrezeptorliganden U69593 ließ sich keine K_D-Wert berechnen.

5.2.7 Ionenabhängigkeit

Bei den Versuchen zur Ionenabhängigkeit der Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 wurden Ca^{2+} - Ionen in Konzentrationen von 2 x 10^{-1} bis 2 x 10^{-4}M und K^+ - Ionen in Konzentrationen von 2 x 10^{-1} M, 2,4 x 10^{-2} M und 6,2 x 10^{-3} M eingesetzt. Das Volumen von 100 µl pro Ansatz setzte sich zusammen aus 10 µl (^{3}H)Naltrindol-lösung, 20µl Ionenlösung, 20 µl Inkubationspuffer (IKP) und 50 µl Membransuspension. Wie in den Diagrammen dargestellt, veränderte sich der Prozentsatz an gebundenem markiertem Naltrindol bei unterschiedlichen Ionenkonzentrationen nur gering. Bei den Versuchen mit 2 x 10^{-1} M Ionenkonzentration waren die Inkubationsansätze sehr zähflüssig; es ist mögich, daß deshalb eine erhöhte Bindung bei diesen Werten gemessen wurde.
Bei den Versuchen zur Abhängigkeit der Bindung von (^{3}H)Naltrindol von der Kalziumionenkonzentration fiel die Menge an gebundenem (^{3}H)NTI – in % von (^{3}H)Naltrindol im Ansatz – von 72 % bei 2 x 10^{-1} M Ca^{2+}-Konzentration auf 52 % bei 2 x 10^{-4} M Ca^{2+}-Konzentration. Die Streuung der gemessenen Werte war jedoch so groß, daß der Abfall der Bindung von (^{3}H)NTI nicht signifikant war (siehe Abb.9). Mit steigenden Konzentrationen von Kalium stieg die gebundene Konzentration an (^{3}H)NTI gering, aber statistisch signifikant an (siehe Abb.10). Insgesamt zeigte sich die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an die Membranen der Melanomzellinie G-361 durch unterschiedliche Ionenkonzentrationen im Bereich von 2 x 10^{-1}M bis 2 x 10^{-4}M (Ca^{2+}) bzw. 2 x 10^{-1} M, 2,4 x 10^{-2} M und 6,2 x 10^{-3} M (K^+) bei Berücksichtigung der statistischen Signifikanzen nur geringfügig beeinflußbar.

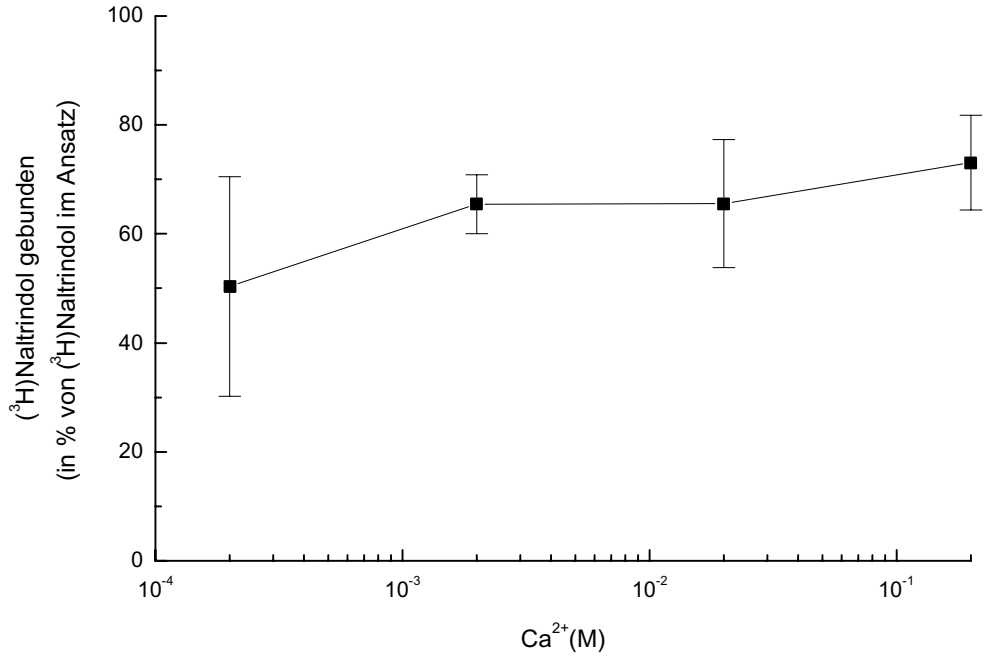

Abb.9: Ionenabhängigkeit der Bindung: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 bei unterschiedlichen Ca^{2+}-Konzentrationen. Angabe der Bindung in Prozent der Gesamtmenge des zugefügten Tracers. Die Konzentration des Tracers im Inkubat betrug 0.6nM. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

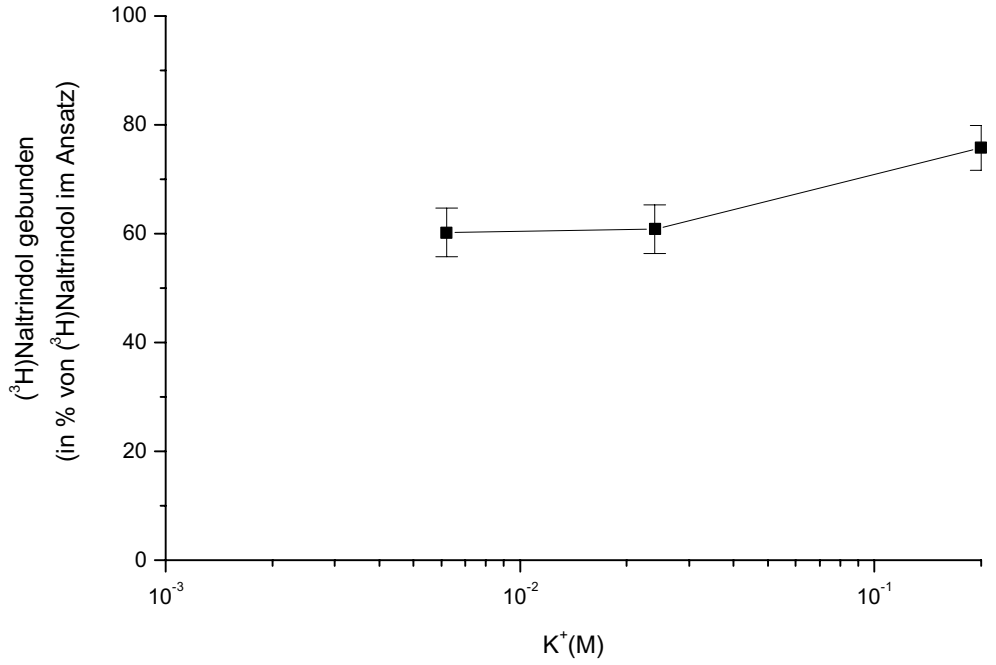

Abb.10: Ionenabhängigkeit der Bindung: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 bei unterschiedlichen K^+-Konzentrationen (2×10^{-1} M, $2{,}4 \times 10^{-2}$ M und $6{,}2 \times 10^{-3}$ M). Angabe der Bindung als Prozent der Gesamtmenge des zugefügten Tracers. Die Konzentration des Tracers im Inkubat betrug 0.6nM. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den Mittelwerten der Daten aus 3 Experimenten.

5.3 Untersuchungen zur Identifizierung des δ-Opioidrezeptorsubtyps, δ_1 bzw. δ_2, auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361

Um zu prüfen, inwieweit es sich bei den auf den Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 lokalisierten δ-Opioidrezeptoren um δ_1-und/oder δ_2-Rezeptoren handelte, wurden Verdrängungsexperimente mit einem hochselektiven δ_1-Rezeptorliganden (DPDPE) und einem hochselektiven δ_2-Rezeptorliganden (Naltriben) durchgeführt.

Der nicht-selektive δ_1-/δ_2-Rezeptorligand Naltrindol wurde zum Vergleich ebenfalls eingesetzt. Die Konzentrationen der Opioide lagen zwischen 2 x 10^{-6} M und 2 x 10^{-11} M.

Die Ergebnisse wurden graphisch in Verdrängungskurven dargestellt (siehe Abb.13): Steigende Konzentrationen an nicht markiertem Liganden wurden gegen die jeweils erhaltenen Konzentrationen an gebundenem markierten Liganden aufgetragen. Aus den Daten der Verdrängungskurven konnte im Computerprogramm LIGAND der Bindungsparameter K_D für die jeweiligen Liganden (Verdränger) berechnet werden.

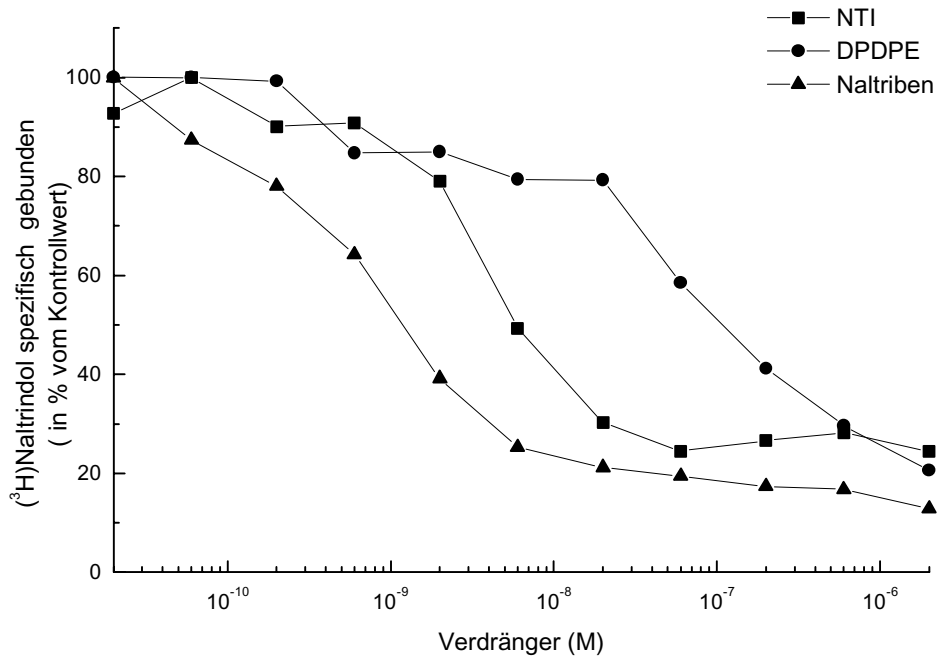

Abb.11: Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 in Anwesenheit von Naltrindol (NTI), Naltriben und [D-Pen^2, D-Pen^5] (DPDPE). Im Inkubat betrug die Konzentration des Tracers 0.6nM und die der nicht-markierten Liganden lag im Bereich von 2 x 10^{-6} M bis 2 x 10^{-11} M. Angaben in % der Kontrolle, die als Bindung von (^{3}H)Naltrindol in Abwesenheit von Verdrängern definiert war. Mittelwerte aus Mittelwerten der Daten aus drei Experimenten.

Die mit dem Computerprogramm LIGAND aus den Daten der Verdrängungs-experimente berechneten Bindungsparameter waren:
Naltriben K_D: 4.06 x 10^{-11} M; Naltrindol (NTI) K_D: 7.7 x 10^{-10} M und [D-Pen^2, D-Pen^5] DPDPE K_D: 3.2 x 10^{-8} M.
Der hochselektive δ_2-Opioidrezeptorligand Naltriben verdrängte (^{3}H)Naltrindol somit mit der höchste Affinität zu den Bindungsstellen und außerdem fast vollständig. Dies läßt darauf schließen, daß es sich bei den δ–Opioidrezeptoren auf G-361-Zellen – zumindest zu hohem Prozentsatz – um δ_2-Opioidrezeptoren handelt. Der zweiphasige Verlauf der DPDPE-Verdrängungskurve läßt vermuten, daß DPDPE mit hoher Affinität und somit hoher Verdrängungspotenz bei niedrigen Konzentrationen (^{3}H)Naltrindol aus δ_1–Rezeptoren verdrängte und mit geringer δ_2–Affinität, aber im hohen Konzentrationsbereich doch mit ausreichender Verdrängungskapazität (^{3}H)Naltrindol aus δ_2–Rezeptoren verdrängte.

6 Diskussion

6.1 Methodik

6.1.1 Wahl der Zellinie: Melanozyten

Im Bestreben, die Haut als Teil des opioidergen Systems, in dem Opioidpeptide an Opioidrezeptoren wirken, zu erfassen, sind in der Vergangenheit viele Befunde erhoben worden. Zunächst wurden verschiedene POMC-Fragmente in Keratinozyten entdeckt. Die Entdeckung des μ-Opioidrezeptors auf Keratinozyten durch Polymerase Chain Reaction (PCR) (Bigliardi et al., 1998) wies auf das Vorkommen opioiderger Systeme in der Haut hin. Weiterhin wurden spezifische Bindungsstellen für ß-Endorphin auf Keratinozyten nachgewiesen (Egeling et al., 1999). Der Nachweis weiterer Opioidrezeptoren auf Keratinozyten wird diskutiert.
Melanozyten sind ebenfalls Bestandteil der Epidermis der Haut. Da die Entartung dieser Zellen im Sinne von Melanomen ein häufig beobachteter Prozess ist, stellte die Entdeckung des δ-Opioidrezeptors auf Melanozyten und einer offenbar nur auf Melanomzellinien vorkommenden Mutante einen wichtigen Beitrag zur Erforschung dieses Gebietes in Aussicht (Mayer et al., 2000).
Ziel dieser Arbeit war es, durch Charakterisierung der Bindung eines hochaffinen Liganden zum δ-Opioidrezeptor der Melanozytenzellinie G361 genauere Erkenntnisse über diesen Rezeptor zu erhalten.

6.1.2 Bindungsversuche

In dieser Arbeit wurde versucht, mittels Radioligandbindingassays die δ-Opioidrezeptoren der Melanomzellinie G-361 mittels eines hochaffinen Liganden (Naltrindol) zu charakterisieren.

6.1.2.1 Liganden

(^{3}H)Naltrindol ist von verschiedenen Arbeitsgruppen zum Nachweis von δ-Opioidrezeptoren in Membranhomogenaten, z.B: von Nerven- und Intestinalgeweben, eingesetzt worden (Lever and Scheffel, 1998). Die in den Veröffentlichungen angegebenen Konzentrationen von (^{3}H)Naltrindol befanden sich im Bereich 0.1 – 3.0nM. Im Vergleich zu 3.0nM (^{3}H)Naltrindol konnten mit 0.6nM (^{3}H)Naltrindol wesentlich höhere Werte für die spezifische Bindung, die in Prozent der Gesamtradioaktivität im Ansatz gemessen wurden, erzielt werden (siehe 5.1). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde bei allen Versuchen zur Charakterisierung des δ-Opioidrezeptors (^{3}H)Naltrindol in einer Konzentration von 0.6nM eingesetzt.

6.1.2.2 Membranpräparation

Die Herstellung der für die Versuche verwendeten Membransuspensionen erfolgte u.a. nach dem Verfahren von Repp, 1993 (siehe 4.2.2.1). Bei diesem Vorgang wurden die Zellen von den Schalen, in denen sie kultiviert worden waren, mit einem Teflonschaber abgekratzt bzw. abgeschabt. Durch diesen Prozeß wurden die Zellen zerstört und autolytische Enzyme freigesetzt. Um intakte, nicht-zersetzte Zellmembranen zu gewährleisten, wurden alle Schritte nach dem Abpipettieren des Zellkulturmediums bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Bei der Durchführung dieser Prozedur bei 4°C, die für 40 x 145mm Zellkulturschalen ca. vier Stunden betrug, wurde ein Homogenisationspuffer, der verschiedene Enzymhemmer, wie Bacitracin, Leupeptin, PMSF und Trypsin-Inhibitor enthielt (nach Shababi et al., 1992), verwendet. Alternative Durchführungsversuche der Herstellung von Membransuspensionen für Radioligandbindingassays, z.B. bei Raumtemperatur auf Eis und alternative Zellablösungsmethoden, zeigten weniger Bindung und mehr Streuung und wurden daher verworfen.

6.1.2.3 Inkubationsansätze

Alle Inkubationsansätze wurden auf Eis hergestellt (siehe 4.2.3.1). Der Tracer wurde erst im Isotopenlabor unter den erforderlichen Sicherheitsmaßnahmen hinzugefügt. Die Inkubation auf einem Varishaker im Kühlschrank bei 4°C ermöglichte eine gleichbleibende Durchmischung der Inkubate bei Temperaturen, die autolytische Prozesse verhinderten. Die Inkubationsansätze enthielten 0.1% Rinderserumalbumin (BSA-Lösung), um die potentiellen Adsorptionsmöglichkeiten der Eppendorfgefäßwände abzusättigen.

6.1.2.4 Filtration

Durch die Filtration der Inkubationsansätze sollten die gebundenen Liganden (^{3}H)Naltrindol bzw.(^{3}H)DPDPE von den freien Liganden getrennt werden. Dazu wurden Glasfaserfilter verwendet, die 180 Minuten in 0.1% Polyethyleniminlösung inkubiert wurden, um eine Adsorption des freien Liganden an die Glasfaserfilter zu blockieren (siehe 4.2.3.2). Die unspezifische Bindung des freien Liganden, gemessen als Blank-Wert ohne Membransuspension, betrug in allen Versuchen weniger als 5 % der gemessen Gesamtradioaktivität.

6.1.2.5 Bestimmung der Radioaktivität

Nach der Filtration wurden die Glasfaserfilter in Szintillationsgefäße transferiert, 2ml 0.1% Triton X-100 hinzugefügt und auf einem horizontalen Rundschüttler über Nacht bei Raumtemperatur stetig bewegt. Nach Hinzufügung von 10ml Aquasafe 300plus am darauffolgenden Tag wurden die Szintillationsgefäße erneut 24h auf einem horizontalen Rundschüttler bei Raumtemperatur bewegt.
Dieser Prozeß ermöglichte die Desorption der radioaktiv markierten Substanzen vom Filter und ihren Kontakt mit den Komponenten des Szintillators, wodurch eine Messung erst ermöglicht wurde.
Durch das kontinuierliche Bewegen auf einem Rundschüttler sollte eine geringe Streuung der Meßwerte der Radioaktivität erzielt werden.

6.2 Ergebnisse

6.2.1 Nachweis einer spezifischen Bindungsstelle

Die Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol (NTI) an Membranen von Melanozyten der Melanomzelllinie G-361 erfüllte die in der Literatur postulierten Kriterien (Burt, 1978) einer spezifischen Ligand-Binder-Interaktion. Charakteristisch für eine „spezifische“ Bindungsstelle sind eine begrenzte Konzentration der Bindungstellen, eine hohe Affinität des Liganden zu diesen Bindungsstellen und demnach die „Sättigbarkeit“ dieser Bindungsstellen. Hieraus resultieren ein innerhalb eines begrenzten Beobachtungszeitraums ablaufender Bindungs- und Assoziationsprozeß (ON-Kinetik), ein ebenso zeitgebundener Lösungs- und Dissoziationsprozeß (OFF-Kinetik) und die Möglichkeit der Verdrängung eines Liganden aus dieser Bindungsstelle durch eine zweiten Liganden.

Die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanozytenzellinie G-361 erwies sich als abhängig von der Konzentration der eingesetzten Membranen. Bei konstantgehaltener Menge an eingesetztem (^{3}H)Naltrindol und ansteigenden Membrankonzentrationen näherte sich die gemessene Bindung einem Grenzwert (siehe 5.1.1).
Des weiteren erwies sich die Bindung als zeitabhängig und reversibel. Über einen Zeitraum von 180 Minuten stieg die in Abständen gemessene, gebundene Menge an (^{3}H)NTI bis zu einem Gleichgewicht der Assoziation und Dissoziation an (siehe 5.1.2). Durch Zugabe von nicht-tritiiertem NTI konnte die Menge an gebundenem (^{3}H)Naltrindol nach weiteren 180 Minuten so weit reduziert werden, daß man die Bindung zumindest als partiell reversibel bezeichnen konnte (siehe 5.1.3).
Die Sättigbarkeit der Bindung wurde in einem Verdrängungsexperiment bewiesen: Mit steigenden Mengen an zugeführtem nicht-markiertem Liganden bei konstanten Mengen an (^{3}H)Naltrindol fiel die gemessene Menge an gebundenem (^{3}H)NTI sigmoidal ab (siehe 5.1.4). Dieses Ergebnis stellte ein weiteres Merkmal einer spezifischen Bindung unter Beweis.
Aus den Daten des Sättigungsexperiments wurden die Bindungsparameter K_D und B_{MAX} bestimmt. Bei einer spezifischen Bindung hat der Ligand eine hohe Affinität zu

seiner Bindungsstelle, die Dissoziationskonstante K_D ist dementsprechend niedrig. Die im Computerprogramm LIGAND errechnete K_D für die Bindung von (^{3}H)NTI an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 lag bei 7.75 x 10^{-10} M (siehe 5.2.5). Diese niedrige Dissoziationskonstante ist Ausdruck der hohen Affinität von (^{3}H)Naltrindol an den Binder und Zeichen einer spezifischen Bindung.

Aufgrund der aufgeführten Ergebnisse kann die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 als eine spezifische Ligand-Binder-Interaktion bezeichnet werden.

6.2.2 Bestimmung der Dissoziationskonstante (Gleichgewichtskonstante) K_D

Die aus den Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation (k_a) und Dissoziation (k_d) zusammengezogene Gesamtdissoziationskonstante oder Equilibrium-Konstante K_D (k_d / k_a= K_D) ist ein Charakteristikum des Interaktionsprozesses.
Die Bindungsparameter K_D und B_{MAX} wurden aus den Daten des Verdrängungsexperiments mittels des Computerprogramms LIGAND ermittelt. Die iterative Anpassung des jeweilig gewählten Bindungsmodells an die gemessenen Daten des Sättigungsversuchs im LIGAND erlaubt den statistischen Vergleich der Wahrscheinlichkeit von Modellen unterschiedlicher Komplexität, z.B. mit mehreren Bindungsstellen. Die im LIGAND für die Interaktion von (^{3}H)Naltrindol mit der Bindungsstelle berechnete K_D von 7.7 x 10^{-10} M weist auf eine hohe Affinität des Liganden zu dieser Bindungsstelle hin.
Eine Bindungsstelle mit geringer Affintität (K_D : 6,2 x 10^{-9}M) wurde bereits auf Membranen der Melanozytenzelllinie G-361 für den δ-selektiven Opiodrezeptorliganden [D-PEN^2,D-PEN^5] Enkephalin (DPDPE) entdeckt (Mayer et al., 2000). Die Ursache für die geringe Affinität von DPDPE dürfte jedoch die geringere Affinität dieses δ_1–Rezeptorliganden zu den δ_2–Rezeptoren gewesen sein, die in der vorliegenden Arbeit erst nachgewiesen wurden. In der Arbeit von Mayer et al. (2000) wurde mittels Polymerase-chain-reacton (PCR) außer dem „wild type“ δ-Opioidrezeptor eine Mutante dieses Rezeptors mit einer im Bereich der dritten intrazellulären Schleife um 48 Aminosäuren verkürzten Sequenz identifiziert. Der δ-Opioidrezeptor besteht aus sieben transmembranären Domainen, drei intrazellulären

und drei extrazellulären Schleifen. Die dritte extrazelluläre Schleife dieses Rezeptors wird als die über die Selektivität von δ-Opioidrezeptorliganden entscheidende Region interpretiert (Wang et al., 1995; Meng et al., 1995; Valiquette et al., 1996; Li et al., 1996; Varga et al., 1996; Meng et al., 1996). Des weiteren sind die transmembranären Domainen des δ-Opioidrezeptors an der Bindung von δ-selektiven Liganden beteiligt (Belfort et al.; 1996; Kong et al., 1993). Es ist anzunehmen, daß die Verkürzung der dritten intrazellulären Schleife Auswirkungen auf die Ligandenselektivität und die Signaltransduktion der Mutante des δ-Opioidrezeptors hat. Mehr Information zu dieser Fragestellung könnte die getrennte Expression von „wild type“ und Mutante des δ-Opioidrezeptors, beispielsweise in NIH 3T3 - Zellen, bieten.

6.2.3 Berechnung der Bindungskapazität B_{MAX}

Die Bindungskapazität B_{MAX} wurde im Computerprogramm LIGAND aus den Daten des Sättigungsexperiments mit (^{3}H)Naltrindol berechnet : B_{MAX}= 1.0 x 10^{-9} mol/l. Ausgehend von der im LIGAND berechneten Bindungskapazität konnte die Konzentration an Bindungsstellen berechnet werden. Der ermittelt Wert von 4100-10000 Bindungsstellen pro Zelle, umgerechnet 36 fmol Bindungsstellen pro 1 mg Protein, bei einer (^{3}H)NTI –Konzentration von 0,6nM und einer K_D von 7.75 x 10^{-10} M, liegt im Bereich der in der Literatur angegebenen Werte: 1800 (Mayer et al., 2000) bzw. 18000 Bindungsstellen pro Zelle (Prater et al., 1994) und 10 fmol / mg Protein (Mayer et al., 2000) bzw. 45 fmol / mg Protein (Bernard et al., 1983).
Bei der Berechnung der Bindungsstellen wurde ein Korrekturfaktor von 2 – 5 angewendet, da nur 20 – 50 % der Bindungskapazität der Zellmenge, die für einen Ansatz verwendet wurde (3 x 10^7 Zellen / Ansatz), in der „crude membran fraction“ gesammelt wurden und somit im Ansatz präsent waren.

6.2.4 Strukturspezifität der Bindungsstelle

Zur Bestimmung der Strukturspezifität der Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 wurde die Bindung von (^{3}H)NTI in

Anwesenheit veschiedener endogener (ß-Endorphin(1-31), Dynorphin A (1-13), Met-Enkephalin) und exogener (Naltrindol (NTI), [D-PEN^2,D-PEN^5] Enkephalin (DPDPE); Naltriben, [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] Enkephalin (DAMGO), U69593) Opioide gemessen.

Für die Melanomzelline G-361 sind außer dem „wild type“ und der Mutante des δ-Opioidrezeptors keine weiteren Opioidrezeptoren bekannt (Mayer et al., 2000). Fast alle eingesetzten Opioide konnten (^{3}H)NTI zu gewissem Prozentsatz aus der Bindung verdrängen (siehe 5.2.6).

6.2.4.1 Strukturspezifität der Bindungsstelle: Endogene Opioide

Von den eingesetzten endogenen Opioide, Met-Enkephalin, Dynorphin A (1-13) und ß-Endorphin(1-31), konnten lediglich die beiden letztgenannten (^{3}H)Naltrindol eindeutig aus der Membranbindung verdrängen. Bei den eingesetzten Opioiden handelt es sich um Mischliganden, d.h. daß diese Liganden keine ausschließliche Selektivität für einen bestimmten Opioidrezeptortyp besitzen, sondern unterschiedlich hohe Affinitäten zu allen.
Aus den Daten der Verdrängungsexperimente wurden mit dem Computerprogramm LIGAND die Bindungsparameter K_D berechnet. Von den eingsetzten endogenen Opioiden konnte lediglich für ß-Endorphin(1-31) dieser Wert bestimmt werden: ß-Endorphin(1-31) K_D: 8.77 x 10^{-9} M. Für Met-Enkephalin und Dynorphin A (1-13) konnte aus den Daten der Verdrangungsexperimente keine K_D berechnet werden.

Met-Enkephalin ist ein hochselektiver δ- und ein geringselektiver μ-Opioidrezeptorligand (Kieffer et al., 1995). Im Vergleich zu Naltrindol ein niedrigaffiner δ-Opioidrezeptorligand (Takasaki et al., 1999). Das Ergebnis der Strukturspezifitätsversuche zeigt, das Met-Enkephalin trotz seines hohen δ-Selektivitätsprofils (^{3}H)Naltrindol nur geringfügig aus der Bindung an die Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 verdrängt.
Dynorphin A (1-13) ist ein hochaffiner κ-, ein mittelgradig-affiner δ- und ein niedrigaffiner μ-Opioidrezeptorligand (Kieffer et al.; 1995). Die vielseitigen Aktivitäten und Interaktionen von Dynorphin A (1-13) im menschlichen neuroendokrinen System

sind bewiesen, aber noch unzureichend in ihrer Funktion aufgeklärt (Zhang et al., 1998). Im Versuch verdrängte Dynorphin A (1-13) (^{3}H)NTI signifikant aus der Bindung an die δ-Opioidrezeptoren der Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361. Diese deutliche Verdrängung bestätigt die mittelgradige Affinität von Dynorphin A (1-13) zu δ-Opioidrezeptoren. Zum Teil könnte diese Verdrängung auch durch die niedrigaffine μ-Selektivität von Dynorphin A (1-13) bedingt sein, da die Ergebnisse der Versuche mit den exogenen Opioiden auf eine μ-Selektivität der Mutante des δ-Opioidrezeptors hinweisen.
Am deutlichsten konnte ß-Endorphin(1-31) (^{3}H)NTI von den δ-Opioidrezeptoren der Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 verdrängen. ß-Endorphin(1-31), ein Peptid, das aus dem Vorläufermolekül Proopiomelanocortin (POMC) entsteht und das an alle drei Opioidrezeptoren binden kann (Teschemacher, 1987), hat eine hohe Affinität zu μ-und δ-Opioidrezeptoren (Selley et al.; 1992). Die hohe Affinität des ß-Endorphin(1-31) (K_D: 8.77 x 10^{-9} M) für die δ-Opioidrezeptoren der Melanomzellinie G-361 könnte u.a. in einer möglichen μ-Selektivität der Mutante begründet sein.
Aufgrund der Affinität zu δ-Opioidrezeptoren, ist ß-Endorphin(1-31) als „screening"-Substanz zur Entdeckung von δ-Opioidrezeptoren eingesetzt worden (Cone et al.; 1992). ß-Endorphin(1-31) ist im Blut nachgewiesen worden und ß-Endorphin(1-31) – Bindungsstellen sind auf Keratinozyten entdeckt worden (Egeling et al.; 1999). Die Entdeckung der δ-Opioidrezeptoren auf Melanomzellen (Mayer et al.; 2000) und die in dieser Arbeit nachgewiesene Bindung von ß-Endorphin(1-31) an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 eröffnen weitere Perspektiven in der Aufklärung der physiologischen Prozesse des Systems der Haut.

6.2.4.2 Strukturspezifität der Bindungsstelle: Exogene Opioide

Bei den eingesetzten exogenen Opioiden [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin **(**DPDPE) , einem selektven δ_1-Opioidrezeptoragonisten, [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] Enkephalin (DAMGO), einem μ-selektiven Opioidrezeptorliganden, U 69593, einem hochselektiven κ-Opioidrezeptorliganden und Naltrindol (NTI), einem nicht-selektiven δ_1/δ_2-Opioidrezeptorliganden, reduzierten der hochaffine δ-selektive Antagonist

Naltrindol und der δ-selektive Agonist [D-PEN^2,D-PEN^5] Enkephalin (DPDPE) die Menge an gebundenem (^{3}H)NTI an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 deutlich um über 50 %. Das nicht-markierte δ_1-/δ_2-selektive Naltrindol hat eine höhere Affinität zu den δ-Opioidrezeptoren als δ_1-selektive DPDPE und verdrängte (^{3}H)Naltrindol deutlicher als DPDPE aus der Bindung an die Membranrezeptoren.
Die aus den Daten der Verdrängungsexperimente berechneten Bindungsparameter waren: Naltrindol (NTI) K_D= 7.7 x 10^{-10} M, [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin **(**DPDPE) K_D= 3.2 x 10^{-8} M und [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5] Enkephalin (DAMGO) K_D= 1.47 x 10^{-6} M. Für den hochselektiven κ-Opioidrezeptorliganden U69593 konnte aus den Daten der Strukurspezifitätsversuche der Bindungsparameter K_D nicht berechnet werden.

[D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO) ist ein μ-selektiver Ligand (Leslie, 1987; Goldstein and Naidu, 1989; Wollemann, 1994 and Kieffer, 1995), die deutliche Verdrängung von (^{3}H)NTI aus der Bindung an Membranen der Melanomzelllinie G-361 war daher unerwartet. Der aus den Daten der Verdrängungsexperimente berechnete Bindungsparameter K_D : 1.47 x 10^{-6} M für [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO) zeigt die niedrige Affinität dieses Liganden für die Opioidrezeptoren der Melanomzellinie G-361. Die Melanomzellinie G-361 exprimiert sowohl den „wild-type"- δ-Opioidrezeptor als auch eine Mutante davon (Mayer et al., 2000). Die Existenz einer Mutante des δ-Opioidrezeptors läßt die Vermutung zu, daß die Verdrängung des δ-selektiven Opioidrezeptorliganden Naltrindol durch einen μ-selektiven Opioidrezeptorliganden (DAMGO) in einer veränderten Selektivität der Mutante begründet sein könnte.
Die dritte extrazelluläre Schleife des δ-Opioidrezeptors ist entscheidend für die Ligandenselektivität von Naltrindol (Li et al., 1996). Durch Punktmutationen im sechsten und siebten transmembranären Bereich des κ-und des μ-Opioidrezeptors konnte die Affinität des δ-selektiven Naltrindols für κ- und μ-Opioidrezeptoren deutlich erhöht werden (Metzger et al., 2001). Bei Melanozyten der Melanomzellinie G-361 ist eine Mutante des δ-Opioidrezeptors, mit einer um 44 Aminosäuren verkürzten dritten intrazellulären Schleife, bekannt (Mayer et al., 2001). Sollte sich diese Verkürzung auch auf einen Teil des sechsten transmembranären Bereichs der Mutante des δ-Opioidrezeptors auswirken, so könnte dies die Verdrängung von

(^{3}H)Naltrindol aus der Bindung an einen mutierten δ-Opioidrezeptor durch einen μ-selektiven Liganden erklären.

U69593 ist ein hochselektiver κ-Opioidrezeptorligand und die sehr geringe Verdrängung von gebundenem (^{3}H)NTI entspricht der extrem geringen Affinität dieses Liganden für δ-Opioidrezeptoren.

6.2.5 Ionenabhängigkeit

Bei den Versuchen zur Ionenabhängigkeit der Bindung von (^{3}H)Naltrindol an Membranen der Melanomzellinie G-361 wurden wurden Ionenkonzentrationen im Bereich von 2 x 10^{-1} bis 2 x 10^{-4}M (Ca^{2+}) bzw. 2 x 10^{-1} M, 2,4 x 10^{-2} M und 6,2 x 10^{-3} M (K^+) eingesetzt. Die Bindung war unter Berücksichtigung der statistischen Signifikanzen kalziumionenunabhängig und kaum kaliumionenabhängig (siehe 5.1.7).
Die Freisetzung von Neurotransmittern ist abhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration (Starke, 1977). Die Regulation des intrazellulären Kalziumniveaus durch δ-selektive Opioidrezeptorliganden ist ein komplexes Thema der Forschung. Der δ-selektive Agonist [D-Ala^2, D-Leu^5] Enkephalin (DADLE) hemmt Kalziumströme in Neuroblastomzellen (Hescheler et al., 1987). Kalziumkanäle der Zellinie NG108-15 werden durch δ-selektive Opioidrezeptoren reguliert (Taussig et al., 1992). Der δ-selektive Opioidrezeptorligand [D-PEN^2, D-PEN^5] Enkephalin (DPDPE) hemmte die Kalziumkanäle in einer Zellinie des kleinzelligen Lungenkarzinoms (Sher et al., 1996). Im Gegensatz zu diesen Arbeiten bewirkt das δ-selektive [D-Ser5, Leu5, Thr6] Enkephalin (DSLET) einen Anstieg des intrazellulären Kalziumniveaus in ND8-47 Neuroblastomzellen (Tang et al., 1995). Dieser Anstieg wird durch Verapamil und Nifedipin geblockt (Tang et al., 1994). Die molekulare Ursache dieser widersprüchlichen Ergebnisse ist ungeklärt. Die δ-Opioidrezeptor-vermittelte Hemmung der Kalziumkanäle ist wichtig, da das Kalziumniveau die Freisetzung von Neurotransmittern beeinflußt und die Funktion verschiedener Proteinkinasen ändert (Quock et al., 1999).
In dieser Arbeit waren die Ligand-Binder-Interaktionen an Membranen der Melanomzellinie G-361 kalziumionenunabhängig. Möglicherweise können Ligand-

Binder-Interaktionen an intakten Melanomzellen die Wirkung unterschiedlicher Konzentrationen an extrazellulären Kalzium auf die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren sichtbar machen.

Eine Zunahme des Kaliumstroms wurde durch Agonisten an δ-Opioidrezeptoren bewirkt (North et al., 1987). In DRG Neuronen und Neuroblastomen wurde ein biphasischer Effekt von DPDPE auf die Kaliumströme beobachtet. Bei Konzentrationen von x < 1nM wurde der Kaliumstrom gehemmt (Fan et al.,1991), bei höheren Konzentrationen wurde der Kaliumstrom erhöht (Fan and Crain, 1995). Die Abnahme des Kaliumstroms konnte durch Cholera-Toxin (Fan et al., 1993) und die Zunahme des Kaliumstroms konnte durch Pertussis-Toxin blockiert werden. Die weist auf eine Beteiligung verschiedener G-Proteine bei der Vermittlung von Signalen zwischen Kaliumkanälen und δ-Opioidrezeptoren. Die physiologische Bedeutung der biphasischen Kontrolle der Kaliumkanäle durch DPDPE ist unklar (Fan and Crain, 1995). Die Wirkung von δ-Opioidrezeptoren auf die Kaliumleitfähigkeit ist von Bedeutung, da der Kaliumfluß Neuronen sowohl hyperpolarisieren kann, wodurch diese weniger empfindlich auf Neurotransmitter reagieren, als auch das Membranpotential nach einer neuronalen Entladung wiederherstellen kann. In dieser Arbeit war die Bindung von (^{3}H)Naltrindol an δ-Opioidrezeptoren auf Membranen der Melanomzellinie G-361 relativ kaliumunabhängig. Versuche an Melanozyten in toto sollten mehr Aufschluß über die Abhängigkeit dieser Bindung von der Kaliumionenkonzentration geben.

6.2.6 Nachweis von δ_2-Opioidrezeptoren

Um zu überprüfen, ob der nicht-selektive δ_1-/δ_2-Opioidrezeptorligand (^{3}H)Naltrindol an δ_1- oder δ_2-Opioidrezeptoren band, wurden Verdrängungsexperimente mit den nicht-markierten Liganden Naltriben, einem selektiven δ_2-Opioidrezeptorantagonisten, [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin **(**DPDPE), einem selektven δ_1-Opioidrezeptoragonisten, und Naltrindol (NTI), einem nicht-selektiven δ_1/δ_2-Opioidrezeptorantagonisten durchgeführt (siehe 5.3). Die graphische Darstellung dieser Experimente zeigte, daß der δ_2-selektive Opioidrezeptorligand Naltriben in ansteigenden Konzentrationen den konstant 0.6 nM eingesetzten markierten Tracer

(^{3}H)NTI am deutlichsten aus dessen Bindungsstellen verdrängen konnte (siehe Abb.11). Dies wurde durch die berechneten Werte der Gesamtdissoziationskonstante (Equilibrium-Konstante) K_D, die Ausdruck der Affinität eines Liganden für eine Bindungsstelle ist, bestätigt (Naltriben K_D : 4.06 x 10^{-11} M, Naltrindol (NTI) K_D: 7.7 x 10^{-10} M und [D-Pen^2, D-Pen^5] DPDPE K_D: 3.2 x 10^{-8} M).
Die höhere Affinität des δ_2-selektiven Opioidrezeptorliganden Naltriben für die Bindungstellen der Membranen der Melanomzellinie G-361 läßt die Vermutung zu, daß es sich bei der Mehrzahl der nachgewiesenen δ-Opioidrezeptoren dieser Zellinie (Mayer et al., 2000) um δ_2-Opioidrezeptoren handelt. Diese Vermutung wird durch die deutlich geringere Affinität des δ_1-selektiven Opioidrezeptorliganden [D-Pen^2, D-Pen^5] DPDPE für diese Bindungsstellen gestützt.

7 Zusammenfassung

Die Melanozyten der Melanomzellinie G-361 exprimieren sowohl den bereits bekannten („wild type“) δ-Opioidrezeptor als auch eine Mutante davon (Mayer et al., 2000). Beide wurden gentechnologisch nachgewiesen und mit Bindungsversuchen ihre Expression und Membranlokalisation unter Beweis gestellt.
Mittels unterschiedlicher Opioidrezeptorliganden, vor allem aber durch Einsatz von (^{3}H)Naltrindol, Naltriben, [D-Ala^2, MePhe^4, Gly-ol^5]enkephalin (DAMGO), [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin (DPDPE) und ß-Endorphin (1-31), konnten in dieser Arbeit erstmals die Bindungseigenschaften der δ-Opioidrezeptoren auf Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 detailliert charakterisiert und eine differenzierte Betrachtung der δ_1-/δ_2-Rezeptorsubtypen ermöglicht werden.

Die Bindung des δ-Opioidrezeptorliganden (^{3}H)Naltrindol (NTI) an Membranen der Melanomzellinie G-361 erfüllte die Kriterien einer spezifischen Ligand-Binder-Interaktion: die Bindung erwies sich als abhängig von der Konzentration der eingesetzten Membranen, als zeitabhängig und partiell reversibel und als sättigbar. Der aus den Sättigbarkeitsversuchen berechnete Bindungsparameter K_D (7.75×10^{-10} M) belegt die hohe Affinität von (^{3}H)Naltrindol zu den Opioidrezeptoren dieser Zellinie.
Die Bindung erwies sich als unabhängig von der Konzentration des Kalziums im Bereich von 2×10^{-4} bis 2×10^{-1} M und war nur geringfügig abhängig von der Konzentration des Kaliums im Bereich von $6{,}2 \times 10^{-3}$ bis $2{,}0 \times 10^{-1}$ M . Die Bindung des (^{3}H)Naltrindols an Melanozytenmembranen scheint vorwiegend über δ_2-Opioidrezeptoren vermittelt zu werden. Dies wurde durch Verdrängungsversuche mit dem nichtmarkierten Opioidrezeptor-Liganden Naltriben (K_D : 4.06×10^{-11} M), einem selektiven δ_2-Opioidrezeptorantagonisten, und dem nicht markierten Liganden [D-Pen^2, D-Pen^5] Enkephalin (DPDPE) (K_D: 3.2×10^{-8} M), einem selektven δ_1-Opioidrezeptoragonisten, wahrscheinlich gemacht.
Mittels Bindungsversuchen mit dem hochaffinen nicht-selektiven δ_1/δ_2-Opioidrezeptorantagonisten (^{3}H)Naltrindol und Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361 konnten somit die δ-Opioidrezeptoren dieser Zellinie

detailliert charakterisiert werden. Dies bedeutet einen weiteren Schritt in der Aufklärung der Funktion von Melanozyten – ermöglicht durch Untersuchungen am Modell der Melanomzellinie des Menschen, G-361.

8 Literaturverzeichnis

- Beckett, A.H.; Casy, A.F.: Synthetic analgesics: Stereochemical considerations. J.Pharm.Pharmacol. 6, 986-1001, 1954
- Beddell, C.R.; Clark, R.B.; Lowe, L.A. and Wilkinson, S.: A conformational analysis for leucine-enkephalin using acitivity and binding data of synthetic analogues. Br.J.Pharmacol.61, 351-356, 1977
- Belfort, K.; Tabbara, L.; Bausch, S.; Chavkin, C.; Evans, C. and Kieffer, B.L.: The conserved aspartate residue in the third putative transmembrane domain of the ä opioid receptor is not the anionic counterpart for the cationic opiate binding but is a constituent of the receptor binding site. Mol.Pharmacol. 49, 216-223, 1996
- Belfort, K.; Zilliox, C.; Filliol, D.; Yue, S. and Kieffer, B.L.: Constitutive activation of the delta opioid receptor by mutations in transmembrane domains three and seven. J.Biol.Chem. 274, 18574-81, 1999
- Belluzzi, D.; Stein, L.; Dvonch, W.; Dheer, S.; Gluckmann, M.T. and McGregor, W.H.: Enhanced analgesia acitivity of D-Ala^2 enkephalinamides following D-isomer substitutions at position five. Life Sci.23, 99-104, 1978
- Bigliardi, P.L.; Bigliardi-Qi, M.; Büchner, S.; Rufli, T.: Expression of ì-opiate receptor in human epidermis and keratinocytes. J.Invest.Dermatol.111, 297-301, 1998
- Brantl, V. and Teschemacher, H.J.: Opioids in milk. Trends Pharmacol.Sci.4, 193 1983
- Broccardo, M.; Esperama, G.F.; Melchiorri, P. and Montecucchi, P.C.: Pharmacologlical data on demorphins, a new class of potent opioid peptides from amphibian skin. Brit.J.Pharm.73, 625-631 (1981)
- Bruns, R.W.; Lawson-Wendling, K. and Pugsley, T.A.: A rapid filtration assay for soluble receptors using polyethylenimine-treated fliters. Anal.Biochem.132, 74-81,1983
- Bunzow, J.R.; Snez, C.; Mortrud, M.; Bouvier, C.; Williams, J.T.; Low, M. and Grandy, D.K.: Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a ä-, ê-, or ì- opioid receptor type. FEBS Lett.347/ 284-288, 1994

- Burt, D.R.: Criteria for receptor identification. In Neurotransmitter Receptor Binding (Yamamura, Enna, and Kuhar, eds.), Raven Press, New York, 41-55, 1978
- Calderon, S.N.; Rothman, R.B.; Porreca, F.; Flippen-Anderson, J.L.; McNutt, R.W.; Xu, H.; Smith, L.E.; Bilsky, E.J.; Davis, P. and Rice, K.C.: Probes for narcotic mediated phenomena. Synthesis of SNC80: A highly selective non-peptide ä opioid receptor agonist. J.Med.Chem.37, 2125-2128, 1994
- Chakraborty, A. and Pawelek, J.: MSH receptor in immortalized human epidermal keratinocytes. A potential mechanism for coordinate regulation of the epidermal-melanin unit. J.Cell.Physiol. 157, 344-350, 1993
- Chang, K.J., Blanchard, S.G. and Cuatrecasas, P.: Benzomorphan sites are ligand recognition sites of putative å-receptors. Mol.Pharmacol.26, 484-488, 1984
- Chang, K-J.; Rigdon, G.C.; Howard, J.L. and McNutt, R.W.: A novel potent and selective nonpeptidic delta opioid receptor agonist BW373U86. J.Pharmacol.Exp.Ther.267, 852-857, 1993
- Chen, Y.; Fan, Y.; Liu, J.; Mestek, A.; Tian, M.; Kozak, C.A. and Yu, L.: Molecular cloning tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. FEBS Lett. 347, 279-283; 1994
- Cheng, P.Y.; Wu, ,D.; Decena, J.; Soong, Y.; McCabe, S. and Szeto, H.H.: Opioid-induced stimulation of fetal respiratory acitivity by (D-Ala^2) deltorphin I. Eur.J.Pharmacol.230, 85-88, 1993
- Childers, S.R.:Opioid receptor-coupled second messenger systems. Life sci. 48, 1991-2003, 1991
- Cone, R.I.; Rosenfeld, S.; Lameh, J. and Sadee, W.:(^{125}I)-beta-endorphin binding to neuroblastoma X glioma NG108-15 cells: distribution of delta opioid receptors. Life.Sci. 51, 219-24, 1992
- Cowan, A.; Zhu, X.Z.; Mosberg, H.I.; Omnaas, J.R. and Porreca, F.: Direct dependence studies in rat with agents selective for different types of opioid receptor. J.Pharmacol. Exp.Ther. 246, 950-955, 1988
- Dickenson, A.H.: Plasticity: Implications for opioid and other pharmacological interventions in specific pain states. Behav.Brain Sci.20, 392-403, 1997
- Eedy, D.J.; Johnston, C.F.; Shaw, C.; Buchanan, K.D.: Neuropeptides in Psoriasis: An immunocytochemical and radioimmunoassay study. J.Invest. Dermatol.4, 434-438, 1991

- Egeling, K.; Müller, H.; Karschunke, B.; Tschischka, M.; Spennemann, V.; Hain, B.; Teschemacher, H.: Specific binding sites for â-endorphin on keratinocytes. Ann.NY.Acad.Sci.885, 464-465, 1999
- Erspamer, V.; Melchiorri, P.; Falconieri-Erspamer, G.; Negri, L.; Corsi, R.; Severini, C.; Barra, D.; Simmaco, M. and Kreil, G.: Deltorphins: A family of naturally occuring peptides with high affinity and selectivity for ä-opioid binding sites. Pro.Natl.Acad.Sci.USA 88, 5188-5192, 1989
- Fukuda, K.; Kato, S.; Mori, K.; Nishi, M.; Takeshima, H.; Iwabe, N.; Miyata, T.; Houtani, T. and Sugimoto, T.: cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. FEBS Lett. 343, 42-46, 1994
- Gates, M. and Tschudi, G.: The synthesis of morphine; J.Amer.Chem.Soc.74, 1109-1114 1952
- Gilbert, P.E.; Martin, W.R.: The effects of morphine and nalorphine-like drug in the non-dependent morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. J.Pharmacol.Exp.Ther.198, 66-82, 1976
- Gillan, M.G.C.; Kosterlitz, H.W. and Magnan, J.: Unexpected antagonism in the rat vas deferens by benzomorphans which are agonists in other pharmacological tests. Br.J.Pharmacol.72, 13-15, 1981
- Gilman, A.G.: G-proteins: Transducers of receptor generated signals. Annu.Rev. Biochem. 56, 6615-6649, 1987
- Goldstein, A.; Naidu; A.: Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding signatures. Mol.Pharmacol.36, 265-272, 1989
- Goldstein, A.; Tachibana, S.; Lowney, L.I.; Hunkpiller, M.; and Hood, L.: Dynorphin (1-13) an extraordinary potent opioid peptide. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 76, 6666-6670 (1979)
- Goldstein, A.: Binding selectivity profiles for ligands of multiple receptor type. Focus on opioid receptors. Trends Pharmacol.Sci.8, 456-459, 1987
- Gomes, I.; Jordan, B.A.; Gupta, A.; Trapaidze, N.; Nagy, V. and Devi, L.A.: Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. J.Neurosci. 22, RC 110, 2000
- Grando, S.A.; Horton, R.M.; Pereira, E.F et al.: A nicotinergic acetylcholine receptor regulating cell adhesions and motility is expressed in human keratinocytes. J.Invest.Dermatol.105, 774-781, 1995

- Gulland, J.M. and Robinson, R.: The morphine group. Part I. A discussion of the constitutional problem.; J.Chem.Soc.123, 980-987 1923
- Halford, W.P.; Gebhardt, B.M.; Carr, D.J.J.: Functional role and and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. J.Neuroimmunol.59, 91-101, 1995
- Hescheler, J.; Rosenthal, W.; Trautwein, W. and Schultz, G.: The GTP-binding protein G0 regulates neuronal calcium channels. Nature (Lond) 325, 445-47, 1987
- Hughes, J.; Smith, T.; Kosterlitz, H.; Fothergill, L.; Morgan, B. and Morris, H.: Identification of two related pentapeptides from brain with potent opiate agonist activity. Nature 258, 577-579 1975
- Huidobro-Toro, J.P.; Caturay, E.M.; Ling, N.; Lee, N.M.; Loh, H.H. and Way, E.L.: Studies on the structural prerequisites for the activation of the ß-endorphin receptor on the rat vas deferens. J.Pharmacol.Exp.Ther.257, 1069-1075, 1982
- Johnson, N.; Houghten, R.; Pasternak, G.W.: Binding of [^{3}H]-ß-Endorphin in rat brain. Life Sci. 31, 1381-1384, 1982
- Kieffer, B.L.: Recent Advances in Molecular Recognition and Signal Transduction of Active Peptides: Receptors for Opioid Peptides. Cell.Mol.Neurobiol.15, 615-635, 1995
- Kitchen, I.; Slowe, S.J.; Matthes, H.W.D. and Kieffer, B.L.: Quantitative autoradiographic mapping of delta, kappa and mu opioid receptors in knockout mice lacking the mu opioid receptor gene. Brain Res.778, 73-88, 1997
- Kong, H.; Raynor, K.; Yasuda, K.; Moe, S.; Portoghese, P.S.; Bell, G.I. and Reisine, T.: A single residue aspartic acid 95 in the delta opioid receptor specifies selective high affinity agonist binding. J.Biol.Chem. 268, 23055-23058, 1993
- Kreil, G.; Barra, D.; Simmaco, M.; Erspamer, V.; Erspamer, G.F.; Negri, L.; Severini, C.; Corsi, R. and Melchiorri, P.: Deltorphin, a novel amphibian skin peptide with high selectivity and affinity for ä opioid receptors. Eur.J.Pharmacol. 162, 123-128, 1989
- Krull, F.; Holzer, U.; Ihle, J.; et al.: Superantigen-induced lysis of melanoma cells. Melanoma-Res.3, 214-222, 1997
- Lachowicz, J.E.; Shen, Y.; Monsma, F.J.Jr. and Sibley, D.R.: Molecular cloning of a novel G-protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. J.Neurochem. 64, 34-40; 1995

- Law, P.Y.; Loh, H.H. and Li, C.H.: Properties and localization of ß-Endorphin receptor in rat brain. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 76, 5455-5459, 1979
- Leslie, F.M.: Methods used for the study of opioid receptors. Pharmacol.Rev.39, 197-249, 1987
- Lever, J.R.; Scheffel, U.: Selective in vivo binding of (^{3}H)Naltriben to delta-opioid receptors in mouse brain. Eur.J.Pharmacol.350, 335-344, 1998
- Li, C.H.; Chung, D.; Doneen, B.A.: Isolation, characterization and opiate activity of ß-endorphin from human pituitary glands. Biochem. Biophys. Res. Com. 72, 1542-1547, 1976
- Li, X.; Varga, E.V.; Stropova, D.; Zalewska, T.; Malatynska, E.; Knapp, R.J.; Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.: ä opioid receptor: The third extracellular loop determines naltrindole selectivity. Eur.J.Pharmacol.300, R1-R2, 1996
- Lord, J.A.H.; Waterfield, A.A.; Hughes, J.; Kosterlitz, H.W.: Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. Nature, 267, 495-499, 1977
- Malmberg, A.B.; Yaksh, T.L.: Isobolographic and dose-response analyses of the interaction between intrathecal ì and ä agonists, effects of naltrindole and its benzofuran analog (NTB). J.Pharmacol.Exp.Ther.263, 264-275,1992
- Mansour, A.; Fox, C.A.; Akil, H. and Watson, S.J.: Opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: Anatomical and functional implications. Trends Neurosci.18, 22-29, 1995
- Martin, W.R.; Eades, C.G.; Thompson, J.A.I.; Huppler, R.E.; Gilbert, P.E.: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. J.Pharmacol.Exp.Ther.197, 517.532 1976
- Masamichi, S. and Masabumi, M.: Molecular pharmacology of the opioid receptors. Pharmcol.Ther.Vol.68, No.3, pp.343-364, 1995
- Mattia, A.; Vanderaht, T.; Mosberg, H.I.; Porreca, F.: Lack of antinoceptive cross-tolerance between (D-Pen^2, D-Pen^5)enkephalin and (D-Ala^2)deltorphin II in mice: evidence for delta receptor sub-types. J.Pharmacol.Exp.Ther.257, 583-587, 1991
- Mayer, P.; Tischmeyer, H.; Jayasinghe, M.; Bonnekohr, B.; Gollnick, H.; Teschemacher, H.; Höllt, V.: A ä opioid receptor lacking the third cytoplasmic loop is generated by atypical mRNA processing in human malignomas. FEBS Letters, 24044, 1-5, 2000
- Meng, F.; Hoversten, M.T.; Thompson, R.C.; Taylor, L.; Watson, S.J. and Akil, H.: A chimeric study of the molecular basis of affinity and selectivity of the ê and ä

opioid receptors: Potential role of extracellular domains. J.Biol.Chem. 270, 12730-12736, 1995

- Meng, F.; Ueda, Y.; Hoversten, M.T.; Thompson, R.C.; Taylor, L.; Watson, S.J. and Akil, H.: Mapping the receptor domains critical for the binding selectivity of ä opioid receptor ligands. Eur.J.Pharmacol. 311, 285-292, 1996
- Metzger, T.G.; Paterlini, M.G.; Ferguson, D.M. and Portoghese, P.S.: Investigation of the selectivity of oxymorphone-derived and naltrexone-derived ligands via site-directed mutagenesis of opioid receptors: exploring the address recognition locus. J.Med.Chem. 44, 857-862, 2001
- Meunier, J.C.: Nociceptin/orphanin FQ and the opioid-receptor-like ORL_1 receptor. Eur.J.Pharmacol.340, 1-15, 1997
- Meunier, J.C.; Mollereau, C.; Toll, L.; Suaudeau, C.; Moisand, C.; Alvinerie, P.; Butour, J.L.; Guillemot, J.C.; Ferrara, P.; Monsarrat, B.; Mazargull, H.; Vassert, G.; Parmentier, M. and Costentin, L.: Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid- receptor-like ORL_1 receptor. Nature (Lond) 377, 532-535, 1995
- Minami, M. and Satoh, M.: Molecular biology of the opioid receptors: Structures, functions and distributions. Neurosci. Res.23, 121-145, 1995
- Mollereau, C.; Parmentier, M.; Mailleux, P.; Butour, J-L.; Moisand, C.; Chalon, P.; Caput, D.; Vassart, G. and Mounier, J-C.: ORL1 , a novel member of the opioid receptor family: Cloning, functional expression and localization. FEBS Lett. 341, 33-38, 1994
- Mosberg, H.I.; Hurst, R.; Hruby, V.J.; Gee, K.; Yamamura, H.I.; Galligan, J.J. and Burks, T.F.: Cyclic penicillamine containing enkephalin analogs display profound delta receptor selectivities. Life Sci, 33, 447-450, 1983
- Murgo, A.J.: Modulation of murine melanoma growth by naloxone. Cancer Lett. 44, 137-42, 1989
- Nagahama, M.; Funasaka, Y.; Fernandez-Frez, M.I.; Ohashi, A.; Chakraborty, A.K.; Ueda, M.; Ichihashi, M.: Immunoreactivity of alpha-melanocyte stimulating hormone, adrenocorticotrophic hormone and beta-endorphin in cutaneous malignant melanoma and benign melanocytic naevi. Br. J. Dermatol. 138, 981-985, 1998
- Narita, M. and Tseng, L.F.: Evidence for the existence of the ß-endorphin-sensititve „å opioid receptor“ in the brain: The mechanisms of å-mediated antinociception. Jpn J. Pharmacol.64, 35-39, 1998

- Negri, L.; Potenza, R.L.; Corsi, R. and Melchiorrri, P.: Evidence for two subtypes of ä opioid receptors in rat brain. Eur.J.Pharmacol.192, 335-336, 1991
- Nishi, M.; Takeshima, H.; Mori, M.; Nakagawara, K. and Takeuchi, T.: Structure and chromosomal mapping of genes for the mouse ê-opioid receptor and an opioid receptor homologue (MOR-C). Biochem.Biophys.Res.Commun. 205, 1353-1357, 1994
- North, R.A.: Opioid action on membrane ion channels. Handbook of Experimental Pharmacology, Opioids I.Vols.1,2, Berlin, Springer Verlag, 773-793 , 1993
- Oka, M.; Ogita, K.; Ando, H. et al.: Deletion of specific protein kinase C subspecies in human melanoma cells. J.Cell.Phyiol.167, 406412, 1996
- Pasternak, G.W.: Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. Clinical Neuropharmacol.16,1-18, 1993
- Paul, D.; Bodnar, R.J.; Gistrak, M.A.; Pasternak, G.W.: Different ì receptor subtypes mediate spinal and supraspinal analgesis in mice. Eur.J.Pharmacol.168, 307-314, 1989
- Pert, C.B. and Snyder, S.H.: Opiate receptor: Demonstration in nervous tissue. Science 179, 1011-1014 1973
- Pfeiffer, A.; Brantl, V.; Hers, A.; and Emrich, H.M.: Psychotomimesis mediated by opiate receptors. Science (Wash DC), 233, 774-776, 1986
- Pincelli, C.; Fantini, F.; Giardino, L ; Zanni, M. et al: Autoradiographic detection of substance P receptors in normal and psoriate skin. J.Invest. Dermatol.3, 301-304, 1993
- Portoghese, P.S.; ,Sultana, M.; Nagase, H. and Takemori, A.E.: A highly selective $ä_1$-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone. Eur.J.Pharmacol.218, 195-196, 1992
- Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Takemori, A.E.: Naltrindole 5`-isothiocyanate: A non-equilibrium, highly selective ä-opioid receptor antagonist. J.Med.Chem.33,1547-1548, 1990
- Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Nagase, H. and Takemori, A.E.: A highly select $ä_1$-opioid receptor antagonist: 7-Benzylidenenaltrexone. Eur.J.Pharmacol.23, 195-196, 1992
- Portoghese, P.S.: A new concept on the mode of interaction of narcotic analgesics with receptors. J.Med.Chem.8, 809-816, 1965

- Portoghese, P.S.: From models to molecules: opioid receptor dimers, bivalent ligands, and selective opioid receptor probes. J.Med.Chem. 44, 22569-69, 2001
- Portoghese, P.S.; Sultana, M.; Nagase, H. and Takemori. A.E.: Application of the message-address concept in the design of highly potent and selective non-peptide ä-opioid receptor antagonists. J.Med.Chem.31, 281-282, 1988
- Prather, P.L.; McGinn, T.M.; Erickson, L.J.; Evans, C.J.; Loh, H.H. and Law, P.Y.: Ability of delta-opioid receptors to interact with multiple G-proteins is independent of receptor density. J.Biol.Chem. 269, 21293-302, 1994
- Probst, W.C.; Snyder, L.A.; Schuster, D.I.; Brosius, J.; Seaflon, S.C.: Sequence alignment of the G-protein-coupled receptor superfamily. DANN Cell.Biol.11, 1-20,1992
- Quock, R.M.; Burkey, T.H.; Varga, E.; Hosohata, K.; Cowell, S.M.; Slate, C.A.; Ehlert, F.J.; Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.: The delta-opioid receptor: Molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy. Pharmacol.Rev. 51, 503-32, 1999
- Reinscheid, R.K.; Nothacker, H.P.; Bourson, A.; Ardati, A.; Henningsen, R.A.; Bunzow, J.R.; Grandy, D.K.; Langen, H.; Monsma, F.J. and Civelli, O.: Orphanin FQ: A neuropeptide that activates an opioid-like G-protein-coupled receptor. Science (WDC) 270, 792-794, 1995
- Reisine,T. and Bell, G.I.: Molecular biology of opioid receptors. Trends Neur.16, 506-510, 1993
- Repp, H.: Charakterisierung und optische Darstellung der Bindung von Dendrotoxin, einer Komponente des Schlangengiftes der Blattgrünen Mamba, an peripheren Nervenmembranen. Dissertation, Gießen, 1990
- Rossi, G.C.; Leventhal, L. and Pasternak, G.W.: Naloxone sensitive orphanin FQ.-induced analgesia in mice. Eur.J.Pharmacol. 311, R7-R8, 1996
- Rossi, G.C.; Leventhal, L.; Bolan, E. and Pasternak, G.W: Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. J.Pharmacol.Exp. Ther.282, 853-865, 1997
- Satoh, M. and Minami, M.: Molecular pharmacology of the opioid receptors. Pharmacol. Ther.68, 343-364, 1995
- Schulz, R.; Wüster, M. and Herz. A.: Pharmacological characterization of the å-opiate receptor, J.Pharmacol.Exp.Ther.216, 604-606, 1981

- Sedley, D.E. and Bidlack, J.M.: Effects of beta-endorphin on mu and delta opioid receptor-coupled G-protein activity: Low –Km GTPase studies. J.Pharmacol.Exp.Ther. 263, 99-104, 1992
- Sertürner, F.W.A.: Säure im Opium. J.Pharmacie Erfurt 13, 229-243 (1805)
- Sharif, N.A. and Hughes, J.: Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: Quantitative autoradiography species differences and comparison with kappa receptors. Peptides 10, 499-522, 1989
- Sheldon, R.J.; Riviere, P.J.; Malarchik, M.E.; Mosberg, H.I.; Burks, T.F. and Porreca, F.: Opioid regulation of mucosal ion transport in the mouse isolated jejunum. J.Pharmacol.Exp.Ther.253, 144-151, 1990
- Sher, E.; Cesare, P.; Codignola, A.; Clementi, F.; Tarroni, P.; Pollo, A.; Magnelli, V. and Carbone, E.: Activation of δ-opioid receptors inhibits neuronal-like calcium channels and distal steps of Calcium-dependent secretion in human small-lung carcinoma cells. J.Neurosci.16, 3672-84, 1996
- Sibinga, N. and Goldstein, A.: Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. Ann.Rev.Immunol. 6, 219-249, 1988
- Simon, E.J.; Hiller, J.M. and Edelmann, I.: Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (^{3}H)-Etorphine to rat homogenate. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 70, 1974-1949 (1973)
- Slominski, A.; Paus, R.; Wortsman, J.: On the potential role of proopiomelanocortin in skin physiology and pathology. Mol.Cell.Endocrinol.93, C1-C6, 1993
- Slominski, A.; Ermak, G.; Mihm, M.: ACTH receptor, CYP11A1, CYP17 and CYP21A2 genes are expressed in skin. J.Clin.Endocrinol.Metab. 81, 2746-2749, 1996
- Sofuoglu, M.; Portoghese, P.S.; Takemori, A.E.: Differentiial antagonism of ä opioid agonists by naltrindole and the benzofuran analog (NTB) in mice: evidence for ä opioid receptor subtypes. J.Pharmacol.Exp. Ther.257, 676-680, 1991
- Strosberg, A.D.: Structure/function relationship of proteins belonging to the family of receptors coupled to GTP-binding proteins. Euro.J.Biochem.196, 1-10,1991
- Suh, H.H. and Tseng, L.F.: *Delta* but not *mu*-opioid receptors in the spinal cord are involved in antinociception induced by ß-Endorphin given intracerebroventricularly in mice. J.Pharma.Exp.Ther.253, 981-986, 1990

- Takasaki, Y.; Wolff, R.A.; Chien, G.L. and van Winkle, D.M.: Met^5-enkephalin protects isolated adult rabbit cardiomyocytes via delta-opioid receptors. Am.J.Physiol. 277, 2442-50, 1999
- Takemori, A.E. and Portoghese, P.S.: Selective naltrexone-derived opioid receptor antagonists. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.32, 239-269, 1992
- Takemori, A.E.; Portoghese, P.S.: Selective nalttrexone derived opioid receptor antagonists. Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.32, 239-269, 1992
- Tang, T.; Kiang, J.G. and Cox, B.M.: Opioids acting through delta opioid receptors elicit a transient increase in the intracellular free calcium concentration in ND8-47 neuroblastoma x dorsal root ganglion hybrid cells. J.Pharmacol.Exp.Ther. 270, 40-46, 1994
- Tang, T.; Kiang, J.G.; Cote, T. and Cox, B.M.: Opioid-induced increase in Calcium in ND8-47 neuroblastoma x dorsal root ganglion hybrid cells is mediated through G-protein coupled δ-opioid receptors and desensitized by chronic exposure to opioid. J.Neurochem. 65, 1612-21, 1995
- Taussig, R.; Sanchez, S.; Rifo, M.; Gilman, A.G. and Belardetti, F.: Inhibition of the ω-conotoxin-sensitive calcium current by distinct G proteins. Neuron. 8, 799-809, 1992
- Terenius, L.:Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synapitc plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. Acta Pharmacol.Toxicol.32, 317-320 1973
- Teschemacher, H. and Schweigerer, L: Opioid peptides: Do they have immunological significance? Trends Pharmacol.Sci.6, 368-370, 1985
- Teschemacher, H.J.: Opioidrezeptoren und Opioidpeptide, Pharmazeutische Zeitung, 132.Jahrgang Nr.10, 556-567, 1987
- Teschemacher, H.J.; Koch, G.; Scheffler, S.; Hildebrand, A.; and Brantl, V.: Opioid Peptides: Immunological significance? Ann.NY. Acad.Sciences 594, 66-77. 1990
- Tseng, L.F. and Collins, K.A.: Pretreatment with pertussis-toxin blocks morphine but not ß-Endorphin-induced antinociception in the mouse. Eur.J.Pharmacol. 294, 345-348, 1995
- Tseng, L.F. and Collins, K.A.: Pretreatment with pertussis-toxin differentially modulates morphine-and ß-endorphine-induced antinociception in the mouse. J.Pharmacol. Exp.Ther.279, 39-46, 1996

- Valiquette, M.; Vu, H.K.; Yue, S.Y.; Wahlestedt, C. and Walker, P.: Involvement of Trp-284, Val-296 and Val-297 of the human ä opioid receptor in binding of ä-selective ligands. J.Biol.Chem. 271, 18789-18796, 1996
- Vanderah, T.W.; Takemori, A.E.; Sultana, M.; Portoghese, P.S.; Mosberg, H.I. et al.: Interaction of DPDPE and [D-Ala^2,Glu^4]deltorphin with ä opioid receptor subtypes in vivo. Eur.J.Pharmacol.252, 133-137, 1994
- Varga, E.V.; Li, X.; Stropova, D.; Zalewska, T.; Landsmann, R.S.; Knapp, R.J.; Malatynska, E.; Kawai, K.; Mizusura, A.; Nagase, H.; Calderon, S.N.; Rice, K.; Hruby, V.J.; Roeske, W.R. and Yamamura, H.I.: The third extrazcellular loop of the human ä opioid receptor determines the selectivity of ä receptor agonists. Mol.Pharmacol.50, 1619-1624, 1996
- Vaughn, L.K.; Wire, W.S.; Davis, P.; Shimohgashi, Y.; Toth, G.; Knapp, R.J.; Hruby, V.J.; Burks, T.F. and Yamamurah, H.I.: Differentiation between rat brain and mouse vas deferens ä opioid receptors. Eur.J.Pharmacol.177, 99-101, 1990
- Wang, J.B.; Johnson, P.S.; Imai, Y.; Persico, A.M.; Ozenberger, B.A.; Eppler, C.M. and Uhl, G.R.: cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant, FEBS Lett. 348, 75-79, 1994
- Wang, W.W.; Shahrestanifer, M.; Jin, J. and Howells, R.D.: Studies on ì and ä opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92, 12436-12440, 1995
- Wheatley, M.; Howl, J.; Yarwood, N.; Davies, A.R.L.; Parslow, R.A.: Preparation of a membrane fraction for receptor studies and solubilization of receptor proteins with retention of biological activity. Methods in Molecular Biology 73, 305-322, 1997
- Wick, M.J.; Minnerath, S.R.; Lin, W.; Elde, R.; Law, P.Y. and Loh, H.H.: Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned ì, ä and ê opioid receptors. Mol.Brain Res.27, 37-44, 1994
- Wintzen, M.; Yaar, M.; Burbach, J.P.H.; Gilchrest, B.A.: Proopiomelanocortin gene product regulation in keratinocytes. J.Invest.Dermatol. 106, 673-678, 1996
- Wollemann, M.: Discrepancies between identical amino acid sequences of cloned opioid receptor subtypes and their binding data. Trends.Neurosci.17, 337, 1994
- Woods, J.A.; Shahabi, N.A.; Sharp, B.: Characterization of a naloxone-insensitive ß-endorphin receptor on murine peritoneal macrophages. Life Sci.60,573-586, 1997

- Wüster, M.; Schulz, R. and Herz, A.: Specific of opioid towards the ì-, ä- and å-opiate receptors. Neurosci.Lett.15, 193-198, 1979
- Zhang, S.; Tong, Y.; Tian, M.; Dehaven, R.N.; Cortesburgos, L.; Mansson, E.; Simonin, F.; Kieffer, B.L. and Yu, L.: Dynorphin A as a potential endogenous ligand for four members of the opioid receptor gene family. J.Pharmacol.Exp.Ther. 286, 136-141, 1998
- Zuikin, R.Z.; Eghali, M.; Olive, D.; Unterwald, E.M.; Tempel, A.: Characterization and visualization of rat and guinea pig brain ê opioid receptors; evidence for $\hat{e}_1$ a d $\hat{e}_2$ opioid receptors. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 4061-4065, 1988

9 Danksagungen

Das Erstellen einer experimentellen Doktorarbeit ist alleine nicht möglich. Kommt es zum erfolgreichen Abschluß einer solchen Arbeit, dann ist das immer dank der Zusammen- und Mitarbeit mehrerer Personen. An dieser Stelle möchte ich all den Personen danken, ohne die das Zusammenstellen und der Abschluß dieser Arbeit niemals möglich gewesen wäre.

Zu allererst möchte ich Prof. Dr. Hans-Jörg Teschemacher danken, der mir diese Doktorarbeit ermöglichte und mir auch während der fast einjährigen ergebnislosen Anfangsphase sein Vertrauen schenkte. Die Konzeption des Themas ist ihm zu verdanken. Besonders hervorheben möchte ich die Betreuung durch Prof. Dr. Hansjörg Teschemacher: Während der kompletten Doktorandenzeit war er stets ansprechbar für seine Doktoranden und bei Problemen gab es innerhalb weniger Tage die Möglichkeit, diese zu besprechen. Aus Gesprächen mit Studienkommilitonen und Kollegen weiß ich, daß diese Art der Betreuung eher eine Ausnahme als die Regel darstellt.

Besonders danken möchte ich weiterhin Beate Dickopf, die als medizinisch-technische Assistentin unserer Arbeitsgruppe uns fachlich und persönlich begleitet hat. Der gesamte Teil der Strukturspezifitätsversuche und der Nachweis der $ä_1$-/$ä_2$-Opioidrezeptoren würde ohne ihre Arbeit nicht existieren. Der Abschluß dieser Arbeit wäre ohne sie nicht möglich gewesen.

Weiterhin danken möchte ich Melanie Jayasinghe, die fast zeitgleich mit mir ihre Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe begann und gerade in der Anfangszeit eine große Hilfe war, Alexander Poloczek, der als „alter“ Doktorand immer aufmunternde Worte parat hatte, Birgit Hain, die als „alte“ Doktorandin immer Zeit für ein Gespräch oder freundliche Worte hatte, Christian Dierks, der als „alter“ Doktorand der Arbeitsgruppe von Prof. Presek mir den großartigen Tip, beim Schreiben der Doktorarbeit zeitgleich das Literaturverzeichnis anzugeben, gab, und Birgit Kube, die als „alte“ Doktorandin und Organisationsgenie, gerade in praktischen und konkreten Fragen eine große Hilfe war.

Besonders danken möchte ich weiterhin meinen Eltern Wolf und Heidrun Oeßel und meinen Brüdern Marc und Stefan Oeßel, die meinen Wunsch Medizin zu studieren

nicht immer verstanden aber immer akzeptiert haben und mich während des gesamten Studiums großartig unterstützt haben.
An letzter Stelle möchte ich besonders meiner lieben Freundin Katharina Egeling danken, die ich in dieser Arbeitsgruppe kennengelernt habe und mit der ich seit ca. 3 Jahren glücklich zusammenlebe. Diese Beziehung hat mir Ruhe und Kraft gegeben, sowohl bei der experimentellen Phase als auch bei dem Zusammenschreiben der Arbeit.

10 Lebenslauf

1. Angaben zur Person

Name :	Andre Oeßel
Geburtsdatum :	06.12.1972
Geburtsort :	Hildesheim
Familienstand :	ledig

2. Schulausbildung

1979-1983	Grundschule Barienrode
1983-1993	Gymnasium Andreanum, Hildesheim
1989-1990	Weber High School, Ogden, UT, USA
Abschluss	Abitur

3. Studium

1993-1994	Romanistik/Anglistik Fac des Lettres, Montpellier, Frankreich
Abschluss	Diplôme Approfondi de la Langue Francaise (DALF)
1994-1995	International Economic Studies, Maastricht, Niederlande
Abschluss	Propaedeutisches Exam (Vordiplom)
1996-2001	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Giessen
Frühjahr 1998	Physikum
Frühjahr 1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/1999	Bestehen des 1. Abschnitts der United States Medical License Examination (USMLE 1)
Frühjahr 2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2001	Erstellen der 1. Fassung der Doktorarbeit
2001-2002	Praktisches Jahr : 1.Tertial Chirurgie im Zentralkrankenhaus St.Jürgenstr., Bremen (Leitung Prof. Dr. Klempa) 2.Tertial Orthopädie im Hôpital Orthopédique du CHUV, Lausanne, Schweiz (Leitung Prof. J-P. Leyvraz) 3.Tertial Innere Medizin im Zentralkrankenhaus St.Jürgenstr., Bremen (Leitung Prof. Dr. Arnold)
Abschluss	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Oktober 2002

4. Famulaturen

Februar 1998	Famulatur im Städt. Krankenhaus Wetzlar, Abteilung Gynäkologie/Geburtshilfe
Sebtember 1999	Famulatur im Kreiskrankenhaus Schotten, Abteilung Chirurgie
Juli 2000	Famulatur am Uniklinikum Giessen, Abteilung Pathologie
September 2000	Famulatur in der Praxis Dr.Dohmen, Allgemeinmedizin, Hohenhameln

5. Nebentätigkeiten

1998/1999	Stud. Mitarbeiter Kursus der Makroskopischen Anatomie (Präparierkurs)
1999-2001	Stud. Mitarbeiter in der Klinischen Chemie des Uniklinikums Giessen,

	Routinediagnostik Nacht/Wochenende
1996-2000	Teilnahme an den Lektürekursen der Anglistik JLU Giessen

6. Promotion

04/99-12/01	Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie an der JLU Giessen, Betreuer Prof. Dr. H-J. Teschemacher
Thema	Untersuchungen zur Bindung des δ-Opiodrezeptor-Antagonisten Naltrindol an Membranen von Melanozyten der Melanomzellinie G-361
Methoden	Verarbeiten von Zellen in der Zellkultur, Entwicklung und Modifikation eines Bindingassays an Membranen aus adhärenten Melanomzellen, Produktion von polyklonalen Antikörpern in Kaninchen, Datenverarbeitung anhand folgender Computerprogramme: Microcal Origin, Microsoft Excel, Microsoft Word for Windows, EBDA (equilibrium binding data analysis)
Abschluss	Einreichung der Arbeit vrst. 03/2003

7. Kenntnisse

EDV	Microsoft Word, Microsoft Excel, Microcal Origin
Sprachen	Englisch und Französisch (DALF) fliessend, gute Sprachkenntnisse: Niederländisch

8. Ärztliche Tätigkeit

(12/2002 – vrstl. 05/2004)	Arzt im Praktikum (AiP), Orthopädie, Prof. Dr. G. Lenz, Ev. Diakonissen Krankenhaus Gmbh, Bremen,