

Technische Universität München  
Neurologische Klinik und Poliklinik im Neurokopf Zentrum  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer)

**Eine immunhistochemische Analyse der humanen  $\mu$ -  
Opioidrezeptor Expression und seiner Regulatoren  
in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met  
Polymorphismus**

Julia Schell

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Medizin  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. apl. Prof. Dr. A. Berthele  
2. Univ.-Prof. Dr. B. Hemmer

Die Dissertation wurde am 14.12.2011 bei der Technischen Universität eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 12.06.2013 angenommen.

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>7</b>
1.1. Das opioide System .....	7
1.1.1. Rezeptoren .....	7
1.1.1.1. Struktur und Wirkmechanismus .....	7
1.1.1.2. Rezeptorsubtypen .....	9
1.1.1.3. $\mu$ -Opioidrezeptor .....	9
1.1.2. Endogene Liganden .....	10
1.1.2.1. Opioid Peptide .....	11
1.1.2.2. Morphin .....	12
1.2. Dopaminstoffwechsel .....	14
1.2.1. Dopamin .....	14
1.2.2. Dopaminrezeptoren .....	15
1.2.3. Die Catechol-O-Methyltransferase: Funktion, Aufbau und Gen .....	16
1.2.4. Der COMT Val <sup>108/158</sup> Met Polymorphismus .....	17
<b>2. Aufgabenstellung</b> .....	<b>19</b>
2.1. Dynorphin und Enkephalin Regulation über D1 und D2 Rezeptoren im Striatum .....	19
2.2. Einfluss des dopaminergen Tonus auf die $\mu$ -Opioidrezeptor Expression .....	20
2.3. Einfluss des COMT Val <sup>108/158</sup> Met Polymorphismus auf die Expression des $\mu$ - Opioidrezeptors .....	20
2.3.1. [ <sup>11</sup> C]Carfentanil Liganden-PET (Zubieta et al. 2003) .....	21
2.3.2. <sup>3</sup> H-DAMGO-Liganden Binding (Berthele et al. 2005) .....	22
2.4. Zielsetzung .....	25
<b>3. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
3.1. Gewebegewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials .....	26
3.1.1. Gewinnung des Gehirngewebes .....	26
3.1.2. Anfertigung von Gefrierschnitten .....	26
3.2. Genotypisierung .....	28
3.2.1. Isolation von DNA .....	28
3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion .....	28
3.3. Immunhistochemie .....	29
3.3.1. Fixierung der Gewebeschnitte .....	30
3.3.2. Blocking .....	30
3.3.3. Antikörper und Immunreaktion .....	31
3.3.4. ABC-Reaktion und DAB .....	32
3.3.5. Dehydrieren und Eindeckeln .....	32
3.3.6. Computerauswertung .....	33
3.3.7. Statistische Auswertung .....	34
3.4. <i>In situ</i> Hybridisierung .....	34
3.4.1. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide .....	35
3.4.2. Fixierung der Gewebeschnitte .....	36
3.4.3. Ablauf der <i>in situ</i> Hybridisierung .....	36
3.4.4. Filmautoradiographie .....	37
3.4.5. Computerauswertungen und Statistik der Autoradiographie .....	37
<b>4. Ergebnisse</b> .....	<b>38</b>
4.1. Immunhistochemie .....	38
4.1.1. $\mu$ -Opioidrezeptor .....	38
4.1.1.1. Cerebraler Kortex .....	38
4.1.1.2. Basalganglien .....	38

4.1.1.3. <i>Thalamus</i> .....	38
4.1.2. Enkephalin.....	41
4.1.3. Dynorphin.....	43
4.1.3.1. Dynorphin A.....	43
4.1.3.1.1. <i>Cerebraler Kortex</i> .....	43
4.1.3.1.2. <i>Basalganglien</i> .....	44
4.1.3.1.3. <i>Thalamus</i> .....	44
4.1.3.2. Dynorphin B.....	44
4.1.4. COMT .....	47
4.1.4.1. <i>Cerebraler Kortex</i> .....	47
4.1.4.2. <i>Basalganglien</i> .....	48
4.1.4.3. <i>Thalamus</i> .....	48
4.2. <i>In situ</i> Hybridisierung Präprodynorphin im Striatum .....	50
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>53</b>
5.1. $\mu$ -Opioidrezeptor .....	53
5.1.2. $\mu$ -Opioidrezeptor Expression und methodische Einflüsse .....	53
5.1.3. COMT abhängige $\mu$ -Opioidrezeptor Expression .....	53
5.2. Enkephalin Expression.....	54
5.3. Dynorphin Expression und striatale Regulationswege.....	56
5.4. COMT Aktivität und Expression .....	57
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>61</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>63</b>
7.1. Chemikalien Reagenzien.....	63
7.2. Literaturverzeichnis:.....	65

### **Abkürzungsverzeichnis:**

°C	Grad Celsius
<sup>11</sup> C	Kohlenstoff-11
<sup>3</sup> H	Tritium
[ <sup>3</sup> H]DAMGO	Tritiiertes (D-Ala <sub>2</sub> ,N-Me-Phe <sub>4</sub> ,Gly <sub>5</sub> -ol)-Enkephalin
<sup>35</sup> S	Schwefel-35
ABC	<i>avidin-biotin complex</i>
Ala	Alanin
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
Arg	Arginin
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
BA	Brodmann Area
BP	<i>binding potential</i>
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
Cb	Cerebellum
Ci	Curie
CYP2D6	Subfamilie 2D6 der Cytochrom-P <sub>450</sub> -Enzyme
Co <sup>2+</sup>	Kobalt
CoCl <sub>2</sub>	Kobaltchlorid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
DAB	Diaminobenzidin
DAMGO	(D-Ala <sub>2</sub> ,N-Me-Phe <sub>4</sub> ,Gly <sub>5</sub> -ol)-Enkephalin
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat
dATPαS	Desoxy-Adenosin-5'-(α-Thio-)Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxy-Nucleotid-Triphosphat-Gemisch
DOP	δ-Opioidrezeptor
DTT	Dithiotreitol
Dyn	Dynorphin
Enk	Enkephalin
Fa	Firma
g	Gramm
GABA	γ-Aminobuttersäure
G <sub>i</sub>	inhibitorisches G-Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure

Gly	Glycin
Go	G-Protein der Subgruppe 0
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GTP	Guanosin-Triphosphat
GTP $\gamma$ S	Guanosin-5'-( $\gamma$ -Thio)-Triphosphat
h	<i>hour</i>
IHC	<i>immunohistochemistry</i>
Ile	Isoleucin
ISH	<i>in situ</i> Hybridisierung
K <sup>+</sup>	Kalium
kb	Kilobase
KOP	$\kappa$ -Opioidrezeptor
l	Liter
L -DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin, Levodopa
Leu	Leucin
Lys	Lysin
mb-COMT	<i>membrane-bound COMT</i>
M	molar
MD	Nucleus mediodorsalis thalami
Met	Methionin
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
MI	<i>molecular layer</i>
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
mmol	Millimol
MOP	$\mu$ -Opioidrezeptor
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Na <sup>2+</sup>	Natrium
Nac	Nucleus accumbens
Ncl	Nucleus
NF $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa B</i>
NGS	<i>normal goat serum</i>
NOP	Nociceptin-Rezeptor
NO	<i>nitric oxide</i>
OD	<i>optical density</i>
ORL-1	<i>opioid receptor-like 1</i>
pAK	Primärantikörper
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
Phe	Phenylalanin
PMI	<i>post-mortem</i> Intervall
pmol	Picomol
PPE	Präproenkephalin
Pro	Prolin
Put	Putamen
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
ROI	<i>region of interest</i>
RT	Raumtemperatur
sAK	Sekundärantikörper
s-COMT	<i>soluble COMT</i>
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Ser	Serin
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSC	<i>standard saline citrate solution</i>
stoT	<i>storage time</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TH	Tyrosinhydroxylase
Th	Thalamus
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
Val	Valin
vs	versus
ZNS	Zentrales Nervensystem



# 1. Einleitung

## 1.1. Das opioiderge System

Seit Jahrhunderten ist die schmerzlindernde und euphorisierende Wirkung der Opioide bekannt. Heutiges Ziel der Erforschung molekularer opioiderger Mechanismen ist es, neue Analgetika ohne unerwünschte Nebenwirkungen zu entwickeln und fortschrittliche Therapieansätze zur Behandlung der Opiatabhängigkeit zu finden.

Innerhalb der vergangenen 35 Jahre wurden maßgebliche Informationen über die biochemischen Grundlagen des Opioid-Systems gewonnen. Wesentliche Erkenntnisse erbrachten die Entdeckung und spätere Klonierung der verschiedenen Opioidrezeptoren sowie ihrer endogenen Liganden.

### 1.1.1. Rezeptoren

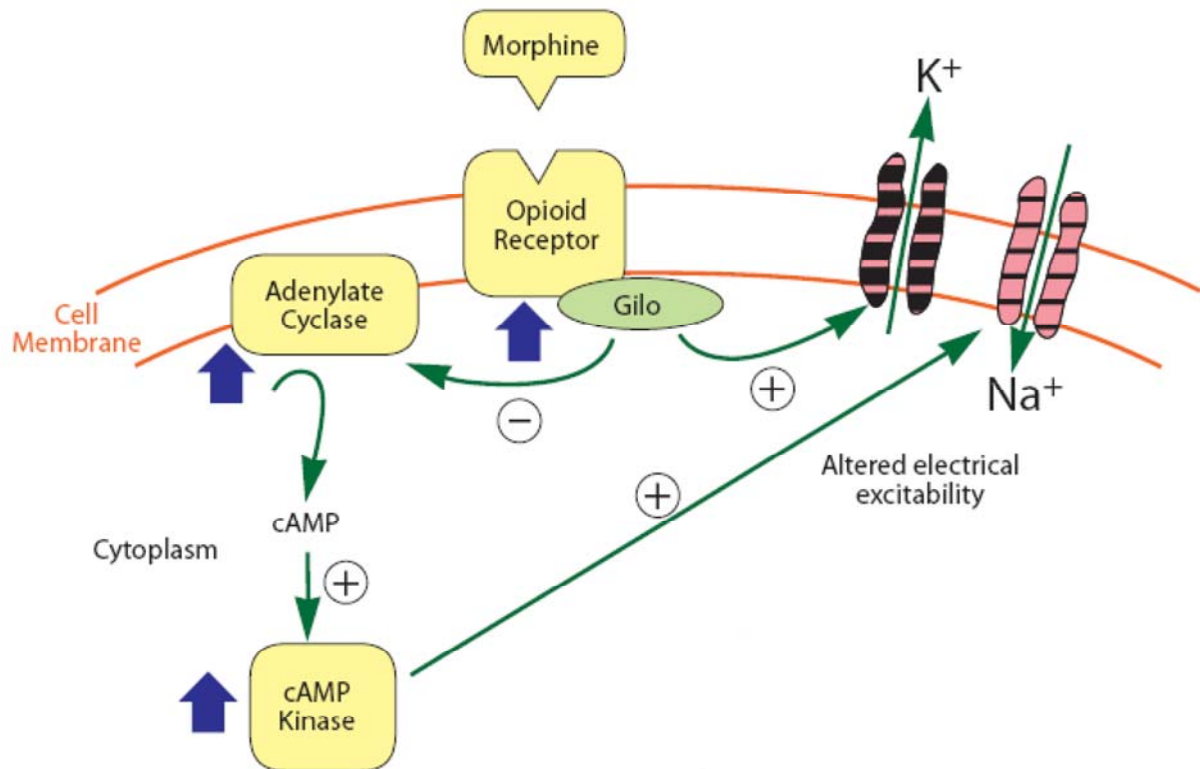
#### 1.1.1.1. Struktur und Wirkmechanismus

Opioidrezeptor Bindungsstellen wurden erstmals im Jahr 1973 nachgewiesen (Pert und Snyder 1973, Simon et al. 1973, Terenius et al. 1973). Seit dieser Zeit konnten durch eine Reihe pharmakologischer Studien verschiedene Opioidrezeptoren und ihre Subtypen entdeckt werden.

Die Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), die ihre zellulären Wirkmechanismen vor allem durch  $G_i/G_o$  Proteine hervorrufen. Strukturell bestehen sie aus einer extrazellulären N-terminalen Domäne, sieben transmembranösen Helices, die durch jeweils 3 extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, sowie einer intrazellulären C-terminalen Domäne.

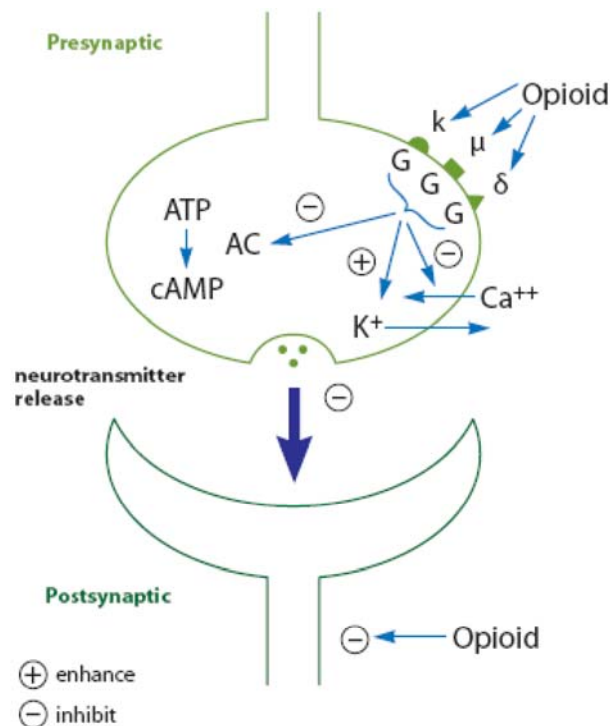
Nach Rezeptoraktivierung werden intrazellulär verschiedene Zielstrukturen aktiviert bzw. inhibiert. Zum Einen ist eine direkte Beeinflussung membranständiger Ionenkanäle möglich. Beispielsweise werden verschiedene Kalium Kanäle durch Opioidrezeptoren aktiviert (William et al. 2001). Zum Anderen inhibieren die Rezeptoren über ihre  $G_i/G_o$  Proteine die Adenylatcyclase, was einen Abfall intrazellulärer cAMP Spiegel zur Folge hat. Über ein Absinken dieses second messengers werden die Proteinkinase A gehemmt und Transkriptionsfaktoren reguliert.





**Abbildung 1:** Darstellung des intrazellulären Wirkungsmechanismus der Opioidrezeptoren (modifiziert nach Trescot et al. 2008).

Diese zellulären Signalwege können zu einer reduzierten Freisetzung von Neurotransmittern führen, dessen systemischer Nettoeffekt wiederum von der anatomischen Lokalisation der Rezeptoren abhängt: In der rostroventralen Medulla zum Beispiel führen präsynaptische  $\mu$ -Rezeptoren auf GABAergen Interneuronen durch Disinhibition zu verstärkter neuronaler Aktivität, während postsynaptische Nociceptin Rezeptoren die neuronale Aktivität hemmen (Corbett et al. 2006). Entscheidend für die Wirksamkeit ist demnach weniger der Rezeptortyp als vielmehr die Lokalisation der Rezeptoren.



**Abbildung 2:** Opioidrezeptor-Lokalisation und Neurotransmitterausschüttung (Abbildung aus Trescot et al. 2008).

### 1.1.1.2. Rezeptorsubtypen

Bis dato sind vier wesentliche Opioidrezeptor Subtypen beschrieben: der  $\mu$ - (MOP),  $\delta$ - (DOP),  $\kappa$ - (KOP) sowie Nozizeptin- (NOP) Rezeptor. Nachdem in den 90er Jahren die Gene für den MOP, DOP und KOP kloniert wurden, konnte durch Homologie-Screening ein weiterer Rezeptor identifiziert werden. Dieser wurde zunächst aufgrund geringer Affinität der zu diesem Zeitpunkt bekannten endogenen Liganden als ORL-1 (opioid receptor-like 1), später im Zuge neuerer Nomenklaturen als Nociceptin-Rezeptor bezeichnet (Corbett et al. 2006, Waldhoer et al. 2004).

Im Anschluss soll der  $\mu$ -Opioidrezeptor genauer erläutert und vorgestellt werden.

### 1.1.1.3. $\mu$ -Opioidrezeptor

Die Affinität seines prototypischen exogenen Liganden, des Schmerzmittels Morphin, erbrachte dem  $\mu$ -Opioidrezeptor seinen Namen (Martin et al. 1976). Weitere Analgetika wie Morphin-6-Gluconid, Methadon, Etonitazen, Codein und Fentanyl erwiesen sich ebenfalls als  $\mu$ -Opioidrezeptor selektive Agonisten. Von immenser klinischer Relevanz war zudem die Entwicklung des selektiven Antagonisten Naloxon.

Unterschiede in der pharmakologischen Wirkung multipler im klinischen Alltag gebräuchlicher Opioide, vor allem das Phänomen der inkompletten Kreuztoleranz, warf die Frage nach verschiedenen  $\mu$ -Opioidrezeptor Subtypen auf.

Pasternak und Mitarbeiter vermuteten aufgrund ihrer [ $^3\text{H}$ ]-Bindungsstudien die Existenz zweier Bindungsstellen am  $\mu$ -Opioidrezeptor: einer hochaffinen  $\mu_1$ - sowie einer  $\mu_2$ -Bindungsstelle mit vergleichsweise geringerer Affinität zu markierten Agonisten (Wolozin und Pasternak 1981). Andere Arbeitsgruppen konnten diese Hypothese bisher nicht bestätigen. Auch gibt es Studien, die sich mit Splicingvarianten der C-terminalen Domäne des  $\mu$ -Opioidrezeptors beschäftigen (Pasternak 2001). Zudem wurde ein weiterer Subtyp detektiert, der  $\mu_3$  Rezeptor, der sich sensitiv gegenüber Opiaten, jedoch insensitive gegenüber Opioidpeptiden verhielt (Stefano et al. 1993, Cadet et al. 2003).

Die Bildung homomerer und heteromerer Rezeptorkomplexe G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist ein weiterer Aspekt, der bei Betrachtung der Wirkungsweise des  $\mu$ -Opioidrezeptors einkalkuliert werden muss (Reviews siehe Devi 2001, Milligan 2004).

Auch die Verteilung des  $\mu$ -Rezeptors im ZNS verschiedener Spezies war Thema experimenteller Studien.  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen wurden in zahlreichen Regionen des Gehirns und des Rückenmarks der Ratte nachgewiesen (Mansour et al. 1987, Tempel und Zukin 1987). Eine hohe Dichte dieser Bindungsstellen konnte beispielsweise im Striatum, Thalamus, Ncl. interpeduncularis, Locus coeruleus, Ncl. tractus solitarius sowie in den Hinterhörnern des Rückenmarkes gezeigt werden. Die Lage der  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen steht dabei im Einklang mit ihrer Funktion im Rahmen der sensomotorischen Integration und der Schmerzmodulation. Die anatomische Expression der kodierenden mRNA korreliert weitgehend mit den Bindungsstellen (Delfs et al. 1994, Mansour et al. 1994).

Auch in menschlichem post-mortem-Hirngewebe wurde die Verteilung der Opioidrezeptoren mittels *in situ* Hybridisierung untersucht (Peckys und Landwehrmeyer 1999) und zeigte für den  $\mu$ -Opioidrezeptor ein zur Ratte homologes Expressionsmuster.

Physiologisch bringt die Aktivierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors durch einen Agonisten einerseits die klinisch erwünschte Wirkung der Analgesie mit sich, führt jedoch andererseits zu unerwünschten Nebenwirkungen wie Atemdepression, Übelkeit und Erbrechen, Obstipation und Abhängigkeit.

### 1.1.2. Endogene Liganden

### 1.1.2.1. Opioid Peptide

In den 70er Jahren rückte immer mehr die Frage nach natürlichen Transmittern der Opioidrezeptoren in den Vordergrund. Hughes und Kosterlitz isolierten 1975 erstmals das Pentapeptid Enkephalin als körpereigenen Liganden. Heute lassen sich die endogenen Liganden in die Gruppe der typischen und atypischen Opioid-Peptide unterteilen. Hierfür ist ihre Aminosäuresequenz am N-Terminus von entscheidender Bedeutung. Während die atypischen Opioid-Peptide hier durch verschiedene Sequenzen charakterisiert sind, weisen die typischen endogenen Peptide Enkephalin, Dynorphin und  $\beta$ -Endorphin konstant Tyr-Gly-Gly-Phe als Aminosäuresequenz auf. Sie werden aus ihren Vorläufermolekülen Pro-enkephalin, Pro-dynorphin und Pro-opiomelanocortin durch enzymatische Spaltung freigesetzt und unterscheiden sich bezüglich ihrer Affinität zu den Opioidrezeptoren.

Vorläufer	Endogenes Peptid	Aminosäuresequenz	Affinität zu Opioidrezeptoren
Pro-enkephalin	Met-Enkephalin	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met	$\delta, \mu$
	Leu-Enkephalin	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu	$(\delta \gg \mu)$
Pro-opiomelanocortin	$\beta$ -Endorphin	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu	$\mu, \delta$ $(\mu = \delta)$
Pro-dynorphin	Dynorphin A	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln	$\kappa, \mu, \delta$ $(\kappa \gg \mu \text{ und } \delta)$
	Dynorphin B	<b>Tyr-Gly-Gly-Phe</b> -Leu-Arg-Arg-Gln-Phe-Lys-Val-Val-Thr	
Pro-nociceptin	Nociceptin	<b>Phe</b> -Gly-Gly-Phe-Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln	ORL
Unbekannt	Endomorphin-1	<b>Tyr</b> -Pro-Trp-Phe-NH <sub>2</sub>	$\mu$
	Endomorphin-2	<b>Tyr</b> -Pro-Phe-Phe-NH <sub>2</sub>	

**Tabelle 1:** Endogene Opioid-Peptide (modifiziert nach Janecka et al. 2004).

Eine Sonderstellung nehmen Nociceptin sowie Endomorphin-1 und -2 ein. Nociceptin resultiert zwar ebenfalls aus einem Vorläufermolekül, dem Pro-nociceptin, sein N-terminales Ende bildet jedoch die Aminosäure Phenylalanin, was seine Selektivität gegenüber dem Nociceptin Rezeptor erklärt.

Als ebenfalls hoch selektiv, jedoch für den  $\mu$ -Opioidrezeptor, erwiesen sich die Tetrapeptide Endomorphin 1 und -2, die erst im Jahre 1997 von Zadina et al. extrahiert wurden. Hierfür sind bisher keine Präkursoren bekannt.

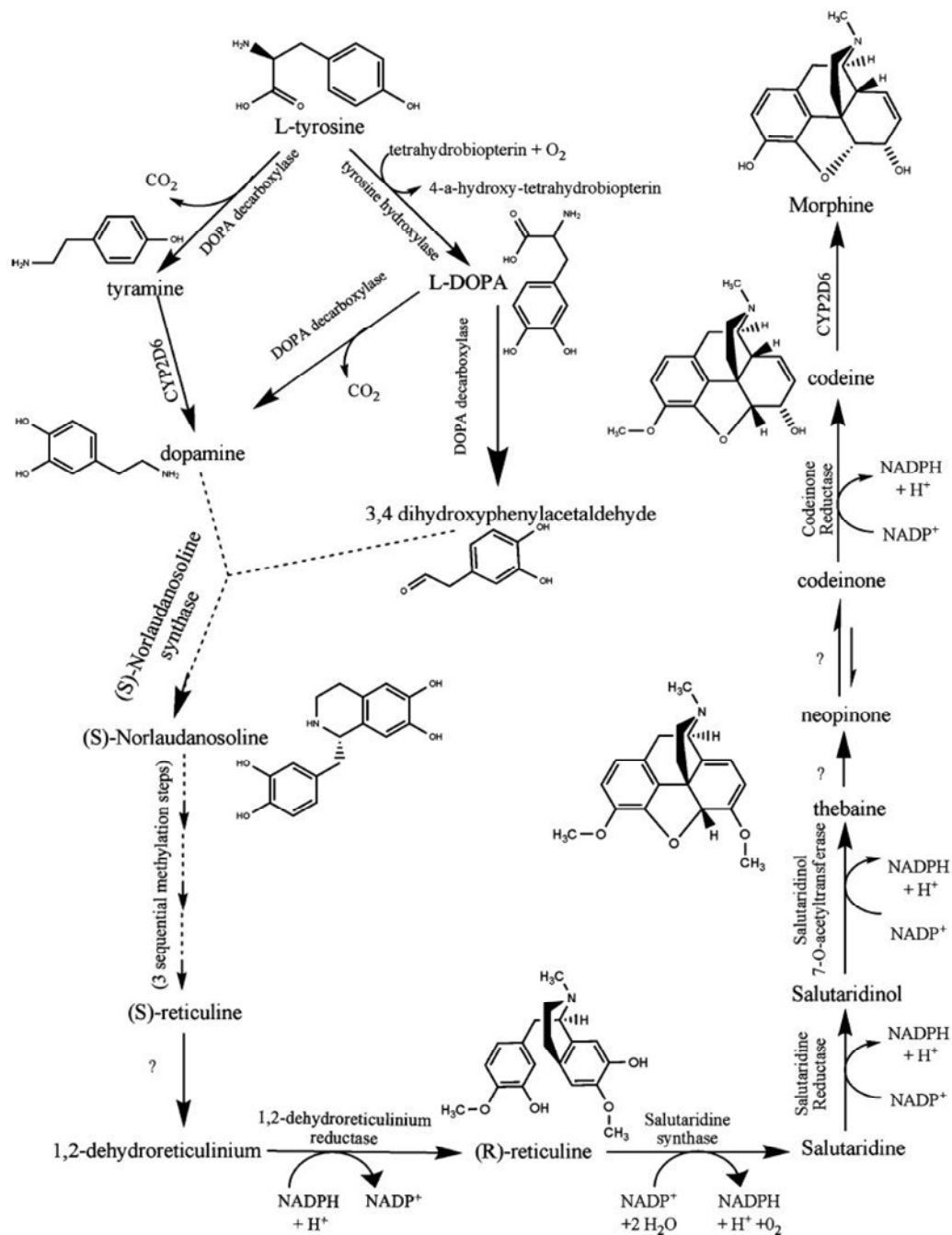
Das polypeptidische Vorläufermolekül des Enkephalin, das Proenkephalin, ist Ausgangssubstanz für ein Leu-Enkephalin Peptid, vier Met-Enkephalin Peptide sowie für zwei weitere Met-Enkephalin Varianten, einem Octa- und einem Heptapeptid. Proenkephalin wird sowohl in neuronalem als auch nicht-neuronalem Gewebe synthetisiert und unterschiedlich weiterzerlegt. Met- und Leu-Enkephalin binden an den  $\delta$ - und  $\mu$ - Rezeptor, wobei die Affinität zum  $\delta$ -Rezeptor überwiegt.

Prodynorphin ist der Ursprung des Dynorphin A und B und weiterer Peptide, die als Grundgerüst die Strukturformel von Leu-Enkephalin aufweisen. Diese Substanzen binden mit hoher Affinität an den  $\kappa$ -Rezeptor. Auch der  $\mu$  und  $\delta$  Rezeptor stellen mögliche, wenn auch geringer affine, Bindungsstellen dar (Corbett et al. 1993).

### **1.1.2.2. Morphin**

Lange Zeit wurde vermutet, dass der klassische Ligand des  $\mu$ - Rezeptors, das Morphin, nicht endogen synthetisiert werden könne. Vielfache Studien beschäftigten sich bis dato mit der physiologischen Relevanz des Morphins, widerlegten diese These, und wiesen endogen synthetisiertes Morphin in verschiedenen Lebewesen und Geweben, unter anderem in Leukozyten (Zhu et al. 2005) und menschlichem Hirn (Fricchione et al. 2008), nach.

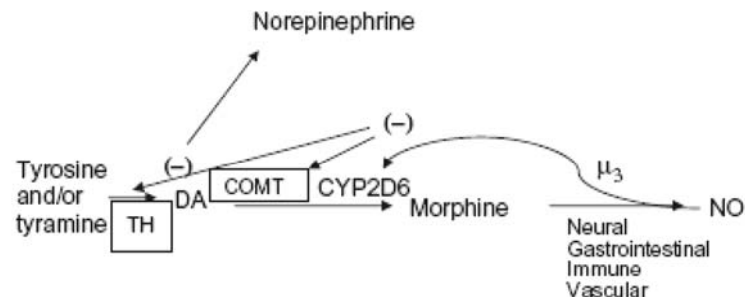
Die Biosynthese erfolgt aus den Vorläufermolekülen L-DOPA, Retikulin, Tetrahydrobiopterin und Tyramin. Eine Reihe enzymatischer Reaktionen sind an dieser Synthese beteiligt, dabei Schritte der CYP2D6 (Zhu 2008) sowie eine Methylierungsreaktion der COMT (Zhu et al. 2003, Zhu et al. 2005, Zhu und Stefano 2009).



**Abbildung 3:** Endogene Morphin Synthese (Abbildung aus Zhu und Stefano 2009).

Im Zusammenhang mit der Morphinsynthese wurde der  $\mu_3$ -Rezeptor, ein Subtyp der  $\mu$ -Opioidrezeptoren, beschrieben, der selektiv durch Opiate, nicht aber durch endogene Opioide stimuliert werden kann (Stefano et al. 1993, Cadet et al. 2003). Bei Besetzung dieses Rezeptors durch Morphin wird in verschiedenen Zellen durch eine Ca<sup>2+</sup> stimulierte konstitutive NO-Synthase Stickstoffmonoxid freigesetzt, welches wiederum intrazelluläre Signalwege aktivieren kann (Stefano et al. 2004, Cadet et al. 2007). Durch einen negativen Feedback Mechanismus kann NO die Expression verschiedener Enzyme des

Katecholaminstoffwechsels sowie der Opiatsynthese, darunter COMT, CYP2D6 und die Tyrosinhydroxylase, regulieren (Mantione et al. 2008).



**Abbildung 4:** Schema eines negativen Feedback Mechanismus von Stickstoffmonoxid auf Enzyme der Morphinsynthese (Abbildung aus Mantione et al. 2008).

*Abkürzungen:* TH: Tyrosinhydroxylase; DA: Dopamin; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; CYP2D6: Subfamilie 2D6 der Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme; NO: Stickstoffmonoxid;  $\mu_3$ : Subtyp der  $\mu$ -Opioidrezeptoren.

Dieser Regulationsweg veranschaulicht eine der möglichen Verknüpfungen zwischen Opiat- und Dopaminstoffwechsel und ist Diskussionsgegenstand der vorliegenden Arbeit.

## 1.2. Dopaminstoffwechsel

### 1.2.1. Dopamin

Dopamin wird zu den Katecholaminen gezählt und ist Hauptvertreter dieser Stoffgruppe im menschlichen Gehirn. Synthetisiert wird es aus der aromatischen Aminosäure L-Tyrosin. Dopamin ist als Neurotransmitter maßgeblich an der Steuerung wichtiger Hirnfunktionen wie der Kontrolle reibungsloser Bewegungsabläufe, der Wahrnehmung, Emotionen und der endokrinen Regulation beteiligt. Abnormalitäten, wie die Degeneration dopaminger nigrostriataler Bahnen beim Morbus Parkinson oder eine dopaminerge Überaktivität bei psychotischen Erkrankungen, machen deutlich, wie ausschlaggebend der Dopaminstoffwechsel und seine Regulation für neurobiologische Funktionen ist.

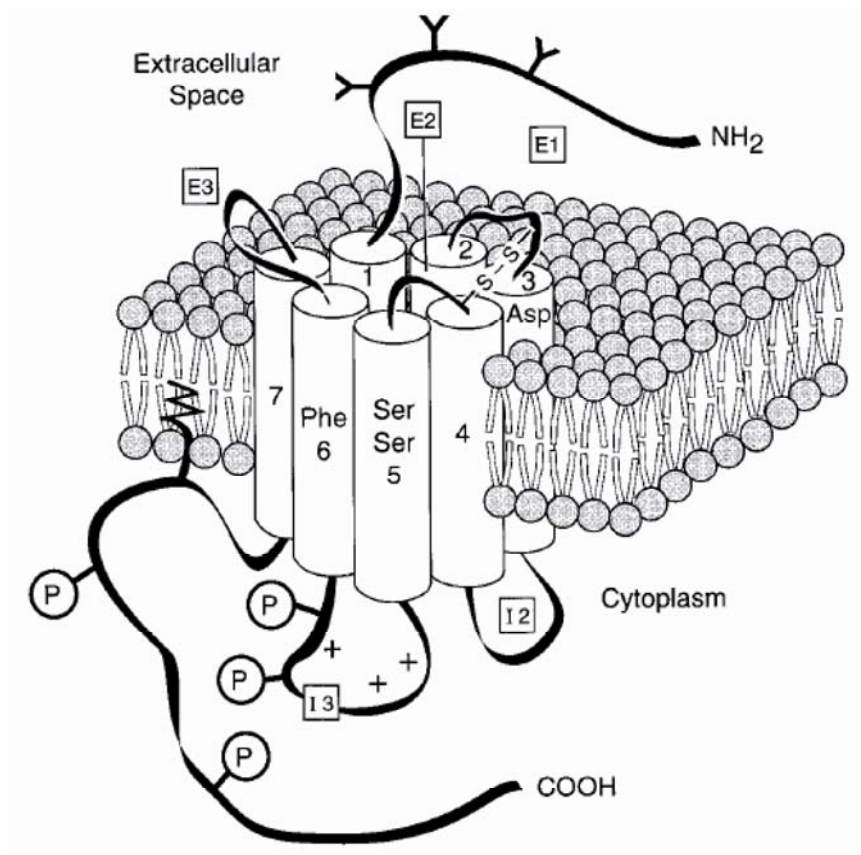
Wesentliche dopaminerge Projektionen sind die nigrostriatalen, mesolimbischen, mesocorticalen und tuberoinfundibulären Bahnen (Vallone et al. 2000). Während die nigrostriatalen Verbindungen vor allem für motorische Kontrolle verantwortlich sind, wird den mesolimbischen und mesocorticalen Bahnen eine Rolle bei Funktionen wie Motivation

bzw. Lernen und Gedächtnis zugeschrieben. Durch tuberoinfundibuläre Projektionen beteiligt sich Dopamin am endokrinen System und vermindert die Ausschüttung von Prolaktin aus dem Hypophysenvorderlappen.

Die Komplexität des dopaminergen Systems lässt sich unter anderem auf die verschiedenen Dopaminrezeptoren zurückführen.

### 1.2.2. Dopaminrezeptoren

Bis dato sind fünf verschiedene Dopaminrezeptoren, D1 bis D5, bekannt. Diese lassen sich aufgrund ihres unterschiedlichen intrazellulären Signalweges zwei Rezeptorgruppen, der D1 oder der D2 Gruppe zuordnen (Kebabian und Calne 1979). Zur D1 Gruppe gehören der D1 und D5 Rezeptor, die über ein  $G_s$ -Protein die Adenylatcyclase aktivieren. Die Rezeptoren der D2 Gruppe hingegen (D2, D3 und D4) inhibieren über ein  $G_i$  Protein die Adenylatcyclase. Die Rezeptoren sind durch den typischen Aufbau G-Protein gekoppelter Rezeptoren mit sieben hydrophoben transmembranösen Domänen, der extrazellulären N-terminalen- und der intrazellulären C-terminalen Domäne charakterisiert.

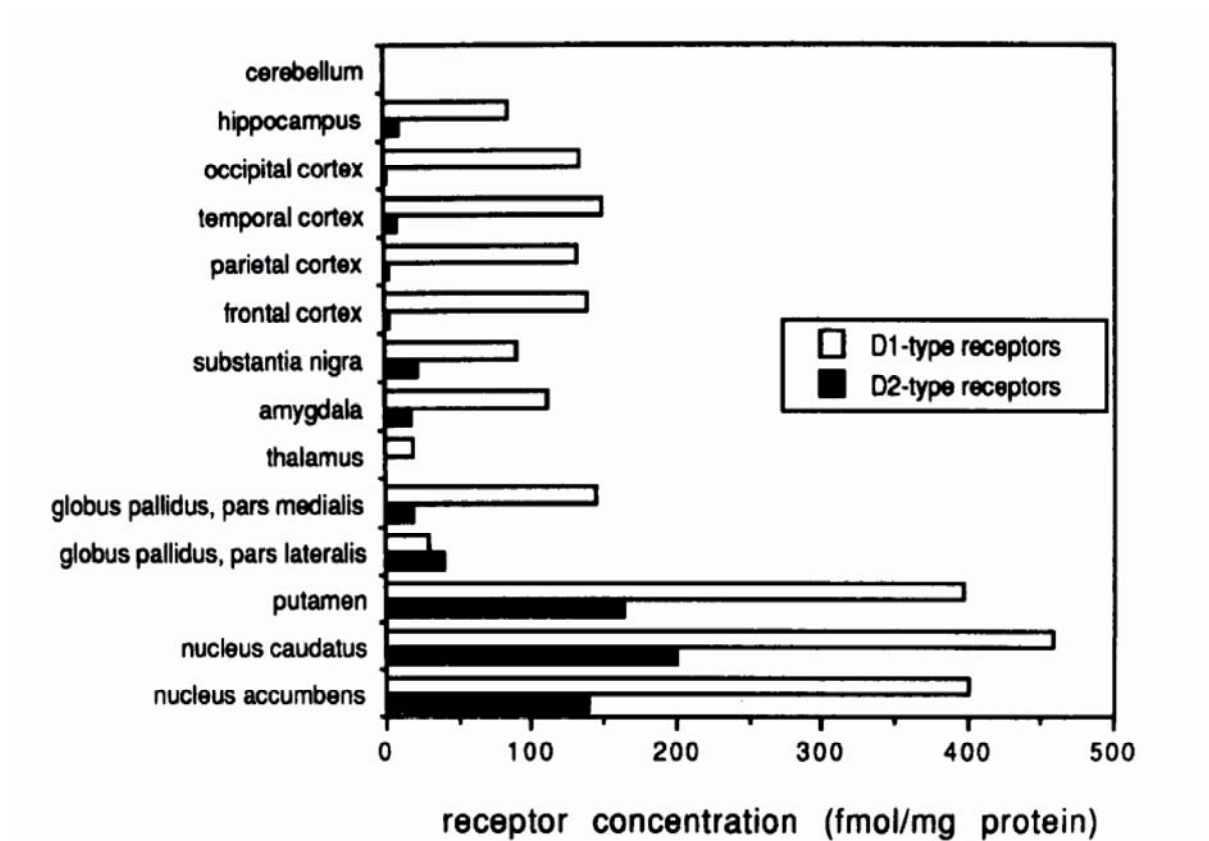


**Abbildung 5:** Struktur des Dopamin Rezeptors (Abbildung aus Missale et al. 1998).



Die Stimulation der Adenylatcyclase führt über erhöhte cAMP Spiegel zu einer Aktivierung der Proteinkinase A, die zelluläre und nukleäre Proteine phosphoryliert und damit unter anderem die Funktion von Ionenkanälen beeinflusst. Im Falle der D1 Rezeptoren kann es durch die Modulation von L- bzw. N- und P-Typ  $\text{Ca}^{2+}$  Kanälen zu einer Verstärkung bzw. Reduktion von  $\text{Ca}^{2+}$  Strömen kommen (Vallone et al. 2000). In einigen Regionen, wie dem Striatum oder dem Mesencephalon, wurde eine Regulation von  $\text{K}^+$  Strömen durch Aktivierung von D2 Rezeptoren beobachtet (Jackson und Westlind-Danielsson 1994).

Die Verteilung der Rezeptoren vom D1 Typ und D2 Typ ist in Abbildung 6 dargestellt. Für diese Arbeit ist an erster Stelle die Expression der D1 und D2 Rezeptoren im Striatum von Bedeutung.



**Abbildung 6:** Regionale Verteilung der Dopamin Rezeptoren vom D1- und D2-Typ im menschlichen Hirn (Abbildung aus De Keyser 1993).

### 1.2.3. Die Catechol-O-Methyltransferase: Funktion, Aufbau und Gen

Ein möglicher Abbaumechanismus im Dopaminstoffwechsel ist das Enzym Catechol-O-Methyltransferase (COMT), das klinisch einen wichtigen Angriffspunkt in der Therapie des

Morbus Parkinson darstellt. COMT katalysiert den Transfer einer Methylgruppe seines Coenzym S-Adenosylmethionin auf die Hydroxygruppe von Dopamin, Epinephrin oder anderen Katecholen (Axelrod und Tomchick 1958) und führt somit zu einer Inaktivierung. Die katalytische Seite enthält die basische Aminosäure Lysin, die in Gemeinschaft mit  $Mg^{2+}$  und dem Coenzym S-Adenosylmethionin eine Ionisierung des Substrates bewirkt, auf welches im Anschluss die Methylgruppe des Coenzym übertragen werden kann (Vidgren et al. 1994). Es existieren zwei Enzymvarianten (Isoenzyme) der COMT: eine lösliche (s-COMT) und eine membrangebundene (mb-COMT) Form (Borchardt et al. 1974; Grossmann et al. 1985; Jeffery und Roth 1984). Während beim Menschen die lösliche Form in Leber, Niere, Nebenniere und der Brustdrüse vorherrscht, überwiegt im Gehirn die membrangebundene Form mit 70% (Tenhunen et al. 1994, Matsumoto et al. 2003)

Das COMT Gen befindet sich auf Chromosom 22 im Bereich q11.2 (Grossmann et al. 1992) und beinhaltet sechs Exons, wobei die Startcodons sowohl für s-COMT als auch mb-COMT in Exon drei liegen. Die Transkription der COMT-Isoformen wird durch zwei verschiedene Promotoren reguliert (Tenhunen et al. 1994). Ergebnis der Transkription ist eine 1,3 kb bzw. 1,5 kb mRNA für s-COMT bzw. mb-COMT, die für 221 bzw. 271 Aminosäuren codiert. Die zusätzlichen, vor allem hydrophoben, Aminosäuren der längeren Variante ermöglichen eine Verankerung (Lundström et al. 1991) in der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums (Ulmanen et al. 1997).

Verschiedene Experimente zur Detektion der zellulären Verteilung der COMT wurden durchgeführt. Immunhistochemisch ergaben sich differierende Hinweise auf eine nicht-neuronale (Kaplan et al. 1979) beziehungsweise eine sowohl nicht-neuronale als auch neuronale Expression (Kastner et al. 1994) des Enzyms im ZNS. Ergebnisse auf mRNA Ebene unterstützten die Vermutung einer neuronalen Lokalisation (Matsumoto et al. 2003).

#### **1.2.4. Der COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus**

Die COMT unterliegt einem genetischen Polymorphismus, der die Enzymaktivität beeinflusst. Ein SNP (Guanin → Adenin) in Exon 4 führt zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin an Position 108 (s-COMT) bzw. 158 (mb-COMT) des COMT Proteins (Lotta et al. 1995; Lachman et al. 1996). Der Einbau von Valin führt zu einer höheren Thermostabilität und damit in seiner homozygoten Ausprägung zu einer drei bis vierfach erhöhte Enzymaktivität gegenüber der homozygoten Methionin Variante. Resultat ist eine trimodale Verteilung mit der höchsten Enzymaktivität für COMT<sup>Val/Val</sup>, einer intermediären Enzymaktivität für COMT<sup>Val/Met</sup> und der geringsten Enzymaktivität für COMT<sup>Met/Met</sup>

Allelträger (Scanlon et al. 1979, Spielmann und Weinshilboum 1981, Lotta et al. 1995, Lachman et al. 1996).

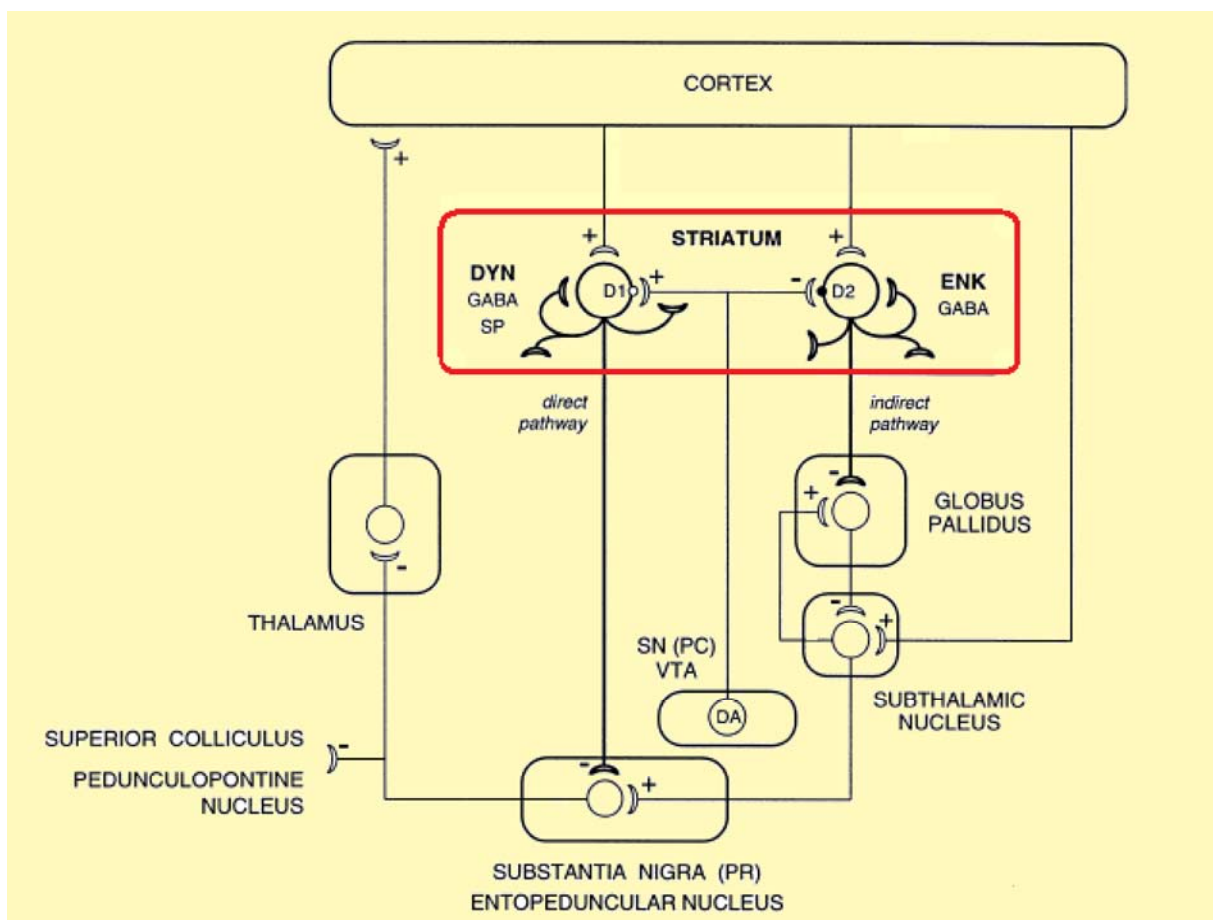
Zur Detektion ethnischer Unterschiede in der Allelhäufigkeit wurden die COMT Genotypen zahlreicher Populationen bestimmt. Dabei stellte sich heraus, dass die Allelfrequenzen weltweit deutlich variieren und dabei das für eine geringere Enzymaktivität codierende Met-Allel bei Europäern am häufigsten vertreten ist (Palmatier et al. 1999).

Seit seiner Entdeckung war der COMT<sup>Val108/158Met</sup> Polymorphismus Gegenstand zahlreicher klinischer und experimenteller Studien.

## 2. Aufgabenstellung

### 2.1. Dynorphin und Enkephalin Regulation über D1 und D2 Rezeptoren im Striatum

Zahlreiche Studien untersuchten vor allem im Striatum den Einfluss des dopaminergen Tonus auf das opioiderge System. Postsynaptische dopaminerge Effekte werden hier über D1 und D2 Rezeptoren vermittelt, die sich im Wesentlichen auf die direkten und indirekten Projektionsneurone des Striatum aufteilen. In GABAergen striatonigralen Neuronen des direkten Systems konnte eine Kollokalisierung von D1 Rezeptoren und Dynorphin bzw. Substanz P nachgewiesen werden, während die GABAergen indirekten Projektionsneurone zum Globus Pallidus D2 Rezeptoren und Enkephalin koexprimierten (Aubert et al. 2000, Gerfen et al. 1990, Le Moine et al. 1990, Le Moine and Bloch 1991, 1995).



**Abbildung 7:** Vereinfachte Darstellung der striatalen Projektionen. Die direkten Projektionsneurone des Striatum beinhalten D1 Rezeptoren und Dynorphin, während die indirekten Projektionsneurone zum Globus Pallidus v.a. D2 Rezeptoren und Enkephalin exprimieren (modifiziert nach Steiner und Gerfen 1998).

Interessanterweise zeigten die Experimente eine gegensätzliche Regulation von Dynorphin und Enkephalin über ihre kolokalisierten Rezeptoren. Beispielsweise führte ein Dopamin-Mangel nach Injektion des Neurotoxins 6-Hydroxydopamin zu einer verringerten Expression von Dynorphin in striatonigralen Neuronen (Young et al. 1986, Voorn et al. 1987, Gerfen et al. 1990, 1991, Li et al. 1990, Engber et al. 1992). Zudem zeigten D1 Rezeptor Knockout Mäuse eine niedrigere Dynorphin Expression bei gleichzeitig nur minimalem bzw. keinem Einfluss auf Enkephalin Spiegel.

Im Gegensatz dazu wurde in verschiedenen Tiermodellen im Striatum eine erhöhte Expression der Präproenkephalin mRNA nach Schädigung nigrostriataler Bahnen beobachtet (Asselin et al. 1994, Gerfen et al. 1990, Morissette et al. 1997, Morris et al. 1989, Tel et al. 2002, Zeng et al. 1995). Auch auf Proteinebene konnte dieser reziproke Effekt nachgewiesen werden (George und Kertesz 1987). Ein Mangel an D2 Rezeptoren in Knockout Mäusen zeigte eine erhöhte Enkephalin Expression (Baik et al. 1995). Diese Experimente lassen eine gegenläufige Regulation von Dynorphin und Enkephalin über D1 bzw. D2 Rezeptoren vermuten.

## **2.2. Einfluss des dopaminergen Tonus auf die $\mu$ -Opioidrezeptor Expression**

Auch ein potentieller Einfluss des Dopamin Spiegels auf die Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren war Thema experimenteller Studien. Bei wiederholter Verabreichung von Kokain, einem Dopamin-Reuptake Hemmer, konnte in der Ratte eine vermehrte Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren im Ncl. accumbens, im Striatum, im cingulären Kortex und der Amygdala nachgewiesen werden (Unterwald et al. 1994). Im Striatum der Maus führte die Behandlung mit einem Dopaminrezeptor Agonisten zu einer verminderten Enkephalin-Biosynthese und Hochregulation von  $\mu$ -Opioidrezeptoren (Chen et al. 1993).

## **2.3. Einfluss des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus auf die Expression des $\mu$ -Opioidrezeptors**

Diese Experimente lassen die Vermutung zu, dass der COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus, der sich nachweislich auf die COMT Enzymaktivität und damit auf den Dopamin Spiegel auswirkt, auch die Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptors beeinflusst.

Dabei lässt sich hypothetisieren, dass das Met-Allel, welches für eine niedrigere Enzymaktivität codiert als das Val-Allel, über erhöhte Dopamin Spiegel zu einer verringerten

Enkephalin Expression via D2 Rezeptoren und damit zu einer Hochregulation der  $\mu$ -Opioidrezeptoren führt.

Diese Hypothese war Thematik zweier Studien, die Voraussetzung für diese Arbeit waren.

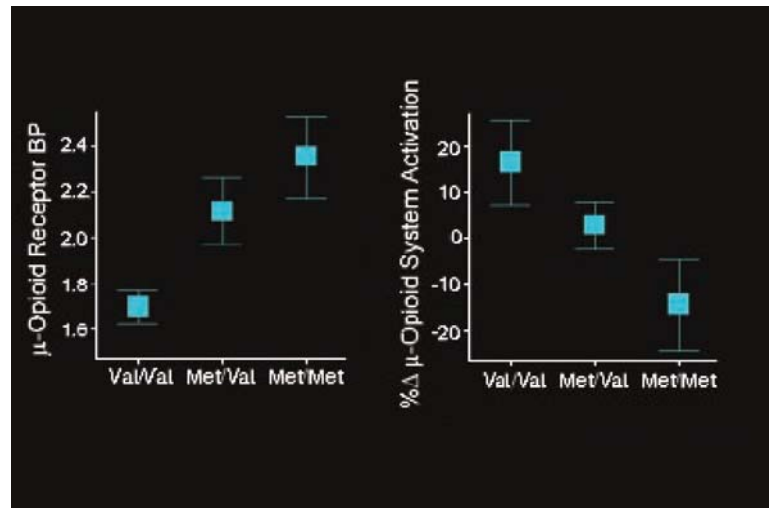
### 2.3.1. [ $^{11}\text{C}$ ]Carfentanil Liganden-PET (Zubieta et al. 2003)

Zubieta et al. untersuchten 2003 mittels [ $^{11}\text{C}$ ]Carfentanil Liganden-PET das  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungspotential und die  $\mu$ -Opioidrezeptor Aktivierung in Abhängigkeit des COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyps.

Gesunden Probanden wurde der für den  $\mu$ -Opioidrezeptor selektive radioaktive Tracer [ $^{11}\text{C}$ ]Carfentanil verabreicht. Das Bindungspotential wurde unter zwei verschiedenen Konditionen gemessen: Zum einen während der Stimulation durch einen schmerzlosen Kontrollreiz und zum anderen während der Verabreichung eines anhaltenden intensitätskontrollierten Schmerzreizes. Neben der Messung des basalen Bindungspotentials konnte damit das Ausmaß der Reduktion des Bindungspotentials und damit der  $\mu$ -Opioidrezeptor Aktivierung ermittelt werden.

Die Erfassung des basalen Bindungspotentials zeigte Genotyp-abhängig signifikante Unterschiede im posterioren ipsilateralen Pulvinar und im anterioren Thalamus. Das Bindungspotential war am höchsten für COMT<sup>Met/Met</sup> homozygote, intermediär für heterozygote und am niedrigsten für COMT<sup>Val/Val</sup> homozygote Probanden. Signifikante Korrelationen zur Gendosis zeigten sich ipsilateral im anterioren Thalamus, im Ncl. accumbens und im ventralen Pallidum.

Die  $\mu$ -Opioidrezeptor Aktivierung nach Schmerzreiz hingegen verhielt sich konträr. Die höchsten Werte wurden in diesem Fall bei COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten gemessen, während die niedrigsten Aktivierungswerte COMT<sup>Met/Met</sup> homozygote Probanden aufwiesen. Aktivierungswerte heterozygoter Probanden lagen dazwischen. Signifikant verschieden waren diese Messungen im posterioren ipsilateralen Pulvinar und anterioren Thalamus sowie den ventralen Basalganglien bilateral. Korrelationsanalysen ergaben signifikante Ergebnisse im ipsilateralen posterioren Thalamus, bilateral im Ncl. accumbens und ventralen Pallidum, sowie kontralateral in Amygdala und temporalem Kortex.



**Abbildung 8:** Mittelwert und Standardabweichung des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus abhängigen  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungspotentials und der  $\mu$ -Opioidrezeptor Aktivierung im Ncl. accumbens nach ipsilateralem Schmerzreiz (modifizierte Darstellung der Ergebnisse aus Zubieta et al. 2003).

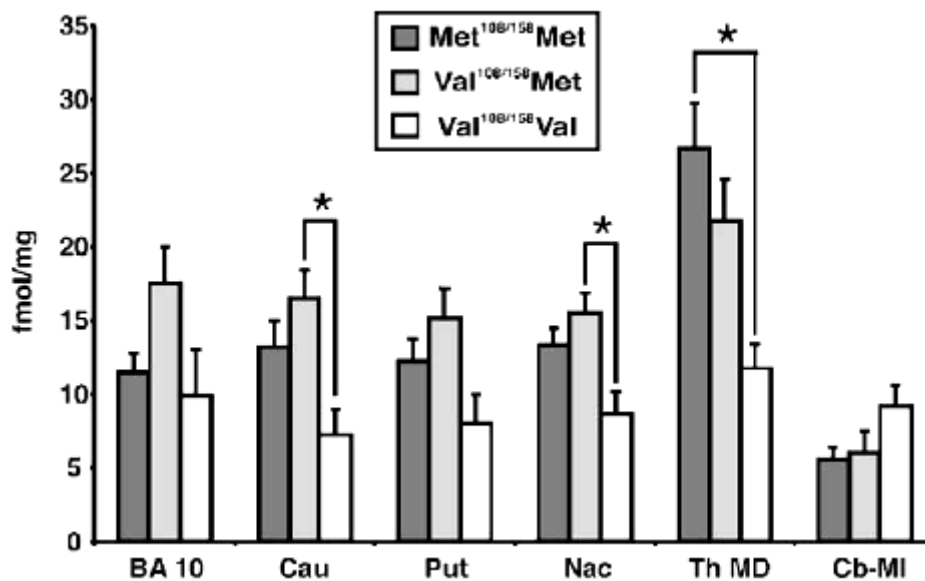
Die Ergebnisse eines erhöhten Bindungspotentials bei gleichzeitig niedriger  $\mu$ -Opioidrezeptor Aktivierung bestätigte die Autoren in ihrer Hypothese, ein erhöhter dopaminerges Tonus bei COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten verringere über D2 Rezeptoren, analog oben erwähnter Tiermodelle, die Konzentration an Enkephalin im humanen Striatum. Niedrigere Konzentrationen dieses endogenen Liganden führten in der Konsequenz zu einer Hochregulation des  $\mu$ -Opioidrezeptors.

### 2.3.2. <sup>3</sup>H-DAMGO-Liganden Binding (Berthele et al. 2005)

Eventuelle Limitationen einer *in vivo* Liganden-PET, wie zum Beispiel ihre Sensitivität gegenüber endogenen Liganden und ihre damit eingeschränkte Aussagekraft über die tatsächliche basale Rezeptor-Expression, veranlassten Berthele et al. 2005 zu einer Verifizierung der Ergebnisse Zubietas *ex vivo* an menschlichem post-mortem Hirngewebe. Mittels eines <sup>3</sup>H-DAMGO-Liganden Bindings und einer DAMGO-stimulierten [<sup>35</sup>S]GTP $\gamma$ S-Autoradiographie wurde erneut die Expression der  $\mu$ -Opioidrezeptoren in Abhängigkeit vom COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp an einem ähnlich großen Kollektiv untersucht.

Auch diese Studie bestätigte die Vermutung, dass der COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp die Verfügbarkeit der  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen beeinflusst. COMT<sup>Met/Met</sup> sowie COMT<sup>Val/Met</sup> Allelträger wiesen gegenüber COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten eine höhere Anzahl an  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen auf. Signifikante Unterschiede wurden im Ncl. caudatus (COMT<sup>Val/Met</sup> vs. COMT<sup>Val/Val</sup>), Ncl. accumbens (COMT<sup>Val/Met</sup> vs. COMT<sup>Val/Val</sup>) und im Ncl. mediodorsalis des Thalamus (COMT<sup>Met/Met</sup> vs. COMT<sup>Val/Val</sup>) gemessen. Die Ergebnisse der

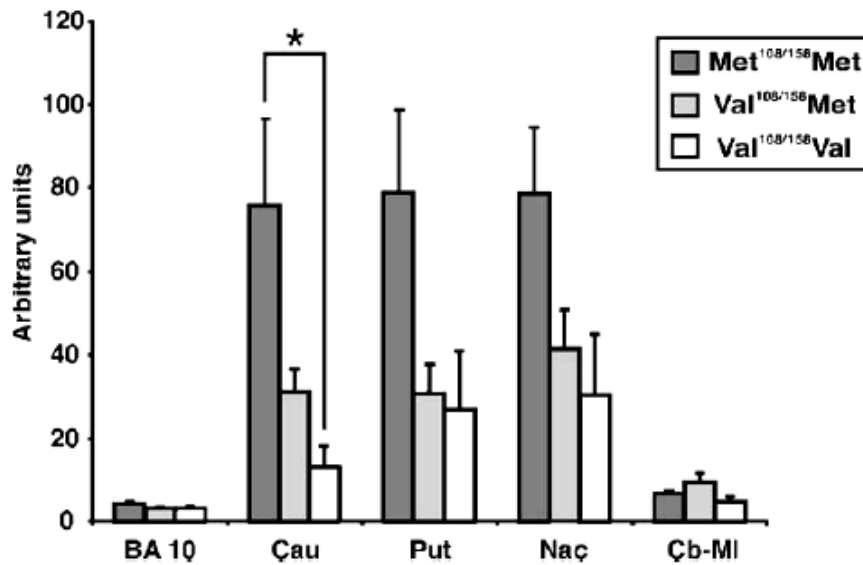
DAMGO-stimulierten [ $^{35}$ S]GTP $\gamma$ S-Autoradiographie spiegeln im Wesentlichen die Ergebnisse des Liganden Bindings wieder.



**Abbildung 9:** Darstellung der COMT Val<sup>108/158</sup>Met Genotyp assoziierten  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression in menschlichem post-mortem Hirngewebe. Ergebnisse des  $^3$ H-DAMGO-Liganden Bindings in frontalem Kortex (BA 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac), Ncl. mediodorsalis des Thalamus sowie der Molekularschicht des cerebellären Kortex (Cb-MI) (Abbildung aus Berthele et al. 2005).

Um die Rolle des Enkephalin in der COMT abhängigen Regulation des  $\mu$ -Opioidrezeptors zu untersuchen, wurde eine *in situ* Hybridisierung der Präproenkephalin mRNA durchgeführt. Überraschenderweise war die mRNA Menge im Striatum COMT<sup>Met/Met</sup> homozygoter Probanden am höchsten. Signifikant war dieser Unterschied im Ncl Caudatus. Im Thalamus konnte keine Präproenkephalin mRNA nachgewiesen werden.





**Abbildung 10:** Mittelwert und Standardabweichung der COMT Val<sup>108/158</sup>Met Genotyp assoziierten Präproenkephalin Expression in menschlichem post-mortem Hirn. Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung in frontalem Kortex (BA 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) sowie der Molekularschicht des cerebellären Kortex (CB-MI). Der Ncl. mediodorsalis des Thalamus zeigte keine Präproenkephalin Expression (Abbildung aus Berthele et al. 2005).

In der Annahme, dass erhöhte mRNA Spiegel mit einer erhöhten Enkephalin Expression einhergehen, ließen diese Ergebnisse die Vermutung einer  $\mu$ -Opioidrezeptor Regulation über seinen endogenen Liganden Enkephalin als zweifelhaft erscheinen. Es zeigte sich vielmehr eine gleichgerichtete Regulation des Rezeptors und seines endogenen Liganden. Zudem konnte im Präproenkephalin freien Thalamus ein nahezu linearer Gen-Dosis Effekt festgestellt werden, was ebenfalls einer Enkephalin abhängigen Regulation widerspricht.

## 2.4. Zielsetzung

Die Ergebnisse beider Studien stellen die Ausgangsposition für die Experimente der vorliegenden Arbeit dar.

In nachfolgenden Untersuchungen soll mit Hilfe der Immunhistochemie die Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptors, des Enkephalin, des Dynorphin sowie der COMT in frontalem Kortex, im Striatum und im Thalamus bei den Genotypen des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus ermittelt werden. Dies ermöglicht

1. eine immunhistochemische Validierung der Ergebnisse der [<sup>11</sup>C]Carfentanil Liganden-PET sowie des <sup>3</sup>H-DAMGO-Liganden Bindings zur  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression.
2. den Nachweis von Enkephalin auf Proteinebene und damit eine Aussage über seine Rolle als möglicher  $\mu$ -Opioidrezeptor Regulator in den verschiedenen COMT-Genotypen.
3. eine Darstellung der Dynorphin Expression im Striatum, die weitere Hinweise auf mögliche Regulationswege erbringen soll. Unter anderem soll die These einer gegensätzlichen Regulation von Enkephalin und Dynorphin durch dopaminerge D1 und D2 Rezeptoren geprüft werden (Dopamin  $\uparrow$   $\rightarrow$  Dynorphin $\uparrow$  vs. Dopamin  $\uparrow$   $\rightarrow$  Enkephalin $\downarrow$ ). Hierzu wurden bereits existierende PPE mRNA Daten (Berthele et al. 2005, Jochim 2006) durch eine *in situ* Hybridisierung des Dynorphin ergänzt.
4. die Darstellung etwaiger Unterschiede der COMT Expression in den untersuchten Hirnregionen, die Hinweise auf lokoregional unterschiedliche Einflüsse der COMT auf den dopaminergen Stoffwechsel und nachgeschalteter Regulationswege geben könnten.

## 3. Material und Methoden

### 3.1. Gewebegewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

#### 3.1.1. Gewinnung des Gehirngewebes

Die Gewebeproben der verschiedenen Hirnregionen wurden im Rahmen von pathologischen bzw. rechtsmedizinischen Sektionen gewonnen. Es handelte sich um 17 verschiedene, kaukasische Hirne, davon 6 weiblichen und 11 männlichen Ursprungs. Das Alter der Spender zum Todeszeitpunkt betrug durchschnittlich 59,3 Jahre. Die Sektionen erbrachten keine neuropathologischen Auffälligkeiten. Zudem war bei keinem der Verstorbenen eine neurologische oder psychiatrische Vorerkrankung bekannt. Zur Minimierung eines Einflusses des Östrogen-Stoffwechsels auf die Ergebnisse (Xie et al. 1999, Jiang et al. 2003), wurden Gewebe weiblicher Personen lediglich im postmenopausalen Status untersucht. Das post-mortem Intervall betrug im Mittel 16,9 Stunden. Aufgrund der limitierten Verfügbarkeit menschlichen post-mortem Gewebes wurden die Experimente an Hirnregionen durchgeführt, in denen der COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus die Expression endogener Opioidrezeptoren nachweislich beeinflusst (Berthele et al. 2005) und die zudem eine ausschlaggebende Rolle in der zentralen Schmerzverarbeitung und Modulation spielen (Chudler et al. 1995). Hierzu gehören das Striatum mit Ncl. caudatus, Putamen und Ncl. accumbens, der Thalamus mit Ncl. mediodorsalis sowie der frontale Kortex (BA 10). Geschlechts- und Alterverteilung, Todesursachen und Kenngrößen zur Gewebequalität des untersuchten Kollektivs finden sich in Tabelle 2.

#### 3.1.2. Anfertigung von Gefrierschnitten

Unter Zuhilfenahme des neuroanatomischen Atlas von Nieuwenhuys et al. (1980) wurden Gewebeproben aus den interessierenden Regionen entnommen, auf Trockeneis direkt nach Entnahme durchgefroren bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer Gefriertruhe bis zur Anfertigung von Gefrierschnitten gelagert. Hierzu wurden die Gewebeblöcke bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in einem Kryostat (Frigocut, Fa. Reichert-Jung) in koronarer Schnittebene aufgeblickt. Auf zuvor mit Ethanol gereinigte, anschließend heißluftsterilisierte und mit Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger wurden  $20\mu\text{m}$  dicke Hirnschnitte aufgetragen. Von allen für die Versuche relevanten Hirnstrukturen eines Gewebes wurden maximal 40 Schnitte erzeugt, wobei nach jedem zwanzigsten Schnitt ein Exemplar zur Anfertigung eines Nissl-Schnittes (Thioninblau) zur

histologischen Untersuchung gewonnen wurde. Bis zur weiteren Verwendung wurden die vorbereiteten Objektträger erneut luftdicht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

ID	Genotyp	Geschlecht	Alter zum Todeszeit punkt	PMI (h)	stoT	pH	Todesursache
1	VV	M	56	18,5	108	6,205	HerzKreislaufversagen
2	VV	W	86	10,5	78	5,755	HerzKreislaufversagen
3	VV	W	49	18,5	33	6,195	hämorrhag. Schock
4	VM	W	81	18	107	6,035	Sepsis
5	VM	M	60	29,5	107	6,385	HerzKreislaufversagen
6	VM	M	67	6	106	6,185	HerzKreislaufversagen
7	VM	M	47	19	89	6,49	hämorrhag. Schock
8	VM	W	78	28	89	6,19	Myokardinfarkt
9	VM	W	82	18	89	6,345	Herzbeutelamponade
10	VM	M	61	22,5	88	6,105	HerzKreislaufversagen mit Lungenödem
11	VM	M	32	23	34	6,58	Herzversagen
12	MM	W	66	7	109	6,105	Multiorganversagen bei Sepsis
13	MM	M	62	19,5	109	5,92	Unbekannt
14	MM	M	58	7	73	6,36	Ertrinken
15	MM	M	55	24,5	34	6,515	Verkehrsunfall
16	MM	M	29	8	29	6,71	Herzversagen
17	MM	M	39	10	26	6,695	hämorrhag. Schock
Mittelwert			$\pm 59,3$	$\pm 16,9$	$\pm 76,9$	$\pm 6,5$	
Standartabweichung			16,8	7,5	32,4	0,3	

**Tabelle 2:** Übersicht über die biographischen Daten des verwendeten Untersuchungsmaterials  
*Abkürzungen:*

ID: Identifikationsnummer; MM: COMT Genotyp Met/Met; MV: COMT Genotyp Met/Val;  
VV: COMT Genotyp Val/Val; PMI (h): post-mortem Intervall in Stunden; stoT: Lagerzeit in  
Monaten bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2. Genotypisierung**

Die Genotypisierung erfolgte aus DNA kortikalen Gewebes in Experimenten, die dieser Arbeit vorausgingen (Berthele et al. 2005, Jochim 2006). Zur Vervollständigung der relevanten Methodik wird nachfolgend das Genotypisierungsprotokoll aufgeführt.

#### **3.2.1. Isolation von DNA**

Die DNA Isolation wurde anhand des Protokolls der Firma Gentra Systems (PUREGENE® DNA Isolation Kit) durchgeführt:

- 1) 400-500 mg gefrorenes Hirngewebe werden mit 18 ml Cell Lysis Lösung (Gentra) sofort kräftig vermischt
- 2) Homogenisierung dieser Suspension von Hand für ca. 2 min
- 3) Inkubation des Lysates bei 65°C für 15-60 Minuten
- 4) Abkühlen auf Zimmertemperatur
- 5) Zugabe von 6ml „Protein Precipitation“- Lösung und kräftiges Schütteln für 20 Sekunden
- 6) Zentrifugation mit 2000 g für 10 Minuten
- 7) Abpipettieren der oberen wässrigen Phase (welche die DNA enthält) und Fällung der DNA durch Zugabe von 18 ml 100% Isopropanol
- 8) Durchmischen durch 50-maliges Invertieren
- 9) Zentrifugation mit 2000 g für 5 Minuten. Am Boden des Zentrifugenröhrchens ist ein zartes DNA Pallet zu sehen.
- 10) Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 18 ml 70% Ethanol
- 11) Zentrifugation mit 2000 g für 1 Minute und Verwerfen des Überstandes
- 12) Trocknen der Pellets bei Zimmertemperatur für 15 Minuten
- 13) Lösen der DNA in 1 ml TRIS-EDTA-Puffer durch wiederholtes Mischen und Inkubation für eine Stunde bei 65°C
- 14) Lagerung der Isolate bei 2-8°C.

#### **3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR für die hier verwendeten DNAs wurde empirisch optimiert. Als Negativkontrolle wird in die PCR neben der DNA noch eine DNA freie Probe eingesetzt. Hierdurch kann ausgeschlossen werden, dass ein Amplifikat aus einer versuchsbedingten DNA-Kontamination entstanden ist. Zur Reaktion mit einem Primerpaar werden die Reagenzien für

die einzelnen Proben insgesamt in einem „Mastermix“ angesetzt, um mögliche Pipettierfehler zu egalisieren.

- 1) PCR-Mastermix (pro Ansatz):
  - 38,0 µl H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub>
  - 5,0 µl PCR-Puffer (10x)
  - 1,5 µl MgCl<sub>2</sub> (50mM)
  - 1,0 µl dNTP-Mix (10mM)
  - 1,0 µl Primer sense (10µM):
    - Comt1 nt 1881 5'-CTC ATC ACC ATC GAG ATC AA-3'
  - 1,0 µl Primer antisense (10µM):
    - Comt2 nt 1989 5'-CCA GGT CTG ACA ACG GGT CA -3'
  - 0,5 µl Taq DNA Polymerase
- 2) Zugabe und Mischen von jeweils 2,0 µl cDNA (bzw. H<sub>2</sub>O<sub>PCRgrade</sub> als Negativ-Kontrolle) in 48,0 µl PCR Mastermix.
- 3) Inkubation im PCR-Block mit folgendem Programmablauf:
  - Aufschmelzen bei 94°C für 5 min
  - 36 Zyklen mit 54°C
  - Elongation des Produktes bei 72°C für 10 min.
- 4) Kühlen bei 4-8°C für 10 min.
- 5) Inkubation des PCR-Produktes mit dem Restriktionsenzym N1aIII, das spezifisch bei 86 (Val) bzw. 68 (Met) Basenpaaren schneidet, bei 37°C für 4 Stunden.
- 6) Auftrennung der PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel bei 130 V und 80 mA in einer Elektrophoreseeinheit für 120 min unter TAE-Laufpuffer.
- 7) Färben mit Ethidiumbromid, Fragmente mit 86 Basenpaaren zeigen das Val-Allel an, Fragmente mit 68 Basenpaaren das Met-Allel.

### **3.3. Immunhistochemie**

Zum Nachweis der µ-Rezeptoren, des Enkephalin, des Dynorphin sowie der COMT wurden immunhistochemische Methoden eingesetzt. Diese unterliegen einigen Limitierungen. Hintergrundfärbungen durch unspezifische Bindung der Antikörper an antigen-ähnliche Strukturen und multiple Variablen wie die Konzentration des primären Antiserums, die Beschaffenheit der Verdünnungspuffer oder die Schichtdicke der histologischen Schnitte (Grube 2004) können Resultate beeinflussen.

Ein großer Vorteil der Immunhistochemie ist jedoch, dass sie als *in situ* Methode eine gleichzeitige Lokalisierung nachgewiesener Antigene ermöglicht. Methodisch stehen grundsätzlich zwei Varianten zur Verfügung: der direkte und indirekte Antigennachweis. Die direkte Methode (mit Hilfe eines markierten primären Antikörpers) ist schnell durchführbar und unspezifische Bindungen treten hierbei seltener auf.

Aufgrund ihrer höheren Sensitivität wird in den Experimenten der vorliegenden Arbeit die gängigere indirekte Methode angewendet. Hierbei handelt es sich um ein mehrstufiges Verfahren, bei welchem zunächst der Primärantikörper das Antigen erkennt und im zweiten Schritt selbst von einem Sekundärantikörper an seinem Fc-Fragment detektiert wird. Der Einsatz der ABC und DAB Methode (siehe Gliederungspunkt 3.3.4) führt letztendlich zu einem Farbumschlag am Ort des Antigens.

Alle eingesetzten Primärantikörper waren polyklonalen Ursprungs. Im Gegensatz zu monoklonalen Antikörpern sind diese zwar durch eine geringere Spezifität gekennzeichnet, ermöglichen aber einen stabileren Nachweis verschiedener Epitope desselben Antigens.

Zur Quantifizierung unspezifischer Hintergrundfärbungen wurde für jeden Schnitt gleichzeitig ein Kontrollschnitt nach gleichem Protokoll, jedoch ohne Inkubation mit dem Primärantikörper, angefertigt.

### **3.3.1. Fixierung der Gewebeschnitte**

Ziel einer Fixierung ist es, den Reagenzien der Immunkaskade optimale Permeabilität zur Antigendetektion zu ermöglichen und das Gewebe gleichzeitig in seiner ursprünglichen Struktur zu erhalten.

In Vorversuchen wurde zur Darstellung der Primärantikörper die jeweils geeignete Fixierungsmethode ermittelt. Im Falle des MOP war dies 4%iger Paraformaldehyd, während sich COMT, Enkephalin und Dynorphin optimal mit Aceton nachweisen ließen.

Für den immunhistochemischen Versuchsablauf wurden die vorbereiteten und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerten Kryostatschnitte aufgetaut und für ca. 30 min bei Raumluft getrocknet.

Die Verwendung von Paraformaldehyd erforderte zunächst die Markierung der Hirnregionen mit einem hydrophoben Stift. Daraufhin wurden die Schnitte für zehn Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  fixiert und anschließend zehn Minuten in 1x PBS gewaschen.

Fixierung in Aceton erfolgte bei  $-20^{\circ}\text{C}$  für 7 Minuten. In diesem Fall wurden die Schnitte erst nach der Fixierung umrandet.

### **3.3.2. Blocking**

Zur Minimierung unspezifischer Bindungen der Primär- und Sekundärantikörper wurden die Schnitte vor der eigentlichen Immunkaskade mit Blockierungslösung inkubiert.

Da in den Experimenten Ziege-Zweitantikörper zum Einsatz kam, wurde als Blockierungslösung normales Ziegenserum verwendet (PBSTN). Hiervon wurde jeweils 1 ml der Lösung auf die Schnitte pipettiert. Das Blocking erfolgt für 45 min bei Raumtemperatur.

### 3.3.3. Antikörper und Immunreaktion

Die Primärantikörper wurden während der letzten 5 Minuten der Blocking-Inkubationszeit in PBSTN verdünnt und für einige Sekunden bei mittlerer Geschwindigkeit gevortext. Die verdünnte Lösung wurde auf die Schnitte aufgetragen und anschließend in einer feuchten Kammer zur Inkubation über Nacht bei 4°C gelagert. Die Kontrollschnitte ohne Primärantikörper inkubierten unter gleichen Bedingungen in Blockierungslösung.

Ungebundene Erstantikörper wurden nach der Inkubationszeit von 18 Stunden durch einen dreimaligen Waschvorgang in 1x PBS für jeweils fünf Minuten entfernt.

In Tabelle 3 sind die eingesetzten Primärantikörper und ihre Eigenschaften dargestellt.

Primärantikörper (pAK)	Spezies pAK	Konzentration	Klonalität
Anti-COMT	Kaninchen	1:5000	polyklonal
Anti-Enk	Kaninchen	1:1000	polyklonal
Anti-Dyn A	Kaninchen	1:500	polyklonal
Anti-Dyn B	Kaninchen	1:500	polyklonal
Anti-MOP	Kaninchen	1:1000	Polyklonal

**Tabelle 3:** Primärantikörper

Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde auf die in Vorversuchen erprobte Konzentration mit Pufferlösung (PBSN) verdünnt und nach dem Waschvorgang auf die Hirnschnitte pipettiert. Der Zweitantikörper inkubierte eine Stunde lang. Vor Durchführung der ABC Reaktion wurden die Schnitte erneut intensiv mit 1x PBS (3\*5 Minuten) gespült.

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Konzentration
Anti-COMT	Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:200
Anti-Enk	Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:200



Anti-Dyn A	Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:100
Anti-Dyn B	Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:100
Anti-MOP	Ziege anti-Kaninchen, biotinyliert	1:100

**Tabelle 4:** Sekundärantikörper

### 3.3.4. ABC-Reaktion und DAB

Durch den Einsatz eines biotinylierten sekundären Antikörpers kann die Bindung des Primär-Antikörpers durch das ABC System sichtbar gemacht werden. Der Komplex aus Avidin-Biotin und dem Enzym Meerrettichperoxidase, der an den biotinylierten Zweitantikörper bindet, ermöglicht durch eine anschließende Farbreaktion eine Detektion der Antigene.

Die Stammlösung wurde mehr als 30 min vor Verwendung in einer Verdünnung von 1:50 hergestellt und unter Lichtausschluss aufbewahrt. Während einer einstündigen Inkubationszeit erfolgte die Koppelung des ABC-Komplexes an den Zweitantikörper. Ungebundene Molekülkomplexe wurden anschließend durch Waschen in 1x PBS entfernt. (3 mal 5 Minuten).

Die Farbreaktion erfolgte mittels 3´3 Diaminobenzidin. Es bildet das Substrat für die im ABC Komplex gebundene Meerretticheroxidase und führt so zu einem bräunlichen Farbumschlag am Ort der Immunkaskade.

Eine Inkubation fand bei Raumtemperatur für 4-6 Minuten, im Falle des frontalen Kortex für 8 min statt.

### 3.3.5. Dehydrieren und Eindeckeln

Die Dehydrierung der Schnitte erfolgte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96%, 100% für jeweils eine Minute). Die Objektträger verblieben für 5 min in Rotihistol, bevor sie mit Roti<sup>®</sup>Histokitt und Deckgläsern eingedeckt wurden.

Der chronologische Ablauf der immunhistochemischen Methode ist in Tabelle 5 zusammengefasst.

Methodischer Schritt	Reagenz	Temperatur	Dauer
Fixierung	Acton bzw.	-20°C	7 min
	PFA	-4°C	10 min
Waschen*	1x PBS	RT	10 min

Blocken	PBSTN	RT	45 min
pAK**	verdünnt in PBSTN; pH 7,4	-4°C	18 h
3 x Waschen	1x PBS	RT	5 min jeweils
sAK***	verdünnt in PBSN; pH 7,8	RT	60 min
3 x Waschen	1x PBS	RT	5 min jeweils
Enzymmarkierung	ABC (1:50)	RT	60 min
3 x Waschen	1x PBS	RT	5 min jeweils
Färbung****	DAB	RT	4-6 min
Dehydrieren	70% Ethanol	RT	1 min
	96% Ethanol		1 min
	100% Ethanol		1 min
Fixierung	RotiHistol	RT	5 min

**Tabelle 5:** Übersicht über den chronologischen Ablauf der Immunhistochemie.

*Symbole:*

\*bei Fixierung in PFA

\*\* siehe Tabelle 3

\*\*\* siehe Tabelle 4

\*\*\*\* Im Falle des frontalen Kortex erfolgte eine Färbung von 8 min

### 3.3.6. Computerauswertung

Alle Schnitte und Kontrollen wurden mit einem Flachbettscanner (MicrotecArtixScan 2700) bei einer Auflösung von 600 dpi eingelese. Helligkeit, Kontrast sowie schwarz/weiß Gradation wurden für alle Scans konstant gehalten. Die Bildanalyse erfolgte durch das Programm Object-Image 2.10 (Vischer 2002) auf einem Computer der Firma Apple. Eine Markierung der ROIs auf den digitalisierten Schnitten wurde per Hand mit einer Computer-Mouse durchgeführt. Mit der Funktion „Uncalibrated OD“ wurde im Anschluss die optische Dichte der ROIs gemessen. Das ermittelte Ergebnis entspricht demnach einem relativen Wert der optischen Dichte und erlaubt keine Aussagen über die absolute Antigenmenge in den untersuchten Regionen. Es sind lediglich Vergleiche möglich, sofern die Schnitte nach gleichem Protokoll mit identischem Antikörper gefärbt wurden.

Das endgültige Ergebnis wurde durch Subtraktion der Grauwerte der Kontrollen von denen der spezifisch gefärbten Schnitte ermittelt.

### 3.3.7. Statistische Auswertung

Für die untersuchten Genotypen wurden jeweils Mittelwert und Standardabweichungen der gemessenen Grauwerte in den verschiedenen Hirnregionen berechnet. Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse und Ermittlung möglicher Signifikanzen wurde eine Varianzanalyse (one-way ANOVA) durchgeführt. Aufgrund der Annahme, dass der Effekt des COMT Genotyps in den unterschiedlichen Hirnregionen konstant ist, wurde nicht für multiple Vergleiche korrigiert. Zur Vermeidung eines Fehlers erster Art kam als post-hoc Verfahren der Bonferroni-Test zum Einsatz.

Um zusätzlich den Einfluss methodischer Variablen auf die Ergebnisse zu untersuchen, wurde für jede Hirnregion und Versuchsreihe jeweils der Spearman Rangkorrelationskoeffizient für eine mögliche Korrelation mit dem Alter zum Todeszeitpunkt, dem *post mortem* Intervall, der Lagerzeit, dem Gewebe pH und dem Geschlecht ermittelt. Zudem wurde eine schrittweise multiple Regression zur Analyse dieser Kovariablen berechnet.

Alle Auswertungen erfolgten mit der Statistik-Software SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago IL) für Windows XP auf einem Computer der Firma Fujitsu Siemens.

### 3.4. *In situ* Hybridisierung

Grundsätzlich gibt es drei Möglichkeiten mRNA nachzuweisen: den Northern-Blot, die Reverse-Transkriptase PCR und die *in situ* Hybridisierung (ISH). Trotz Einbußen in Sensitivität und Spezifität, war in vorliegender Arbeit die *in situ* Hybridisierung Methode der Wahl, da sie eine anatomisch-histologische Lokalisation nachgewiesener mRNA ermöglicht.

Grundprinzip der Methode ist die Paarung komplementärer Basen zweier Nukleinsäure Einzelstränge. Eine hergestellte Oligonukleotid-Sonde bildet mit der im Präparat nachzuweisenden mRNA ein Hybrid.

Der Versuchsablauf beinhaltet mehrere Schritte. Nach Markierung der Sonde und Fixation des Gewebes erfolgt die Hybridisierung der komplementären Einzelstränge in einem geeigneten Puffer. Anschließend werden unspezifisch gebundene Sonden in einem Waschschrift entfernt. Zuletzt erfolgt die Detektion der markierten Oligonukleotide.

Eine Markierung der Sonden kann durch farbgebende Enzyme, fluoreszierende oder radioaktive Signale erfolgen. Vorteil der radioaktiven Detektion gegenüber den anderen genannten Methoden ist ihre höhere Sensitivität. Versuchsablauf und -bedingungen wurden im Vorfeld dieser Untersuchungen durch Vorexperimente optimiert (Berthele et al. 2003, Jochim 2006, Platzer 2005). Insbesondere Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie das Verhältnis von Signal zu Hintergrund wurden ermittelt. Beste Resultate wurden durch Zusatz

von DTT (10mM) zum Hybridisierungsansatz, bei einer Hybridisierungstemperatur von 42°C und einer Hybridisierungszeit von 48 Stunden, erzielt.

Eine 50%ige Formamidlösung, der ein langkettiges Dextran (10%) zugegeben wird, bildet im Wesentlichen den Hybridisierungspuffer. SSC und Natriumphosphatpuffer (gesamt  $[Na^+] = 0,69 M$ ) bestimmen Salzgehalt und damit die Pufferkapazität.

Die Entfernung unspezifisch bzw. unvollständig hybridisierter Oligonukleotide erfolgt in Waschlösungen aus SSC. Die erste Waschung wird bei einer Temperatur knapp über jener der Hybridisierung durchgeführt. Daran schließen sich Waschungen bei Raumtemperatur und absteigender Ionenstärke an (sog. stringentes Waschen).

Zur Bestimmung des Ausmaßes unspezifischer Bindungen werden im gleichen Versuchsablauf Negativkontrollen angefertigt. Zur Anfertigung dieser gibt es grundsätzlich zwei Verfahren. Zum einen gibt es die Möglichkeit die Kontroll-Schnitte mit RNase vorzubehandeln, was jedoch immer die Gefahr einer Kreuzkontamination und damit eines RNA Verdaus in den zu untersuchenden Geweben birgt. Zum anderen können dem eigentlichen Hybridisierungsansatz unmarkierte Sonden in mehrfachem Überschuss zugeben werden. Diese Sonden verdrängen kompetitiv die markierten Nukleotide und sind dadurch ein Indikator für die Stärke des unspezifischen Hintergrundsignals. Die zweite Variante war in vorliegender Arbeit Methode der Wahl. Dabei wurden unmarkierte Oligonukleotide in 100fachem Überschuss zugegeben.

Die Auswahl der Sonden erfolgt nach mehreren Kriterien. Die Primer müssen zu 100% komplementär zur nachzuweisenden Sequenz sein und dürfen keine Kreuzaffinität zu anderen Nukleinsäuresequenzen aufweisen. Zudem muss eine hohe Anzahl an Guanin und Cytosin Basen enthalten sein, damit ein energetisch stabiler Hybridisierungsvorgang gewährleistet wird. Diese Kriterien sowie die Informationen der Internet-Datenbank NIH Blast waren Grundlage der Primerauswahl.

### **3.4.1. Radioaktive Markierung der Oligonukleotide**

Die verwendeten Oligonukleotid-Proben wurden mittels Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und  $[^{33}P]dATP\alpha P$  (spezifische Aktivität ca. 1000 Ci/mmol) am 3'-Ende radioaktiv markiert. Die Anwesenheit von  $Co^{2+}$  Ionen und die Verwendung eines arsenhaltigen Reaktionspuffers führt dazu, dass die TdT nahezu ausschließlich am 3'-Ende der Oligonukleotide eine Kette aus  $[^{33}P]dATP\alpha P$  bilden kann.

Folgender Abschnitt gibt den detaillierten Ablauf der Markierungsreaktion wieder:

- 1) 8,0 µl TdT-Puffer (5x),  
2,4 µl CoCl<sub>2</sub> (25 mM),  
22,6 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>,  
2,0 µl des jeweiligen Oligonukleotids (0,36pmol/µl)  
3,0 µl [<sup>33</sup>P]dATPαP  
werden angesetzt und kurz gemischt.
  - 2) 2,0 µl TdT (50 U) werden zugegeben und nur durch leichtes Umrühren vermischt. Es dürfen keine Luftbläschen im Ansatz verbleiben, da diese die Reaktion der TdT hemmen.
  - 3) Inkubation für 30 min bei 38°C unter leichter Bewegung.
  - 4) Die Reaktion wird durch Zugabe von 60,0 µl TNES-Puffer gestoppt und kurz auf Eis gekühlt.
  - 5) Während der Inkubation wird aus Chromatographie-Säulen der Lagerungspuffer durch Zentrifugation mit 1000g für 2 min bei 4°C entfernt.
  - 6) Der Markierungsansatz (100 µl) wird vollständig auf die Säule gegeben und nach einer etwa 2minütigen Einwirkzeit mit 1000g für 4 min bei 4°C zentrifugiert. Das Polyacrylamid-Gel dieser Säulen ist so beschaffen, dass Nukleotide einer Länge von weniger als 5 Basen zurückgehalten, die markierten längeren Oligonukleotide dagegen eluiert werden.
- 2,0 µl der aufgereinigten markierten Oligonukleotide werden in 3,0 ml eines Szintillations-Cocktails in einem β-Counter (Fa. Wallace NEN) gemessen. Bei den hier markierten Sonden konnten spezifische Aktivitäten von 0,68-1,22 x 10<sup>6</sup> cpm/µl gemessen werden.

### 3.4.2. Fixierung der Gewebeschnitte

Die für die ISH vorbereiteten Kryostatschnitte wurden aus der Tiefkühltruhe (-80°C) entnommen, bei Raumtemperatur aufgetaut und für 30 min getrocknet. Anschließend wurden die Schnitte in Paraformaldehyd fixiert und in Alkohol dehydriert:

- 1) Fixierung in 4% Paraformaldehyd-Lösung bei 4°C für 5 min.
- 2) Waschen der Schnitte in 1x PBS bei Raumtemperatur für 1 min.
- 3) Dehydrieren der Schnitte in 70% und darauf folgend 96% Ethanol bei Raumtemperatur für jeweils 5 min.
- 4) Lagerung der Schnitte bei 4°C und in 96% Ethanol bis zur Hybridisierung.

### 3.4.3. Ablauf der *in situ* Hybridisierung

Die Oligonukleotid-Sonden wurden mit dem Hybridisierungspuffer im Verhältnis 1:100 verdünnt. Anschließend wurde DTT Lösung (Endkonzentration: 10 mM) beigegeben und der Ansatz intensiv gemischt. Der Hybridisierungsansatz der Kontrollschnitte enthielt zudem das unmarkierte Oligonukleotid (0,72pmol/100µl Ansatz).

- 1) Der Hybridisierungsansatz wurde in einer Menge von 9 µl/cm<sup>2</sup> auf die Objektträger pipettiert und durch Auflage eines passenden Parafilmstreifens auf den Schnitten verteilt. Die Filmstreifen verblieben während des gesamten Hybridisierungsvorgangs als Abdeckung.
- 2) Die vorbereiteten Objektträger wurden zur Hybridisierung in Petrischalen gelegt. Das Austrocknen der Schnitte wurde durch feuchte Papierknäuel, die zuvor in einer Lösung aus 50% Formamid und 4xSSC getränkt wurden, verhindert.
- 3) Hybridisierung für 48 Stunden bei 42°C in einem Umluftofen.
- 4) Abziehen der Parafilmstreifen und Waschen der Schnitte:
  - i) in 1xSSC für 30 min bei 56°C (konstant temperiert im Wasserbad).
  - ii) in 1xSSC für 3 min bei Raumtemperatur.
  - iii) in 0,1xSSC für 3 min bei Raumtemperatur.
- 5) Dehydrieren der Schnitte:
  - i) in 70% Ethanol für 3 min bei Raumtemperatur.
  - ii) in 96% Ethanol für 3 min bei Raumtemperatur.
- 6) Trocknen der Schnitte für etwa 30 min bei Raumtemperatur.

#### **3.4.4. Filmautoradiographie**

Die hybridisierten und getrockneten Gewebsschnitte wurden mit Klebeband auf zugeschnittenen Pappbögen fixiert und in Röntgenfilmkassetten gegen Biomax MR<sup>®</sup>-Film exponiert.

Die Filme wurden nach 28 Tagen bei Raumtemperatur für 3 min in Entwicklerlösung GBX gegeben, ca. 30 Sekunden in ein Stoppbad getaucht, für 3 min in Fixiererlösung GBX fixiert und in entsalztem Wasser für 5 min gewässert. Im Anschluss daran wurden sie zum Trocknen aufgehängt.

#### **3.4.5. Computerauswertungen und Statistik der Autoradiographie**

Zur makroskopischen Beurteilung wurden die Autoradiographien unter konstanten Bedingungen (wie unter 3.3.6. beschrieben) eingescannt. Die statistische Auswertung erfolgte ebenfalls analog zu den immunhistochemischen Auswertungen (siehe 3.3.7.).

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Immunhistochemie

#### 4.1.1. $\mu$ -Opioidrezeptor

Der MOP Nachweis zeigte beim heterozygoten Genotyp in allen Regionen eine höhere Immunoreaktivität als bei COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten.

Signifikante Unterschiede ließen sich im Ncl. mediodorsalis des Thalamus nachweisen.

##### 4.1.1.1. Cerebraler Kortex

Der frontale Kortex zeigte im Vergleich eine höhere  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression als das Striatum und der Thalamus. Hierbei muss bedacht werden, dass längere Färbezeiten möglicherweise für diese Unterschiede im Expressionsniveau verantwortlich sein können. Das stärkste Signal wurde bei COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygoten gemessen. COMT<sup>Met/Met</sup> und COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygote zeigten niedrigere Werte, wobei der Wert der homozygoten Val-Gruppe geringfügig höher war. Signifikante Unterschiede waren nicht eruierbar.

##### 4.1.1.2. Basalganglien

Auch in den Basalganglien waren im Falle des  $\mu$ -Opioidrezeptors keine Signifikanzen detektierbar. Ein Trend ließ sich jedoch ablesen. In allen drei Regionen war die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten und der Heterozygoten höher als der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten. Im Ncl. caudatus und Putamen zeigte die COMT<sup>Met/Met</sup> Gruppe den höchsten Wert, während im Ncl. accumbens die COMT<sup>Val/Met</sup> Gruppe den Spitzenwert darstellte.

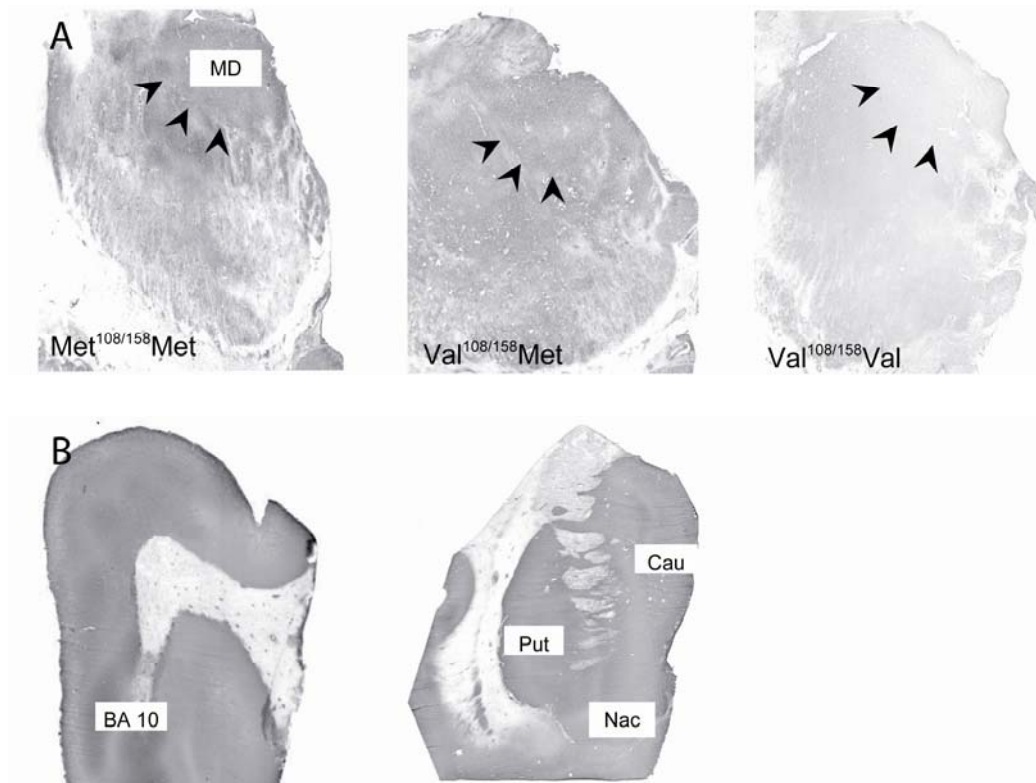
##### 4.1.1.3. Thalamus

Bereits die [<sup>11</sup>C]Carfentanil Liganden-PET sowie das <sup>3</sup>H-DAMGO-Liganden-Binding konnten eine COMT abhängige  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression im Thalamus zeigen.

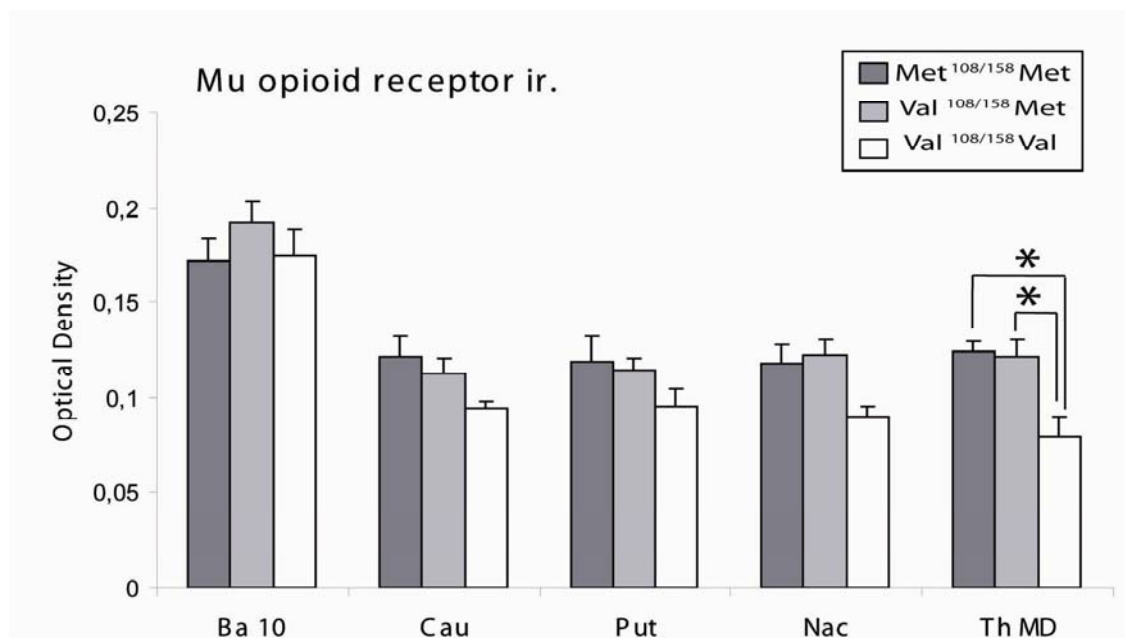
Auch die immunhistochemischen Experimente vorliegender Arbeit bestätigen diese Beobachtungen:

Im Ncl. mediodorsalis zeigten sowohl die COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten (p=0.017 im Posthoc-Test) als auch die COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygoten (p=0.020 im Posthoc-Test) eine gegenüber der COMT<sup>Val/Val</sup> Gruppe signifikant erhöhte  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression (Tabelle 6).

Die Bestätigung des COMT Einflusses in der Regressionsanalyse blieb jedoch aus.



**Abbildung 11:** MOP Immunhistochemie **A:** Expression im Ncl. mediodorsalis des Thalamus in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus. **B:** Repräsentative immunhistochemische Schnitte im frontalen Kortex (BA 10) und Striatum.



**Abbildung 12:** Semiquantitative Bestimmung der  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus durch Densitometrie der immunhistochemisch gefärbten Schnitte des frontalen Kortex (Ba 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (Th MD).



Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM. Sterne markieren signifikante Unterschiede (\* $p \leq 0.05$  im Bonferroni-Test).

<i>MOP IHC</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni)		
	Region	F	df	P	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
<b>BA 10</b>	1.023	2,16	0.385	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
<b>Cau</b>	1.275	2,16	0.310	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
<b>Put</b>	0.982	2,16	0.399	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
<b>Nac</b>	2.349	2,16	0.132	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
<b>Th MD</b>	6.338	2,15	<b>0.012</b>	$P > 0,1$	<b>0.017</b>	<b>0.020</b>

**Tabelle 6:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zur  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression.  
 Abkürzungen: ANOVA: analysis of variance; M/M: COMT<sup>Met/Met</sup>; V/M: COMT<sup>Val/Met</sup>; V/V: COMT<sup>Val/Val</sup>.

<i>MOP IHC</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
	Region	Model		Variable	Beta	P
		<i>F</i>	<i>df</i>			
<b>BA 10<sup>a</sup></b>						
<b>Cau<sup>a</sup></b>						
<b>Put<sup>a</sup></b>						
<b>Nac<sup>a</sup></b>						
<b>Th MD<sup>a</sup></b>						

**Tabelle 7:** Regressionsanalyse der  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression. Die Variablen COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp (COMT), Alter zum Todeszeitpunkt (age), post-mortem Intervall (pmI), Lagerzeit (stoT), Gewebe-pH (pH) und Geschlecht (sex) werden bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression getestet. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0.05$ ) werden die Variablen in der Regressionstabelle aufgeführt.

<sup>a</sup>Keine der Variablen zeigte einen Wert  $p < 0.05$ .

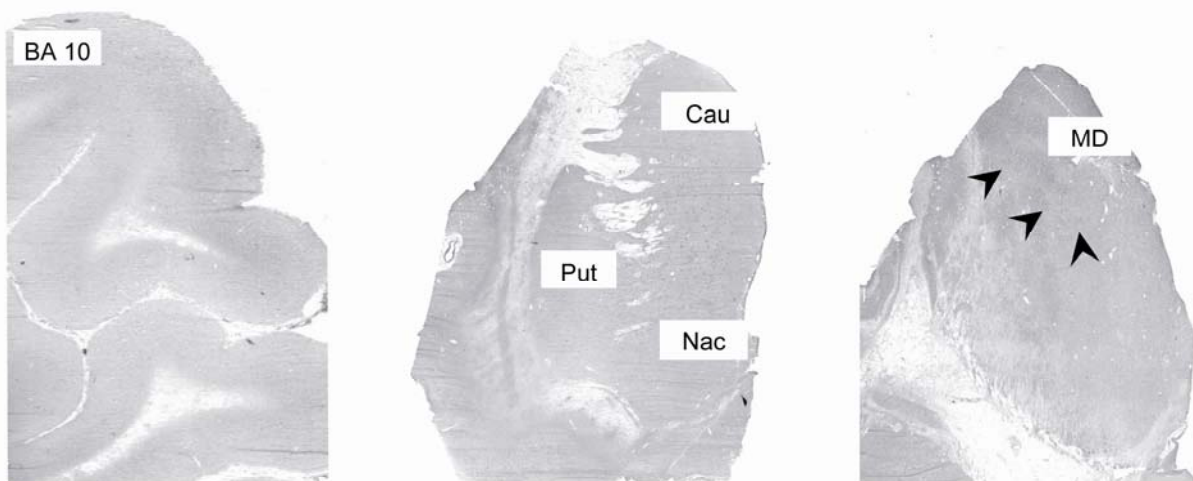
#### 4.1.2. Enkephalin

In den durchgeführten Experimenten ließen sich keine Signifikanzen bezüglich einer COMT abhängigen Regulation nachweisen.

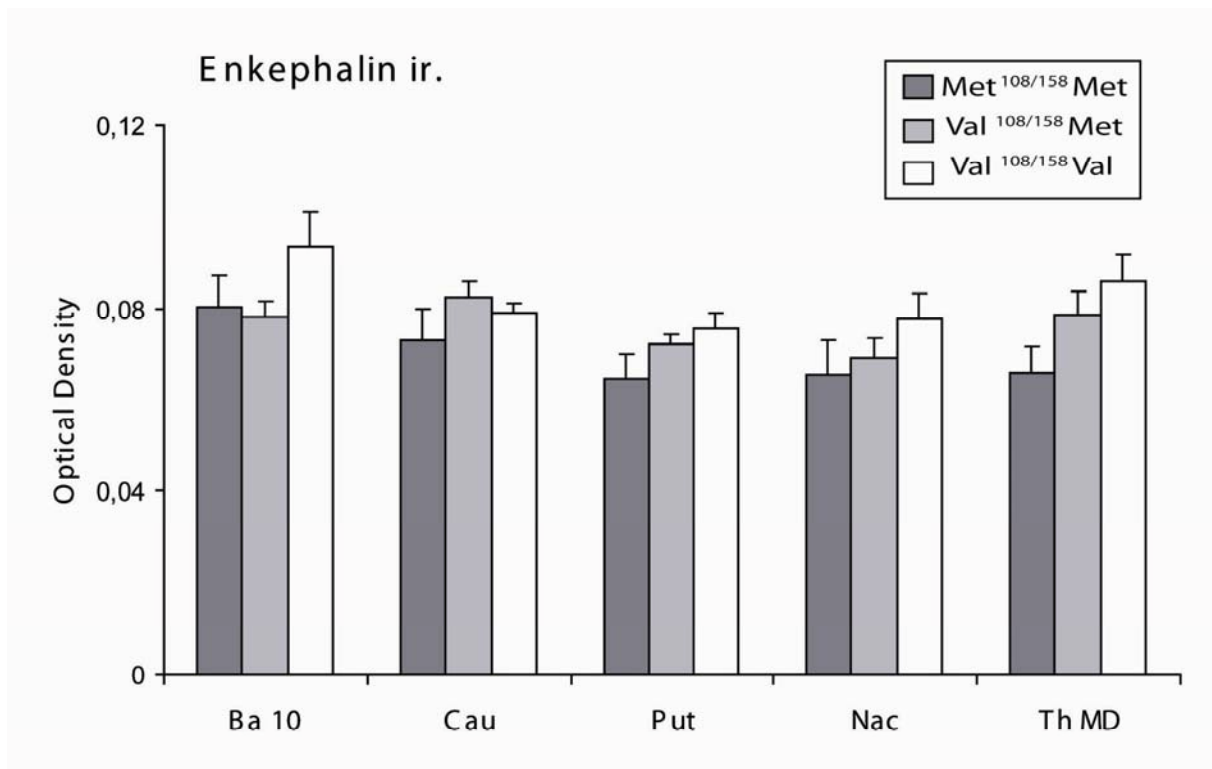
Die Enkephalin Expression der verschiedenen Hirnregionen lag auf einem ähnlichen Niveau. Anders als es die Ergebnisse vorausgegangener PPE mRNA Experimente erwarten ließen (Berthele et al. 2005, Jochim 2006), konnte in vorliegender Arbeit jedoch bei allen drei Genotypen eine Enkephalin Expression im Thalamus nachgewiesen werden.

In allen Regionen übertraf die Enkephalin Expression des COMT<sup>Val/Val</sup> Genotyps die Expression der beiden anderen Genotyp-Varianten. Lediglich im Ncl. caudatus war die Expression der heterozygoten Form geringfügig höher als die des COMT<sup>Val/Val</sup> Kollektivs. Im Thalamus und den Regionen des Striatum zeigte die Gruppe der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten jeweils die geringste Expression.

Die Regressionsanalyse (siehe Tabelle 9) legte im Ncl. caudatus, Ncl. accumbens sowie im Thalamus einen Einfluss des Gewebe-pHs auf die Ergebnisse nahe. Im Ncl. Accumbens waren zudem das post-mortem Intervall sowie das Alter zum Todeszeitpunkt und im Thalamus post-mortem Intervall und Geschlecht von Bedeutung für die Ergebnisse.



**Abbildung 13:** Immunhistochemie des Enkephalin. Repräsentative Schnitte im frontalen Kortex (BA 10), Striatum mit Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put) und Ncl. accumbens (Nac) sowie dem Ncl. mediodorsalis des Thalamus (MD).



**Abbildung 14:** Semiquantitative Bestimmung der Enkephalin Expression in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus durch Densitometrie der immunhistochemisch gefärbten Schnitte des frontalen Kortex (Ba 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (Th MD). Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

<i>Enk IHC</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni)		
	Region	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
<b>BA 10</b>	1,458	2,16	0,266	$p > 0,1$	$p > 0,1$	$p > 0,1$
<b>Cau</b>	1,037	2,16	0,380	$p > 0,1$	$p > 0,1$	$p > 0,1$
<b>Put</b>	1,832	2,16	0,196	$p > 0,1$	$p > 0,1$	$p > 0,1$
<b>Nac</b>	0,743	2,16	0,494	$p > 0,1$	$p > 0,1$	$p > 0,1$
<b>Th MD</b>	2,650	2,15	0,108	$p > 0,1$	$p > 0,1$	$p > 0,1$

**Tabelle 8:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zur Enkephalin Expression.

*Abkürzungen:* ANOVA: analysis of variance; M/M: COMT<sup>Met/Met</sup>; V/M: COMT<sup>Val/Met</sup>; V/V: COMT<sup>Val/Val</sup>.

<i>Enk IHC</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
Region	Model			Variable	Beta	P
	F	df	P			
<b>BA 10<sup>a</sup></b>						
<b>Cau</b>	6.534	1.16	0.022	pH	- 0.551	0.022
<b>Put<sup>a</sup></b>						
<b>Nac</b>	6.359	3.16	0.007	pH	- 0.971	0.004
				pmI	- 0.499	0.015
				age	- 0.603	0.050
<b>Th MD</b>	39.981	3.15	0.000	pH	- 0.604	0.000
				sex	0.459	0.001
				pmI	0.196	0.044

**Tabelle 9:** Regressionsanalyse der Enkephalin Expression. Die Variablen COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp (COMT), Alter zum Todeszeitpunkt (age), post-mortem Intervall (pmI), Lagerzeit (stoT), Gewebe-pH (pH) und Geschlecht (sex) werden bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die Enkephalin Expression getestet. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0.05$ ) werden die Variablen in der Regressionstabelle aufgeführt.

<sup>a</sup>Keine der Variablen zeigte einen Wert  $p < 0.05$ .

### 4.1.3. Dynorphin

In Kortex, Striatum und Thalamus wurde jeweils die Expression von Dynorphin A und B untersucht.

Die Werte des Dynorphin B lagen dabei in wesentlich niedrigeren Bereichen als die Werte des Dynorphin A. Die Verhältnisse der Regionen zueinander waren jedoch bei beiden Liganden ähnlich.

#### 4.1.3.1. Dynorphin A

##### 4.1.3.1.1. Cerebraler Kortex

Die Expression des Dynorphin im cerebralen Kortex übertraf die der anderen Regionen deutlich. Auch dieses Ergebnis könnte die Konsequenz längerer Färbezeiten sein. Bezüglich der COMT abhängigen Expression war es die Gruppe der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten, die gegenüber den anderen Genotypen einen deutlich höheren Mittelwert zeigte. Der Unterschied zwischen COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten und COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygoten lag in der Posthoc-Analyse nur knapp oberhalb des Signifikanzniveaus ( $p = 0.52$ ; siehe Tabelle 10 oben). In der Regressionsanalyse wurde der COMT Genotyp als einziger signifikanter Prädiktor ermittelt (siehe Tabelle 11 oben).

#### 4.1.3.1.2. Basalganglien

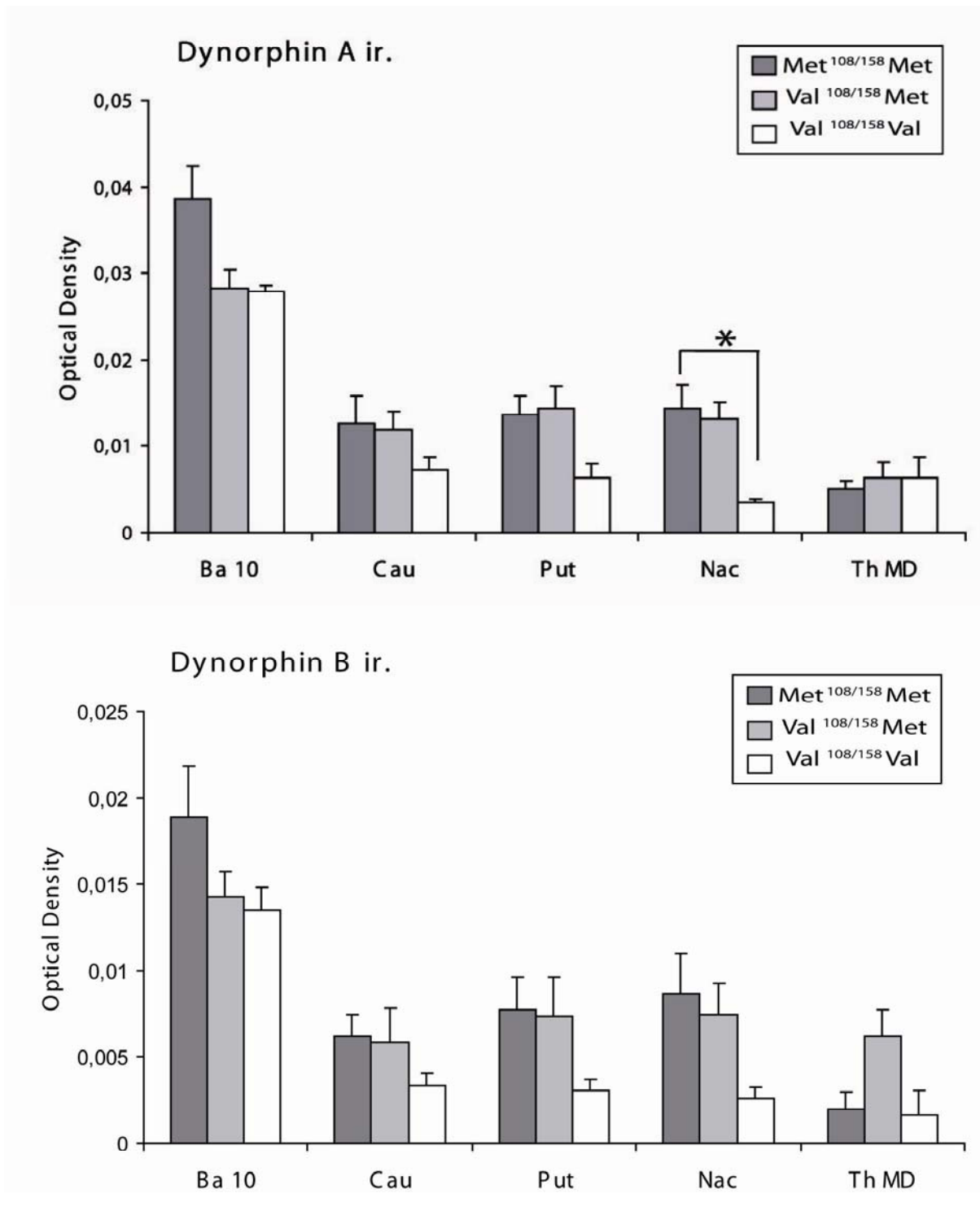
Die Werte des Ncl. caudatus, des Putamen und des Ncl. accumbens zeigten untereinander ein ähnliches Expressionsniveau. In allen drei Regionen waren die Mittelwerte der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten höher als die der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten. Ein signifikanter Unterschied wurde hierbei im Ncl. accumbens detektiert. Die Regressionsanalyse ermittelte COMT als einzige signifikante Variable in dieser Region (siehe Tabelle 11 oben).

#### 4.1.3.1.3. Thalamus

Keine signifikanten Ergebnisse ließen sich im Thalamus nachweisen. Die Werte der drei Genotypen lagen eng beieinander. Der Mittelwert der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten war gegenüber den anderen leicht erniedrigt.

#### 4.1.3.2. Dynorphin B

Die Ergebnisse blieben ohne Signifikanzen und verhielten sich analog zur Dynorphin A Expression. Lediglich im Thalamus zeigte die COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygotengruppe eine auffällig höhere Expression als die Vergleichsgruppen.



**Abbildung 15:** Semiquantitative Bestimmung der Dynorphin A und B Expression in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus durch Densitometrie der immunhistochemisch gefärbten Schnitte des frontalen Kortex (Ba 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (Th MD). Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM. Sterne markieren signifikante Unterschiede (\* $p \leq 0.05$  im Bonferroni-Test).

Oben: Dynorphin A; Unten: Dynorphin B.

<i>DynA IHC</i>		ANOVA		Posthoc-Test (Bonferroni)		
Region	F	df	p	M/M vs. V/M	<b>p</b> M/M vs. V/V	V/M vs. V/V
<b>BA 10</b>	4.193	2,16	<b>0.037</b>	<b>0.52</b>	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
<b>Cau</b>	0.786	2,16	0.475	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
<b>Put</b>	2.190	2,16	0.149	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
<b>Nac</b>	4.290	2,16	<b>0.035</b>	<i>p</i> >0.1	<b>0.043</b>	0.066
<b>Th MD</b>	0.211	2,15	0.813	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1

<i>DynB IHC</i>			ANOVA		Posthoc-Test (Bonferroni)		
Region	F	df	Region	M/M vs. V/M	<b>p</b> M/M vs. V/V	V/M vs. V/V	
<b>BA 10</b>	1.661	2,16	0.225	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	
<b>Cau</b>	0.476	2,16	0.631	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	
<b>Put</b>	0.946	2,16	0.412	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	
<b>Nac</b>	1.503	2,16	0.256	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	
<b>Th MD</b>	3.239	2,15	0.072	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	

**Tabelle 10:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zur Dynorphin A und B Expression.

*Abkürzungen:* ANOVA: analysis of variance; M/M: COMT<sup>Met/Met</sup>; V/M: COMT<sup>Val/Met</sup>; V/V: COMT<sup>Val/Val</sup>.

Oben: Dynorphin A; Unten: Dynorphin B.

<i>DynA</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
Region	Model			Variable	Beta	P
	F	df	P			
<b>BA 10</b>	6.035	1.16	0.027	COMT	0.536	0.027
<b>Cau</b>	6.660	1.16	0.021	stoT	0.555	0.021
<b>Put<sup>a</sup></b>						
<b>Nac</b>	5.798	1.16	0.029	COMT	0.528	0.029
<b>Th MD<sup>a</sup></b>						

<i>DYNB</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
Region	Model			Variable	Beta	P
	F	df	P			
<b>BA 10<sup>a</sup></b>						
<b>Cau<sup>a</sup></b>						
<b>Put<sup>a</sup></b>						
<b>Nac<sup>a</sup></b>						
<b>Th MD</b>	7.986	2.15	0.005	stoT	1.014	0.002
				pH	0.594	0.037

**Tabelle 11:** Regressionsanalyse der Dynorphin A und B Expression. Die Variablen COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp (COMT), Alter zum Todeszeitpunkt (age), post-mortem Intervall (pmI), Lagerzeit (stoT), Gewebe-pH (pH) und Geschlecht (sex) werden bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression getestet. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0.05$ ) werden die Variablen in der Regressionstabelle aufgeführt.

Oben: Dynorphin A; Unten: Dynorphin B.

<sup>a</sup>Keine der Variablen zeigte einen Wert  $p < 0.05$ .

#### 4.1.4. COMT

Die optischen Dichtewerte der COMT lagen in allen untersuchten Regionen auf einem vergleichbaren Niveau.

##### 4.1.4.1. Cerebraler Kortex

Im cerebralen Kortex waren die höchsten Werte der optischen Dichte bei der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygotengruppe nachweisbar. Die Werte der Heterozygoten waren geringfügig höher als die Werte der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten. Die Auswertung mittels one-way ANOVA erbrachte für diese Region jedoch keine signifikanten Unterschiede.



#### 4.1.4.2. Basalganglien

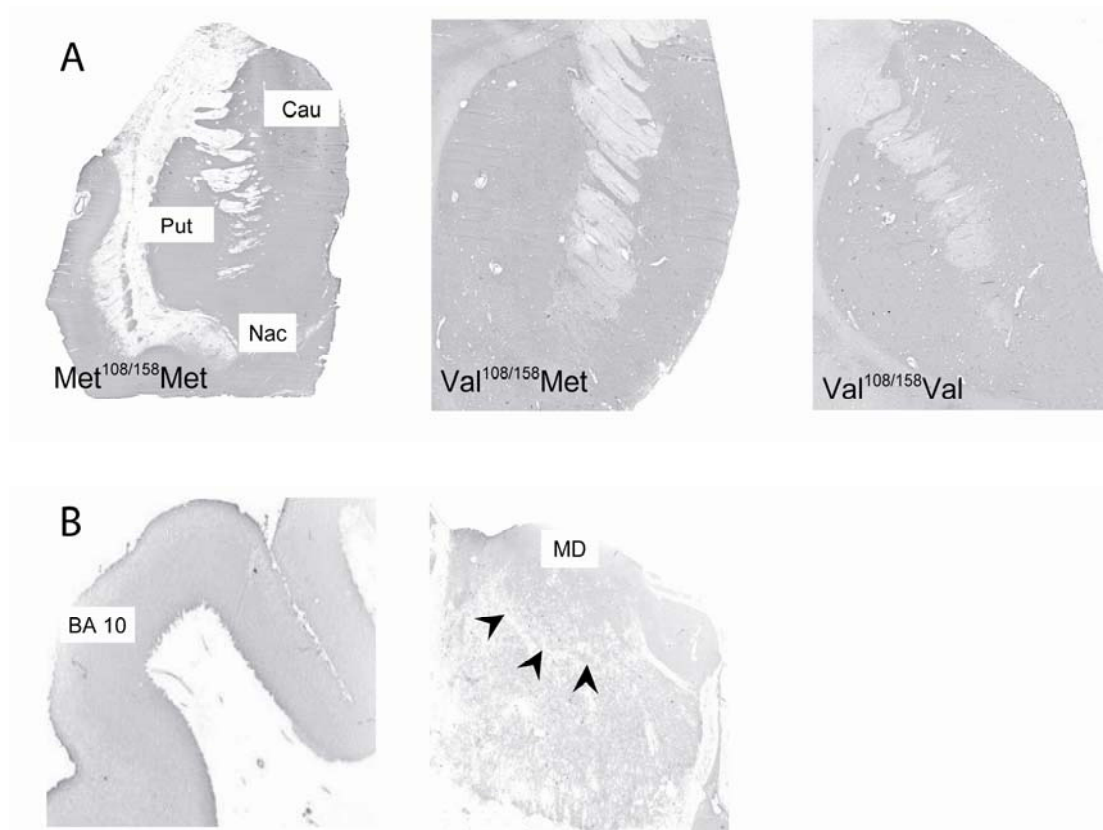
Die Regionen der Basalganglien zeigten untereinander ein ähnliches Expressionsmuster. Sowohl im Ncl. caudatus, als auch im Putamen und Ncl. Accumbens war die optische Dichte der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten signifikant gegenüber der COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygotengruppe erhöht. Hochsignifikant war dieser Unterschied im Ncl. caudatus ( $p=0,010$  im Posthoc-Test). Auch der Vergleich der beiden Homozygotenkollektive erbrachte in der Auswertung signifikante Ergebnisse. Dies war jedoch nur im Ncl. caudatus und Putamen der Fall. Jedoch auch im Ncl. accumbens lag der p-Wert der Posthoc-Analyse unter 0,1 (vgl. Tabelle 12).

Die COMT<sup>Val/Met</sup> und COMT<sup>Val/Val</sup> Kollektive zeigten annähernd gleiche Resultate, wobei der Mittelwert der COMT<sup>Val/Met</sup> Gruppe jeweils leicht über dem der COMT<sup>Val/Val</sup> Gruppe lag.

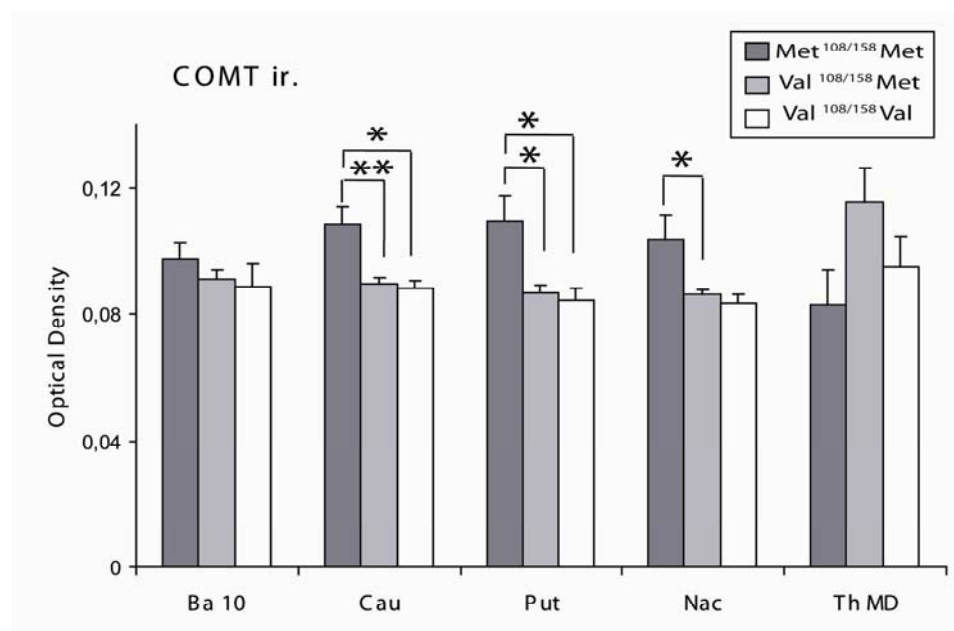
Die Regressionsanalyse detektierte den COMT Genotyp in allen drei Regionen als prädiktive Kovariable. Im Ncl. caudatus hatte zudem das post-mortem Intervall, im Putamen das post-mortem Intervall und das Alter zum Todeszeitpunkt einen Einfluss auf die Ergebnisse (siehe Tabelle 13).

#### 4.1.4.3. Thalamus

Anders als im Kortex und den Basalganglien war es im Thalamus der COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp, der die höchste Expression zeigte. Der Mittelwert war, wenn auch nicht signifikant, gegenüber dem Wert der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten erhöht. Der geringste Wert wurde bei COMT<sup>Met/Met</sup> Heterozygoten gemessen.



**Abbildung 16:** COMT Immunhistochemie **A:** Expression im Striatum in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus. **B:** Repräsentative immunhistochemische Schnitte im frontalen Kortex (BA 10) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (MD).



**Abbildung 17:** Semiquantitative Bestimmung der COMT Expression in Abhängigkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus durch Densitometrie der immunhistochemisch gefärbten Schnitte des frontalen Kortex (Ba 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (Th MD). Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM. Sterne markieren signifikante Unterschiede (\* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$  im Bonferroni-Test).

<i>COMT IHC</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni)		
	Region	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
<b>BA 10</b>	0.950	2,16	0.410	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
<b>Cau</b>	7.360	2,16	<b>0.007</b>	<b>0.010</b>	<b>0.035</b>	<i>p</i> >0.1
<b>Put</b>	6.836	2,16	<b>0.008</b>	<b>0.014</b>	<b>0.040</b>	<i>p</i> >0.1
<b>Nac</b>	4.764	2,16	<b>0.026</b>	<b>0.047</b>	0.083	<i>p</i> >0.1
<b>Th MD</b>	2.579	2,15	0.114	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1

**Tabelle 12:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zur COMT Expression.

Abkürzungen: ANOVA: analysis of variance; M/M: COMT<sup>Met/Met</sup>; V/M: COMT<sup>Val/Met</sup>; V/V: COMT<sup>Val/Val</sup>.

<i>COMT IHC</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
	Region	Model		Variable	Beta	P
		<i>F</i>	<i>df</i>			
<b>BA 10<sup>a</sup></b>						
<b>Cau</b>	10.429	2.16	0.002	COMT	0.521	0.010
				pmI	- 0.455	0.021
<b>Put</b>	10.854	3.16	0.001	COMT	0.397	0.028
				pmI	- 0.437	0.014
				age	- 0.398	0.024
<b>Nac</b>	7.724	1.16	0.014	COMT	0.583	0.014
<b>Th MD</b>	11.225	1.15	0.005	stoT	0.667	0.005

**Tabelle 13:** Regressionsanalyse der COMT Expression. Die Variablen COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp (COMT), Alter zum Todeszeitpunkt (age), post-mortem Intervall (pmI), Lagerzeit (stoT), Gewebe-pH (pH) und Geschlecht (sex) werden bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression getestet. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p < 0.05$ ) werden die Variablen in der Regressionstabelle aufgeführt.

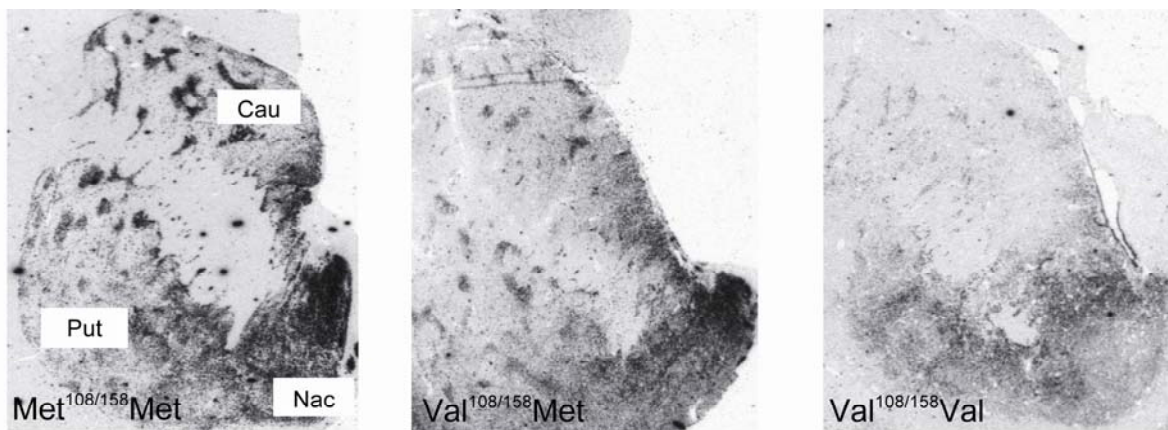
<sup>a</sup>Keine der Variablen zeigte einen Wert  $p < 0.05$ .

#### 4.2. *In situ* Hybridisierung von Präprodynorphin mRNA im Striatum

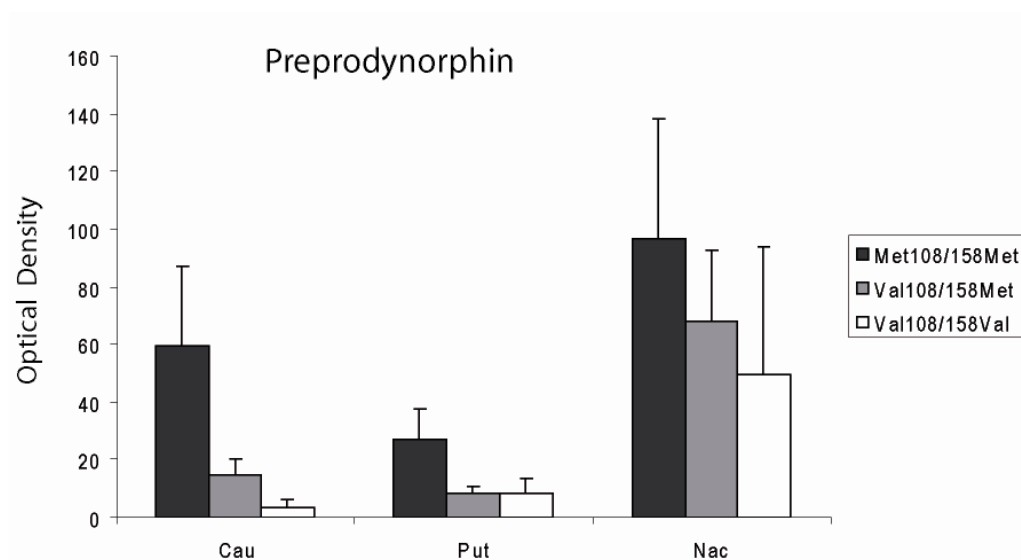
Um weitere Hinweise auf mögliche Regulationswege im Striatum zu erhalten, wurden bereits existierender PPE mRNA Daten (Berthele et al. 2005, Jochim 2006) durch eine Präprodynorphin *in situ* Hybridisierung ergänzt.

Äquivalent zu den immunhistochemischen Daten war die mRNA Expression der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten jeweils höher als die Expression der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten. Eine

Signifikanz blieb aus, was möglicherweise durch hohe Standardabweichungen der Daten erklärbar ist. Auffällig war jedoch, dass im Ncl. caudatus und im Ncl. accumbens der  $\text{COMT}^{\text{Met}/\text{Met}}$  Genotyp jeweils den höchsten, der  $\text{COMT}^{\text{Val}/\text{Met}}$  Genotyp den intermediären und der  $\text{COMT}^{\text{Val}/\text{Val}}$  Genotyp den geringsten Wert ergab. Diese Konstanz sowie die Parallelen zur Immunhistochemie lassen vermuten, dass es sich nicht um eine zufällige Beobachtung handelt. Ein Einfluss der Lagerzeit auf die Ergebnisse muss jedoch berücksichtigt werden (Tabelle 15).



**Abbildung 18:** Autoradiographien der Präprodynorphin mRNA *in situ* Hybridisierung. Darstellung der  $\text{COMT}^{\text{Val}^{108/158}\text{Met}}$  Polymorphismus abhängigen Expression im Striatum.



**Abbildung 19:** Semiquantitative Bestimmung der Präprodynorphin mRNA Expression in Abhängigkeit des  $\text{COMT}^{\text{Val}^{108/158}\text{Met}}$  Polymorphismus durch Densitometrie der Autoradiographien des frontalen Kortex (Ba 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac) und Ncl. mediodorsalis des Thalamus (Th MD). Darstellung der Mittelwerte  $\pm$  SEM.

<i>Preprodynorphin</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni)		
	Region	F	df	p	p	
				M/M vs. V/M	M/M vs. V/V	V/M vs. V/V
<b>Cau</b>	2.631	2.16	0.107	$p>0.1$	$p>0.1$	$p>0.1$
<b>Put</b>	2.373	2.16	0.130	$p>0.1$	$p>0.1$	$p>0.1$
<b>Nac</b>	0.369	2.16	0.698	$p>0.1$	$p>0.1$	$p>0.1$

**Tabelle 14:** Ergebnisse der statistischen Auswertung zur Präprodynorphin mRNA Expression.

Abkürzungen: ANOVA: analysis of variance; M/M: COMT<sup>Met/Met</sup>; V/M: COMT<sup>Val/Met</sup>; V/V: COMT<sup>Val/Val</sup>.

<i>Preprodynorphin</i> ISH	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
	Region	Model		Variable	Beta	P
	F	df	P			
<b>Cau</b>	10.193	1.16	0.006	stoT	-0.907	0.006
<b>Put</b>	12.652	1.16	0.003	stoT	-6.76	0.003
<b>Nac<sup>a</sup></b>						

**Tabelle 15:** Regressionsanalyse der Präprodynorphin mRNA Expression. Die Variablen COMT<sup>Val/Met</sup> Genotyp (COMT), Alter zum Todeszeitpunkt (age), post-mortem Intervall (pmI), Lagerzeit (stoT), Gewebe-pH (pH) und Geschlecht (sex) werden bezüglich ihres möglichen Einflusses auf die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression getestet. Im Falle eines signifikanten Ergebnisses ( $p<0.05$ ) werden die Variablen in der Regressionstabelle aufgeführt.

<sup>a</sup>Keine der Variablen zeigte einen Wert  $p<0.05$ .

## 5. Diskussion

### 5.1. $\mu$ -Opioidrezeptor

#### 5.1.2. $\mu$ -Opioidrezeptor Expression und methodische Einflüsse

Die immunhistochemischen Ergebnisse unterscheiden sich teilweise von den in der Literatur beschriebenen Daten.

Bei den Versuchen der vorliegenden Arbeit übertraf die Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptors im frontalen Kortex die Expression im Ncl. mediodorsalis des Thalamus und im Striatum. Peckys und Landwehrmeyer untersuchten 1999 die Verteilung der  $\mu$ -Opioidrezeptor mRNA im menschlichen ZNS anhand einer *in situ* Hybridisierung. Die Anzahl markierter Neurone war hier im Thalamus und Striatum höher als im präfrontalen Kortex. Auch das  $^3\text{H}$ -DAMGO-Liganden Binding (Berthele et al. 2005) zeigte im Thalamus das intensivste Signal. Bei Betrachtung dieser Ergebnisse ist zu bedenken, dass möglicherweise die längeren Färbezeiten des frontalen Kortex eine höhere Rezeptorexpression imitieren. Zudem handelt es sich bei Peckys und Landwehrmeyer um mRNA Experimente, während in dieser Arbeit Protein Niveaus detektiert werden. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse ist daher nur eingeschränkt möglich.

Interessant wird eine Interpretation vor allem jedoch, wenn berücksichtigt wird, dass sich das Liganden Binding auf die Detektion der  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen fokussiert, während die immunhistochemische Darstellung auch inaktive sowie internalisierte Rezeptoren nachweisen kann. Ungleichheiten können demnach auch Hinweise auf Unterschiede im Rezeptorstatus sein.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand jedoch nicht die Darstellung der absoluten Rezeptorexpression, sondern die Gegenüberstellung der Expressionsmuster der verschiedenen COMT Genotypen anhand der optischen Dichte.

#### 5.1.3. COMT abhängige $\mu$ -Opioidrezeptor Expression

Bezüglich der COMT abhängigen  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression wies die immunhistochemische Darstellung Parallelen zu den vorausgegangenen Experimenten auf.

Binding und PET zeigten jeweils in der Gruppe der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten das stärkste Signal bzw. Bindungspotential. Die Ergebnisse der hier vorgestellten Experimente lassen nun für die COMT<sup>Met/Met</sup> Gruppe auch immunhistochemisch die höchste  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression erkennen.

Zwar konnte die im Binding für den Thalamus nachgewiesene lineare Korrelation zwischen COMT- Met<sup>108/158</sup>-Allel-„Dosis“ und der  $\mu$ -Opioidrezeptordichte immunhistochemisch nicht nachgewiesen werden, jedoch wies auch hier die Gruppe der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten die signifikant höchste Rezeptorexpression auf. Auch im Ncl. caudatus und Putamen wurde das stärkste Signal bei COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten, das schwächste jeweils in der Gruppe der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten gemessen.

Diese Resultate bestätigen immunhistochemisch für den  $\mu$ -Opioidrezeptor eine COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus abhängige Regulation, wie sie bisher bereits mittels PET und Binding für aktive  $\mu$ -Rezeptor Bindungsstellen nachgewiesen wurde. Der Polymorphismus beeinflusst demnach den gesamten Rezeptorstatus, inclusive inaktiver und internalisierter Rezeptoren.

## 5.2. Enkephalin Expression

Die Kolo-kalisation von Enkephalin und D2-Rezeptoren in indirekten, striatalen Projektionsneuronen lässt die Hypothese zu, dass die  $\mu$ -Rezeptorregulation über den endogenen Liganden Enkephalin erfolgt. Zur Klärung dieser Frage wurde in vorliegender Arbeit die Enkephalin Expression untersucht.

Das Expressionssignal von Enkephalin in den verschiedenen Hirnregionen war annähernd gleich stark.

Aus immunhistochemischen Experimenten im ZNS der Ratte ist eine Enkephalin Expression im Ncl. caudatus, Putamen und Accumbens bekannt, mit einer schwachen bis mittleren Enkephalin Expression in neuronalen Fasern (Sar et al. 1978). Im Ncl. caudatus und Putamen konnte Enkephalin zudem in Zellkörpern nachgewiesen werden. Im Ncl. mediodorsalis des Thalamus konnte im Rattenhirn kein Enkephalin nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich im Affenhirn (Haber und Elde 1982).

Passend zu diesen Resultaten war bei der *in situ* Hybridisierung des Präproenkephalin im Thalamus des Menschen keine mRNA nachweisbar, während das Striatum eine deutlich Expression zeigte (Berthele et al. 2005, Jochim 2006).

Interessanterweise zeigen jedoch die vorgelegten immunhistochemischen Daten am menschlichen Hirn, anders als es die *in situ* Hybridisierung vermuten ließ, auch im Thalamus eine Enkephalin Expression.

Die hierzu in der Literatur vorbeschriebenen Daten im Thalamus der Ratte zeigen eine ähnliche Konstellation. Während Harlan et al. keine mRNA in thalamischen Kernen

beschrieben, wurden von Coveñas et al. unter anderem im Ncl. mediodorsalis des Thalamus ein deutliches Signal detektiert.

Dieser „Mismatch“ ist nach vorliegenden Ergebnissen nicht nur in der Ratte, sondern auch in menschlichem post-mortem Hirn nachweisbar.

Bei Betrachtung dieser Diskrepanz ist zu berücksichtigen, dass mRNA und Translationsprodukt nicht zwangsläufig die gleiche Lokalisation aufweisen müssen. Für einen weiteren thalamischen Kern beispielweise, den Ncl. ventralis anterior, sind afferente enkephalinerge Projektionsneurone beschrieben (Fujii et al. 1986). Zudem sind methodische Einflüsse zu bedenken. In Fällen, in denen der immunologische Proteinnachweis ein höheres Signal ergibt als seine äquivalente *in situ* Hybridisierung, muss vor allem eine mögliche Kreuzreaktivität der eingesetzten Antikörper mitbedacht werden (Harlan et al. 1987).

Trotz dieser methodischen Unsicherheiten ist die Parallele zwischen Mensch und Ratte bemerkenswert.

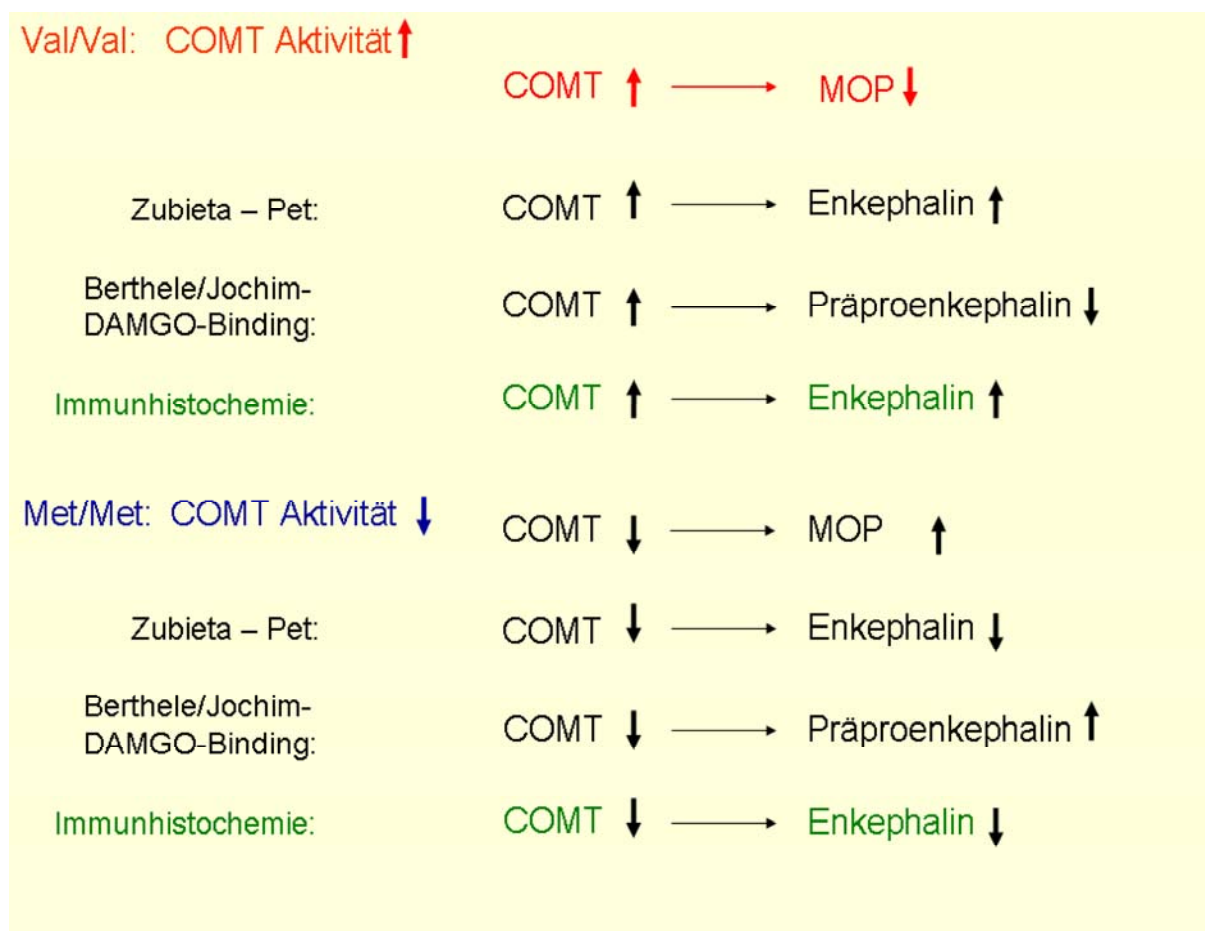
Im Fokus dieser Arbeit lag jedoch vor allem die COMT abhängige Enkephalin Expression.

In allen Regionen war das Enkephalin Signal der COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten größer als das der COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoten. Signifikant verschieden waren diese Unterschiede jedoch nicht.

Interessant ist vor allem ein Vergleich dieser Expression mit den Daten des Präproenkephalin und den Ergebnissen Zubieta. Während Zubieta et al. eine Regulation des  $\mu$ -Opioidrezeptors über Enkephalin vermuteten, stellten die Ergebnisse der *in situ* Hybridisierung der Präproenkephalin mRNA diese These in Frage. Die Untersuchung der Expressionsniveaus des Proteins war deshalb von großem Interesse.

Die erzielten Ergebnisse sind in Abbildung 20 dargestellt. Zusammengefasst zeigen die immunhistochemischen Ergebnisse ein zur mRNA gegensätzliches Muster und stützen die These einer Regulation über den endogenen Liganden. Unklar bleibt jedoch, wie die geringere mRNA COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoter zu einer höheren Protein Expression führen kann.





**Abbildung 20:** Überblick über die Thesen einer COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus abhängigen Regulation des  $\mu$ -Opioidrezeptors. Zusammenfassung der Ergebnisse Zubieta (2003), Bertheles (2005) und des Resultates der vorliegenden Arbeit.

### 5.3. Dynorphin Expression und striatale Regulationswege

Für das Verständnis striataler Regulationswege ist neben der Enkephalin auch die Dynorphin Expression von Bedeutung. Zahlreiche Studien belegten eine gegenläufige Regulation von Enkephalin und Dynorphin über striatale Dopaminrezeptoren (siehe Gliederungspunkt 2.1.).

In der Ratte ist die Expression des Dynorphin A im Kortex, Ncl. caudatus, Putamen und Ncl. accumbens beschrieben (Fallon und Leslie 1986). Auch die Verteilung der Präprodynorphin mRNA wurde im ZNS der Ratte untersucht (Merchenthaler et al. 1997) und zeigt ebenso wie vorliegende Ergebnisse eine höhere mRNA Dichte im Kortex als im Striatum.

Wie bereits beim Enkephalin erwähnt, war jedoch auch im Falle des Dynorphin die Dopamin- bzw. COMT abhängige Verteilung des Liganden von Interesse. Hierbei zeigen, anders als zuvor, mRNA und Protein eine gleichgerichtete Expression. Sowohl Präprodynorphin mRNA als auch Dynorphin A und B Protein waren im Striatum bei COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoten jeweils am stärksten exprimiert. Diese Ergebnisse untermauern damit die These einer

gleichgerichteten Regulation von Dopamin und Dynorphin im Striatum, wie sie in der Literatur bereits beschrieben wurde.

**Val/Val:** COMT ↑ - Dopamin ↓ - Dynorphin ↓

**Met/Met:** COMT ↓ - Dopamin ↑ - Dynorphin ↑

Es stellt sich die Frage inwieweit Dynorphin die Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptors beeinflusst. Bailey et al. postulierten 2007 eine Präprodynorphin medierte Zunahme der  $\mu$ -Opioidrezeptoraktivität. Ähnliche Beobachtungen traten in Experimenten anderer Arbeitsgruppen auf (Narita et al. 2003, Unterwald et al. 1994, Zubieta et al. 1996).

In diesem Falle wäre jedoch eine gegenläufige Beeinflussung des Rezeptorstatus durch den Liganden, wie im Falle des Enkephalin postuliert, nicht plausibel. Diese Tatsache deutet an, dass der Rezeptorstatus durch komplexe Mechanismen beeinflusst wird.

#### 5.4. COMT Aktivität und Expression

Ziel dieser Arbeit war des Weiteren die Darstellung der COMT Verteilung und die Gegenüberstellung von Enzymaktivität und Enzymexpression. Die höhere Thermostabilität des Val-Proteins bringt in seiner homozygoten Ausprägung eine drei- bis vierfach höhere Enzymaktivität mit sich als sein homozygotes Met-Äquivalent (Scanlon et al. 1979, Spielmann und Weinshilboum, 1981, Lotta et al. 1995, Lachman et al. 1996).

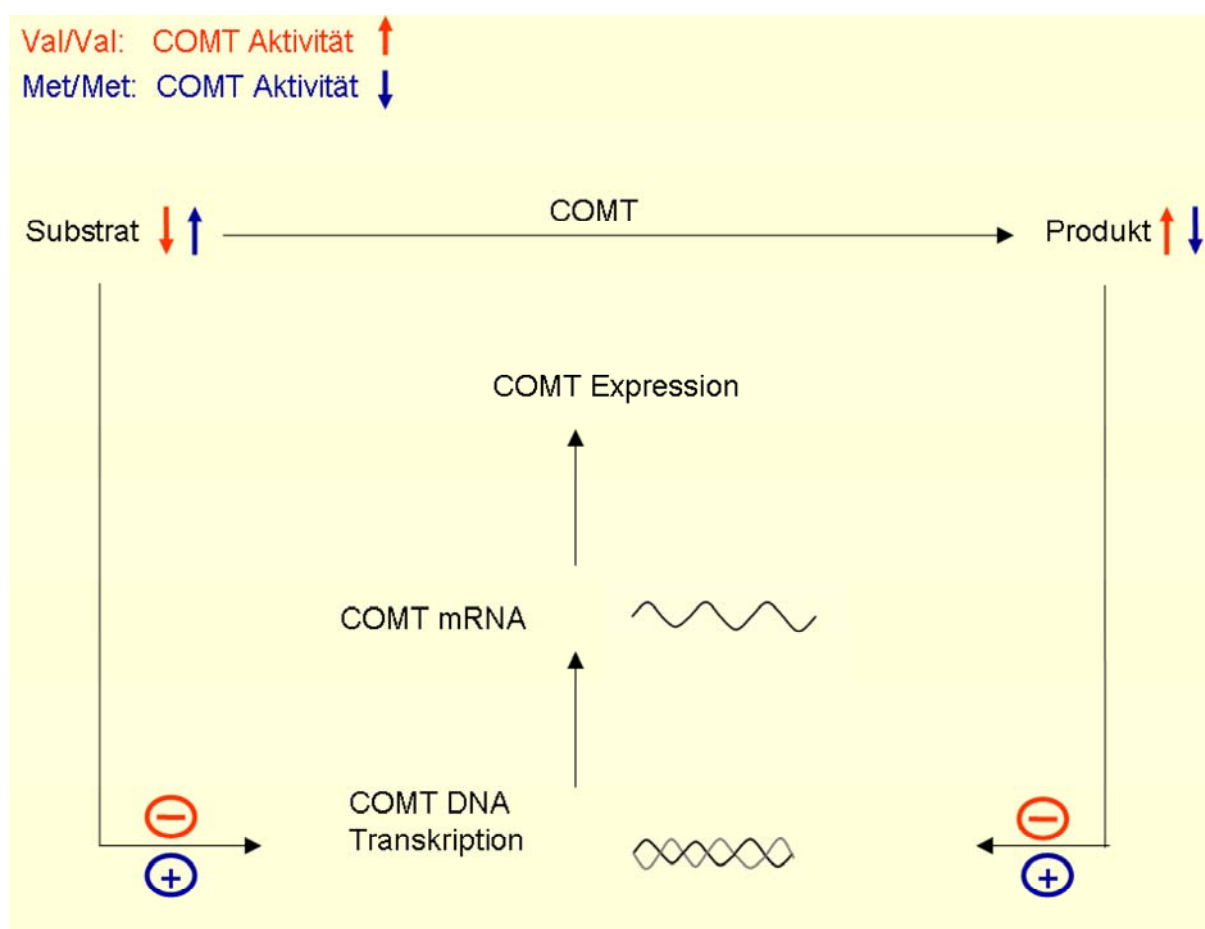
Interessanterweise verhielten sich die Ergebnisse der vorliegenden Experimente zur Enzymexpression konträr zur Enzymaktivität. Im frontalen Kortex und Striatum zeigte sich die höchste COMT Expression in der Gruppe der homozygoten  $\text{COMT}^{\text{Met/Met}}$  Allelträger, eine intermediäre bei heterozygoten  $\text{COMT}^{\text{Val/Met}}$ , und die geringste Expression bei homozygoten  $\text{COMT}^{\text{Val/Val}}$  Individuen. Im Striatum erreichte diese Verschiedenheit Signifikanz.

Demnach geht eine höhere Enzymaktivität  $\text{COMT}^{\text{Val/Val}}$  Homozygoter mit einer vergleichsweise niedrigeren Enzymexpression einher. In der Literatur ist bisher eine gegensätzliche Beobachtung beschrieben. Chen et al. untersuchten 2004 die Immunreaktivität der COMT mittels Western Blot und ermittelten, äquivalent zur Enzymaktivität, die höchste COMT Expression in der homozygoten  $\text{COMT}^{\text{Val/Val}}$  Gruppe.

Bei Betrachtung vorliegender Ergebnisse stellt sich die Frage, wie mit einer höheren COMT Enzymaktivität einhergehende geringere Enzymexpression zu interpretieren ist.

Eine Möglichkeit bestünde in einer langfristigen Enzymregulation. Grundsätzlich sind in der Biochemie kurzfristige Mechanismen der Enzymregulation, wie die kompetitive und nicht

kompetitive Inhibition, und langfristige Vorgänge, wie eine genetische Transkriptionskontrolle, beschrieben. Bekannt wurde in diesem Zusammenhang beispielsweise das Operon-Modell der französischen Nobelpreisträger Jacob und Monod (Jacob et al. 2005). Dieses Modell veranschaulicht am Beispiel des prokaryotischen Glucose- bzw. Laktose Stoffwechsels unter anderem die Regulation der Enzymtranskription durch das Substrat bzw. Produktangebot. Auch für die COMT wäre eine derartige Enzymsteuerung denkbar. Vorstellbar ist eine dauerhafte Down-Regulation der COMT Expression  $\text{COMT}^{\text{Val/Val}}$  Homozygoter durch ein niedrigeres Substrat- und höheres Produktangebot (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21:** Schema einer möglichen Regulation der COMT Expression in den Genotypen des  $\text{COMT Val}^{108/158}\text{Met}$  Polymorphismus.

*Symbole:* + Aktivierung, - Inhibition

Auch im Falle des Morphins ist eine autokrine bzw. parakrine Modulation der eigenen Synthese beschrieben (Mantione et al. 2008, siehe Gliederungspunkt 1.1.2.2).

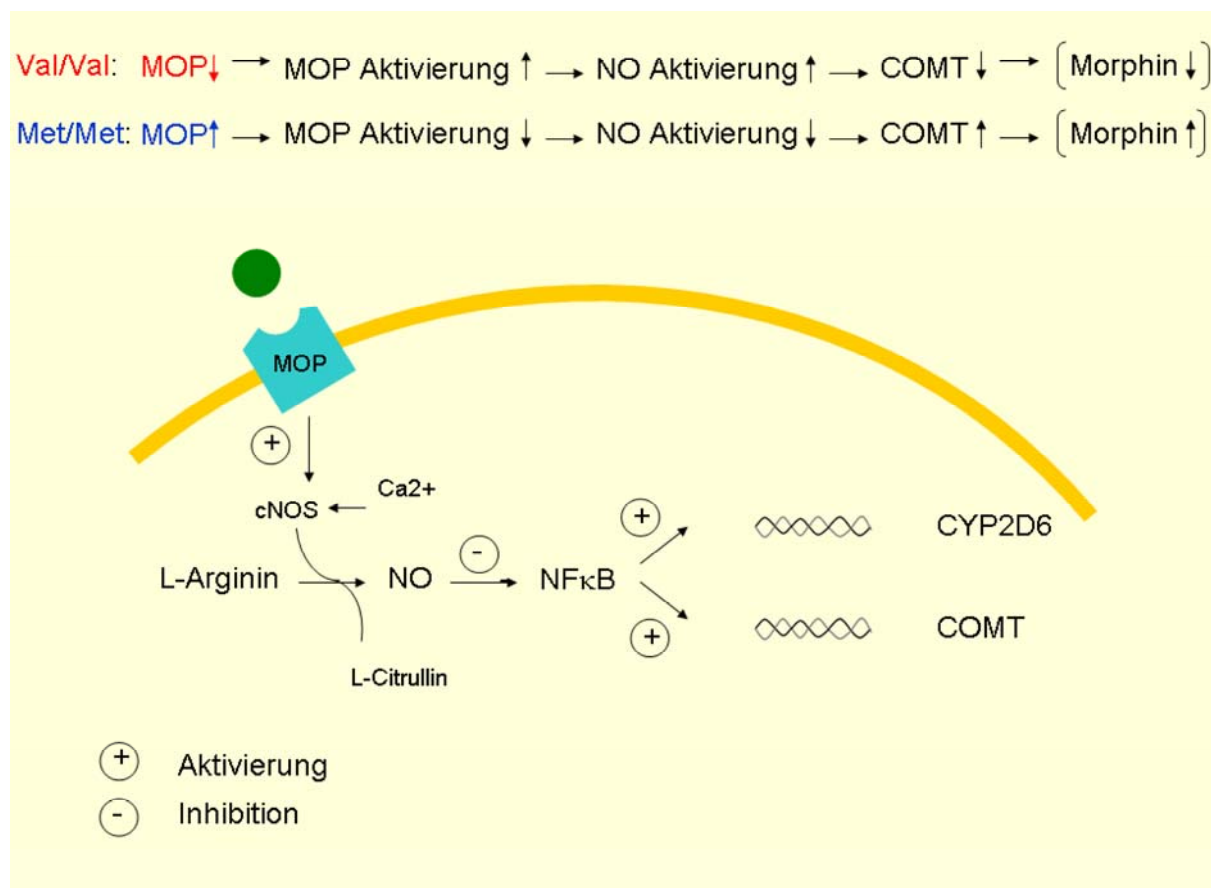
Neben der Schilderung eines negativen Feedbackmechanismus, ist in diesem Zusammenhang zudem die mögliche Beeinflussung des Dopaminstoffwechsels durch Morphin von Interesse.

Wie in der Einleitung dargelegt, führte in menschlichen Leukozyten eine Aktivierung des  $\mu_3$ -Rezeptors durch Morphin zu einer verminderten COMT mRNA Expression. Vorstellbar wäre eine ähnliche Beeinflussung des COMT Expressionsniveaus in den verschiedenen Genotypen des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus.

Die aufgrund eines höheren Ligandenangebotes geringere  $\mu$ -Opioidrezeptordichte COMT<sup>Val/Val</sup> Homozygoter könnte über eine gesteigerte Rezeptoraktivierung zu höheren NO Spiegeln führen, die wiederum konsekutiv die COMT Expression hemmen. Ein konträrer Mechanismus wäre demnach für COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygote denkbar (Abbildung 22).

Im Rahmen von Experimenten zur immunsuppressiven Wirkung von Morphin wurden in menschlichen Leukozyten die intrazellulären Signalwege dieses Liganden untersucht. Dabei zeigte sich, dass Morphin über intrazelluläres NO die Expression des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B inhibieren und somit immunsuppressiv wirken kann (Welters et al. 2000). Ein ähnlicher Mechanismus könnte sich in menschlichen Neuronen abspielen.

Voraussetzung dafür wäre jedoch die Funktion von NF $\kappa$ B in seiner klassischen Rolle als Transkriptionsaktivator. Bezüglich der COMT ist NF $\kappa$ B bisher jedoch als Expressionsinhibitor beschrieben (Tchivileva et al. 2009).



**Abbildung 22:** Möglicher Zusammenhang zwischen  $\mu$ -Opioidrezeptor- und COMT Expression in den Genotypen des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus.

*Abkürzungen:* MOP:  $\mu$ -Opioidrezeptor; Ca<sup>2+</sup> Calcium ; cNOS: konstitutive NO-Synthase; NO: Stickstoffmonoxid; NF $\kappa$ B: nuclear factor kappa B; COMT: Catechol-O-Methyltransferase; CYP2D6: Subfamilie 2D6 der Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme.

Dieses Modell stellt eine Hypothese zur Erklärung einer höheren  $\mu$ -Opioidrezeptor- und COMT Expression in der Gruppe COMT<sup>Met/Met</sup> homozygoter Allelträger dar.

Es muss jedoch bedacht werden, dass die Ergebnisse anderer Studien nicht ohne weiteres auf menschliches neuronales Gewebe übertragen werden können. Zudem verknüpft dieses Regulationsmodell den endogenen Opioid- und Morphinstoffwechsels, wobei die Bedeutung endogen synthetisierten Morphins bislang noch nicht hinreichend untersucht wurde.

Es steht jedoch fest, dass sich Dopamin- und Opioidmetabolismus wechselseitig beeinflussen und sowohl Mechanismen der liganden-assoziierten Rezeptorregulation als auch komplexe, intrazelluläre Signalwege an dieser Verknüpfung beteiligt sind.

## 6. Zusammenfassung

Der  $\mu$ -Opioidrezeptor hat aufgrund seines analgetischen Potentials immense Bedeutung für die Physiologie des Menschen. Seine Wirkung wird über endogene Liganden, darunter Enkephalin und Dynorphin, und exogene Medikamente, wie dem Morphin, vermittelt.

Der Einfluss des dopaminergen Tonus auf das opioiderge System war Thema zahlreicher Studien. Im Bezug auf endogene opioiderge Liganden ließen diese Experimente im Striatum eine gegensätzliche Regulation von Dynorphin und Enkephalin über D1 und D2 Rezeptoren vermuten. Was den  $\mu$ -Opioidrezeptor betrifft, konnte eine vermehrte Expression bei erhöhtem dopaminergen Tonus nachgewiesen werden.

Gegenstand zweier für diese Arbeit entscheidender Studien war die Prüfung der Bedeutsamkeit des COMT Val<sup>108/158</sup>Met Polymorphismus für die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression im Gehirn des Menschen.

Ein SNP im Exon 4 des COMT Gens (Guanin  $\rightarrow$  Adenin) führt zum Austausch der Aminosäure Valin gegen Methionin an Position 108 (s-COMT) bzw. 158 (mb-COMT) des COMT Proteins. Das Valin Allel codiert für eine höhere Thermostabilität und damit für eine drei bis vierfach erhöhte Enzymaktivität. Demnach zeigen COMT<sup>Val/Val</sup> Träger die höchste, COMT<sup>Val/Met</sup> Individuen eine intermediäre und COMT<sup>Met/Met</sup> Allelträger die geringste Enzymaktivität.

Sowohl eine *in vivo* [<sup>11</sup>C]Carfentanil Liganden-PET als auch eine *ex vivo* <sup>3</sup>H-DAMGO Bindungsstudie bestätigten eine erhöhte Expression der  $\mu$ -Opioidrezeptor Bindungsstellen bei COMT<sup>Met/Met</sup> homozygoten Allelträgern. Beide Studien unterschieden sich jedoch in der Aussage über einen möglichen Regulationsmechanismus. Im ersten Fall wurde die These einer Regulation über den endogenen Liganden Enkephalin vermutet, während die zweite Studie dies nicht bestätigen konnte und von intrazellulären Regulationsmechanismen ausging.

Diese Thesen wurden in vorliegender Arbeit durch den Nachweis der  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression sowie von Enkephalin und Dynorphin im menschlichen post-mortem Hirngewebe erneut überprüft. Methodisch stand dabei die Immunhistochemie im Vordergrund.

Es wurden hierzu histologische Schnitte aus frontalem Kortex, dem Striatum (mit Ncl. caudatus, Putamen und Ncl. accumbens) sowie dem Ncl. mediodorsalis des Thalamus gewonnen.

Die  $\mu$ -Opioidrezeptor Expression COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoter war im Striatum und Thalamus höher als die Expression COMT<sup>Val/Met</sup> heterozygoter und COMT<sup>Val/Val</sup> homozygoter Individuen. Statistische Signifikanz erreichten diese Unterschiede im Thalamus.

Diese Ergebnisse bestätigen damit immunhistochemisch eine erhöhte Rezeptorexpression im Kollektiv COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoter und ergänzen dadurch die bisherigen Daten der [<sup>11</sup>C]Carfentanil Liganden-PET und des <sup>3</sup>H-DAMGO-Liganden Bindings zu verfügbaren  $\mu$ -Rezeptorbindungsstellen.

Konträr zu den Ergebnissen des  $\mu$ -Opioidrezeptors zeigte die Enkephalin Expression im Striatum und Thalamus COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygoter die geringste Expression. Obwohl die Ergebnisse keine Signifikanzen zeigten, untermauern sie die These einer Enkephalin abhängigen  $\mu$ -Rezeptorregulation.

Dynorphin zeigte im Striatum passend zu den in der Literatur vorbeschriebenen Daten die geringste Expression in der COMT<sup>Val/Val</sup> Gruppe. Die Auswertungen ergaben statistische Signifikanz im Ncl. accumbens. Gleichgerichtet verhielt sich die *in situ* Hybridisierung des Präprodynorphin, die zur Ergänzung vorliegender äquivalenter Präproenkephalin Daten durchgeführt wurde.

Die Immunhistochemie bestätigt damit eine gegenläufige dopaminerge Steuerung des Enkephalin und Dynorphin im Striatum und lässt eine gegenläufige Regulation des  $\mu$ -Rezeptors durch seinen Liganden Enkephalin als plausibel erscheinen. Ein äquivalenter Mechanismus kommt jedoch für das Dynorphin nicht in Frage.

Der Nachweis der COMT Expression und eine Aussage über das Verhältnis von Enzymexpression zu Enzymaktivität war eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit. Methodisch kam auch hierbei die Immunhistochemie zum Einsatz.

Die Expression verhielt sich dabei konträr zur Enzymaktivität. Im frontalen Kortex und Striatum zeigten COMT<sup>Met/Met</sup> Homozygote die höchste, COMT<sup>Val/Met</sup> Heterozygote eine intermediäre und COMT<sup>Val/Val</sup> Heterozygote die geringste Expression. Signifikante Ergebnisse wurden in allen Regionen des Striatum gemessen. Auf den Zusammenhang zwischen COMT Expression und Aktivität wird in der Diskussion anhand zweier Modelle möglicher Regulationsmechanismen näher eingegangen.

## 7. Anhang

### 7.1. Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien ohne Herstellerangaben wurden von der Firma Sigma-Aldrich bezogen.

H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> :	AMPUWA <sup>®</sup> (Fa. Fresenius)
H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> :	H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> wird mit 0,1% v/v DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt und ca. 12 h gerührt, bevor es autoklaviert wird
H <sub>2</sub> O <sub>PCRgrade</sub> :	hochreines H <sub>2</sub> O; auf RNase- und DNase Freiheit getestet

#### 7.1.1. Anfertigen der Gefrierschnitte und Histologie

Poly-L-Lysin Lösung:	0,01%w/v Poly-L-Lysin in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
Thioninlösung:	0,05%w/v Thioninblau; gelöst in einem Puffer aus 0,1 M Essigsäure und 0,1 M Natriumacetat

#### 7.1.2. Isolation der DNA

#### 7.1.3. PCR

Trizol <sup>®</sup> :	Phenol/Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Invitrogen)
Chloroform:	(für die Molekularbiologie; Fa. Fluka)
Isopropanol 100%:	(für die Molekularbiologie)
Oligo dT <sub>12-18</sub> :	Oligonukleotid aus 12-18 Desoxy-Thymidinbasen (500µg/ml; Fa. Invitrogen)
dNTP-Mix:	gleichteiliges Gemisch aus dATP, dTTP, dGTP und dCTP (10mM, Fa. Invitrogen)
RNase Inhibitor:	RNaseOUT <sup>®</sup> (Fa. Invitrogen)
Taq DNA Polymerase:	Platinum Taq DNA Polymerase (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 10x PCR-Puffer und MgCl <sub>2</sub> -Lösung (50 mM)
TAE-Laufpuffer:	0,4 M Tris-Base, 0,2 M Essigsäure, 10 mM EDTA in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Agarosegel:	2%w/v Agarose werden in TAE-Laufpuffer aufgekocht, mit 1,0 µl/100ml Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) versetzt, in die Gelkammer gegossen und nach dem Erkalten bei Raumtemperatur verwendet



**7.1.4. Immunhistochemie**

10x PBS:	1,3 M NaCl, 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>
Fixativ:	4% w/v Paraformaldehyd (Merck) wird in 1xPBS (mit H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub> angesetzt) für ca. 15 Min auf 60°C erhitzt und nach der Klärung der Lösung (was durch Zugabe von wenigen Tropfen 1M NaOH katalysiert wird) filtriert und abgekühlt  Aceton (Fa. Roth)
PBSTN:	1xPBS, 0,1%v/v TritonX, 2,0%v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)
PBSN:	1xPBS, 10%v/v Normalserum der Ziege (Fa. Vector)
Primärantikörper:	Kaninchen-IgG gegen <ul style="list-style-type: none"> <li>○ MOP Rezeptor Protein (Fa. Chemicon)</li> <li>○ Met-Enk (Fa. Chemicon)</li> <li>○ COMT (Fa. Chemicon)</li> <li>○ DynA (Fa. Abcam)</li> <li>○ DynB (Fa. Abcam)</li> </ul>
Sekundärantikörper:	biotinylierter Antikörper gegen IgG des Kaninchens (Fa. Vector)
ABC-Komplex:	Avidin-Merettichperoxidase-Komplex (Fa. Vector)
DAB-Lsg.:	Diaminobenzidinlösung (4%w/v in 0,06%v/v H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ; 0,2%w/v NiCl <sub>2</sub> ; Fa. Vector)

**7.1.5. In situ Hybridisierung**

10x PBS:	1,3 M NaCl, 70 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 30 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
20xSSC:	3,0 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0
TdT:	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (aus Kalbsthymus, 25 U/μl; Fa. Roche-Diagnostika) Kit enthält auch den TdT-Puffer und CoCl <sub>2</sub> (25mM)
[ <sup>33</sup> P]dATPαP:	[ <sup>33</sup> P]-Desoxyadenosin-5'-(α-Thio-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)
TNES-Puffer:	140 mM NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 7,4), 1 mM EDTA, 0,1% SDS)
Polyacrylamid-Säulen:	Bio-Spin 6 Chromatography Columns (Fa. Bio-Rad)

DTT-Lösung:	1,0 M Dithiotreitol in H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub>
Paraformaldehyd-Lsg.:	4%w/v Paraformaldehyd Herstellung der Lösung wie unter 7.1.4. beschrieben, wobei 1x PBS (RNA) verwendet wird
Hybridisierungspuffer:	50%v/v Formamide (Fa. Fluka); 10%w/v Dextran (MG>350.000g/mol; Fa. Fluka), 5xDenhardts Lösung (Fa. Fluka), 0,6 M NaCl, 60 mM Na-Citrat, 25 mM Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , 1 mM Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> , 200 mg/l Einzelstrang DNA (hydrolysiert aus Lachs-Sperma), 100 mg/l Poly-Adenylat; pH 7,0
Ethanol:	zur Fixierung und Lagerung der Gewebeschnitte (70 bzw. 96%) wird 100% Ethanol (unvergällt, p.A., Fa. Merck) mit H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> verdünnt

## 7.1.6. Oligonukleotide und Primer

### 7.1.6.1. Primer zur PCR von COMT mRNA

sense

5'-CTC ATC ACC ATC GAG ATC AA-3'

Länge: 20mer                      GC-Gehalt: 45%                      T<sub>m</sub>: 54°C

Antisense

5'CCA GGT CTG ACA ACG GGT CA-3

Länge: 20 mer                      GC-Gehalt: 55%                      T<sub>m</sub>: 54°C

### 7.1.6.2. Oligonukleotide zur *in situ* Hybridisierung von Präprodynorphin

sense

5' - CCA TTT CAG AAC ATC ATC AGA TAC CTG GGG ACT GCG CAT-3'

Länge: 40mer                      GC-Gehalt: 50%                      T<sub>m</sub>: 74°C

## 7.1.7. Autoradiographie

Entwicklerlösung GBX: 1 : 3,75 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Fa. Kodak)

Fixiererlösung GBX: 1 : 3,75 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Fa. Kodak)

Entwickler D19: 160 g/l werden mit 37°C warmen H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> versetzt und gerührt und danach auf ca. 17°C abgekühlt (Fa. Kodak)

Fixierer RT2000: 1:9 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> (Fa. Ilford)

## 7.2. Literaturverzeichnis:

- Akil**, M., Kolachana, B.S., Rothmond, D.A., Hyde, T.M., Weinberger, D.R., Kleinman, J.E., 2003. Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain. *J. Neurosci.* 23, 2008-2013.
- Asselin**, M.-C., Soghomonian, J.-J., Côté, P.Y., Parent, A., 1994. Striatal changes in preproenkephalin mRNA levels in parkinsonian monkeys. *NeuroReport* 5, 2137-2140.
- Aubert**, I., Ghorayeb, I., Normand, E., Bloch, B., 2000. Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum. *J. Comp. Neurol.* 418, 22-32.
- Axelrod** J., Tomchick R., 1958. Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols. *J. Biol. Chem.* 233, 702-705.
- Baik**, J-H., Picetti, R., Saiardi, A., Thiriet, G., Dierich, A., Depaulis, A., Le Meur, M., Borrelli, E. 1995. Parkinsonian-like locomotor impairment in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* 377, 424-428.
- Bailey**, A., Yoo, J.H., Racz, I., Zimmer, A., Kitchen, I., 2007. Preprodynorphin mediates locomotion and D2 dopamine and mu-opioid receptor changes induced by chronic 'binge' cocaine administration. *J Neurochem.* 102, 1817-1830.
- Berthele**, A., Platzer, S., Dworzak, D., Schadrack, J., Mahal, B., Büttner, A., Assmus, H.P., Wurster, K., Zieglgänsberger W., Conrad, B., Tölle, T.R., 2003. [<sup>3</sup>H]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mRNA expression in the human brain. *Neuroscience* 121, 629-640.
- Berthele**, A., Platzer, S., Jochim, B., Boecker, H., Buettner, A., Conrad, B., Riemenschneider M., Toelle, T.R., 2005. COMT Val<sup>108/158</sup> Met genotyp affects the mu-opioid receptor system in the human brain: Evidence from ligand-binding, G-protein activation and preproenkephalin mRNA expression. *Neuroimage* 28, 185-193.
- Bertocci**, B., Miggiano, V., Da Prada, M., Dembic, Z., Lahm, H.W., Malherbe, P., 1991. Human catechol-O-methyltransferase: cloning and expression of the membrane-associated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 1416-1420.
- Bilder**, R.M., Volavka, J., Czobor, P., Malhotra, A.K., Kennedy, J.L., Ni, X., Goldman, R.S., Hoptman, M.J., Sheitman, B., Lindenmayer, J.P., Citrome, L., McEvoy, J.P., Kunz, M., Chakos, M., Cooper, T.B., Liebermann, J.A., 2002. Neurocognitive correlates of the COMT Val<sup>158</sup>Met polymorphism in chronic schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 52, 701-707.
- Bonifácio**, M.J., Palma, P.N., Almeida, L., Soares-da-Silva, P., 2007. Catechol-O-methyltransferase and its inhibitors in Parkinson's disease. *CNS Drug Rev.* 13, 352-379.
- Borchardt**, R.T., 1974. A rapid spectrophotometric assay for catechol-O-methyltransferase. *Anal Biochem.* 58, 382-389.

- Boudíková**, B., Szumlanski, C., Maidak, B., Weinshilboum, R., 1990. Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics. *Clin. Pharmacol. Ther.* 48, 381-389.
- Bouras**, C., Taban, C.H., Constantinidis, J., 1984. Mapping of enkephalins in human brain. An immunohistofluorescence study on brains from patients with senile and presenile dementia. *Neuroscience* 1, 179-190.
- Cadet**, P., Mantione, K.J., Stefano, G.B. 2003. Molecular identification and functional expression of mu 3, a novel alternatively spliced variant of the human mu opiate receptor gene. *J Immunol.* 170, 5118-5123.
- Cadet**, P., Mantione, K.J., Zhu, W., Kream, R.M., Sheehan, M., Stefano, G.B., 2007. A functionally coupled mu3-like opiate receptor/nitric oxide regulatory pathway in human multi-lineage progenitor cells. *J Immunol.* 179, 5839-5844.
- Chen**, J., Lipska, B.K., Halim, N., Ma, Q.D., Matsumoto, M., Melhem, S., Kolachana, B.S., Hyde, T.M., Herman, M.M., Apud, J., Egan, M.F., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2004. Functional analysis of genetic variation in catechol-o-methyltransferase (COMT): effects on mRNA, protein and enzyme activity in postmortem human brain. *Am. J. Hum. Genet.* 75, 807-821.
- Chen**, J.F., Aloyo, V.J., Weiss, B., 1993. Continuous treatment with the D2 dopamine receptor agonist quinpirole decreases D2 dopamine receptors, D2 dopamine receptor messenger RNA and proenkephalin messenger RNA, and increases mu opioid receptors in mouse striatum. *Neuroscience* 54, 669-680.
- Chudler**, E.H and Dong W.K., 1995. The role of the basal ganglia in nociceptin and pain. *Pain* 60, 3-38.
- Clarke**, S., Zimmer, A., Zimmer, A.M., Hill, R.G., Kitchen, I., 2003. Region selective up-regulation of micro-, delta- and kappa-opioid receptors but not opioid receptor-like 1 receptors in the brains of enkephalin and dynorphin knockout mice. *Neuroscience* 122, 479-489.
- Corbett**, A.D., Henderson, G., McKnight, A.T., Paterson, S.J., 2006. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br. J. Pharmacol.* 147, 153-162.
- Corbett**, A.D., Paterson, S.J., Kosterlitz, H.W., 1993. Selectivity of ligands for opioid receptors. In "Opioids", Herz A. (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, Bd. 1, pp. 645-680.
- Coveñas**, R., Alonso, J.R., Conrath, M., 1989. Immunocytochemical study of enkephalin-like cell bodies in the thalamus of the rat. *Brain Res Bull.* 23, 277-281.
- Craig**, A.D., 2003. Pain mechanisms : labeled lines versus convergence in central processing. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 1-30.
- Daunais**, J.B., Letchworth, S.R., Sim-Selley, L.J., Smith, H.R., Childers, S.R., Porrino, L.J., 2001. Functional and anatomical localization of mu opioid receptors in the striatum , amygdala, and extended amygdala of the nonhuman primate. *J. Comp. Neurol.* 433, 471-485.

- De Keyser, J.**, 1993. Subtypes and localization of dopamine receptors in human brain. *Neurochem Int.* 22, 83-93.
- Delfs, J.M., Kong, H., Mestek, A., Chen, Y., Yu, L., Reisine, T., Chesselet, M.F.** 1994. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol* 345, 46-68.
- Devi, L.A.**, 2001. Heterodimerization of G-protein-coupled receptors: pharmacology, signaling and trafficking. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 532–537.
- Egan, M.F., Goldberg, T.E., Kolachana, B.S., Callicott, J.H., Mazzanti, C.M., Straub, R.E., Goldman, D., Weinberger, D.R.**, 2001. Effect of COMT Val<sup>108/158</sup> Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 6917-6922.
- Engber, T.M., Boldry, R.C., Kuo, S., Chase, T.N.**, 1992. Dopaminergic modulation of striatal neuropeptides: differential effects of D1 and D2 receptor stimulation on somatostatin, neuroptide Y, neurotensin, dynorphin and enkephalin. *Brain Res.* 581,261-268.
- Fallon, J.H., Leslie, F.M.**, 1986. Distribution of dynorphin and enkephalin peptides in the rat brain. *J Comp Neurol.* 249, 293-336.
- Finley, J.C., Maderdrut, J.L., Petrusz, P.** 1981. The immunocytochemical localization of enkephalin in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 198, 541-65.
- Fricchione, G., Zhu, W., Cadet, P., Mantione, K.J., Bromfield, E., Madsen, J., DeGirolami, U., Dworetzky, B., Vaccaro, B., Black, P., Stefano, G.B.**, 2008. Identification of endogenous morphine and a mu3-like opiate alkaloid receptor in human brain tissue taken from a patient with intractable complex partial epilepsy. *Med Sci Monit.* 14, CS45-49.
- Fujii, S., Senba, E., Kiyama, H., Ueda, Y., Tohyama, M.**, 1987. Mammillothalamic enkephalinergic pathway in the rat: an immunocytochemical analysis. *Brain Res.* 401, 1-8.
- George, S.R., Kertesz, M.**, 1987. Met-enkephalin concentrations in striatum respond reciprocally to alterations in dopamine neurotransmission. *Peptides* 8, 487– 492.
- Gerfen, C.R., Engber, T.M., Mahan, L.C., Susel, Z., Chase, T.N., Monsma Jr., F.J., Sibley, D.R.**, 1990. D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons. *Science* 250, 1429-1432.
- Gerfen, C.R., McGinty, J.F., Young, W.S. III**, 1991. Dopamine differentially regulates dynorphin, substance P, and enkephalin expression in striatal neurons: in situ hybridization histochemical analysis. *J. Neurosci.* 11,1016-1031.
- Gross-Isseroff, R., Dillon, K.A., Israeli, M., Biegon, A.**, 1990. Regionally selective increases in mu opioid receptor density in the brain of suicide victims. *Brain Res.* 530, 312-316.
- Grossman, M.H., Creveling, C.R., Rybczynski, R., Braverman, M., Isersky, C., Breakefield, X.O.**, 1985. Soluble and particulate forms of rat catechol-O-methyltransferase distinguished by gel electrophoresis and immune fixation. *J. Neurochem.* 44, 421-432.

- Grossman**, M.H., Emanuel, B.S., Budarf, M.L., 1992. Chromosomal mapping of the human catechol-O-methyltransferase gene to 22q11.1----q11.2. *Genomics* 12, 822-825.
- Grube**, D., 2004. Constants and variables in immunohistochemistry. *Arch Histol Cytol* 67 (2), 115-134.
- Haber**, S., Elde, R., 1982. The distribution of enkephalin immunoreactive neuronal cell bodies in the monkey brain: preliminary observations. *Neurosci Lett.* 32, 247-252
- Harlan**, R.E., Shivers, B.D., Romano, G.J., Howells, R.D., Pfaff, D.W., 1987. Localization of preproenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J Comp Neurol.* 258, 159-184.
- Henderson**, G., McKnight, A.T., 1997. The orphan opioid receptor and its endogenous ligand--nociceptin/orphanin FQ. *Trends Pharmacol Sci.* 18, 293-300.
- Hiller**, J.M., Fan, L.Q., 1996. Laminar distribution of the multiple opioid receptors in the human cerebral cortex. *Neurochem. Res.* 21, 1333-1345.
- Hirai**, T., Jones, E.G., 1989. Distribution of tachykinin- and enkephalin- immunoreactive fibers in the human thalamus. *Brain Res. Rev.* 14, 35-52.
- Hughes**, J., Smith, T.W., Kosterlitz, H.W., Fothergill, L.A., Morgan, B.A., Morris, H.R., 1975. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258, 577-80.
- Hurd**, Y.L., 1996. Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain. *Neuroscience* 72, 767-783.
- Jackson**, D.M., Westlind-Danielsson, A.1994. Dopamine receptors: molecular biology, biochemistry and behavioural aspects. *Pharmacol Ther.* 64, 291-370.
- Jacob**, F., Perrin, D., Sánchez, C., Monod, J., Edelman, S., 2005. [The operon: a group of genes with expression coordinated by an operator. *C.R.Acad. Sci. Paris* 250 (1960) 1727-1729] *C R Biol.* 328, 514-20.
- Janecka**, A., Fichna, J., Janecki, T., 2004. Opioid receptors and their ligands. *Curr Top Med Chem.* 4, 1-17.
- Jeffery**, D.R., Roth, J.A., 1984. Characterization of membrane-bound and soluble catechol-O-methyltransferase from human frontal cortex. *J. Neurochem.* 42, 826-832.
- Jiang**, H., Xie, T., Ramsden, D.B., Ho, S.L., 2003. Human catechol-O-methyltransferase down-regulation by estradiol. *Neuropharmacology* 45, 1011-8.
- Jochim**, B., 2006. „Der Einfluss des COMT Val108/158/Met Polymorphismus auf das  $\mu$ -Opioidrezeptorsystem im Gehirn des Menschen“, Dissertation, Medizinische Fakultät, Technische Universität München.
- Kaplan**, G.P., Hartman, B.K., Creveling. C.R., 1979. Immunohistochemical demonstration of catechol-o-methyltransferase in mammalian brain. *Brain. Res.* 167, 241-50.

**Karhunen**, T., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Julkunen, I., Panula, P., 1994. Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42, 1079-1090.

**Karhunen**, T., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Panula, P., 1995. Neuronal and non-neuronal catechol-O-methyltransferase in primary cultures of rat brain cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 825-834.

**Kastner**, A., Anglade, P., Bounaix, C., Damier, P., Javoy-Agid, F., Bromet, N., Agid, Y., Hirsch, E.C., 1994. Immunohistochemical study of catechol-O-methyltransferase in the human mesostriatal system. *Neuroscience* 62, 449-57.

**Kebabian**, J.W., Calne, D.B., 1979. Multiple receptors for dopamine. *Nature*, 277, 93-96.

**Kingsbury**, A.E., Foster O.J., Nisbet, A.P., Cairns, N., Bray, L., Eve, D.J., Lees, A.J., Marsden, C.D., 1995. Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. *Mol. Brain Res.* 28, 311-318.

**Kopin**, I.J., 1985. Catecholamine metabolism: basic aspects and clinical significance. *Pharmacol. Rev.* 37, 333-364.

**Lachman**, H.M., Papolos, D.F., Saito, T., Yu, Y.M., Szumlanski, C.L., Weinshilboum, R.M., 1996. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics* 6, 243-250.

**Le Moine**, C., Bloch, B., 1991. Rat striatal and mesencephalic neurons contain the long isoform of the D2 dopamine receptor mRNA. *Brain Res Mol Brain Res.* 10, 283-9.

**Le Moine**, C., Bloch, B. 1995. D1 and D2 dopamine receptor gene expression in the rat striatum: sensitive cRNA probes demonstrate prominent segregation of D1 and D2 mRNAs in distinct neuronal populations of the dorsal and ventral striatum. *J. Comp. Neurol.* 355, 418-426.

**Le Moine**, C., Normand, E., Guitteny, A.F., Fouque, B., Teoule, R., Bloch, B. 1990. Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 230-234.

**Li**, S.J., Jiang, H.K., Stachowiak, M.S., Hudson, P.M., Owyang, V., Nanry, K., Tilson, H.A., Hong, J.S., 1990. Influence of nigrostriatal dopaminergic tone on the biosynthesis of dynorphin and enkephalin in rat striatum. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 8, 219-225.

**Löffler**, P., Petrides P., 2003. *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 7. Auflage

**Lotta**, T., Vidgren, J., Tilgmann, C., Ulmanen, I., Melén, K., Julkunen, I., Taskinen, J., 1995. Kinetics of human soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase: a revised mechanism and description of the thermolabile variant of the enzyme. *Biochemistry* 34, 4202-4210.

- Lundström, K.**, Salminen, M., Jalanko, A., Savolainen, R., Ulmanen, I., 1991. Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA. *DNA Cell Biol.* 10, 181-189.
- Luttmann, W.**, 2006. *Der Experimentator*. 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Malhotra, A.K.**, Kestler, L.J., Mazzanti, C., Bates, J.A., Goldberg, T., Goldman, D., 2002. A functional polymorphism in the COMT gene and performance on a test of prefrontal cognition. *Am. J. Psychiatry* 159, 652-654.
- Männistö, P.T.**, Kaakkola, S., 1999. Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors. *Pharmacol. Rev.* 51, 593-628.
- Mansour, A.**, Fox, C.A., Burke, S., Meng, F., Thompson, R.C., Akil, H., Watson, S.J., 1994. Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *J Comp Neurol.* 350, 412-438.
- Mansour, A.**, Khachaturian, H., Lewis, M.E., Akil, H., Watson, S.J., 1987. Autoradiographic differentiation of mu, delta, and kappa opioid receptors in the rat forebrain and midbrain. *J Neurosci* 7(8), 2445-2464.
- Mantione, K.J.**, Cadet, P., Zhu, W., Kream, R.M., Sheehan, M., Fricchione, G.L., Goumon, Y., Esch, T., Stefano, G.B., 2008. Endogenous morphine signaling via nitric oxide regulates the expression of CYP2D6 and COMT: autocrine/paracrine feedback inhibition. *Addict Biol.* 13, 118-23.
- Martin, W.R.**, Eades, C.G., Thompson, J.A., Huppler, R.E., Gilbert, P.E., 1976. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197, 517-532.
- Mathieu-Kia, A.M.**, Fan, L.Q., Kreek, M.J., Simon, E.J., Hiller, J.M., 2001. Mu-, delta-, and kappa opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients. *Brain Res.* 893, 121-134.
- Matsumoto, M.**, Weickert, C.S., Akil, M., Lipska, B.K., Hyde, T.M., Herman, M.M., Kleinman, J.E., Weinberger, D.R., 2003. Catechol O-methyltransferase mRNA expression in human and rat brain: evidence for a role in cortical neuronal function. *Neuroscience* 116, 127-37.
- McLeod, H.L.**, Fang, L., Luo, X., Scott, E.P., Evans, W.E., 1994. Ethnic differences in erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in black and white Americans. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 26-29.
- Merchenthaler, I.**, Maderdrut, J.L., Cianchetta, P., Shughrue, P., Bronstein, D., 1997. In situ hybridization histochemical localization of prodynorphin messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol.* 384, 211-32.
- Milligan, G.**, 2004. G protein-coupled receptor dimerization: function and ligand pharmacology. *Mol. Pharmacol.* 66, 1-7.



**Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., 1998.** Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol Rev.* 78, 189-225.

**Morissette, M., Goulet, M., Soghomonian, J.J., Blanchet, P.J., Calon, F., Bedard, P.J., Di Paolo, T., 1997.** Preproenkephalin mRNA expression in the caudate-putamen of MPTP monkeys after chronic treatment with the D2 agonist U91356A in continuous or intermittent mode of administration : comparison with L-DOPA therapy. *Mol. Brain. Res.* 49, 55-62.

**Morris, B.J., Herz, A., Höllt, V., 1989.** Localization of striatal opioid gene expression, and its modulation by the mesostriatal dopamine pathway: an in situ hybridization study. *J. Mol. Neurosci.* 1, 9-18.

**Narita, M., Khotib, J., Suzuki, M., Ozaki, S., Yajima, Y., Suzuki, T., 2003.** Heterologous mu-opioid receptor adaptation by repeated stimulation of kappa-opioid receptor: up-regulation of G-protein activation and antinociception. *J Neurochem.* 85, 1171-1179.

**Noll, S., Schaub-Kuhnen, S., 2000.** Praxis der Immunhistochemie. Höfler, H., Müller, K., 1. Auflage, Urban und Fischer, München.

**Ogawa, N., 1995.** Molecular and chemical neuropharmacology of dopamine receptor subtypes. *Acta Med Okayama* 49, 1-11.

**Palmatier, M.A., Kang, A.M., Kidd, K.K., 1999.** Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles. *Biol. Psychiatry* 46, 557-567.

**Pasternak, G.W., 2001.** Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors. *Trends Pharmacol. Sci.* 22, 67-70.

**Pasternak, G.W., 2001.** Insights into mu opioid pharmacology the role of mu opioid receptor subtypes. *Life Sci.* 68, 2213-2219.

**Pasternak, G.W., 2004.** Multiple opiate receptors: déjà vu all over again. *Neuropharmacology* 47, 312-323.

**Pasternak, G.W., 2005.** Molecular biology of opioid analgesia. *J. Pain Symptom Manage.* 29, 2-9.

**Peckys, D., Landwehrmeyer, G.B. 1999.** Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a 33P in situ hybridization study. *Neuroscience* 88, 1093-1135.

**Pert, C.B., Snyder, S.H., 1973.** Opiate receptor: Its demonstration in nervous tissue. *Science* 179, 1011-1014.

**Platzer, S., 2005.** "Expression der GABA-B Rezeptoren im Gehirn des Menschen", Dissertation, Medizinische Fakultät, Technische Universität München.

**Rosen, H., Douglass, J., Herbert, E., 1984.** Isolation and characterization of the rat proenkephalin gene. *J Biol Chem*, 259, 14309-14313.

**Salminen**, M., Lundström, K., Tilgmann, C., Savolainen, R., Kalkkinen, N., Ulmanen, I., 1990. Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase. *Gene* 93, 241-247.

**Sar**, M., Stumpf, W.E., Miller, R.J., Chang, K.J., Cuatrecasas, P., 1978. Immunohistochemical localization of enkephalin in rat brain and spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 182, 17-37.

**Satoh**, M., Minami, M., 1995. Molecular pharmacology of the opioid receptors. *Pharmacol Ther.* 68, 343-364.

**Scanlon**, P.D., Raymond F.A., Weinshilboum R.M., 1979. Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. *Science* 203, 63-65.

**Schroeder**, J.A., Niculescu, M., Unterwald, E.M., 2003. Cocaine alters mu but not delta or kappa opioid receptor-stimulated in situ [35S]GTPgammaS binding in rat brain. *Synapse* 47, 26-32.

**Shield**, A.J., Thomae, B.A., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Weinshilboum, R.M., 2004. Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes. *Mol. Psychiatry* 9, 151-160.

**Simon**, E.J., Hiller, J.M., Edelman, I., 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic [3H]etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70, 1947-1949.

**Sladek-Chelgren**, S., Weinshilboum, R.M., 1981. Catechol-o-methyltransferase biochemical genetics: human lymphocyte enzyme. *Biochem. Genet.* 19, 1037-1053.

**Spielman**, R.S., Weinshilboum R.M., 1981. Genetics of red cell COMT activity: analysis of thermal stability and family data. *Am. J. Med. Genet.* 10, 279-290.

**Stefano**, G.B., Digenis, A., Spector, S., Leung, M.K., Bilfinger, T.V., Makman, M.H., Scharrer, B., Abumrad, N.N., 1993 Opiate-like substances in an invertebrate, an opiate receptor on invertebrate and human immunocytes, and a role in immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90, 11099-103.

**Stefano**, G.B., Kream, R.M., Mantione, K.J., Sheehan, M., Cadet, P., Zhu, W., Bilfinger, T.V., Esch, T., 2008. Endogenous morphine/nitric oxide-coupled regulation of cellular physiology and gene expression: implications for cancer biology. *Semin Cancer Biol.* 18, 199-210.

**Stefano**, G.B., Zhu, W., Cadet, P., Bilfinger, T.V., Mantione, K., 2004. Morphine enhances nitric oxide release in the mammalian gastrointestinal tract via the micro(3) opiate receptor subtype: a hormonal role for endogenous morphine. *J Physiol Pharmacol.* 55, 279-88.

**Steiner**, H., Gerfen, C.R., 1998. Role of dynorphin and enkephalin in the regulation of striatal output pathways and behavior. *Exp. Brain. Res.* 123, 60-76.

- Tchivileva**, I.E., Nackley, A.G., Qian, L., Wentworth, S., Conrad, M., Diatchenko, L.B., 2009. Characterization of NF- $\kappa$ B-mediated inhibition of catechol-O-methyltransferase. *Mol pain* 5 :13.
- Tel**, B.C., Zeng, B.Y., Cannizzaro, C., Pearce, R.K., Rose, S., Jenner, P., 2002. Alterations in striatal neuropeptide mRNA produced by repeated administration of l-DOPA, ropinirole or bromocriptine correlate with dyskinesia induction in MPTP-treated common marmosets. *Neuroscience* 115, 1047–1058.
- Tempel**, A., Zukin, R.S., 1987. Neuroanatomical patterns of the mu, delta, and kappa opioid receptors of rat brain as determined by quantitative in vitro autoradiography. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84, 4308-4312.
- Tenhunen**, J., Salminen, M., Lundström, K., Kiviluoto, T., Savolainen, R., Ulmanen, I., 1994. Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters. *Eur. J. Biochem.* 223, 1049-1059.
- Tenhunen**, J., Ulmanen, I., 1993. Production of rat soluble and membrane-bound catechol O-methyltransferase forms from bifunctional mRNAs. *Biochem. J.* 296, 595-600.
- Terenius**, L., 1973. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 32, 317–320.
- Tilgmann**, C., Kalkkinen, N., 1991. Purification and partial sequence analysis of the soluble catechol-O-methyltransferase from human placenta: comparison to the rat liver enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 174, 995-1002.
- Trescot**, A.M., Datta, S., Lee, M., Hansen, H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician* 11, 133-53.
- Ulmanen**, I., Peränen, J., Tenhunen, J., Tilgmann, C., Karhunen, T., Panula, P., Bernasconi, L., Aubry J.P., Lundström, K., 1997. Expression and intracellular localization of catechol O-methyltransferase in transfected mammalian cells. *Eur. J. Biochem.* 243, 452-459.
- Unterwald**, E.M., Rubinfeld, J.M., Kreek, M.J., 1994. Repeated cocaine administration upregulates kappa and mu, but not delta, opioid receptors. *NeuroReport* 5, 1613– 1616.
- Vallone**, D., Picetti, R., Borrelli, E., 2000. Structure and function of dopamine receptors. *Neurosci Biobehav Rev.* 24, 125-132.
- Vidgren**, J., Svensson, L.A., Liljas, A., 1994. Crystal structure of catechol O-methyltransferase. *Nature* 368, 354-358.
- Voorn**, P., Roest, G., Groenewegen, H.J., 1987. Increase of enkephalin and decrease of substance P immunoreactivity in the dorsal and ventral striatum of the rat after midbrain 6-hydroxydopamine lesions. *Brain. Res.* 412, 391-396.
- Waldhoer**, M., Bartlett, S.E., Whistler, J.L., 2004. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 953-990.

- Weinshilboun**, R.M., Raymond, F.A., 1977. Inheritance of low erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in man. *Am. J. Hum. Genet* 29, 125-135.
- Weinshilboun**, R.M., Raymond, F.A., Elveback, L.R., Weidman, W.H., 1974. Correlation of erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity between siblings. *Nature* 252, 490-491.
- Weinshilboun**, R.M., 2006. Pharmacogenomics: catechol O-methyltransferase to thiopurine S-methyltransferase. *Cell. Mol. Neurobiol.* 26, 539-561.
- Welters**, I.D, Fimiani, C., Bilfinger, T.V., Stefano, G.B., 2000. NF $\kappa$ B, nitric oxide and opiate signaling. *Med Hypotheses* 54, 263-268.
- Welters**, I.D., Menzebach A., Goumon Y., Cadet P., Menges, T., Hughes, T.K., Hempelmann G., Stefano, G.B., 2000. Morphine inhibits NF-kappaB nuclear binding in human neutrophils and monocytes by a nitric oxide-dependent mechanism. *Anesthesiology* 92, 1677-1684.
- Williams**, J.T., Christie, M.J., Manzoni, O., 2001. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol. Rev.* 81, 299–343.
- Wolozin**, B.L., Pasternak, G.W., 1981. Classification of multiple morphine and enkephalin binding sites in the central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 6181–6185.
- Xie**, T., Ho, S.L., Ramsden, D., 1999. Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription. *Mol Pharmacol.* 56, 31-8.
- Young**, W.S. III, Bonner, T.I., Brann, M.R., 1986. Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 9827-9831.
- Zadina**, J.E., Hackler, L., Ge, L.J., Kastin, A.J., 1997. A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* 386, 499-502.
- Zeng**, B.-Y., Jolkkonen, J., Jenner, P., Marsden, C.D., 1995. Chronic l-dopa treatment differentially regulates gene expression of glutamate decarboxylase, preproenkephalin and preprotachykinin in the striatum of 6-hydroxydopamine-lesioned rat. *Neuroscience* 66, 19–28.
- Zhu**, W., 2008. CYP2D6: a key enzyme in morphine synthesis in animals. *Med Sci Monit.* 14, SC15-8.
- Zhu**, W., Cadet, P., Baggerman, G., Mantione, K.J., Stefano, G.B., 2005. Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation. *J Immunol.* 175, 7357-62.
- Zhu**, W., Ma, Y., Cadet, P., Yu, D., Bilfinger, T.V., Bianchi, E., Stefano, G.B., 2003. Presence of reticuline in rat brain: a pathway for morphine biosynthesis. *Brain Res Mol Brain Res.* 117, 83-90.
- Zhu**, W., Stefano, G.B., 2009 Comparative aspects of endogenous morphine synthesis and signaling in animals. *Ann N Y Acad Sci.* 1163, 330-9.

**Zubieta**, J.K., Gorelick, D.A., Stauffer, R., Ravert, H.T., Dannals, R.F., Frost, J.J., 1996. Increased mu opioid receptor binding detected by PET in cocaine-dependent men is associated with cocaine craving. *Nat Med.* 2, 1225-1229.

**Zubieta**, J.-K., Heitzeg, M.M., Smith, Y.R., Bueller, J.A., Xu, K., Xu, Y., Koeppe, R.A., Stohler, C.S., Goldmann, D., 2003. COMT val<sup>158</sup>met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor. *Science* 299, 1240-1243.

**Danksagung:**

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. A. Berthele, meinem Doktorvater, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, Erarbeitung und Überlassung des Themas sowie kompetente wissenschaftliche Betreuung. Hierdurch wurde mein Interesse für Neurologie und Neurobiologie gefestigt.

Danke zudem Dr. M. Kowarik und Dr. S. Platzler für die intensive Betreuung, Beratung sowie Motivation an der „Bench“. Es hat Spaß gemacht.

Zuletzt danke ich vor allem meinem Mann, meiner Familie und meinen Freunden, die mich motiviert und unterstützt haben.