

Neurologische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Conrad)

**Der Einfluss des
COMT Val^{108/158}Met Polymorphismus
auf das μ -Opioidrezeptorsystem
im Gehirn des Menschen**

Burkard Johannes Jochim

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. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. A. Berthele
2. Univ.-Prof. Dr. Dr. Th. R. Tölle

Die Dissertation wurde am 12.10.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 21.03.2007 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das dopaminerge System.....	1
1.1.1 Dopaminrezeptoren.....	2
1.1.2 Die Catechol-O-Methyltransferase	5
1.2 Das μ -opioiderge System	7
1.2.1 Opioidrezeptoren	7
1.2.2 Endogene Opioide.....	10
1.3 Der Einfluss des <i>COMT Val^{108/158}Met</i> -Polymorphismus auf das <i>in vivo</i> - Bindungsverhalten an μ -Opioidrezeptoren	12
1.3.1 Einfluss auf das basale <i>binding potential</i> unter Ruhebedingungen	12
1.3.2 Einfluss auf die μ -Opioidrezeptoraktivierung nach Schmerzreiz	13
1.3.3 Limitationen der <i>in vivo</i> -Studie von Zubietta et al.....	14
2. Aufgabenstellung	16
3. Material und Methoden	17
3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials	17
3.1.1 Gewinnung des Gehirngewebes.....	17
3.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten.....	17
3.2 Genotypisierung der Gewebe	18
3.2.1 Isolation von DNA.....	18
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	19
3.3 ³ H-DAMGO-Liganden-Binding	20
3.3.1 Durchführung des ³ H-DAMGO-Liganden-Bindings	20
3.4 DAMGO-stimulierter [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassay.....	20
3.4.1 Durchführung des Agonisten-stimulierten [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassays	22
3.5 In situ Hybridisierung	22
3.5.1 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide.....	23
3.5.2 Fixierung der Gewebeschnitte	24
3.5.3 Ablauf der <i>In situ</i> Hybridisierung.....	24
3.6 Durchführung der Autoradiographien.....	25
3.6.1 Exposition und Entwicklung.....	25
3.6.2 ³⁵ S- und ³³ P-spezifische Kalibration.....	25
3.6.3 Auswertung der Film-Autoradiographien	26
3.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	27
4. Ergebnisse	28
4.1 ³ H- Liganden Binding.....	28
4.1.1 Cerebraler Cortex	28
4.1.2 Basalganglien	29
4.1.3 Thalamus.....	29
4.1.4 Cerebellum.....	30
4.2 DAMGO-stimulierter [³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassay.....	33
4.2.1 Cerebraler Cortex	33
4.2.2 Basalganglien	34

4.2.3	Thalamus.....	34
4.2.4	Cerebellum.....	34
4.3	PPE mRNA-Expression	37
4.3.1	Cerebraler Cortex	37
4.3.2	Basalganglien	37
4.3.3	Thalamus.....	37
4.3.4	Cerebellum.....	38
5.	Diskussion.....	41
5.1	Differenzierte Regulation von μ -Opioidrezeptor- und PPE-Expression durch den <i>COMT Val^{108/158}Met</i> -Polymorphismus	41
5.1.1	Auswirkungen des <i>COMT Val^{108/158}Met</i> -Polymorphismus auf das μ - Opioidrezeptorsystem	41
5.1.2	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur	41
5.1.3	Mögliche Mechanismen dieser Regulation.....	42
5.2	Pharmakologische und pathophysiologische Implikationen	49
5.2.1	Mögliche Effekte auf die supraspinale Nozizeption.....	50
5.2.2	Suchterkrankungen	55
5.2.3	Einfluss auf die Therapie des M. Parkinson	58
6.	Zusammenfassung	62
7.	Anhang.....	I
7.1	Chemikalien und Reagenzien.....	I
7.1.1	Anfertigen der Gefrierschnitte / Histologie.....	I
7.1.2	Isolation der DNA	I
7.1.3	PCR	I
7.1.4	³ H-DAMGO-Liganden-Binding.....	I
7.1.5	[³⁵ S]GTP γ S-Bindungsassay	II
7.1.6	<i>In situ</i> Hybridisierung	II
7.1.7	Oligonukleotide und Primer.....	II
7.1.8	Autoradiografie	III
7.2	Literaturverzeichnis.....	IV

Abkürzungsverzeichnis

[³ H]DAMGO	tritiertes (D-Ala ₂ ,N-Me-Phe ₄ ,Gly ₅ -ol)-Enkephalin
°C	Grad Celsius
¹¹ C	Kohlenstoff-11
¹⁴ C	Kohlenstoff-14
³³ P	Phosphor-33
³⁵ S	Schwefel-35
³ H	Tritium
5-HT	Serotonin
6-OHDA	6-Hydroxydopamin
A	Adenosin
AC	Adenylatcyclase
ACC	anteriöer cingulärer Cortex
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
AdoMet	S-Adenosyl-L-Methionin
Ala	Alanin
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
BA	Brodmann Area
bp	Basenpaare
BP	<i>binding potential</i>
C	Cytidin
Ca	Calcium
CA	Kalifornien
CaMK	Calcium/Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
Cau	Nucleus caudatus
Cb	Kleinhirn
Ci	Curie
Co	Kobalt
CO ₂	Kohlendioxid
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>CRE binding protein</i>
D	Dopamin
Da	Dalton
DAMGO	(D-Ala ₂ ,N-Me-Phe ₄ ,Gly ₅ -ol)-Enkephalin
DAT	Dopamintransporter
dATP	Desoxy-Adenosin-Triphosphat

dATP α S	Desoxy-Adenosin-5'-(α -Thio-)Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
df	Freiheitsgrad
DLPFC	dorsolateraler präfrontaler Cortex
DLPT	dorsolaterales pontines Tegmentum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat-Gemisch
DOP	δ -Opioidrezeptor
DTT	Dithiotreitol
EGTA	Ethylen-Glycol-Bis-Tetraessigsäure
Fa.	Firma
G	Guanosin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GC	<i>granular cell layer</i>
GDP	Guanosin-Diphosphat
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GPi	Globus pallidus, pars interna
GTP	Guanosin-Triphosphat
GTP γ S	Guanosin-5'-(γ -Thio-)Triphosphat
IASP	International association for the study of pain
Ile	Isoleucin
ISH	<i>In situ</i> Hybridisierung
K	Kalium
K _{ir}	<i>inward rectifying potassium channel</i>
kbp	kilo Basenpaare
kDa	Kilodalton
K _i	Inhibitorische Bindungskonstante
KOP	κ -Opioidrezeptor
L	Lamina
ld	laterodorsal
L-DOPA	L-Dihydroxyphenylalanin, Levodopa
Leu	Leucin
LID	Levodopa-induzierte Dyskinesien
lv	lateroventral
Lys	Lysin
M	molar
MAO	Monoaminoxidase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase

MB-COMT	membrangebundene Catechol-O-Methyltransferase
MD	Nucleus mediodorsalis thalami
md	mediodorsal
Met	Methionin
MgCl ₂	Magnesium-Chlorid
Min.	Minuten
ML	<i>molecular layer</i>
mmol	millimol
MOP	μ-Opioidrezeptor
MPQ	<i>McGill pain questionnaire</i>
MPTP	1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSN	<i>medium spiny neurons</i>
mv	medioventral
n.s.	nicht signifikant
Na	Natrium
Nac	Nucleus accumbens
Ncl	Nucleus
NIH	National Institute of Health
nM	nanomolar
NOP	Nociceptin-Rezeptor
NSB	<i>non specific binding</i>
PAG	periaquäduktales Höhlengrau
PANAS	<i>positive and negative affectivity scale</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline solution</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pCREB	phosphoryliertes CREB
PET	Positronen Emissions Tomographie
Phe	Phenylalanin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMI	<i>post mortem</i> Intervall
POMC	Proopiomelanocortin
PPE	Präproenkephalin
Pro	Prolin
Put	Putamen
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
RVM	rostroventrale Medulla

S-COMT	lösliche Catechol-O-Methyltransferase
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
Ser	Serin
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SNV	ventraler Anteil der substantia nigra
SSC	<i>standard saline citrate solution</i>
T	Thymidin
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Th	Thalamus
TH	Tyrosinhydroxylase
Thr	Threonin
Trp	Tryptophan
Tyr	Tyrosin
v. Chr.	vor Christus
Val	Valin
VMPFC	ventromedialer präfrontaler Cortex
VTA	<i>ventral tegmental area</i>

1. Einleitung

Die Neurobiologie ist eine moderne Wissenschaft, allerdings mit weit in die Antike reichenden historischen Wurzeln. Zwar sind aus dem alten Ägypten Schilderungen von Kopfverletzungen und chirurgischen Eingriffen am Gehirn überliefert, die eigentliche wissenschaftliche Gehirnforschung hat ihren Ursprung jedoch im antiken Griechenland. Im 6. Jahrhundert v.Chr. beschrieb Alkmaion von Kroton die zentrale Rolle des Gehirns für die menschliche Erkenntnis, ein Konzept, das von Hippokrates weiterentwickelt und verfeinert wurde, allerdings in der Folgezeit immer weniger Beachtung fand, gipfelnd in der kardiozentrischen Theorie des Aristoteles, der dem Gehirn lediglich eine Kühlfunktion für das erhitzte Blut zuschrieb (Oeser 2002).

Der römische Arzt Claudius Galenus betrachtete das Gehirn als eine Drüse, deren sezernierte Flüssigkeit von Kanälen, den Nerven, in die Peripherie des Körpers weitergeleitet würde, eine Vorstellung, die sich bis in das 18. Jahrhundert behauptete.

Im späten 18. Jahrhundert war durch die Arbeiten Galvanis und später von du Bois-Reymond, Müller und Helmholtz entdeckt worden, dass elektrische Signale an der Arbeitsweise des Nervensystems beteiligt sind.

Aber erst der spanische Histologe und Neuroanatom Ramón y Cajal entdeckte Ende des 19. Jahrhunderts mittels histologischer Färbetechniken das Grundelement aller Nervensysteme, das Neuron. Dies war der Grundstein für die Neuronentheorie, derzufolge einzelne Neuronen die elementaren Signalübertragungseinheiten des Nervensystems sind.

Nachdem in den 1920er Jahren von Loewi erstmals gezeigt worden war, dass die Signalübertragung an der Synapse, ein Begriff, der von Sherrington für die spezialisierte Kontaktzone zwischen zwei Neuronen eingeführt worden war, auch auf chemischem Wege durch Transmittersubstanzen erfolgen konnte (Kandel et al. 1996), wurde eine Vielzahl von Neurotransmittersystemen entdeckt, die auf vielfältige Art und Weise miteinander interagieren, um die Funktion des Nervensystems zu gewährleisten.

Zwei solche Systeme sind das dopaminerge und das opioiderge System, deren Interaktionen in jüngster Zeit mehr und mehr in den Focus der Neurowissenschaften geraten. Bislang wurden jedoch in erster Linie die Wirkungen des Opioidsystems auf dopaminerge Neurone untersucht, insbesondere unter dem Gesichtspunkt der Opiatabhängigkeit. Weniger Beachtung fanden dagegen dopaminerge Effekte auf das Opioidsystem.

1.1 Das dopaminerge System

Erst in den späten 1950er Jahren wurde Dopamin als eigenständiger Neurotransmitter erkannt, als der Nachweis der uneinheitlichen Verteilung von Dopamin im Gehirn eine spezifische funktionelle Rolle nahe legte. Verstärktes Interesse für Dopamin erwuchs aus der Erkenntnis, dass dieser Neurotransmitter eine wichtige Rolle in der Pathogenese und der Pharmakotherapie

einiger Hirnerkrankungen spielt, wie beispielsweise beim Morbus Parkinson oder der Schizophrenie.

1.1.1 Dopaminrezeptoren

Auf der Suche nach den Wirkungsorten von Dopamin, nach Dopaminrezeptoren also, führten anatomische, elektrophysiologische und pharmakologische Studien in den 1970er Jahren zum Konzept von zwei Dopaminrezeptortypen, Dopamin D1- und D2-Rezeptoren, die sich durch unterschiedliche biochemische und pharmakologische Eigenschaften auszeichnen und unterschiedliche physiologische Funktionen vermitteln (Kebabian und Calne 1979). Mit molekularbiologischen Methoden konnten bis heute fünf verschiedene Dopaminrezeptoren (D1-D5) nachgewiesen werden, die ihrerseits wieder in diversen Varianten auftreten können. Pharmakologisch und funktionell lassen sich D1 mit D5 sowie D2 mit D3 und D4 zu je einer Gruppe, in der angloamerikanischen Terminologie als „D1-like“ und „D2-like“ bezeichnet, zusammenfassen, die jeweils die gleichen Signalwege teilen und im Gehirn unterschiedlich verteilt sind (Sibley und Monsma 1992; Civelli et al. 1993; Jarvie und Caron 1993; Strange 1996).

1.1.1.1 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen

Die Analyse der Aminosäuresequenz der Dopaminrezeptortypen zeigt große Übereinstimmungen, wobei die Rezeptoren einer Familie (D1-bzw. D2-Familie) die größte Homologie aufweisen (Jarvie und Caron 1993). Alle Dopaminrezeptoren sind metabotrope, d.h. G-(Guanin-Nukleotid-bindende) Protein-gekoppelte Rezeptoren. Sie besitzen sieben hydrophobe, transmembranäre Helices, die durch extra- bzw. intrazelluläre hydrophile Aminosäureschleifen (*loops*) miteinander verbunden sind. Diese sieben transmembranären Domänen des Rezeptors bilden gemeinsam eine Bindungstasche für den Liganden. Die Rezeptoren der D1-Familie besitzen einen langen Carboxyterminus und eine kurze dritte intrazelluläre Schleife, wohingegen den Rezeptoren der D2-Familie eine längere dritte intrazelluläre Schleife und ein kurzer Carboxyterminus zu eigen sind. Diese Unterschiede stellen eine strukturelle Basis für die Unterscheidung in zwei Rezeptorfamilien dar und sind vermutlich von funktioneller Signifikanz bezüglich der Spezifität der Rezeptor-G-Protein-Interaktion (Giros et al. 1989; Fishburn et al 1993).

Nach Aktivierung durch einen Agonisten übermitteln die Rezeptoren ihre Signale mit Hilfe der heterotrimeren G-Proteine ins Zellinnere. Jedes dieser Proteine ist aus drei Untereinheiten, α , β und γ , aufgebaut, von welchen wiederum mehrere Subtypen existieren. Die Klassifizierung der G-Proteine erfolgt auf Basis der α -Untereinheit, unter anderem in G_s , $G_{i/o}$, G_q und G_{olf} . Im Ruhezustand binden G-Proteine GDP, das nach Interaktion mit einem aktivierten Rezeptor gegen GTP ausgetauscht wird, woraufhin das Protein in seine α und $\beta\gamma$ -Untereinheiten dissoziiert. Sowohl α als auch $\beta\gamma$ können unabhängig voneinander intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren (*second messengers*). Die Spaltung von GTP durch die GTPase-Aktivität der α -

Untereinheit führt zur Inaktivierung und Reassoziierung von α mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit. Danach kann der Zyklus erneut gestartet werden, sofern noch aktivierte Rezeptoren vorhanden sind.

Die Stimulation von Rezeptoren der D1-Familie führt zu einer G_s-vermittelten Aktivierung der Adenylatcyclase und somit zu einem Anstieg des intrazellulären *second messengers* cAMP, während die Aktivierung von Rezeptoren der D2-Familie über G_{i/o}-Proteine zur Hemmung der Adenylatcyclase, zur Aktivierung von Kalium-Kanälen oder zur Hemmung von Calcium-Kanälen führen kann (Vallar und Meldolesi 1989).

1.1.1.2 Funktion und Verteilung

Die einzelnen Dopaminrezeptorsubtypen zeigen teilweise deutliche Unterschiede in ihrer zellulären und subzellulären Verteilung und scheinen daher, trotz ähnlicher pharmakologischer Eigenschaften, funktionell unterschiedliche Aufgaben zu erfüllen. Der D1-Rezeptor ist am weitesten verbreitet und wird in höherer Dichte exprimiert als alle anderen Dopaminrezeptoren. Tabelle 1.1 fasst das Vorkommen und die funktionelle Bedeutung von Dopaminrezeptoren zusammen.

Obwohl der Anteil dopaminergener Neurone im Gehirn relativ gering ist (unter 1/100 000), spielen Dopaminneurone und -rezeptoren eine erhebliche Rolle in der Regulation verschiedener Gehirnfunktionen (Girault und Greengard 2004). Allerdings ist die funktionelle Rolle von D1- und D2-Rezeptoren erheblich besser untersucht als diejenige von D3-, D4- und D5-Rezeptoren.

Am bekanntesten sind die Dopaminwirkungen im extrapyramidal-motorischen System. Die synergistische Interaktion zwischen D1- und D2-Rezeptoren im Striatum stimuliert die motorische Aktivität, während die Erregung präsynaptischer D2- und postsynaptischer D3-Rezeptoren (im Ncl. accumbens) die Motorik hemmt.

Im mesolimbischen System spielt die Freisetzung von Dopamin eine Rolle bei der Aktivierung des Belohnungs- und Verstärkungssystems durch Pharmaka und andere Substanzen mit Suchtpotential. Auch hier scheint ein Synergismus zwischen D1- und D2-Rezeptor-vermittelten Effekten vorzuliegen.

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von D1- und D2-Rezeptoren im Hippocampus den Erwerb und die Erinnerung von Gedächtnisinhalten verbessert.

Die Stimulation oder Blockade von D2-Rezeptoren im Hypophysenvorderlappen hemmt bzw. steigert die Sekretion von Prolactin.

Die Stimulation von D2-Rezeptoren in der Chemorezeptorentriggerzone, der Area postrema, führt zu Nausea und Emesis, ein Effekt, der durch Neuroleptika antagonisierbar ist (Missale et al. 1998).

Rezeptor-subtyp	Lokalisation	Funktion	Rezeptor-subtyp	Lokalisation	Funktion
D1	Cortex, Striatum, Thalamus, Hypothalamus, mesolimbisches System, Hippocampus	Aktivierung extrapyramidaler Motorik, Stimulation des zentralen „Belohnungssystems“, stimulierende Effekte auf Lern- und Gedächtnisleistungen	D2	Striatum, Substantia nigra, Hypothalamus, mesolimbisches System, Hippocampus, Cortex (niedrig)	Aktivierung extrapyramidaler Motorik, Stimulation des zentralen „Belohnungssystems“ stimulierende Effekte auf Lern- und Gedächtnisleistungen
				Area postrema	Nausea, Emesis
				Hypophyse	Hemmung der Sekretion von Prolactin und α -MSH
D5	Hippocampus, Thalamus, Cortex, Striatum, lat. Corpus mamillare (überall niedrig)	Stimulierende Effekte auf Lernen und Gedächtnis (?)	D3	Mesolimbisches System, Substantia nigra, Cerebellum, Cortex (niedrig)	Hemmung der Lokomotorik, Wirkung auf Emotion und Cognition (?), Modulation des „Belohnungssystems“ (?)
			D4	Frontaler Cortex, Hippocampus, Amygdala, Hypothalamus, Mesencephalon (überall niedrig), Retina	Wirkung auf Emotion und Kognition (?)

Tabelle 1.1 Vorkommen und funktionelle Bedeutung von Dopaminrezeptoren (nach Missale et al. 1998)

1.1.2 Die Catechol-O-Methyltransferase

Die rasche Inaktivierung des Transmitters im synaptischen Spalt ist Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Erregbarkeit der postsynaptischen Membran für den durch nachfolgende Aktionspotentiale freigesetzten Überträgerstoff. Im dopaminergen System tragen, wie auch beim noradrenergen Effektorsystem, mehrere Mechanismen zur Inaktivierung des Transmitters bei. Der größte Teil wird über einen speziellen Dopamintransporter (DAT) präsynaptisch wieder aufgenommen (*re-uptake*) und dort entweder in Speichervesikel reinkorporiert oder enzymatisch durch die Monoaminoxidase (MAO) abgebaut. Auf der postsynaptischen Seite enthalten die Effektorzellen Catechol-O-Methyltransferase (COMT), die Dopamin zu unwirksamen Verbindungen abbaut.

1.1.2.1 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen

In den späten 1950er Jahren beschrieben Axelrod und Kollegen erstmals die enzymatisch katalysierte Methylierung von Katecholaminen und anderen Katecholen (Axelrod et al. 1958). Ihnen gelang auch die Isolierung und Charakterisierung des dafür verantwortlichen Enzyms, der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) (Axelrod und Tomchick, 1958). Die COMT katalysiert dabei den Transfer einer Methylgruppe von S-Adenosyl-L-Methionin (AdoMet) zu einer Hydroxylgruppe des Katechol-Substrates, wodurch dieses in eine inaktive Form überführt wird (Guldberg und Marsden, 1975). Nachdem der pharmakologische Einsatz von ersten COMT-Inhibitoren zunächst wenig erfolgreich war, erwuchs Ende der 1980er Jahre durch die Entwicklung neuer, potenter und selektiver Inhibitoren neues Interesse, infolgedessen die Strukturen von zwei Isoformen und das für das Enzym kodierende Gen charakterisiert werden konnten (Männistö und Kaakkola 1999).

Für die Catechol-O-Methyltransferase existiert ein Gen, das für beide Isoformen des Enzyms, die lösliche Form (S-COMT) und die membran-gebundene Form (MB-COMT), kodiert (Kastner et al. 1994). Dieses Gen konnte auf Chromosom 22 im Band q11.2 lokalisiert werden. Es besteht aus sechs Exons, von denen die ersten beiden nicht kodieren. Zwei auf Exon 3 gelegene Promotoren regulieren die Expression von zwei Transkripten, einem längeren mit 1,5kbp und einem kürzeren mit 1,3kbp. Das längere Transkript kann für beide Isoformen kodieren, während das kürzere nur für das S-COMT-Polypeptid kodieren kann (Tenhunen et al. 1993, 1994).

In den meisten menschlichen Organen finden sich beide Transkripte, wobei allerdings im Gehirn nur das längere Transkript vorkommt. Western-Blot-Analysen haben gezeigt, dass in den meisten Geweben der Gehalt von S-COMT überwiegt, mit Ausnahme des Gehirns, wo 70% der COMT in der membrangebundenen Form (MB-COMT) vorliegen (Pihlavisto et al. 2002, Männistö und Kaakkola 1999).

Die S-COMT setzt sich aus 221 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 24,4kDa, die MB-COMT hingegen besteht aus 271 Aminosäuren, das Molekulargewicht beträgt

30,0 kDa. 20 dieser 50 zusätzlichen Aminosäuren bei der membrangebundenen Form fungieren als hydrophobe Membranverankerungen (Tai et al. 2002, Männistö und Kaakkola 1999).

1.1.2.2 Funktion und Verteilung der COMT

Zu den physiologischen Substraten der COMT gehören die Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin, deren hydroxylierte Metabolite, L-Dopa, Katecholöstrogene, Ascorbinsäure und dihydroxyindolische Abbauprodukte von Melanin. Die Funktion der COMT ist im Allgemeinen die Elimination aktiver oder toxischer Katechole und einiger anderer hydroxylierter Metabolite (Zhu et al. 1994). Ebenso fungiert sie als enzymatisch detoxifizierende Barriere zwischen Blut und anderen Geweben, z.B. Darmmukosa oder Gehirn. Vermutlich ist die COMT auch an der Regulation und Modulation des dopaminergen Tonus in Gehirn, Niere und Gastrointestinaltrakt beteiligt.

Bei den Säugetieren ist die COMT in sehr vielen Organen nachweisbar. Im Gehirn konnte durch immunhistologische Studien nachgewiesen werden, dass es in präsynaptischen dopaminergen Neuronen keine COMT-Aktivität gibt, wohingegen COMT in postsynaptischen Neuronen sowie in Gliazellen lokalisiert wurde (Karhunen et al. 1994, 1995; Kastner et al. 1994). Elektronenmikroskopische Untersuchungen legen eine Lokalisation in den Synapsen und Kapillaren umgebenden Fortsätzen von Astrozyten nahe, des Weiteren in postsynaptischen dendritischen *Spines* (Karhunen et al. 1995). Die höchste Immunreaktivität im Gehirn wurde in den periventriculären Ependymzellen und im Plexus choroideus gefunden (Kaplan et al. 1979, 1981; Karhunen et al. 1994).

Außerhalb des Gehirns ist zudem COMT in zahlreichen Organen nachgewiesen worden. Die höchste COMT-Aktivität wurde in der Leber gefunden, gefolgt von Niere und Gastrointestinaltrakt. Im Pankreas findet sich COMT in β - und δ -, nicht jedoch in α -Zellen (Karhunen et al. 1994, Tai et al. 2002). Auch in Lunge (DeSanti 1998), Auge (Karhunen et al. 1994) und der Haut wurde COMT entdeckt (Männistö und Kaakkola 1999). Interessanterweise enthalten dabei maligne entartete Melanocyten beide Isoformen des Enzyms, was man sich therapeutisch nutzbar machen zu können erhofft (Shibata et al. 1993; Smit et al. 1994). Auch andere Tumoren, insbesondere das Phäochromozytom, weisen einen hohen COMT-Gehalt auf (Männistö und Kaakkola 1999).

1.1.2.3 Der COMT Val^{108/158}Met-Polymorphismus

Die Enzymaktivität der COMT in menschlichen Geweben zeigt ein genetisch polymorphes Verhalten mit drei verschiedenen Aktivitätsniveaus, niedrige (COMT^{LL}), intermediäre (COMT^{LH}) und hohe Aktivität (COMT^{HH}) (Lachmann et al. 1996). Dieser Polymorphismus, der durch autosomal-codominante Allele verursacht wird, führt zu Unterschieden in der Enzymaktivität um das 3-4-fache in menschlichen Erythrozyten und Leberzellen. Es konnte gezeigt werden, dass die niedrige Enzymaktivität mit einer Thermolabilität des Enzyms assoziiert ist (Scanlon et al. 1979; Spielman und Weinshilboum 1981; Boudikova et al. 1990; Männistö und Kaakkola 1999). Mitte der 1990er Jahre konnte der molekulare Hintergrund dieses Phänomens aufgeklärt werden: Die

Substitution der Aminosäure Valin (mit dem codierenden Codon GTG) an Position 108 der S-COMT beziehungsweise 158 der MB-COMT durch Methionin (ATG) wird durch den Austausch von Guanin gegen Adenosin im *Codon108/158* verursacht, einen sogenannten „*single nucleotide polymorphism*“ (SNP). Das ist äußerst bemerkenswert, da hier gezeigt werden konnte, dass der Austausch einer einzigen Aminosäure erhebliche funktionelle Auswirkungen auf die Enzymaktivität hat. Der *Met/Met*-Genotyp entspricht dabei der COMT^{LL}-Form, also niedriger Enzymaktivität, der *Val/Val*-Genotyp der COMT^{HH}, also hoher Aktivität, während die heterozygote *Met/Val*-Variante mit einer intermediären Enzymaktivität vergesellschaftet ist (Lachmann et al. 1996). Dieser Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf die Enzymaktivität konnte auch für aus menschlicher Großhirnrinde isolierte MB-COMT gezeigt werden (Chen et al 2004).

Die drei Formen sind in der mitteleuropäischen Bevölkerung annähernd gleichverteilt. Allerdings sind ethnische Unterschiede hinsichtlich der Verteilung berichtet worden. Die Häufigkeit des *Met/Met*-Genotyp ist in der kenianischen Bevölkerung niedriger als in der mitteleuropäischen oder der südwest-asiatischen Bevölkerung, Afroamerikaner haben eine höhere COMT-Aktivität als weiße Amerikaner (Palmatier et al. 1999). Interessant ist auch, dass der *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus bislang nur beim Menschen, nicht jedoch bei anderen Primaten nachgewiesen werden konnte (Shield et al. 2004).

Angemerkt sei, dass neben dem mit der unterschiedlichen Enzymaktivität (Shield et al. 2004) assoziierten Polymorphismus im *Codon108/158* noch andere Mutationen im *COMT*-Gen beschrieben sind, deren funktionelle Relevanz jedoch nach derzeitigem Kenntnisstand unklar sind (Lachmann et al. 1996). Da es nur ein *COMT*-Gen gibt, ist davon auszugehen, dass dieser Zusammenhang für alle Gewebe gilt (Männistö und Kaakkola 1999).

1.2 Das μ -opioiderge System

1.2.1 Opioidrezeptoren

Opium, der getrocknete Milchsaft des Schlafmohnes *Papaver somniferum*, wurde jahrhundertlang sowohl als schmerzlindernde als auch als berauschende Substanz verwendet. Die analgetische Wirkung des Opiums ist vor allem auf das Alkaloid Morphin zurückzuführen, welches 1806 erstmals von Sertürner isoliert wurde. Allerdings besitzt Morphin neben seiner hervorragenden analgetischen Wirkung auch zum Teil erhebliche Nebenwirkungen, die einem bedenkenlosen klinischen Einsatz entgegenstehen, beispielsweise Atemdepression, Sedierung, Obstipation und insbesondere ein starkes Suchtpotenzial. Auf der Suche nach einer in der Analgesie dem Morphin ähnlichen Substanz, welche zumindest nebenwirkungsärmer sein sollte, gelang der Firma Bayer mit Diacetylmorphin erstmals die Herstellung eines synthetischen Morphinderivates. Nach dem großen Erfolg des Aspirins, eines acetylierten Derivates der Salicylsäure, glaubte man durch die Acetylierung des Morphins ein hochpotentes Analgetikum ohne Suchtpotenzial gefunden zu haben, was sich alsbald als ein Irrtum herausstellte:

Diacetylmorphin, bekannter unter der Bezeichnung Heroin, barg ein noch wesentlich stärkeres Abhängigkeitspotential in sich als Morphin (Friderichs und Strassburger 2002).

In der Folgezeit wurden nach der Formulierung eines allgemeinen Strukturkonzeptes für Bindungsstellen, die die Wirkung von Morphin und seinen Derivaten, den Opioiden, vermitteln (Beckett und Casey 1954), durch zahlreiche pharmakologische Studien mehrere Opioidrezeptortypen identifiziert, nämlich die μ - (MOP), κ - (KOP) und δ - (DOP) Opioidrezeptoren (Pert und Snyder 1973; Simon et al. 1973; Terenius 1973; Martin et al. 1976; Lord et al. 1977). Mit Beginn der 1990er Jahre wurden zudem im Zuge der Klonierung dieser drei Opioidrezeptortypen (Kieffer et al. 1992; Evans et al. 1992; Y. Chen et al. 1993; Meng et al. 1993; Minami et al. 1993; Thompson et al. 1993; Wang et al. 1993; Yasuda et al. 1993) durch Sequenzanalogueuntersuchungen die Nociceptinrezeptoren (NOP) entdeckt (Wang JB et al. 1994, Lachowicz JE et al. 1994, Wick MJ et al. 1994, Buzow JR et al. 1994, Mollereau C et al. 1994, Fukuda K et al. 1994)

1.2.1.1 Biochemische und molekularbiologische Grundlagen

Bei allen Opioidrezeptoren handelt es sich um heptahelikale, Pertussis-Toxin-sensitive, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), die mit sieben hydrophoben transmembranären Domänen in die Zellmembran eingebunden sind.

Intrazellulär sind die Opioidrezeptoren an inhibitorische Guanin-Nukleotid-bindende Proteine, sogenannte $G_{i/o}$ -Proteine gekoppelt (Connor und Christie 1999).

Als weitere Signalmechanismen werden für präsynaptische Opioidrezeptoren eine Inhibition der Neurotransmitter-Ausschüttung von z.B. Glutamat, GABA, Dopamin, Noradrenalin und Acetylcholin und die Modulation des intrazellulären Spiegels an Ca^{2+} -Ionen durch Beeinflussung spannungsabhängiger Calciumkanäle angesehen, während die durch die Öffnung von K_{ir}^{+} -Kanälen induzierte Hyperpolarisation auch für postsynaptische Opioidrezeptoren gilt (Johnson und Lambert 2002). Durch diese Mechanismen ist die physiologische Funktion der Opioidrezeptoren zu erklären, durch prä- und postsynaptische Hemmung die Erregungsübertragung abzuschwächen und in nachgeschalteten Neuronen die Transmitterfreisetzung herabzusetzen (Friderichs und Strassburger 2002). Kontrovers diskutiert werden derzeit weitere Transduktionsmechanismen, wie beispielsweise die Aktivierung der Phospholipasen A und C, die Aktivierung der MAPK-Kaskade, die Modulation von Wachstumsfaktoren und eine direkte Hemmwirkung auf die Transmitterexozytose.

Abbildung 1.1 veranschaulicht die Signalmechanismen der Opioidrezeptoren.

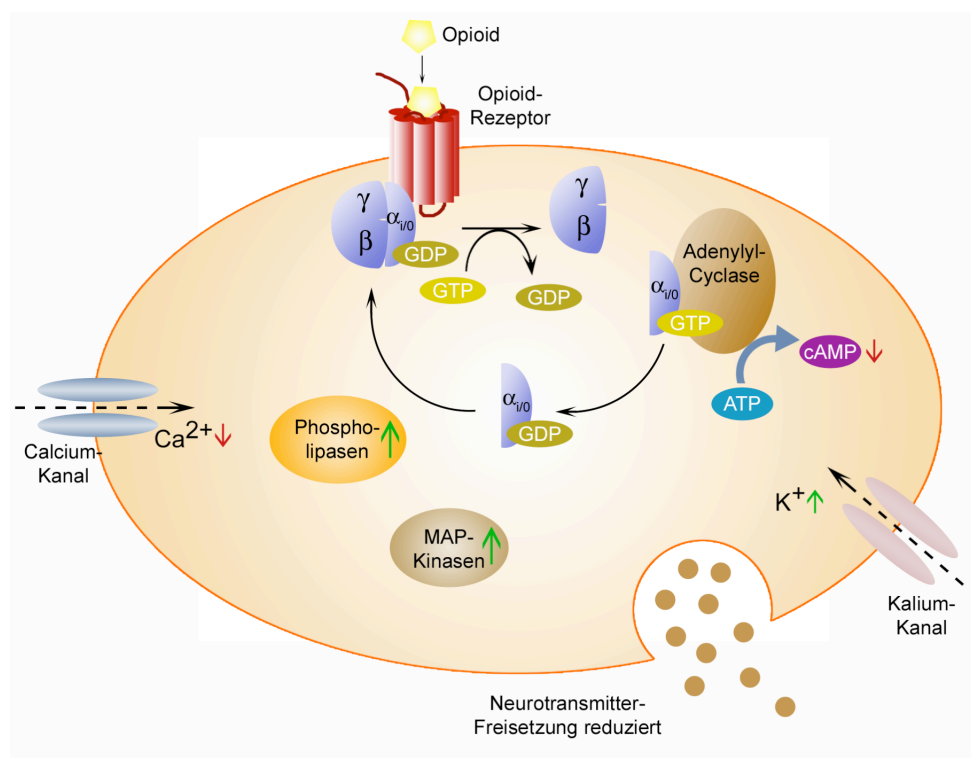


Abb. 1.1 Intrazelluläre Effektorsysteme, die durch Bindung von Opioiden an μ -, δ - und κ -Opioidrezeptoren beeinflusst werden. (modifiziert nach Friderichs und Strassburger 2002).

1.2.1.2 μ -Opioidrezeptorsubtypen

Funktionelle Tests sowie Bindungsstudien ergaben Hinweise auf die Existenz von Unterformen von Opioidrezeptortypen. So postulierten Pasternak et al. auf Grund von pharmakologischen Tests und Verhaltensbeobachtungen die Existenz von zwei μ -Rezeptorsubtypen. Die μ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxazon und Naloxonazin vermochten selektiv die Morphin-vermittelte Analgesie sowohl supraspinal als auch systemisch zu blockieren, hatten aber keinen Effekt auf die Morphin-induzierte Atemdepression und Inhibition der gastrointestinalen Motilität. Demzufolge wurde dem Naloxonazin-sensitiven μ_1 -Rezeptor die Mediierung der supraspinalen Antinozizeption zugeschrieben, wohingegen der nicht durch Naloxonazin zu blockierende μ_2 -Rezeptor für Atemdepression und die gastrointestinalen Effekte der Opiode verantwortlich gemacht wurde (Pasternak 1986, 2001a, Abbadie und Pasternak 2003). Die Existenz dieser pharmakologisch definierten μ -Rezeptorsubtypen konnte allerdings bisher auf mRNA-Ebene nicht nachvollzogen werden. Bislang ist noch unklar, ob und wie sich die Subtypen von Opioidrezeptoren über das Bindungsverhalten hinaus nach Form und Struktur beschreiben lassen. Als mögliches Substrat für strukturelle und funktionelle Unterschiede werden unter anderem Splice-Varianten (Pasternak 2001b), posttranslationale Veränderungen (Minami und Satoh, 1995) oder die Kopplung an unterschiedliche Transduktionsmechanismen (Connor und Christie, 1999) diskutiert.

1.2.1.3 Funktion und Verteilung

Abhängig von der Lokalisation auf exzitatorischen oder inhibitorischen Neuronen führt die Aktivierung von Opioidrezeptoren zu einer Inhibition beziehungsweise Disinhibition. Neben der sensorischen Wahrnehmung, insbesondere der Nozizeption, spielen die Opioidrezeptoren auch eine Rolle bei einer Reihe von Funktionen und Verhaltensweisen, wie zum Beispiel bei Belohnungs- und Suchtmechanismen im ZNS, bei der neuroendokrinen Regulation, bei der motorischen Kontrolle sowie bei Lernen und Gedächtnis (Minami und Satoh 1995). Veränderungen des Opioidrezeptorsystems oder des Systems der endogenen Opioiden werden im Zusammenhang mit der Pathophysiologie beispielsweise des Morbus Parkinson, des Tourette-Syndroms, des Morbus Alzheimer, Erkrankungen des schizophrener Formenkreises sowie affektiver Psychosen diskutiert (Burn et al. 1995, Henry et al. 1996, Piccini et al. 1997, Sandyk 1985, Haber et al. 1986, Barg et al. 1993, Hiller et al. 1987, Berger et al. 1981, Gabilondo et al. 1995).

Der klinische Einsatz von Opioiden allerdings beschränkt sich bislang weitestgehend auf die Analgesie.

Bindungsuntersuchungen und funktionellen Tests zufolge wird die analgetische Wirkung der Opioiden sowohl über μ -Opioidrezeptoren als auch über κ - und δ -Opioidrezeptoren vermittelt. Bei den therapeutisch eingesetzten Substanzen überwiegt allerdings die μ -Opioidrezeptor-vermittelte Wirkung, da alle Opioidanalgetika vom Morphin-Wirktyp eine Präferenz für μ -Opioidrezeptoren zeigen. Auch die wesentlichen Nebenwirkungen der Opioidagonisten wie Atemdepression, Obstipation, Euphorie und Abhängigkeit sind μ -Opioidrezeptor-vermittelt, wie an μ -Opioidrezeptor-*knockout*-Mäusen demonstriert werden konnte (Sora et al. 1997, Loh et al. 1998)

1.2.2 Endogene Opioiden

Nachdem im Tierexperiment gezeigt werden konnte, dass Naloxon die durch elektrische Stimulation verschiedener Gehirnregionen induzierte Analgesie aufzuheben vermochte (H. Akil et al., 1972), ein erster physiologischer Hinweis auf die Existenz endogener Liganden für die Opioidrezeptoren also, gelang es dann, zahlreiche endogene Opioiden, sogenannte Endorphine, in unterschiedlichen Organen und Tierarten zu isolieren. Überraschenderweise zeigten sie keine strukturelle Ähnlichkeit mit Morphin, sondern wiesen eine peptidische Struktur auf.

Tabelle 1.2 zeigt eine Übersicht über die wichtigsten heute bekannten Opioidpeptide, ihre Sequenz und die Rezeptorselektivität.

Präkursor	Peptid	Rezeptoraffinität	Aminosäuresequenz
?	Endomorphin 1	MOP	Tyr-Pro-Trp-Phe-amid
?	Endomorphin 2	MOP	Tyr-Pro-Phe-Phe-amid
Proopio- melanocortin	β -Endorphin	MOP=DOP	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met -Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro- Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala- Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Tyr-Lys-Lys-Gly- Glu
Pro-enkephalin	Met-Enkephalin	DOP>MOP	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met
	Leu-Enkephalin	DOP>MOP	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu
Pro-dynorphin	Dynorphin A	KOP>>DOP, MOP	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu -Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys- Trp-Asp-Asn-Gln
	Dynorphin B	KOP>>DOP, MOP	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu -Arg-Arg-Glu-Phe-Lys-Val-Val-Thr
Pro-nociceptin	Nociceptin	NOP	Phe-Gly-Gly-Phe-Thr -Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys- Leu-Ala-Asn-Gln

Tabelle 1.2 Übersicht über ausgewählte humane endogene Opioidpeptide (modifiziert nach Straßburger und Friderichs 2002)

Die beiden erst 1997 von Zadina et al. entdeckten Tetrapeptide Endomorphin-1 und -2 sind hochselektive Liganden für den μ -Opioidrezeptor. Bislang ist noch unklar, ob sie *de novo* synthetisiert werden, oder, wie die übrigen Opioidpeptide, von einem längerkettigen Vorläuferpeptid, einem sogenannten Präkursor, abgespalten werden. Sie unterscheiden sich wie auch das Nociceptin in ihrer Aminosäuresequenz von den übrigen Opioidpeptiden, denen die aminoternale Aminosäuresequenz Tyr-Gly-Gly-Phe-[Met/Leu], das sogenannte Opioid-Motiv, gemein ist.

β -Endorphin, ein Peptid mit 31 Aminosäuren, das eine hohe analgetische Potenz mit langer Wirkdauer aufweist, wird, wie auch das adrenocorticotrope Hormon ACTH, von dem Präkursor Proopiomelanocortin (POMC) abgespalten.

Proenkephalin kodiert als Präkursor für zwei Pentapeptide, Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin, die sich nur in ihrer endständigen Aminosäure unterscheiden, sowie für zwei verlängerte Varianten von Met-Enkephalin, ein Heptapeptid und ein Octapeptid (H. Akil et al. 1998).

Prodynorphin kodiert für fünf unterschiedliche Opioidpeptide verschiedener Länge, die alle mit der Sequenz von Leu-Enkephalin beginnen: Zwei Varianten von Dynorphin A, einmal mit 17 und eine kürzere Variante mit acht Aminosäuren, Dynorphin B, und α - sowie β -Neoendorphin (Corbett et al., 1993).

Die verschiedenen Opiode zeigen hinsichtlich ihrer Affinität gewisse Rezeptorpräferenzen. So weisen die δ -Opioidrezeptoren eine hohe Spezifität für Proenkephalin-Produkte auf, während Prodynorphin-Abkömmlinge hochpotent an κ -Opioidrezeptoren wirken, allerdings binden sie auch an die anderen Opioidrezeptoren, wenn auch mit geringerer Affinität. Der κ -Opioidrezeptor zeigt demnach die größte Selektivität unter den endogenen Liganden mit K_i -Werten von ca. 0,5 nM für Dynorphin A bis zu über 1000 nM für Met-Enkephalin, also einer um den Faktor 1000

höheren Affinität für Dynorphin A (Raynor et al. 1994). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich μ - und δ -Opioidrezeptoren in ihrer Affinität zu den endogenen Liganden mit Ausnahme der Endomorphine, die hochselektiv am μ -Rezeptor binden, nur um den Faktor 10, wobei die meisten dieser endogenen Opioide eine Präferenz für den δ -Rezeptor zeigen (H. Akil et al. 1998). β -Endorphin zeigt in etwa die gleiche Affinität zu δ wie zu μ .

Einen Sonderfall unter den endogenen Opioiden bildet der 1995 von zwei Arbeitsgruppen isolierte endogene Ligand für den Nociceptin-Rezeptor Nociceptin/ Orphanin FQ (Meunier et al. 1995; Reinscheid et al. 1995). Dieser Ligand ist ein Peptid aus 17 Aminosäuren mit großen Ähnlichkeiten zu Dynorphin A, von dem er sich durch das aminoternale Ende unterscheidet: Im Gegensatz zu den anderen Opioidpeptiden weist Nociceptin eine Modifikation des Opioid-Motivs auf. Statt der Sequenz TYR-GLY-GLY-PHE beginnt die Sequenz PHE-GLY-GLY-PHE , weshalb Nociceptin nicht an die klassischen Opioidrezeptoren binden kann. Als Vorläufer des Nociceptin wurde ein Molekül namens Präpronociceptin identifiziert (Nothacker et al. 1996, Pan et al. 1996).

1.3 Der Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf das *in vivo*-Bindungsverhalten an μ -Opioidrezeptoren

In einer Untersuchung mittels Liganden-Positronen-Emissions-Tomographie (Liganden-PET) konnten Zubieta und Kollegen (2003) zeigen, dass der *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp mit Veränderungen in der Funktion von μ -Opioidrezeptoren assoziiert ist.

1.3.1 Einfluss auf das basale *binding potential* unter Ruhebedingungen

Im anterioren Thalamus und ipsilateral im Pulvinar gesunder Probanden unterlag das basale Bindungspotenzial (*binding potential*) von [¹¹C]Carfentanyl, einem selektiven μ -Opioidrezeptor-Agonisten, in Abhängigkeit vom *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp deutlichen Unterschieden. Das *binding potential* war am höchsten bei *COMT Met^{108/158}*-homozygoten, niedriger bei *COMT Val^{108/158}Met*-heterozygoten und am geringsten bei *COMT Val^{108/158}*-homozygoten Probanden; ein ähnlicher Trend konnte, wenn auch nicht statistisch signifikant, für die ventralen Basalganglien (Ncl. accumbens, ventrales Pallidum) und den kontralateralen Pulvinar nachgewiesen werden. In einer Korrelationsanalyse mit der durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp determinierten Enzymaktivität als Kovariable zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt im anterioren Thalamus, im Ncl. accumbens und im ventralen Pallidum (siehe Abb.1.2).

Der Vergleich der Met/Met-Gruppe mit der Heterozygotengruppe ergab im *post hoc*-Test einen signifikanten Anstieg des *binding potentials* in den ventralen Basalganglien, zentriert im ventralen Pallidum und sich nach medial und anterior in den Ncl. accumbens ausdehnend.

Die *binding potential*-Werte der Val/Val-Gruppe hingegen waren signifikant niedriger als die Werte der Heterozygotengruppe im anterioren Thalamus und im Pulvinar, sowie beidseits im Ncl. accumbens und in der Amygdala, auch wenn diese Unterschiede keine statistische Signifikanz erreichten.

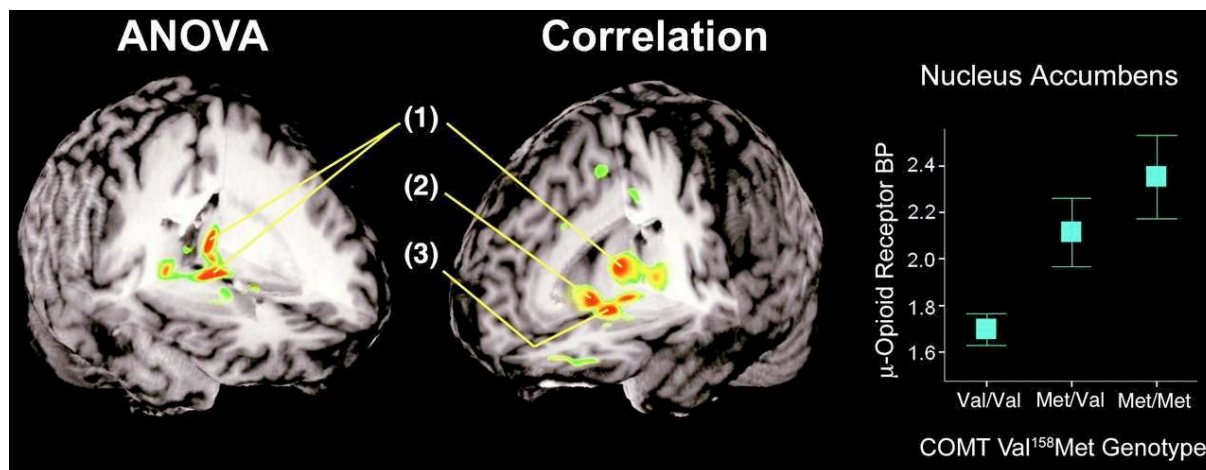


Abb. 1.2 Links: Dreidimensionale Darstellung der signifikanten Unterschiede für den Effekt des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps auf das μ -Opioidrezeptor- *binding potential* (BP) (ANOVA). Signifikante Effekte wurden im anterioren und im posterioren Thalamus (1) beobachtet. Mitte: Dreidimensionale Darstellung der Korrelation zwischen der durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp determinierten Enzymaktivität und dem μ -Opioidrezeptor- *binding potential*. Signifikante Korrelationen ergaben sich ipsilateral zum Schmerzreiz im anterioren Thalamus (1), im Ncl. accumbens (2) und im ventralen Pallidum (3). Rechts: Mittelwert \pm Standardabweichung der BP-Werte im ipsilateralen Ncl. accumbens. Abb. aus Zubieta et al. 2003.

1.3.2 Einfluss auf die μ -Opioidrezeptoraktivierung nach Schmerzreiz

Darüber hinaus konnte in der sogenannten Liganden-Aktivierung nach einem experimentellen Schmerzreiz eine vom *COMT*-Genotyp abhängige Abnahme des Bindungs-Potentials statistisch signifikant im anterioren Thalamus, ipsilateral zum Schmerzreiz im Pulvinar und bilateral in den ventralen Basalganglien (Ncl. accumbens, daran anschließendes ventrales Pallidum und Ncl. subthalamicus) beobachtet werden. Ähnliche Effekte zeigten sich auch ipsilateral in den dorsalen Kernen des Thalamus, beidseits in der Amygdala und kontralateral im anterioren temporalen Cortex, obgleich nicht signifikant. In der Korrelationsanalyse mit der durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp determinierten Enzymaktivität als Kovariable zeigte sich ein statistisch signifikanter Effekt im Pulvinar, im Ncl. accumbens, im ventralen Pallidum und in der Amygdala (vgl. Abb.1.3).

Das Ausmaß dieser Verminderung der Liganden-Bindung war bei *COMT Met^{108/158}*-Homozygoten am geringsten und bei *COMT Val^{108/158}*-Homozygoten am höchsten, bei heterozygoten Probanden lag sie dazwischen. Diese Veränderung des *binding potential* interpretierten die Autoren dieser Studie als die Verdrängung des [¹¹C]Carfentanyl von den μ -Opioidrezeptoren durch endogene Opioiden, die infolge des Schmerzreizes ausgeschüttet worden seien.

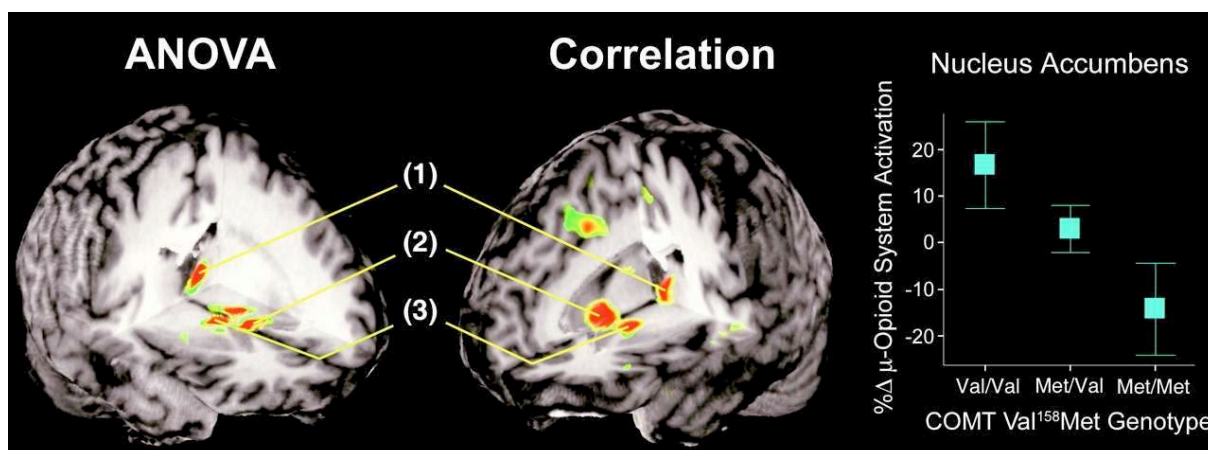


Abb. 1.3 Links: Dreidimensionale Darstellung der signifikanten ANOVA-Ergebnisse für den Effekt des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps auf die μ -Opioidrezeptorsystem-Aktivierung nach Setzen eines Schmerzreizes. Signifikante Effekte wurden im anterioren und im posterioren (Pulvinar) Thalamus (1), im Ncl. accumbens (2), im ventralen Pallidum (3) sowie im Ncl. subthalamicus (bilateral) beobachtet.

Mitte: Dreidimensionale Darstellung der Korrelation zwischen der durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp determinierten Enzymaktivität und der μ -Opioidrezeptorsystem-Aktivierung. Signifikante Korrelationen ergaben sich im posterioren Thalamus (1) (ipsilateral), bilateral im Ncl. accumbens (2) und im ventralen Pallidum (3), kontralateral in Amygdala und dem daran anschließenden temporalen Cortex.

Rechts: Mittelwert \pm Standardabweichung der prozentualen Abweichung der μ -Opioidrezeptorsystem-Aktivierung im ipsilateralen Ncl. accumbens.

Abb. aus Zubieta et al. 2003.

Außerdem ließ sich beobachten, dass Met-homozygote Probanden die geringste Stimulusstärke benötigten, um den experimentellen Schmerzreiz in derselben Stärke zu verspüren wie Heterozygote oder Homozygote für Val.

Bemerkenswert an dieser Studie ist, dass der *COMT*-Genotyp einen sehr starken genetischen Einfluss auf die Opioidrezeptor-Expression haben muss, da die beschriebenen Unterschiede bereits in einer Gesamtgruppe von 18 Probanden nachweisbar waren.

1.3.3 Limitationen der *in vivo*-Studie von Zubieta et al.

Methodisch bedingt unterliegt jedoch die Studie von Zubieta et al. hinsichtlich ihrer Aussagekraft einigen Limitationen.

Die in der PET-Methode bestimmten Unterschiede sind solche im *binding potential* und lassen nur bedingt Rückschlüsse auf die tatsächliche Rezeptorzahl zu. Neben einer tatsächlichen Änderung der Rezeptorzahl kann auch der Besatz der Rezeptoren durch endogene Liganden zu einer Änderung des *binding potential* führen. Die von Zubieta et al. eingesetzten Konzentrationen von [¹¹C]Carfentanyl sind vergleichsweise gering. Unterschiede im *binding potential* zwischen den *COMT*-Genotypen könnten also auch durch unterschiedliche Konzentrationen von endogenen Opioiden, die den exogenen Liganden [¹¹C]Carfentanyl von den Rezeptoren verdrängen, bedingt sein. Des Weiteren können auch Unterschiede in der Rezeptoraffinität zu Liganden Unterschiede im *binding potential* zur Folge haben. Schließlich ist auch ein Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf die Funktionalität der μ -Opioidrezeptoren denkbar.

Umgekehrt gilt für die sogenannte Rezeptoraktivierung, dass die PET-Methode nicht direkt die Ausschüttung endogener Substanzen zeigen kann, sondern nur die relative Differenz zwischen dem PET-Liganden-Binding unter zwei verglichenen Konditionen, beispielsweise ohne und mit Schmerzreiz. Bedenkt man jedoch, dass die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren mit den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotypen möglicherweise variiert, ist die Interpretation der Daten des Liganden-PET hinsichtlich des Rezeptorbesatzes durch endogene Liganden äußerst kompliziert, da Unterschiede im PET-Liganden-Binding nach einem Stimulus auch von der absoluten Rezeptorzahl abhängig sind.

Schlussendlich unterliegt die PET-Methode hinsichtlich der räumlichen Auflösung einer deutlichen Begrenzung. Exakte anatomische Zuordnungen, unabdingbare Grundlage für das genaue Erfassen von neurophysiologischen Vorgängen, sind somit nicht möglich.

2. Aufgabenstellung

In der vorliegenden Arbeit sollen die von Zubieta et al. (2003) beschriebenen Effekte in einem weiteren Kollektiv unter Verwendung anderer Untersuchungsmethoden validiert werden.

Mittels neurochemischer und molekularbiologischer Methoden in humanem *post mortem* Gewebe, das von Menschen ohne bekannte neurologische oder psychiatrische Erkrankung stammt, soll die Hypothese getestet werden, die Gegenwart des *COMT Met*^{108/158}-Allels führe zu einer erhöhten Expression von μ -Opioidrezeptoren im menschlichen Gehirn.

Das Liganden-Binding gilt als sogenannter „pharmakologischer Goldstandard“, da es im Gegensatz zur PET die direkte und voll quantifizierbare Bestimmung der Opioidrezeptor-Bindungsstellen erlaubt. Die hohe Auflösung der Rezeptorautoradiographie erlaubt die exakte neuroanatomische Lokalisation der zu beobachtenden Ergebnisse.

Die Ergebnisse des Liganden-Binding sollen durch die Daten aus einem [³⁵S]GTP γ S-Assay ergänzt werden. Während das Liganden-Binding in erster Linie Rezeptoren mit hoher Affinität (im sogenannten „high affinity state“) zeigt, werden im durch Agonisten stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Binding Rezeptoren mit niedriger Affinität zum Liganden (Rezeptoren im sogenannten „low affinity state“) dargestellt (Childers und Snyder 1980). Des Weiteren ermöglicht der [³⁵S]GTP γ S-Assay Aussagen über die funktionelle Kopplung von Rezeptoren.

Ihrer Studie legten Zubieta und Kollegen die auf Grund vorher publizierter tierexperimenteller Daten erstellte Hypothese zu Grunde, bei *COMT Met*^{108/158}-homozygoten Probanden führe ein durch die niedrigere COMT-Aktivität erhöhter Dopaminspiegel zu einer vermehrten Stimulation von D2-Rezeptoren, was wiederum eine verminderte Expression von Enkephalin und somit eine gegenregulatorisch erhöhte Expression von μ -Opioidrezeptoren zur Folge habe. Umgekehrt sei bei *COMT Val*^{108/158}-homozygoten Probanden durch eine verminderte D2-Rezeptorstimulation ein höherer Enkephalinspiegel für eine verminderte μ -Opioidrezeptorexpression verantwortlich.

val/val: COMT \uparrow \rightarrow Dopamin \downarrow \rightarrow Enkephalin \uparrow \rightarrow MOR \downarrow

met/met: COMT \downarrow \rightarrow Dopamin \uparrow \rightarrow Enkephalin \downarrow \rightarrow MOR \uparrow

Abb. 2.1: Hypothese von Zubieta et al. (2003). Der *COMT Met*^{108/158}-Genotyp führt zu einer niedrigeren COMT-Aktivität und somit zu einem höheren Dopaminspiegel. Dies wiederum führt zu einem niedrigeren Enkephalinspiegel, der eine kompensatorisch vermehrte Expression von μ -Opioidrezeptoren bewirkt.

Um diese Hypothese zu testen, soll mittels einer *in situ* Hybridisierung die Expression von Präproenkephalin (PPE) mRNA, dem Präkursor für das endogene Opioid Enkephalin, untersucht werden.

3. Material und Methoden

3.1 Gewinnung und Aufbereitung des Untersuchungsmaterials

3.1.1 Gewinnung des Gehirngewebes

Im Rahmen von pathologischen beziehungsweise rechtsmedizinischen Sektionen wurden von 17 Patienten Gewebeproben aus verschiedenen Gehirnregionen entnommen. Die Gewebelöcke wurden nach der Präparation möglichst zeitnah auf Trockeneis (festes CO₂) eingefroren und in einen Tiefkühlschrank bei -80°C eingelagert. Bei den Patienten waren weder eine neurologische noch eine psychiatrische Erkrankung bekannt, so hatte auch die neuropathologische Begutachtung keinen pathologischen Befund ergeben. Es handelte sich um sechs weibliche und elf männliche Personen mit einem Durchschnittsalter von 59,3 (29-86) Jahren. Zwischen dem ermittelten Todeszeitpunkt und dem Einfrieren der Gewebe (sog. *post mortem*-Intervall, PMI) sind im Mittel 16,9 (6-29,5) Stunden vergangen.

ID	Genotyp	Geschlecht	Alter zum Todeszeitpunkt	PMI (h)	stoT	Todesursache
1	MM	W	66	7	91	Multiorganversagen bei Sepsis
2	MM	M	62	19,5	91	HerzKreislaufversagen
3	VV	M	56	18,5	90	HerzKreislaufversagen
4	VM	W	81	18	89	Sepsis
5	VM	M	60	29,5	89	HerzKreislaufversagen
6	VM	M	67	6	88	HerzKreislaufversagen
7	VM	M	47	19	71	hämorrhag. Schock
8	VM	W	78	28	71	Myokardinfarkt
9	VM	W	82	18	71	Herzbeutelamponade
10	VM	M	61	22,5	70	HerzKreislaufversagen
11	VV	W	86	10,5	60	HerzKreislaufversagen
12	MM	M	58	7	55	Ertrinken
13	VM	M	32	23	16	Herzversagen
14	VV	W	49	18,5	15	hämorrhag. Schock
15	MM	M	55	24,5	16	Verkehrsunfall
16	MM	M	29	8	11	Herzversagen
17	MM	M	39	10	8	hämorrhag. Schock
Mittelwert ± Standardabweichung			59,3±16,8	16,9±7,5	58,9±32,4	

Tabelle 3.1 Übersicht über die biographischen Daten des verwendeten Untersuchungsmaterials:
 Abk.: 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°C.

3.1.2 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die in den tiefgefrorenen Gewebelöcken enthaltenen Hirnstrukturen wurden zunächst makroskopisch unter Zuhilfenahme des neuroanatomischen Atlas von Nieuwenhuys et al. (1980) näher identifiziert. Anschließend wurden die einzelnen Gewebelöcke in einem Kryostaten

(Frigocut, Fa.Reichert-Jung) bei -25°C in anatomisch-coronarer Schnittebene aufgeblokt, angeschnitten und nach Erreichen einer glatten Schnittebene in der Position feinadjustiert.

Zuvor mit 96% Ethanol gereinigte und heißluftsterilisierte Objektträger wurden mit 0,01% Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet. Auf die so vorbereiteten Objektträger wurden dann Gefrierschnitte von $20\mu\text{m}$ Dicke aufgenommen. Im Einzelnen wurden so von jedem Gewebeblock bis zu 100 Schnitte angefertigt, die jeweils den frontalen Cortex (Brodmann Area 10), das Striatum (Nucleus Caudatus, Putamen und Nucleus Accumbens), den mittleren Thalamus beziehungsweise neocerebellären Cortex enthielten.

Nach einer etwa halbstündigen Trocknungszeit bei Raumtemperatur wurden die Gewebeschnitte in luftdicht schließenden Plastikdosen bei -80°C eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung beziehungsweise Fixation eingelagert.

Nach jeweils 20 wie eben geschildert einzulagernden Schnitten wurde zudem ein zusätzlicher Schnitt zur histologischen Beurteilung angefertigt, der nicht eingefroren, sondern luftgetrocknet und später mit Thioninblau nach Nissl gefärbt wurde.

Des Weiteren wurden nach der Anfertigung jeder Schnittserie ein jeweils 500 mg schweres Stück temporales Cortexgewebe homogenisiert und die darin enthaltene DNA isoliert.

3.2 Genotypisierung der Gewebe

3.2.1 Isolation von DNA

Die Isolation von DNA aus den einzelnen Gehirnen erfolgte nach dem PUREGENE® DNA Isolation Kit – Protokoll der Firma Gentra Systems.

- 1) Zu 400-500 mg gefrorenem Hirngewebe werden 18ml Cell Lysis-Lösung (Gentra) gegeben und sofort kräftig gemischt
- 2) Homogenisieren dieser Suspension von Hand für ca. 2 Minuten
- 3) Inkubation des Lysates bei 65°C für 15-60 Minuten
- 4) Abkühlen der Proben auf Zimmertemperatur
- 5) Zugabe von 6ml "Protein Precipitation"- Lösung und kräftiges Schütteln für 20 Sekunden
- 6) Zentrifugation mit 2000g 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 2000g für 5 Minuten. Am Boden des Zentrifugenröhrchens ist nun ein zartes DNA-Pellet zu sehen.
- 10) Verwerfen des Überstandes und Waschen des Pellets mit 18ml 70% Ethanol
- 11) Zentrifugation mit 2000g für 1 Minute und Verwerfen des Überstandes
- 12) Trocknen der Pellets bei Zimmertemperatur für 15 Minuten
- 13) Lösen der DNA in 1ml TRIS-EDTA-Puffer durch wiederholtes Mischen und Inkubation für 1 Stunde bei 65°C

14) Lagerung der Isolate bei 2-8°C

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

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 H₂O_{PCRgrade}

5.0 µl PCR-Puffer (10x)

1.5 µl MgCl₂ (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. H₂O_{PCRgrade} als Negativ-Kontrolle) in 48,0 µl PCR-Mastermix.

3) Inkubation im PCR-Block mit folgendem Programmablauf:

i) Aufschmelzen bei 94°C für 5 Min.

ii) 36 Zyklen mit 54°C

iii) Elongation des Produkts bei 72°C für 10 Min.

4) Kühlung 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.

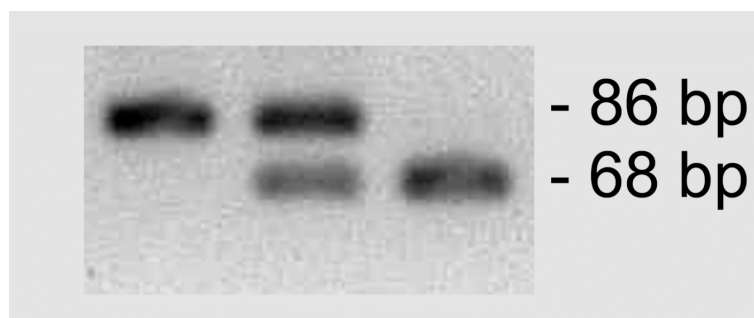


Abb. 3.1. Gelelektrophorese. Zu sehen sind exemplarisch die drei *COMT* Val^{108/158}Met-Genotypen. Links Val/Val, in der Mitte Val/Met, rechts Met/Met.

3.3 ³H-DAMGO-Liganden-Binding

Mit dieser Methode kann durch die Bindung eines tritiierten Liganden die Rezeptorverteilung in Gewebeschnitten dargestellt werden. Für die μ -Opioidrezeptoren wurde in dieser Studie der selektive μ -Opioidrezeptor-Agonist (D-Ala₂,N-Me-Phe₄,Gly₅-ol)-Enkephalin (DAMGO) verwendet. Die für eine annähernde Sättigung der μ -Opioid-Bindungsstellen nötige DAMGO-Konzentration wurde aus der Literatur (Mathieu-Kia et al. 2001) übernommen und in Vorversuchen mit Schnitten aus dem frontalen Cortex überprüft. Eine annähernd sättigende Konzentration erlaubt eine sehr gute Abschätzung aller Bindungsstellen (B_{\max}).

3.3.1 Durchführung des ³H-DAMGO-Liganden-Bindings

Das ³H-DAMGO-Liganden-Binding beginnt mit einem Präinkubationsschritt, bei dem die Rehydrierung des Gewebes und die Auswaschung von endogenen Liganden aus dem Gewebe erfolgt. Im zweiten Schritt, der Inkubation, kommt es zur Bindung des mit ³H markierten Liganden an die zu untersuchenden Rezeptoren. Um die unspezifische Bindung des tritiierten Liganden am Gewebe zu bestimmen, wird in einem zweiten Satz von Gefrierschnitten, die anatomisch unmittelbar an die ersten Schnitte anschließen, ³H-DAMGO durch den Einsatz des hochpotenten Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon aus der Rezeptorbindung verdrängt:

- 1) Auftauen und Trocknen der Gefrierschnitte bei 25°C für 30 Minuten
- 2) Präinkubation in Assaypuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4)) bei 25°C für 20 Minuten
- 3) Inkubation mit 4,2 nM ³H-DAMGO (spezifische Aktivität 42,4 Ci/mmol) mit (unspezifische Bindung) und ohne (spezifische Liganden-Bindung) den Zusatz von 10 μ M Naloxon in Assaypuffer bei 25°C für 60 Minuten
- 4) Zweimaliges Waschen der Schnitte in 50 mM TRIS-Puffer für 3 Minuten bei 4°C
- 5) Trocknen der Schnitte im Luftstrom bei Raumtemperatur

3.4 DAMGO-stimulierter [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay

Mit dieser Methode kann die Aktivierung G $\alpha_{i/o}$ -Protein-gekoppelter Rezeptoren durch den entsprechenden Agonisten in Gewebeschnitten dargestellt werden. Für die μ -Opioidrezeptoren wurde hier der für den μ -Opioidrezeptor selektive Agonist (D-Ala₂,N-Me-Phe₄,Gly₅-ol)-Enkephalin (DAMGO) verwendet.

Im Unterschied zu Rezeptorbindungsstudien, die allein die membranständige Expression des Rezeptor-Proteins aufzeigen, kann mit dieser Methode nachgewiesen und quantifiziert werden, ob es sich um einen funktionell aktiven Rezeptor handelt, der an eine intrazelluläre Signalkaskade gekoppelt ist.

Der hier verwendete [³⁵S]Guanylyl-5'-(γ S)-triphosphat- ([³⁵S]GTP γ S-) Assay wurde ursprünglich als sensitive Methode zur Untersuchung der Rezeptorinteraktion mit G-Proteinen in Membranpräparationen entwickelt (Hilf et al. 1989; Traynor und Nahorski 1995). Diese Methode

basiert darauf, dass die α -Untereinheiten in der inaktiven Form des Rezeptors eine höhere Affinität zu GDP im Vergleich zu GTP aufweisen.

Aktiviert ein Agonist einen $G_{\alpha i/o}$ -gekoppelten Rezeptor, so verringert sich die Affinität der α -Untereinheit für GDP zugunsten von GTP. Infolgedessen kommt es zur Abspaltung von α -GTP von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit, welche jeweils intrazelluläre Effekte auslösen können. Die Wirkung des α -GTP wird durch GTPase-katalysierte Hydrolyse zu α -GDP terminiert, das wiederum zur Rekonstitution des an einen Rezeptor gebundenen G-Proteins dient.

Beim $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assay wird anstelle von GTP nicht hydrolysierbares $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ im Überschuss eingesetzt, das nach Stimulation des Rezeptors das freigesetzte α -Protein und somit dessen Wiederanlagerung an den Rezeptor blockiert. Durch Messung der gebundenen Radioaktivität kann so der rezeptorvermittelte, agonisteninduzierte Umsatz an den G-Proteinen bestimmt werden.

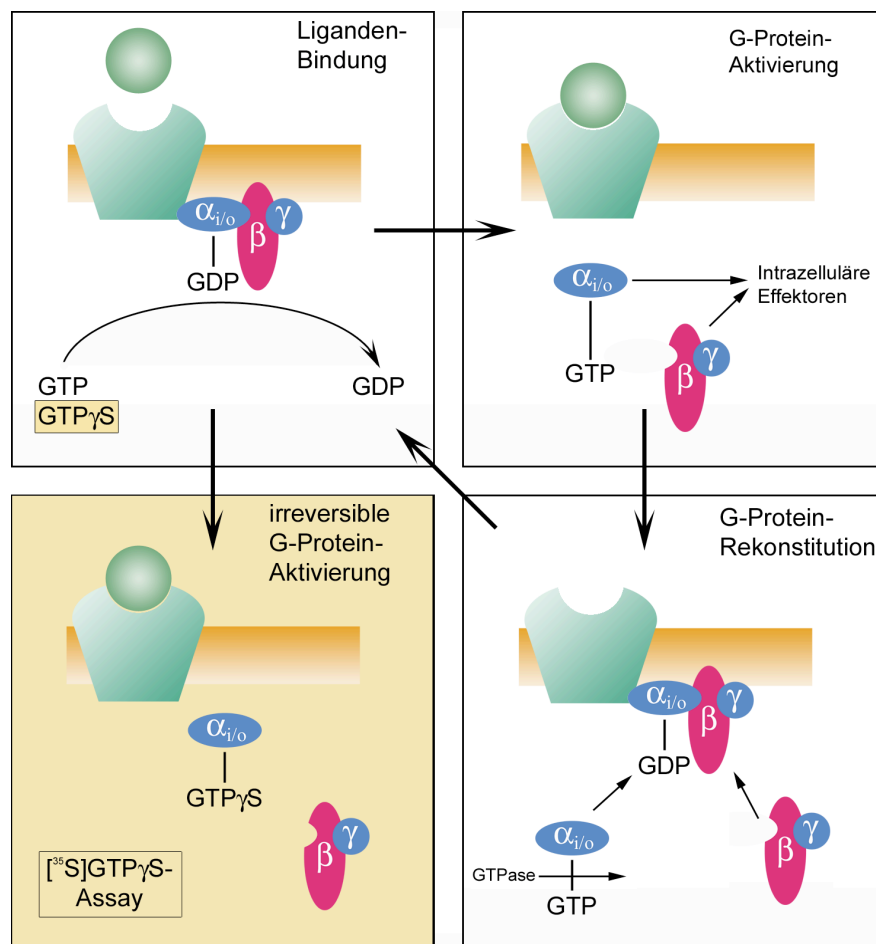


Abb. 3.2. Dargestellt ist die Aktivierung eines G-Proteins nach Stimulation des Rezeptors unter physiologischen Bedingungen und unter den Bedingungen des $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assays (gelb unterlegt). (modifiziert nach Platzer 2005)

Diese Methode wurde von Laura J. Sim zur Anwendung auf histologischen Schnitten adaptiert (Sim et al. 1995), weshalb die Darstellung und Quantifizierung eines intrazellulären Signaltransduktionsweges in Gewebeschnitten möglich ist. Die Durchführbarkeit dieser Methode an humanem *post mortem* Hirngewebe konnte bisher für 5-HT₁-, Cannabinoid-, GABA_B- und

Opioidrezeptoren belegt werden (Dupuis et al. 1999; Rodriguz-Puertas et al. 2000; Platzer et al. 2000, Platzer 2005).

3.4.1 Durchführung des Agonisten-stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassays

Der [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay beginnt mit zwei Prä-Inkubationsschritten. Im ersten Schritt erfolgt die Rehydrierung des Gewebes und die Abspaltung und Auswaschung von endogenen Liganden von den Opioidrezeptoren. Im zweiten Schritt werden durch GDP im Puffer alle G $\alpha_{i/0}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren in den Schnitten in einen stabilen und aktivierbaren Zustand überführt, wonach sie mit der Inkubation mit dem Agonisten DAMGO stimuliert werden können und es zur Anlagerung von [³⁵S]GTP γ S an die G $\alpha_{i/0}$ -Proteine der aktivierbaren Rezeptoren kommt. Da der Basalumsatz der G $\alpha_{i/0}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren unter den Assay-Bedingungen relativ hoch ist, wird dieser ebenfalls ermittelt.

In einem weiteren Ansatz wird die unspezifische Bindung (Non Specific Binding, NSB) von radioaktivem ³⁵S am Gewebe durch Verdrängung von [³⁵S]GTP γ S unter Zugabe von nicht-radioaktivem GTP γ S bestimmt.

- 1) Auftauen und Trocknen der Gefrierschnitte an der Raumluft für 30 Minuten.
- 2) Präinkubation in Assay-Puffer (50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl, pH 7.4) für 10 Minuten bei 25°C.
- 3) Präinkubation in 2,0mM GDP/Assay-Puffer für 15 Minuten bei 25°C.
- 4) Inkubation mit 0,04nM [³⁵S]GTP γ S in 2,0mM GDP/Assay-Puffer und 10 μ M DAMGO (Agonisten-Stimulation) beziehungsweise keinem weiteren Zusatz (Basalumsatz) oder 10 μ M GTP γ S (unspezifische Bindung) für 120 Minuten bei 25°C.
- 5) Zweimaliges Waschen der Schnitte in Tris-Puffer (50mM, pH 7,4) für 30 Sekunden bei 4°C. Kurzes Abspülen in H₂O_{dest} und Trocknen der Schnitte im Luftstrom bei Raumtemperatur.

3.5 In situ Hybridisierung

Zum Nachweis von mRNA stehen mit dem Northern Blotting, der *in situ* Hybridisierung (ISH) und der RT-PCR drei Verfahren zur Verfügung. Zwar gelten Northern-Blotting und RT-PCR hinsichtlich ihrer Spezifität, letztere auch bezüglich ihrer Sensitivität, als überlegen. Die *in situ* Hybridisierung (ISH) bietet jedoch insofern einen großen Vorteil, als sich Nukleinsäuren und somit die mRNA-Expression in einem anatomisch-histologischen Kontext nachweisen lassen.

Wie alle mRNA-Nachweisverfahren beruht auch die ISH auf der Bildung von Doppelsträngen komplementärer Abschnitte von Nukleinsäuren. Bei der ISH allerdings wird eine markierte einzelsträngige Nukleinsäuresequenz, auch Probe oder Sonde genannt, zur Hybridisation in einem Hybridisierungspuffer auf das zu untersuchende Gewebe aufgebracht und inkubiert. Dort bildet die Sonde mit der nachzuweisenden komplementären mRNA-Sequenz der Zelle durch Basenpaarung doppelsträngige Hybride, die durch eine radioaktive oder nicht-radioaktive Markierung der Sonde sichtbar gemacht werden können. In einem anschließenden Waschschrift

werden die nicht oder unspezifisch gebundene Sonde entfernt und anschließend die Hybride detektiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine ISH mit Oligonukleotid-Sonden und radioaktiver Markierung angewendet, die unter den zur Verfügung stehenden Markierungsmethoden die höchste Sensitivität bietet.

Nach der eigentlichen Hybridisierung werden durch Waschen der Gewebsschnitte unspezifisch oder unvollständig hybridisierte Oligonukleotide entfernt. Dies erfolgt in Waschlösungen aus SSC; zunächst mit einer mäßig über jener der Hybridisierung liegenden Temperatur, gefolgt von Waschungen bei Raumtemperatur und absteigender Ionenstärke (sog. stringentes Waschen).

Hybridisierungstemperatur und -dauer sowie das Verhältnis von Signal zu Hintergrund wurden im Vorfeld dieser Untersuchungen durch Vorversuche optimiert (Platzer 2005, Berthele et al. 2003). Dabei ließen sich durch Zusatz von DTT (10mM) zum Hybridisierungsansatz, einer Hybridisierungstemperatur von 42°C und einer Hybridisierungszeit von 48 Stunden die besten Ergebnisse erzielen.

Um eine unspezifische Bindung der Oligonukleotid-Sonde im Gewebe auszuschließen, zur sogenannten Negativ-Kontrolle also, sind zwei Verfahren gebräuchlich. Zum einen werden parallel zur eigentlichen Hybridisierung Gewebeschnitte mit RNase vorbehandelt, oder aber dem Hybridisierungsansatz wird neben den markierten Oligonukleotiden noch unmarkierte Sonde im mehrfachen Überschuss zugegeben. Da ein Arbeiten mit RNase die erhebliche Gefahr der Kreuzkontamination und somit einer Degradation der RNA auch in den eigentlich zu untersuchenden Schnitten in sich birgt, wurde bei den für diese Untersuchung durchgeführten Kontrollexperimenten ein 100facher Überschuss an unmarkierten Oligonukleotiden eingesetzt. Dadurch entfällt zudem die Optimierung des RNase-Verdaus, bei dem in unterschiedlichen Geweben ein gleichmäßiger und vollständiger Abbau der RNA gewährleistet sein muss (Berthele et al. 1999).

Beim Einsatz unmarkierter Sonde treten bei der spezifischen Hybridbildung mit zellulärer Ziel-mRNA unmarkierte und markierte Oligonukleotide in Konkurrenz. Auf Grund der Konzentrationsverhältnisse wird die markierte Sonde durch die unmarkierte Sonde aus ihrer Bindung an die Ziel-mRNA verdrängt und kann so nach dem Waschschrift der ISH kein Signal mehr geben. Als sogenannter Hintergrund zeigt sich bei diesen Kontrollexperimenten nur eine geringe unspezifische Anlagerung von Oligonukleotid-Sonde an Gewebbestandteile (überwiegend nicht-neuronal), welche durch die Poly-[³³P]dATP α P -Markierung der Sonden bedingt ist.

3.5.1 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotid-Proben werden mittels Terminaler Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) und [³³P]dATP α P (spezifische Aktivität ca. 1000 Ci/mmol) radioaktiv 3'-endmarkiert. Bei Verwendung des mitgelieferten arsenhaltigen Reaktionspuffers und in

Anwesenheit von Co^{2+} -Ionen bildete die TdT fast ausschließlich eine Kette aus ^{33}P dATP α P am 3'-Ende der Oligonukleotide. Die Markierungsreaktion wurde wie folgt durchgeführt:

1. 8,0 μl TdT-Puffer (5x),
2,4 μl CoCl_2 (25 mM),
22,6 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$,
2,0 μl des jeweiligen Oligonukleotids (0,36 pmol/ μl)
3,0 μl ^{33}P dATP α P
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 zweiminütigen 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 wurden in 3,0 ml eines Szintillations-Cocktails in einem β -Counter (Fa. Wallac NEN) gemessen. Bei den hier markierten Sonden konnten spezifische Aktivitäten von 0,68-1,22 $\times 10^6$ cpm/ μl erzielt werden.

3.5.2 Fixierung der Gewebeschnitte

Die für die ISH vorgesehenen Kryostatschnitte der einzelnen Gewebsregionen werden bei Raumtemperatur für 30 Min. aufgetaut, getrocknet, in Paraformaldehyd fixiert und in Ethanol dehydriert und gelagert:

- 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 darauffolgend in 96% Ethanol bei Raumtemperatur für jeweils 5 Min.
- 4) Bis zur Hybridisierung werden die Schnitte in 96% Ethanol bei 4°C gelagert.

3.5.3 Ablauf der *In situ* Hybridisierung

Die markierte Oligonukleotid-Probe wird im Verhältnis 1:100 mit Hybridisierungspuffer verdünnt. Dieser Hybridisierungsansatz wird nach Zugabe von DTT-Lösung (Endkonzentration: 10mM) ausgiebig gemischt. Die Ansätze zur Durchführung der Konrollexperimente (zur Bestimmung unspezifischer Signale, s.o.) enthalten zusätzlich noch das jeweilige unmarkierte Oligonukleotid (0,72 pmol/100 μl Ansatz).

Die Oligonukleotidsonde wurde komplementär zu den Basen 464-503 der veröffentlichten Sequenz der humanen PPEmRNA-Sequenz gewählt (Genebank deposit NM_006211).

- 1) Auf die Objektträger von unterschiedlicher Größe (je nach Gewebsregion) werden 9,0 µl/cm² des Hybridisierungsansatzes pipettiert. Die aufgebrauchte Lösung wird durch Auflage von passenden Parafilmstreifen verteilt. Diese verbleiben während der Hybridisierung als Abdeckung auf den Schnitten.
- 2) Die Objektträger werden in Petrischalen gelegt. In diesen befinden sich zusätzlich feuchte Papierknäuel (getränkt mit einer 50% Formamid / 4x SSC Lösung), die das Eintrocknen der Schnitte verhindern.
- 3) Hybridisierung für 48 Stunden bei 42°C in einem Umluftofen.
- 4) Abziehen der Parafilmstreifen und Waschen der Schnitte:
 - i) in 1x SSC für 30 Min. bei 56°C (konstant temperiert im Wasserbad),
 - ii) in 1x SSC für 3 Min. bei Raumtemperatur,
 - iii) in 0,1x SSC 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.

Trocknen der Schnitte für etwa 30 Min. bei Raumtemperatur.

3.6 Durchführung der Autoradiographien

3.6.1 Exposition und Entwicklung

Die getrockneten Gewebeschnitte werden auf vorgeschrittenen Pappen mit Klebeband fixiert und zusammen mit ³H-Polymer-Standards bekannter Radioaktivität für das Liganden-Binding und ¹⁴C-Standards bekannter Radioaktivität für [³⁵S]GTP_γS-Assay und *in situ* Hybridisierung in Röntgenfilmkassetten gegen Biomax MR®-Film exponiert. Nach 84 Tagen (Liganden-Binding) beziehungsweise 68 Stunden ([³⁵S]GTP_γS-Assay) und 4 Wochen (*in situ* Hybridisierung) werden die Filme bei Raumtemperatur in Entwicklerlösung GBX für 3 Min. entwickelt, kurz (ca. 30 Sek.) in Stoppbad getaucht, für 3 Min. in Fixiererlösung GBX fixiert und in entsalztem Wasser für 5 Min. gewässert, bevor sie zum Trocknen aufgehängt werden.

Für die bei [³⁵S]GTP_γS-Assay und *in situ* Hybridisierung verwendeten ¹⁴C-Standards wird eine gewebsäquivalente und ³⁵S- bzw. ³³P-spezifische Kalibration durchgeführt.

3.6.2 ³⁵S- und ³³P-spezifische Kalibration

Die verwendeten ¹⁴C-Polymer-Standards eignen sich für eine direkte Kalibration von Autoradiographien der Isotope ³⁵S und ³³P nur bedingt, werden jedoch häufig dafür verwendet, da ¹⁴C im Gegensatz zu ³⁵S- und ³³P-Verbindungen eine sehr lange Halbwertszeit (5730 Jahre vs.

87,4 Tage bzw. 25,4 Tage) aufweist und in Polymeren eingeschlossen auch langfristig nicht flüchtig ist.

Hierdurch können mit ^{14}C -Polymer-Standards zwar sehr konstante Werte erzielt werden, diese stehen jedoch in keiner einfachen, d.h. linearen Beziehung zur Aktivität von ^{35}S - bzw. ^{33}P -markierten Proben (Miller et al. 1988; Miller 1991).

Deshalb wurden hier die ^{14}C -Polymer-Standards ihrerseits unter Zuhilfenahme von ^{35}S - bzw. ^{33}P -haltigen Gewebeproben geeicht. Hierzu wurde eine geringe Menge kortikalen Gewebes homogenisiert und je 500 mg hiervon mit 15 verschiedenen Konzentrationen eines ^{35}S - bzw. ^{33}P -haltigen Nukleotids durch intensives Mischen versetzt, in zylindrischer Form eingefroren und im Kryostaten in einer Dicke von 20 μm geschnitten. Die so gewonnenen Schnitte von „*brain paste*“ mit abgestufter ^{35}S - bzw. ^{33}P -Aktivität wurden für die Dauer des [^{35}S]GTP γ S-Assays (68 Stunden) bzw. der ISH (4 Wochen) mit den ^{14}C -Polymer-Standards koexponiert. Der optischen Dichte der Autoradiographie eines jeden Feldes des ^{14}C -Standards kann so eine gewebsäquivalente Aktivität, gültig für ^{35}S - bzw. ^{33}P -Isotop markierte Autoradiografien und o.g. Expositionszeiten zugeordnet werden. Der Vorteil der Methode ist, dass nach einmaliger Kalibration des ^{14}C -Polymer-Standards dieser unter Einhaltung identischer Bedingungen nahezu unbegrenzt als ^{35}S - bzw. ^{33}P -geeichter Standard wieder verwendet werden kann.

3.6.3 Auswertung der Film-Autoradiographien

Die Film-Autoradiographien wurden mit einem Flachbettscanner (MikrotecArtixScan 2700) mit einer Auflösung von 600 dpi, unter Einhaltung konstanter Bedingungen (Helligkeit, Kontrast, schwarz/weiß-Gradation) für alle Einzelscans, eingelesen. Die weitere Auswertung erfolgte mit der Software Object-Image 2.10 (Vischer 2002) auf einem Apple-Computer. Dieses Programm stellt eine Weiterentwicklung der zur Densitometrie von Autoradiographien weit verbreiteten NIH-Image-Software dar.

Zunächst wurden die Grauwerte der ^3H - bzw. ^{14}C -Standards gemessen, den gewebsäquivalenten Aktivitäten zugeordnet und dann die Autoradiogramme mit der Rodbard-Funktion kalibriert.

Für das Liganden-Binding ergaben die anschließenden Messungen der einzelnen anatomischen Regionen direkt die Aktivität bezogen auf das Gewebsgewicht (nCi/g).

Bei der hier dargestellten Auswertung wurden auch die Autoradiographien der Kontrollexperimente ausgemessen. Das, wenn auch niedrige, Signal der unspezifischen Bindung wurde von den Messwerten der anderen Experimente subtrahiert.

Bei der Auswertung der Film-Autoradiographien des [^{35}S]GTP γ S-Bindungsassays wurde die Stimulation als Prozentwert über dem Basalumsatz ausgedrückt. Der durch den Agonisten bedingte Stimulationswert und der Basalwert wurden dabei jeweils um den NSB-Wert korrigiert:

$$\text{St}[\%]=\{[(\text{AgSt-NSB})-(\text{Basal-NSB})]/(\text{Basal-NSB})\}\times 100$$

Formel 1 AgST: die durch den Agonisten bedingte Stimulation; Basal: Basalumsatz; NSB: non specific binding. Alle Werte in nCi/g

Bei der Auswertung der Film-Autoradiographien der ISH wurde die Expression als Aktivität bezogen auf das Gewebegewicht (nCi/g) ausgedrückt.

3.7 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde jeweils eine Analyse der Varianz (*one-way* ANOVA) mit anschließendem *post hoc*-Test unter Verwendung der Statistik-Software SPSS 12.0.1. (SPSS Inc., Chicago IL) durchgeführt. Unter der Annahme, dass der Effekt des *COMT* Genotyps in allen untersuchten Hirnregionen gleich ist, wurde nicht für multiple Vergleiche korrigiert. Als *post hoc*- Testverfahren kam der Bonferroni-Test zur Anwendung.

Um methodische Einflüsse auszuschließen, wurden alle Ergebnisse zusätzlich unter Verwendung des Spearman-Koeffizienten (SPSS 12.0.1., SPSS Inc., Chicago IL) auf eine etwaige Korrelation mit dem Alter zum Todeszeitpunkt, dem *post mortem* Intervall, der Lagerzeit, dem Gewebe-pH und dem Geschlecht getestet. Diese Untersuchung ergab wenige, z.T. inkonsistente Korrelationen zwischen diesen Variablen und den Messwerten der Binding- und mRNA-Untersuchungen. Um diese Kovariablen zu überprüfen, wurde eine schrittweise multiple Regression und, wenn möglich, eine *one-way* ANCOVA durchgeführt (SPSS 12.0.1., SPSS Inc., Chicago IL).

Spearman's correlation coefficient	Alter zum Todeszeitpunkt			<i>Post mortem</i> - Intervall			Lagerzeit		
	DAMGO- binding	GTP γ S- binding	PPE mRNA	DAMGO- binding	GTP γ S- binding	PPE mRNA	DAMGO- binding	GTP γ S- binding	PPE mRNA
BA 10	0.517	0.311	-0.108	-0.163	-0.107	-0.371	0.588	0.538	-0.427
Cau	0.194	0.130	-0.510	0.042	-0.363	-0.219	-0.001	0.411	-0.512
Put	0.196	-0.002	-0.463	-0.022	-0.212	-0.210	0.131	0.283	-0.383
Nac	0.053	0.294	-0.415	-0.167	-0.407	-0.248	0.105	0.606	-0.338
Th MD	-0.300	-0.250	n.d.	-0.211	-0.317	n.d.	-0.248	-0.109	n.d.
Cb-MI	-0.101	-0.110	-0.154	-0.384	-0.086	-0.037	0.012	-0.144	0.033

Spearman's correlation coefficient	Gewebe- pH			Geschlecht		
	DAMGO- binding	GTP γ S- binding	PPE mRNA	DAMGO- binding	GTP γ S- binding	PPE mRNA
BA 10	-0.257	-0.199	0.309	-0,250	0,000	-0,226
Cau	0.169	-0.047	0.779***	-0,151	-0,101	-0,578
Put	0.113	-0.113	0.713*	-0,201	-0,251	-0,553
Nac	0.344	-0.300	0.559	-0,028	0,000	-0,672*
Th MD	0.600	0.396	n.d.	-0,491	-0,426	n.d.
Cb-MI	0.081	0.314	0.306	-0,201	-0,101	-0,503

Tabelle 3.2: Korrelationsanalyse (*Spearman's correlation coefficient*) zwischen den gewebeabhängigen Variablen *Alter zum Todeszeitpunkt*, *post mortem-Intervall*, *Lagerzeit*, *Gewebe- pH* und *Geschlecht* und den Ergebnissen aus [³H]DAMGO-Liganden-Binding, DAMGO-stimuliertem [³⁵S]GTP γ S-binding und der PPE mRNA-*in situ* Hybridisierung: Frontaler Cortex (BA10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac), Ncl. mediodorsalis thalami (Th MD) und cerebellärer Molekularzellschicht (Cb-MI) (*p < 0.05, korrigiert für 5 Vergleiche; **p < 0.05, korrigiert für 85 Vergleiche). Im Thalamus war keine PPE mRNA nachweisbar (n.d.).

4. Ergebnisse

DAMGO-Binding, DAMGO-stimulierte G-Protein-Aktivierung sowie PPE mRNA *in situ* Hybridisierung wurden in verschiedenen Gehirnregionen durchgeführt, deren Auswahl unter dem Gesichtspunkt der Wahrscheinlichkeit eines Einflusses des *COMT Val^{108/158}Met* Polymorphismus auf die μ -Opioidrezeptor-Expression, abgeleitet aus der PET-Studie von Zubieta und Kollegen (2003) erfolgte. Dabei wurden Schnitte aus dem anterioren Corpus striatum mit den Kerngebieten Ncl. caudatus, Ncl. accumbens und Putamen ausgewählt. Repräsentativ für die Großhirnrinde wurden Schnitte aus dem frontalen Cortex (Brodmann Area 10) herangezogen. Der Ncl. mediodorsalis thalami wurde aufgrund seiner zentralen Bedeutung für die Verarbeitung sensorischer Information im sogenannten medialen Schmerzsystem verwendet. Als Region, in der sich nach der Studie von Zubieta et al. (2003) kein Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf das μ -Opioidrezeptorsystem fand, wurde der neocerebelläre Cortex ausgewählt.

4.1 ³H- Liganden Binding

4.1.1 Cerebraler Cortex

In der [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographie waren im frontalen Cortex μ -Opioidrezeptoren über allen sechs Schichten des Cortex in mittlerer Anzahl nachweisbar. Das stärkste Signal zeigte sich in den Laminae II und V, die sich als dunklere Banden abgrenzen ließen (Abb. 4.2). Densitometrisch wurden die Laminae I, II-III, IV-V und VI untersucht. Hierbei ergaben sich nur geringe Unterschiede, wobei Lamina VI das schwächste und Lamina IV/V das stärkste Signal zeigten.

Unter Berücksichtigung des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps war die μ -Opioidrezeptor-Expression in allen sechs Schichten am höchsten für *Val/Met*-Heterozygote. Bei nur geringen Unterschieden zwischen den beiden Homozygoten-Gruppen war das Signal bei *Val*-Homozygoten geringfügig schwächer als bei *Met*-Homozygoten. Allerdings erreichte keiner dieser Unterschiede statistische Signifikanz. Die Signalunterschiede in der Laminierung waren bei *Val/Met*-Heterozygoten am größten.

Obwohl die Korrelationsanalyse eine schwache Korrelation zwischen den gewebeabhängigen Variablen *Alter zum Todeszeitpunkt*, *post mortem-Intervall*, *Lagerzeit*, *Gewebe- pH*, *Geschlecht* und den Ergebnissen aus dem [³H]DAMGO-Liganden-Binding zeigte, konnte in der Regressionsanalyse nur im Cortex ein signifikanter Einfluss einer dieser Kovariablen, nämlich der Lagerzeit, gezeigt werden.

4.1.2 Basalganglien

In allen untersuchten Anteilen des anterioren (d.h. frontal der *commissura anterior*) Striatums ergab die [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographie eine mittelgradige Expression an μ -Opioidrezeptoren.

Unter Berücksichtigung des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps war die μ -Opioidrezeptor-Expression von *Val*-Homozygoten in allen untersuchten Regionen niedriger als die von *Met*-Homozygoten und *Val/Met*-Heterozygoten. Diese Unterschiede waren statistisch signifikant im Nucleus caudatus und im Nucleus accumbens. Interessanterweise ergab das Binding wie für den frontalen Cortex auch in den Basalganglien bei *Val/Met*-heterozygoten Individuen höhere Werte als bei für das *Met*-Allel Homozygoten, wobei aber dieser Unterschied nicht statistisch signifikant war.

Im Ncl. caudatus ergab das Liganden-Binding eine statistisch signifikant niedrigere μ -Opioidrezeptor-Expression bei *Val*-homozygoten Individuen im Vergleich zu der Heterozygoten-Gruppe. Dabei zeigte sich für alle drei Genotypen eine leichte, wenn auch nicht statistisch signifikante Abnahme sowohl von ventral nach dorsal als auch von medial nach lateral.

Auch im Putamen zeigte sich ein ähnliches Bild wie in den Basalganglien insgesamt, jedoch war der Unterschied zwischen den Werten für *Val*-Homozygote und Heterozygote nur im medioventralen Anteil des Putamens statistisch signifikant. Wie im Ncl. caudatus ließ sich auch hier ein, wenn auch nicht statistisch signifikanter, in ventrodorsaler Richtung abnehmender Gradient beobachten.

Für den Ncl. accumbens erfolgte eine Unterteilung in "core" und "shell" analog der von Voorn et al. (1996) vorgeschlagenen, an funktionell-topographischen Gesichtspunkten orientierten Einteilung des Striatums (vgl. Abb. 4.1). In der "core"-Region wurden für alle drei Genotypen signifikant niedrigere Werte gemessen als in der "shell"-Region. In der "core"-Region war das μ -Opioidrezeptor-Binding für *Val*-Homozygote jeweils signifikant niedriger als für Heterozygote und als für *Met*-Homozygote.

In der Regressionsanalyse konnte keine Variable als signifikanter Prädiktor identifiziert werden, was vermutlich auf einen konkurrierenden Effekt einer der Kovariablen zu einem Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps zurückzuführen ist.

4.1.3 Thalamus

Im Ncl. mediodorsalis ergab die [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographie das stärkste Signal aller in dieser Arbeit untersuchten Gehirnregionen. In Bezug auf den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp zeigte sich ein streng linearer Gen-Dosis Effekt für das *Met*-Allel. Die μ -Opioidrezeptor-Expression war am höchsten für *Met*-Homozygote und am niedrigsten für *Val*-Homozygote.

Die Kovarianzanalyse und Regressionsanalyse zeigte, dass der *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp als einzige Variable einen signifikanten Einfluss auf das Rezeptorbinding hat und somit der entscheidende Einflussfaktor ist (siehe Tabelle 4.2).

4.1.4 Cerebellum

Der cerebelläre Cortex zeigt in der [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographie das niedrigste Signal der untersuchten Regionen. Die stärkste Expression innerhalb der Kleinhirnrinde war in der Molekularschicht nachweisbar, während die Körnerzellschicht nur eine sich kaum vom unspezifischen Hintergrundsignal abhebende Signalintensität zeigte.

In der Molekularschicht war die Anzahl der μ -Opioidrezeptoren für *Val*-Homozygote am höchsten und für *Met*-Homozygote am geringsten, wobei diese Unterschiede nur gering und nicht statistisch signifikant waren.

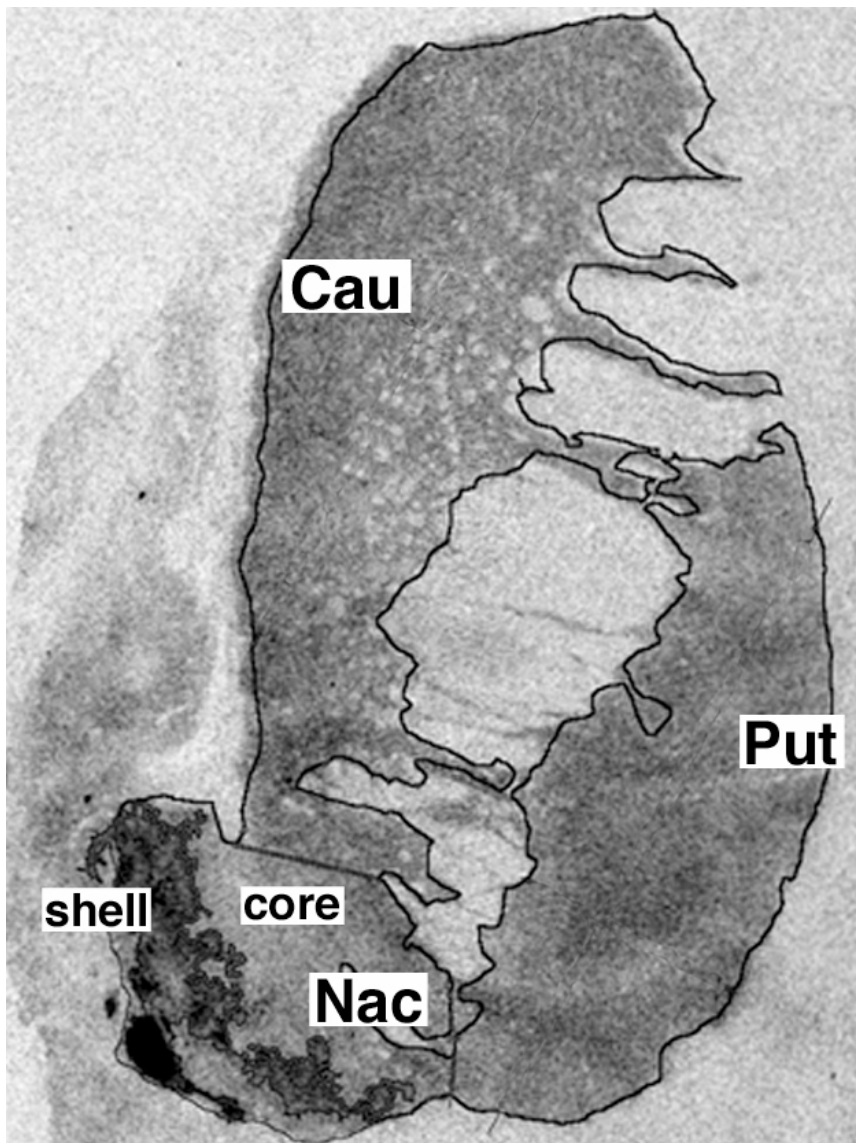


Abb. 4.1 Unterteilung des Striatums in Subregionen
Abkürzungen: Cau: Ncl. Caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. Accumbens.

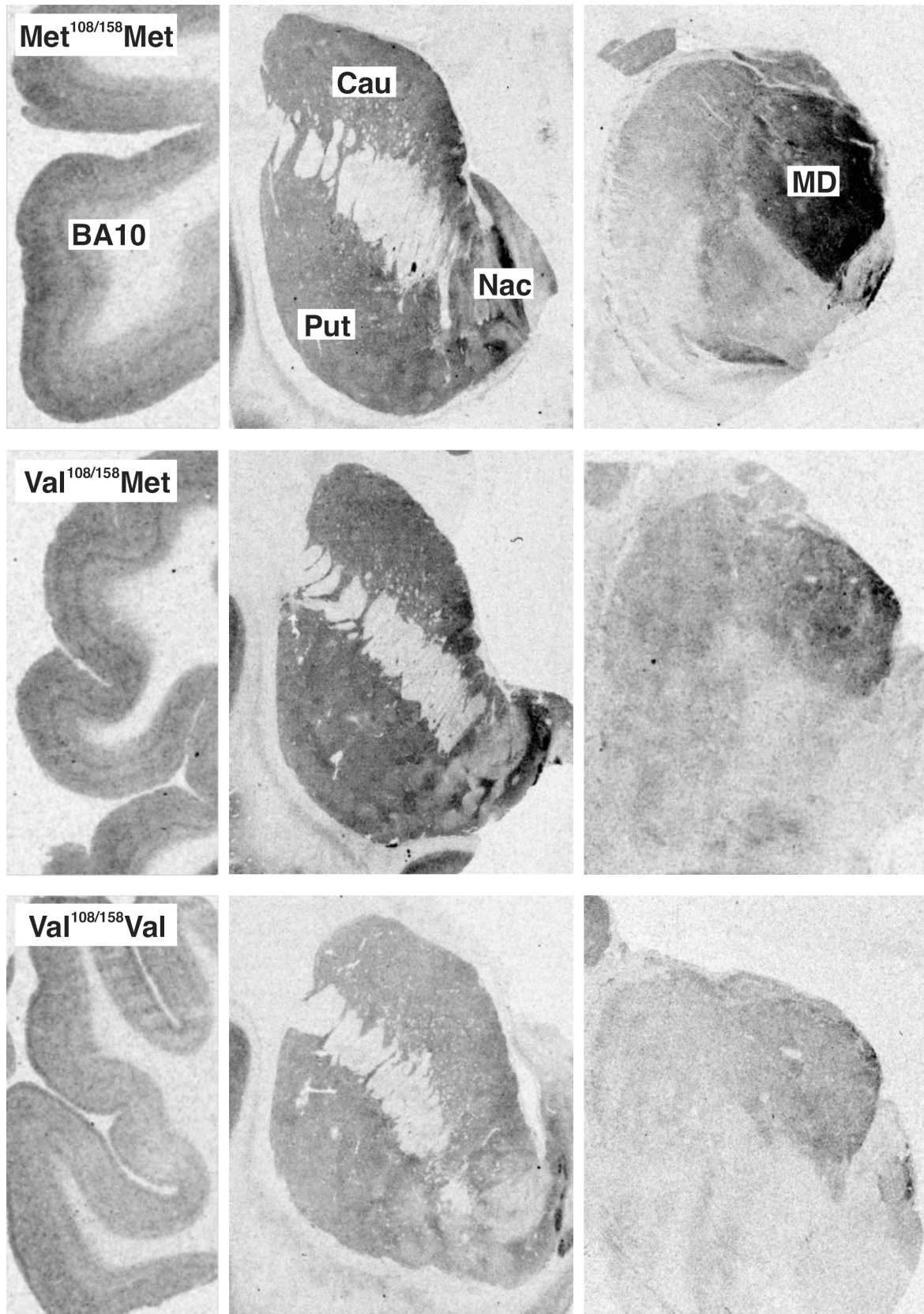


Abb. 4.2 Autoradiographien des DAMGO-Bindings, sortiert nach *COMT Val^{108/158}Met* Genotyp; Linke Spalte: Frontaler Cortex (BA 10); mittlere Spalte: Striatum, bestehend aus Ncl. caudatus (Cau), Ncl. accumbens (Nac) und Putamen (Put) rechte Spalte: Thalamus, MD= Ncl. mediodorsalis. Die Schnitte einer Zeile stammen jeweils von einem Individuum.

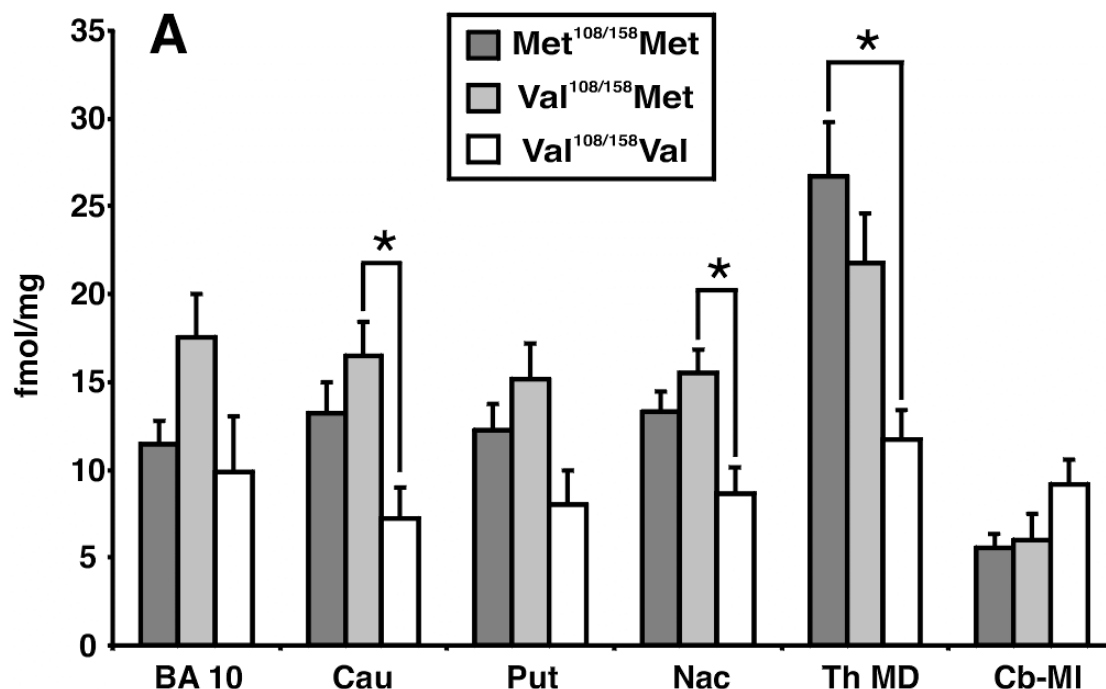


Abb. 4.3 Durch Densitometrie von [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographien bestimmte Verteilung der μ -Opioidrezeptoren in Abhängigkeit vom *COMT* Val^{108/158}Met-Genotyp in frontalem Cortex (BA 10), Ncl. caudatus (Cau), Putamen (Put), Ncl. accumbens (Nac), Ncl. mediodorsalis thalami (ThMD) und Molekularschicht des cerebellären Cortex (Cb-MI). Die Messwerte sind um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und als Mittelwerte in fmol/mg Gewebeäquivalent \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0,05$, in der *Post hoc*-Analyse).

Binding Region	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V	V/M vs. V/V
BA 10	3.095	2,16	0.077	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Cau	3.886	2,16	0.046	$p > 0.1$	$p > 0.1$	0.045
Put	2.489	2,16	0.119	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Nac	4.953	2,15	0.025	$p > 0.1$	$p > 0.1$	0.023
Th MD	4.553	2,14	0.034	$p > 0.1$	0.032	$p > 0.1$
Cb-MI	1.286	2,16	0.307	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$

Tabelle 4.1 Statistische Auswertung der in der [³H]DAMGO-Rezeptorautoradiographie gemessenen Werte.

Abkürzungen: ANOVA: Analyse der Varianz; M/M: Met^{108/158}Met; V/M: Val^{108/158}Met; V/V: Val^{108/158}Val;

BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

<i>Binding</i> Region	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
	Model			Variable	Beta	P
	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>P</i>			
BA 10	14.278	1.15	0.002	stoT	0.698	0.002
Cau^a						
Put^a						
Nac^a						
Th MD	8.940	1.13	0.010	COMT	-0.638	0.010
Cb-MI^a						

Tabelle 4.2: Ergebnisse der Regressionsanalyse (*multiple stepwise regression*) zur Detektion der einflussreichsten (Co-)Variablen auf die Expression von μ -Opioidrezeptoren in den untersuchten Hirnregionen. Die Variablen *COMT Val^{108/158}Met* Genotyp (COMT), *Alter zum Todeszeitpunkt* (age), *post mortem-Intervall* (pmI), *Lagerzeit* (stoT), *Gewebs-pH* (pH) und *Geschlecht* (sex) wurden in das *multiple regression*-Modell eingeschlossen, wenn sie das Eingangskriterium $p < 0.05$ erfüllten.

^aKeine Variable erfüllt das Eingangskriterium.

Abkürzungen: BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

4.2 DAMGO-stimulierter [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay

Diese Experimente wurden durchgeführt, um einen eventuellen Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf die intrazelluläre G-Protein-Kopplung von μ -Opioidrezeptoren zu untersuchen. Dies ist auf Grund methodischer Limitationen nur möglich, wenn der relativ hohe unspezifische Spontanumsatz an $G\alpha_{i0}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren in die Berechnung des Ergebnisses einfließt. Diese unspezifischen, d.h. nicht an eine spezifische Rezeptorstimulation gebundenen Basalsignale sind je nach Hirnregion unterschiedlich stark ausgeprägt. So zeigen cortikale Strukturen im Vergleich zu den anderen untersuchten Arealen einen höheren Basalwert. Wie bereits unter 3.4. erläutert, werden deshalb die Ergebnisse des [³⁵S]GTP γ S Bindungsassay als Stimulation in Prozent über der Basalaktivität dargestellt. In der Literatur wird eine Abweichung von mehr als 10% unter den gegebenen Versuchsbedingungen als sicher spezifischer Umsatz an $G\alpha_{i0}$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren angesehen (Sim und Childers 1997; Happe et al. 2000; Platzer 2005).

4.2.1 Cerebraler Cortex

Über allen Laminae des frontalen Cortex konnten robuste Stimulationen an μ -Opioidrezeptoren erzeugt werden.

Analog zum Liganden-Binding zeigte sich im DAMGO-stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Assay eine Tendenz zu einer erhöhten G-Protein-Aktivierung in den *Met/Met* und *Val/Met* Gruppen im Vergleich zu *Val*-Homozygoten im frontalen Cortex. Dabei waren auch hier die gemessenen Signale für heterozygote Individuen am höchsten. Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz.

4.2.2 Basalganglien

Auch die Untersuchung des Striatums ergab eine deutliche funktionelle Kopplung an μ -Opioidrezeptoren, die geringfügig niedriger als im frontalen Cortex ausfiel.

Im Ncl. caudatus war die G-Protein-Kopplung für *Val/Met*-Heterozygote am höchsten und für *Val*-Homozygote am niedrigsten. Keiner dieser Unterschiede erreichte jedoch statistische Signifikanz. Wie beim Liganden-Binding zeigte sich auch für das DAMGO-stimulierte [³⁵S]GTP γ S-Binding eine ventrodorsale Abnahme der Werte.

Im Putamen waren die Werte für *Val*-Homozygote niedriger als für Träger des *Met*-Allels. Die G-Protein-Kopplung der *Met/Met*- und *Val/Met*-Gruppen war im Putamen annähernd gleich groß. Auch hier ließ sich ein leichter ventrodorsaler Abfall nachweisen.

Im Ncl. accumbens konnte kein Unterschied zwischen "core" und "shell" nachvollzogen werden. Auch hier zeigte sich bezüglich des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps eine niedrigere G-Protein-Kopplung bei *Val*-Homozygoten im Vergleich zu Trägern des *Met*-Allels.

In der Regressionsanalyse zeigten sich allerdings für den Ncl. caudatus die Lagerzeit und der Gewebe-pH als die stärksten Prädiktoren. Für den Ncl. accumbens sind dies der *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp und die Lagerzeit.

4.2.3 Thalamus

Im Ncl. mediodorsalis ergab das DAMGO-stimulierte [³⁵S]GTP γ S-Binding das stärkste Signal aller in dieser Arbeit untersuchten Gehirnregionen.

Die G-Protein-Kopplung korrelierte linear mit dem *COMT*-Genotyp (post-test for linear trend: $r^2 = 0.5440$; $p = 0.0020$). Hierbei zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den drei Genotypen: Das DAMGO-stimulierte [³⁵S]GTP γ S-Binding war am höchsten bei *Met/Met* und am niedrigsten bei *Val/Val*.

Wiederum konnte in der Regressionsanalyse der *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp als der einzige signifikante Prädiktor identifiziert werden.

4.2.4 Cerebellum

Auch im Kleinhirn ließ sich eine deutliche funktionelle Kopplung an μ -Opioidrezeptoren nachweisen. Diese war wiederum am stärksten in der Molekularschicht ausgeprägt.

Wie bei der DAMGO-Rezeptorautoradiographie war auch hier das Signal am stärksten für *Val*-homozygote Individuen, während sich für *Met*-Homozygote das niedrigste Signal zeigte. Allerdings war keiner der festgestellten Unterschiede statistisch signifikant.

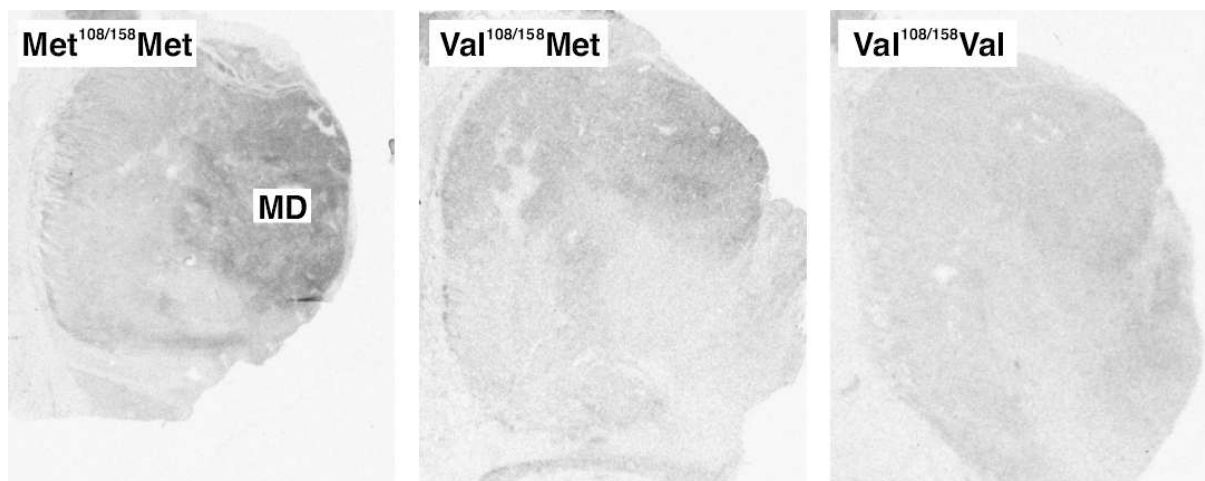


Abb. 4.4 Abnahme des Agonisten-stimulierten $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindings in Abhängigkeit vom *COMT*-Genotyp. Die Autoradiographien zeigen Schnitte durch den Thalamus auf Höhe des Ncl. mediodorsalis (MD).

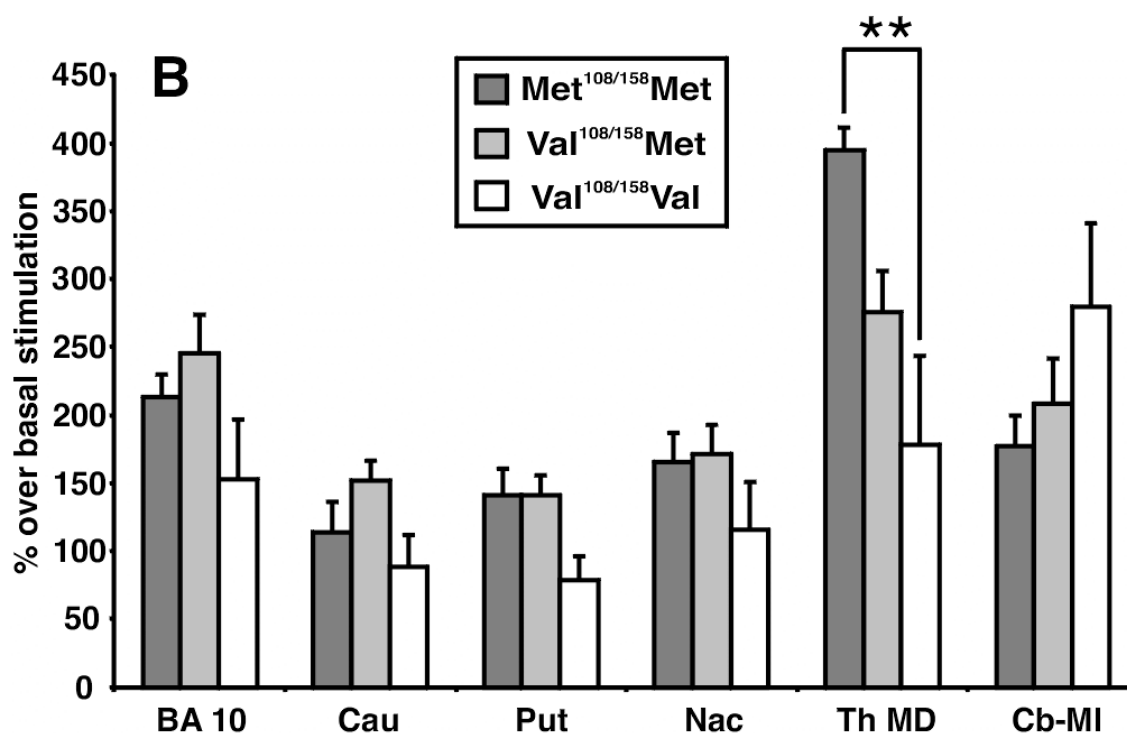


Abb. 4.5 Quantitative Bestimmung der $[^{35}\text{S}]\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung an μ -Opioidrezeptoren in Abhängigkeit vom *COMT* Val^{108/158}Met Genotyp durch Densitometrie von Film-Autoradiographien. Die Stimulation wurde mit DAMGO durchgeführt. Die Messwerte sind um den unspezifischen Hintergrund korrigiert und als Mittelwerte der Abweichung vom Basalwert in % \pm SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ in der *Post hoc*-Analyse).

Abkürzungen:

BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

<i>GTPγS</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	Region	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
BA 10	2.029	2,16	0.168	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
Cau	2.344	2,16	0.132	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
Put	2.667	2,16	0.104	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
Nac	1.135	2,15	0.351	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1
Th MD	8.176	2,14	0.006	0.059	0.006	<i>p</i> >0.1
Cb-MI	1.465	2,16	0.264	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1	<i>p</i> >0.1

Tabelle 4.3 Statistische Auswertung der im [³⁵S]GTP γ S-Binding gemessenen Werte.

Abkürzungen:

ANOVA: Analyse der Varianz; M/M: *Met*^{108/158}*Met*; V/M: *Val*^{108/158}*Met*; V/V: *Val*^{108/158}*Val*;

BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

<i>GTPγS</i>	Stepwise multiple regression			Predictor variables			
	Region	Model			Variable	Beta	P
		F	df	P			
BA 10		6.608	1.15	0.021	stoT	0.553	0.021
Cau		9.065	3.13	0.002	stoT	1.076	<0.001
					pH	0.762	0.004
					pmI	-0.405	0.024
Put^a							
Nac		9.858	2.13	0.002	stoT	0.740	0.001
					COMT	-0.398	0.043
Th MD		17.533	1.13	0.001	COMT	-0.758	0.001
Cb-MI^a							

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Regressionsanalyse (*multiple stepwise regression*) zur Detektion der einflussreichsten (Co-)Variablen auf das [³⁵S]GTP γ S-Binding in den untersuchten Hirnregionen. Die Variablen *COMT Val*^{108/158}*Met* Genotyp (COMT), *Alter zum Todeszeitpunkt* (age), *post mortem-Intervall* (pmI), *Lagerzeit* (stoT), *Gewebs-pH* (pH) und *Geschlecht* (sex) wurden in das *multiple regression*-Modell eingeschlossen, wenn sie das Eingangskriterium *p*<0.05 erfüllten.

^aKeine Variable erfüllt das Eingangskriterium.

Abkürzungen: BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

4.3 PPE mRNA-Expression

4.3.1 Cerebraler Cortex

Präproenkephalin (PPE) mRNA war nur schwach im frontalen Cortex nachweisbar. Dabei ließen sich die Laminae II und III deutlich von Lamina IV-VI abgrenzen. Densitometrisch ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei *COMT*-Genotypen.

4.3.2 Basalganglien

Im Striatum waren die höchsten in dieser Untersuchung gemessenen Werte für die PPE mRNA-Expression festzustellen.

Im gesamten Ncl. caudatus ließen sich deutliche, statistisch signifikante Unterschiede bezüglich des *COMT Val/Met*^{108/158}-Genotyps beobachten. Überraschenderweise war das *COMT Met*^{108/158}-Allel assoziiert mit einem Anstieg der PPE mRNA-Expression: Bei den Geweben der *Met/Met*-Gruppe wurde das höchste PPE mRNA-Signal gemessen, während die PPE mRNA-Expression bei *Val*-Homozygoten am niedrigsten war. Auch hier zeigte die Autoradiographie sowohl eine ventrodorsale als auch eine mediolaterale Abnahme der Werte.

Im Putamen zeigten sich ähnliche Ergebnisse wie im Ncl. caudatus, wobei hier keine Unterschiede in der PPE mRNA-Expression zwischen *Val*-Homozygoten und Heterozygoten festzustellen waren.

Auch im Ncl. accumbens war die PPE mRNA-Expression bei Individuen mit *Met/Met*-Genotyp am höchsten und für *Val*-Homozygote am niedrigsten. Die Unterteilung in "core" und "shell" ergab keine signifikanten Unterschiede.

Die Korrelationsanalyse (Spearman's correlation analysis) wie die Regressionsanalyse (stepwise multiple regression) legten einen signifikanten Einfluss des Gewebe-pH auf die PPE mRNA-Expression im Striatum sowie des Geschlechts im Ncl. accumbens nahe (siehe Tabelle 4.6). Dieser Einfluss des Gewebe-pH auf die in der in situ-Hybridisierung gemessene PPE mRNA-Expression ist in der Literatur vorbeschrieben (Kingsbury et al. 1995). Um den Einfluss dieser beiden Kovariablen sowie des Alters zum Todeszeitpunkt und der Lagerzeit zu berücksichtigen, wurde eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) durchgeführt (vgl. Tabelle 4.5).

Auch die adjustierten Werte der einzelnen *COMT*-Genotypen zeigten die oben beschriebenen signifikanten Unterschiede im Ncl. caudatus und im Putamen. Somit bestätigte die ANCOVA einen signifikanten Einfluss des *COMT Val/Met*^{108/158}-Polymorphismus auf die PPE mRNA-Expression in den Basalganglien.

4.3.3 Thalamus

Im Thalamus war keine PPE mRNA nachweisbar.

4.3.4 Cerebellum

Im Kleinhirn konnte eine, wenn auch sehr schwache, PPE mRNA-Expression nur in der Körnerzellschicht nachgewiesen werden. Hinsichtlich des COMT-Genotyps ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

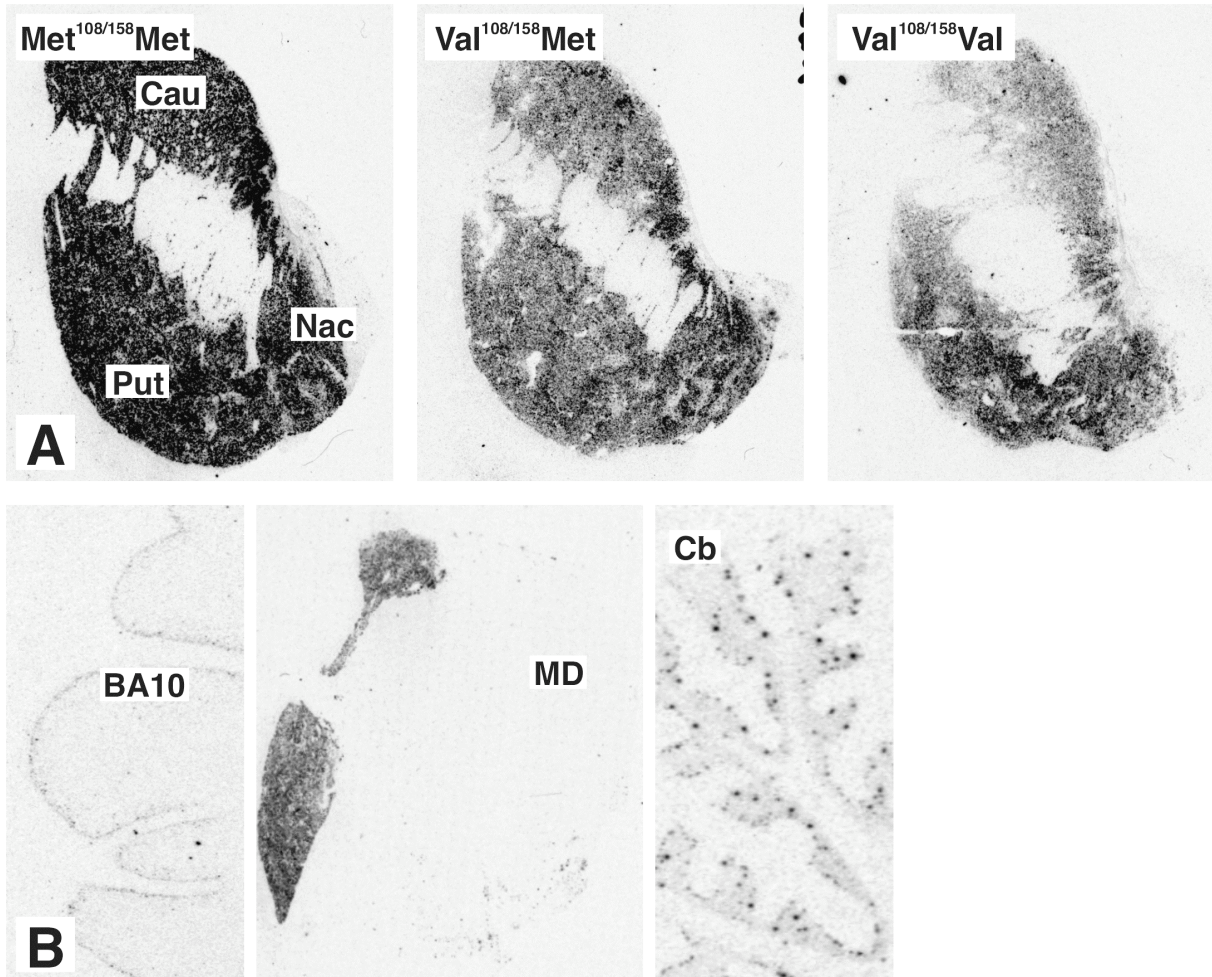


Abb. 4.6 Autoradiographien der PPE mRNA *in situ* Hybridisierung **A:** PPE mRNA-Expression im Striatum in Abhängigkeit vom *COMT*-Genotyp. **B:** Repräsentative Beispiele der PPE mRNA-Expression im frontalen Cortex (BA 10), Ncl. mediodorsalis thalami (MD) und im Kleinhirn (Cb)

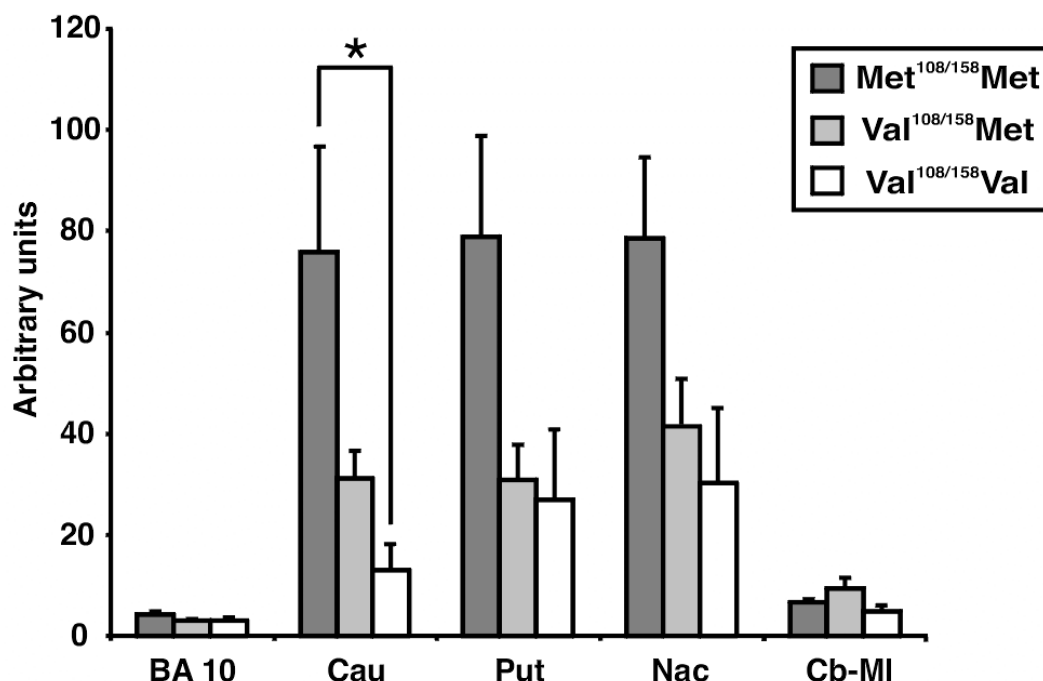


Abb. 4.7 Semiquantitative Bestimmung der Expression von PPE mRNA in Abhängigkeit vom *COMT* Val^{108/158}Met-Genotyp durch Densitometrie von Film-Autoradiographien. Die Messwerte sind als Mittelwerte in nCi/g ± SEM dargestellt. Statistisch signifikante Unterschiede werden durch Sterne angezeigt (* $p < 0.05$ in der *Post hoc*-Analyse).

Abkürzungen:

BA 10: frontale Großhirnrinde der Brodmann Area 10; Cau: Ncl. caudatus; Put: Putamen; Nac: Ncl. accumbens; Th MD: Ncl. mediodorsalis thalami; Cb MI: Molekularschicht der Kleinhirnrinde

<i>PPE mRNA</i>	ANOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	Region	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
BA 10	2.967	2,16	0.084	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Cau	4.876	2,16	0.025	0.069	0.048	$p > 0.1$
Put	4.205	2,16	0.037	0.056	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Nac	3.743	2,15	0.050	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Cb-MI	1.535	2,16	0.250	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$

<i>PPE mRNA</i>	ANCOVA			Posthoc-Test (Bonferroni) p		
	Region	F	df	p	M/M vs. V/M	M/M vs. V/V
BA 10	1.714	2,10	0.255	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Cau	6.905	2,10	0.013	0.024	0.064	$p > 0.1$
Put	7.241	2,10	0.011	0.011	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Nac	2.172	2,9	0.170	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$
Cb-MI	0.347	2,10	0.715	$p > 0.1$	$p > 0.1$	$p > 0.1$

Tabelle 4.5 Statistische Auswertung der in der PPE mRNA *in situ* Hybridisierung gemessenen Werte. Abkürzungen:

ANOVA: Analyse der Varianz; ANCOVA: Analyse der Kovarianz; M/M: *Met*^{108/158}*Met*; V/M: *Val*^{108/158}*Met*; V/V: *Val*^{108/158}*Val*.

Region	Stepwise multiple regression			Predictor variables		
	Model			Variable	Beta	P
	F	df	P			
BA 10	5.132	1.15	0.039	stoT	-0.505	0.039
Cau	18.726	2.14	<0.001	pH	0.614	0.001
				COMT	-0.411	0.009
Put	11.124	2.14	0.001	pH	0.587	0.004
				COMT	-0.377	0.048
Nac	13.462	1.14	0.003	sex	-0.700	0.003
Cb-MI^a						

Tabelle 4.6 Ergebnisse der Regressionsanalyse (*multiple stepwise regression*) zur Detektion der einflussreichsten (Ko-)Variablen auf PPE mRNA-Expression in den untersuchten Hirnregionen. Die Variablen *COMT Val^{108/158}Met* Genotyp (COMT), *Alter zum Todeszeitpunkt* (age), *post mortem-Intervall* (pmI), *Lagerzeit* (stoT), *Gewebs-pH* (pH) und *Geschlecht* (sex) wurden in das *multiple regression*-Modell eingeschlossen, wenn sie das Eingangskriterium $p < 0.05$ erfüllten.

^aKeine Variable erfüllt das Eingangskriterium.

5. Diskussion

5.1 Differenzierte Regulation von μ -Opioidrezeptor- und PPE-Expression durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus

5.1.1 Auswirkungen des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf das μ -Opioidrezeptorsystem

Das ³H-DAMGO-Liganden-Binding in menschlichem *post mortem* Gewebe zeigte eine Abhängigkeit der μ -Opioidrezeptor-Expression vom *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp, wobei die Dichte der μ -Opioidrezeptoren für Träger des *COMT Met^{108/158}*-Allels in allen untersuchten Gehirnregionen mit Ausnahme des Kleinhirns höher als für *COMT Val^{108/158}*-homozygote Individuen war. Interessanterweise konnte dabei der postulierte lineare Gen-Dosis-Effekt mit signifikanten Unterschieden zwischen allen drei Genotypen nur im Thalamus beobachtet werden. Der Vergleich von DAMGO-Liganden-Binding und DAMGO-stimuliertem [³⁵S]GTP γ S-Assay weist in den einzelnen Gehirnregionen ähnliche Verteilungsmuster zwischen μ -Opioidrezeptorbindung und μ -Opioidrezeptor-gekoppelter G-Proteinaktivierung auf. Im Ncl. mediodorsalis thalami war ein signifikanter Genotyp-Effekt in beiden Untersuchungsmethoden nachweisbar. Darüber hinaus zeigte das Verhältnis zwischen G-Protein-Aktivierung und Liganden-Binding keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotyp-Gruppen. Somit scheint der *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus weder Änderungen der Rezeptoraffinität noch der G-Protein-Kopplung nach sich zu ziehen.

Die *in situ* Hybridisierung für PPE mRNA zeigte wider Erwarten eine zur μ -Opioidrezeptordichte gleichläufige Regulation durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus: Die PPE mRNA-Expression offenbart in Striatum und Cortex eine lineare Gendosis-Beziehung zur Anwesenheit des *COMT Met^{108/158}*-Allels, wobei für *COMT Met^{108/158}*-Homozygote die höchste PPE mRNA-Expression festzustellen war.

5.1.2 Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur

Die gemessenen Werte des Liganden-Binding liegen im Bereich publizierter Daten ähnlicher Untersuchungen an humanen (Hiller und Fan 1996; Mathieu-Kia et al. 2001; Gross-Isseroff et al. 1990; Gabilondo et al. 1995) und Primatengehirnen (Daunais et al. 2001). Unterschiede der absoluten Bindungswerte ergeben sich dabei aus verschiedenen Arten der Eichung der Standards in Beziehung zu Gewebeäquivalenten. Vergleicht man jedoch das Verhältnis der Werte der einzelnen Gehirnregionen zueinander, so ergeben sich sehr gute Übereinstimmungen mit den in dieser Arbeit gemessenen Werten.

Auch die Werte des [³⁵S]GTP γ S-Bindings liegen im Bereich früher publizierter Daten vergleichbarer Untersuchungen an menschlichen Geweben (Platzer et al. 2001; Rodríguez-Puertas et al. 2000) und Primatengehirnen (Daunais et al. 2001). Hierbei kann allerdings nur das

Verhältnis der Werte der einzelnen Gehirnregionen zueinander verglichen werden, da die Absolutwerte methodischen Einflüssen unterliegen.

5.1.3 Mögliche Mechanismen dieser Regulation

5.1.3.1 Interaktionen von Dopamin- und Opioidsystem

Der Mechanismus dieser Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus kann vielfältiger Natur sein.

Auf Grund des Zusammenhanges zwischen *COMT*-Genotyp und Enzymaktivität ist davon auszugehen, dass die Gegenwart des *COMT Met^{108/158}*-Allels zu einer Veränderung des dopaminergen Tonus führt.

Interaktionen zwischen dopaminergem und opioidergem System wurden in zahlreichen Studien untersucht, wobei in der weit überwiegenen Zahl der Fälle die Regulation des dopaminergen Systems durch Opioidwirkungen Gegenstand der Untersuchungen war.

So sind in einer Fraktion der sogenannten *medium spiny neurons* (MSN), der zahlenmäßig größten Zellpopulation im Striatum, Dopamin D2-Rezeptoren mit dem endogenen Opioid Enkephalin vergesellschaftet (Gerfen et al. 1990; LeMoine et al. 1990; Curran und Watson 1995; Aubert et al. 2000).

Mehrere Studien an Gehirnen von Mäusen beziehungsweise Ratten untersuchten den Einfluss dopaminergere Stimulation auf die Expression von PPE mRNA und Opioidrezeptoren. So konnte nach selektiver Stimulation von D2-Rezeptoren ein Anstieg der Anzahl von μ -Opioidrezeptoren und eine Abnahme der PPE mRNA-Expression beobachtet werden (Angulo 1992; JF Chen et al. 1993). Umgekehrt führte die Blockade von D2-Rezeptoren zu einer niedrigeren Anzahl von μ -Opioidrezeptoren und zu einer Zunahme der PPE mRNA-Expression (Morris et al. 1988; Morris und Hunt 1991; JF Chen et al. 1994; Angulo 1992). Das Ausschalten dopaminergere Stimulation im Striatum durch die Läsion nigrostriataler Bahnen durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) hatte in Ratten ebenso einen Anstieg der PPE mRNA-Expression zur Folge (Morris et al. 1989; Gerfen et al. 1990), wie in D2-Rezeptor-*knock out* Mäusen die PPE mRNA-Expression über der von Wildtyp-Mäusen lag (Drago et al. 1998).

Diese Ergebnisse führten Zubieta et al. (2003) zu der Hypothese, die durch die niedrigere *COMT*-Enzymaktivität der *COMT Met^{108/158}*-Allelträger erhöhte dopaminerge Stimulation von D2-Rezeptoren führe zu einer Reduktion von Enkephalin, was gewissermaßen als kompensatorische Reaktion zu einer Hochregulation von μ -Opioidrezeptoren führe.

In deutlichem Widerspruch zu dieser Hypothese steht jedoch die in dieser Arbeit beobachtete statistisch signifikante Erhöhung der PPE mRNA-Expression in den Striata von homozygoten *COMT Met^{108/158}*-Allelträgern.

Es ist in diesem Zusammenhang zu bedenken, dass eine genetisch determinierte Veränderung des dopaminergen Tonus nicht nur auf einen Dopaminrezeptortyp wirkt, sondern mit großer

Wahrscheinlichkeit in komplexen Interaktionen zwischen den mittlerweile fünf entdeckten Arten von Dopaminrezeptoren resultiert. Dies entspricht also einer Situation, mit der die Ergebnisse selektiver Rezeptorsubtyp-Stimulationen nur schwer zu vergleichen sind. Studien, die die Folgen nicht selektiver dopaminerger Stimulation durch L-Dopa in Nagetieren oder in Primaten untersucht haben, zeigen im Striatum einen Anstieg der PPE mRNA-Expression (Morissette et al. 1997, Tel et al. 2002, Gross et al. 2003), ähnlich der in dieser Arbeit beobachteten Situation für *COMT Met*^{108/158}-homozygote Individuen.

5.1.3.2 Die Regulation über einen intrazellulären Mechanismus im Thalamus

Die beobachtete Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression durch den *COMT Val*^{108/158}*Met*-Genotyp war am deutlichsten im Thalamus zu erkennen, da hier eine lineare Korrelation zwischen *COMT- Met*^{108/158}-Allel-„Dosis“ und der μ -Opioidrezeptordichte festzustellen war. Da aber der Thalamus, hier insbesondere der Ncl. mediodorsalis, frei von PPE mRNA ist und auch keinem nennenswerten enkephalineren Einfluss unterliegt (Hirai und Jones 1989; Bouras et al. 1984; Inagaki et al. 1985; Hurd et al. 1996; eigene Ergebnisse, siehe auch 4.3), scheint sich die Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression durch den *COMT Val*^{108/158}*Met*-Genotyp zumindest in dieser Hirnregion nicht durch eine Interaktion von D2-Rezeptoren und Enkephalin erklären zu lassen.

Vielmehr ist eine Regulation über die Aktivierung von Rezeptoren aus der Dopamin D1-Rezeptor-Familie ein möglicher Weg, den beobachteten Effekt zu begründen.

Die Rezeptoren der D1-Rezeptor-Familie sind intrazellulär an stimulierende G_s-Proteine gekoppelt. Eine Erhöhung der Dopamin-Menge im synaptischen Spalt, wie sie für *COMT Met*^{108/158}-Homozygote zu erwarten ist, führt durch eine vermehrte Stimulation von D1-ähnlichen Rezeptoren zu einer gesteigerten Aktivität der Adenylatcyclase und somit zu einem intrazellulären Anstieg von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP). In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die durch dopaminerge Stimulation ausgelöste Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels durch die Stimulation von μ -Opioidrezeptoren attenuiert werden kann (Schoffelmeer et al. 1985, 1987, 1992; Heijna et al. 1992).

Darüber hinaus postulierten Zhang et al. (1995) ein Equilibrium, einen Gleichgewichtszustand also, zwischen D1- und μ -Opioidrezeptoren. μ -Opioidrezeptoren sind, wie eingangs beschrieben, an inhibitorische G_{i/o}-Proteine gekoppelte Rezeptoren. Eine Stimulation von μ -Opioidrezeptoren führt folglich, anders als eine Stimulation von D1-Rezeptoren, zu einem Absinken des intrazellulären cAMP-Spiegels. Es erscheint daher möglich, dass ein durch vermehrte dopaminerge Stimulation erhöhter intrazellulärer cAMP-Spiegel bei *COMT Met*^{108/158}-Homozygoten in einer gegenregulatorischen Erhöhung der μ -Opioidrezeptor-Expression resultiert.

2003 wurde nachgewiesen, dass die Stimulation der Adenylatcyclase durch Forskolin zu einer vermehrten Transkription des μ -Opioidrezeptor-Gens führen kann (Lee und Lee, 2003). Eine Stimulation der Adenylatcyclase hat dabei einen erhöhten cAMP-Spiegel zur Folge, wodurch die

Proteinkinase A (PKA) aktiviert wird, die wiederum die Phosphorylierung des *cAMP-response element* -bindenden Proteins (CREB) katalysiert. In der Promoter-Region des μ -Opioidrezeptor-Gens konnte ein *cAMP response element* (CRE) identifiziert werden, das mit CREB einen Protein-DNA-Komplex bilden kann, was wiederum zu einer Induktion der μ -Opioidrezeptor-Transkription führt (vgl. Abb. 5.1) (Lee und Lee, 2003).

Die Stimulation sowohl von D1- als auch D2- Dopaminrezeptoren bewirkt über verschiedene intrazelluläre Signalwege eine Phosphorylierung von CREB, wobei der dominierende Signalweg derjenige über die cAMP-regulierte PKA-Aktivierung nach Stimulation von D1-Rezeptoren ist (Brami-Cherrier et al. 2002; Das et al. 1997).

Voraussetzung für eine Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression durch dopaminerg stimulierte cAMP-Spiegel über einen intrazellulären Signalweg ist eine Kollokalisierung von Dopamin- und μ -Opioidrezeptoren. Im Gegensatz zu D2-Rezeptoren werden D1-Rezeptoren gleichmäßig in frontalem Cortex, Striatum und Thalamus exprimiert (Cortés et al. 1989; Bergson et al. 1995; Lidow et al. 1998; Khan et al. 2000; Hurd et al. 2001). Es gibt deutliche Hinweise für eine Koexpression von μ -Opioidrezeptoren und Rezeptoren der D1-Familie in diesen Hirnregionen (Guttenberg et al. 1996; Peckys und Landwehrmeyer 1999; Voorn et al. 1996; Curran und Watson 1995). Dagegen werden im Kleinhirn Rezeptoren der D1-Familie allenfalls auf Purkinje-Zellen exprimiert, während sich μ -Opioidrezeptoren nur in Körner- und Golgizellen finden (Khan et al. 2000; Hurd et al. 2001; Peckys und Landwehrmeyer 1999; Schadrack et al. 1999). Sie werden also im Kleinhirn nicht in denselben Zellen exprimiert, ein Umstand, der das Ausbleiben eines regulatorischen Einflusses des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf die μ -Opioidrezeptor-Expression über einen intrazellulären Signalweg erklären mag.

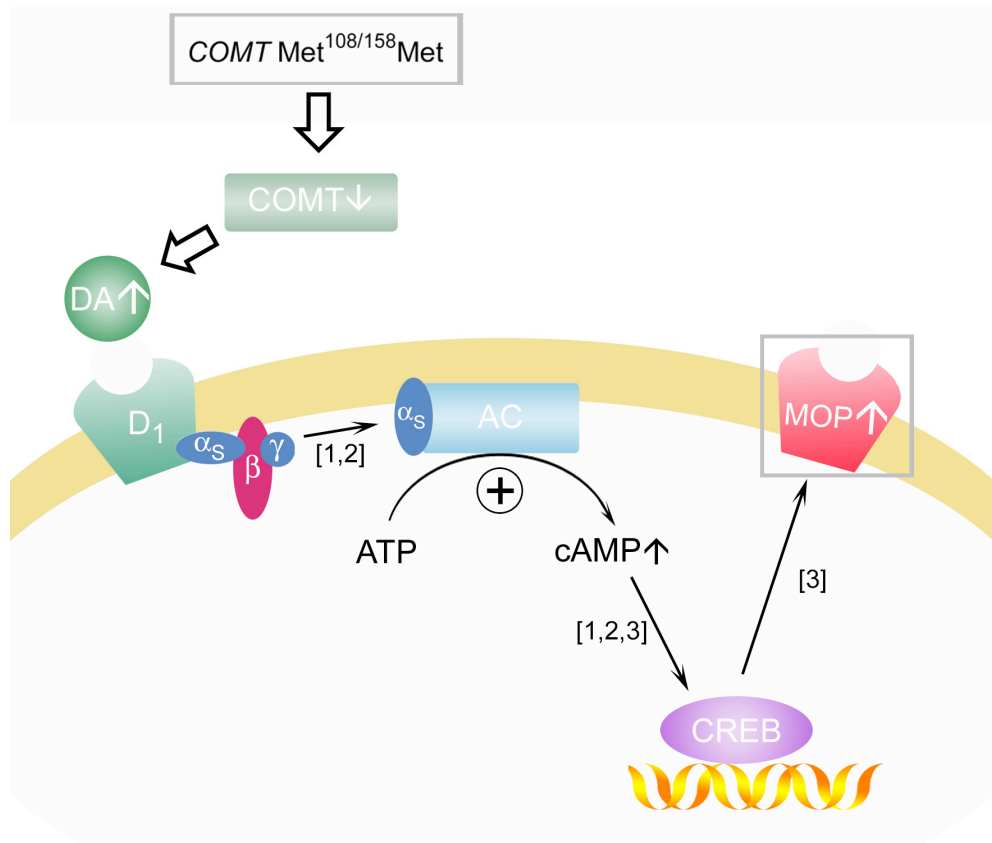


Abb. 5.1 Möglicher Mechanismus der Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp. Grau umrahmt sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Abkürzungen:

DA: Dopamin; AC: Adenylatcyclase; ATP: Adenosinatriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB: cAMP response element binding protein;

Quellen: [1] Brami-Cherrier et al. 2002 [2] Das et al. 1997 [3] Lee und Lee 2003

5.1.3.3 Die Regulation über einen intrazellulären Mechanismus im Striatum

In den untersuchten striatalen Kerngebieten ist die μ -Opioidrezeptor-Expression für *COMT Met^{108/158}*-Homozygote niedriger als angesichts der linearen Korrelation im Thalamus zu erwarten wäre. Auffällig ist, dass in genau diesen Gebieten die Expression von PPE mRNA deutlich erhöht ist. Für das Striatum konnte gezeigt werden, dass enkephalinhaltige Axone komplementär zu μ -Opioidrezeptoren lokalisiert sind, ein deutlicher Hinweis darauf, dass Enkephalin im Striatum ein relevanter endogener Ligand für μ -Opioidrezeptoren ist (Arvidsson et al. 1995). Möglicherweise führt somit der erhöhte Spiegel der endogenen Liganden Met-/Leu-Enkephalin zu einer gegenregulatorischen Abnahme der μ -Opioidrezeptor-Expression bei *COMT Met^{108/158}*-Homozygoten.

Im Striatum besteht eine sehr hohe Kollokalisationsrate von Enkephalin mit D2-Rezeptoren: Über 95% der PPE mRNA enthaltenden Zellen im Striatum tragen D2-Rezeptoren (Curran und Watson 1995). Eine Regulation der PPE mRNA Expression durch dopaminergen, also möglicherweise durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp bestimmten, Einfluss erfolgt somit höchstwahrscheinlich über D2-Rezeptoren.

Eine Stimulation von D2-Rezeptoren im Striatum von Mäusen durch den D2-selektiven Agonisten Quinpirol jedoch führt zu einer Abnahme der PPE mRNA, folglich zur genau entgegengesetzten Situation der in dieser Arbeit für *COMT Met^{108/158}*-Homozygote zu beobachtenden Ergebnisse (JF Chen et al. 1993). Allerdings geht die PPE mRNA-Abnahme im Rattenstriatum nach Quinpirol-Stimulation mit einer Abnahme von D2-Rezeptor-mRNA einher. Umgekehrt hat die Blockade von D2-Rezeptoren einen Anstieg nicht nur der PPE mRNA, sondern auch der D2-Rezeptor-mRNA zur Folge (Le Moine et al. 1990, JF Chen et al. 1994). Die nicht Rezeptortyp-spezifische dopaminerge Stimulation durch L-Dopa, die eher einem für *COMT Met^{108/158}*-Homozygote vermuteten erhöhten Dopaminspiegel entspricht, resultiert hingegen im Mäusestriatum in einem Anstieg von PPE mRNA bei gleichzeitig unverändertem D2-Rezeptor-mRNA-Niveau (Gross et al. 2003). Während also die selektive D2-Stimulation zu einer Abnahme der D2-Rezeptor-mRNA, und somit möglicherweise konsekutiv zu einer Abnahme der PPE mRNA führt, bleibt diese Abnahme der D2-Rezeptor-mRNA für eine „generelle“ (d.h. nicht Rezeptortyp-spezifische) dopaminerge Stimulation aus. Mögliche Ursachen sind komplexe Interaktionen zwischen verschiedenen Dopamin-Rezeptor-Subtypen, die durch eine Stimulation durch L-Dopa, nicht aber durch Quinpirol oder andere selektive D2-Rezeptor-Agonisten, eine Abnahme der D2-Rezeptor-mRNA verhindern, oder auch der Einfluss dopaminerger Interneurone. Darüber hinaus handelt es sich bei dem von J.F. Chen et al. (1993) beobachteten um einen relativ kurzfristigen (sechs Tage) Effekt, wohingegen der *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus einen lebenslangen Einfluss auf das dopaminerge System ausübt.

Molekularbiologische Untersuchungen des PPE-Gens haben gezeigt, dass die für die Regulation der PPE mRNA entscheidende Promotorregion des PPE-Gens drei DNA-Regulationselemente enthält, die zwei *cAMP response elements* CRE-1 und CRE-2, sowie den Transkriptionsfaktor AP-2 (Comb et al. 1986, 1988; Hyman et al. 1988, 1989). Dabei ist nur CRE-2 essentiell für die durch die *second messengers* cAMP und Calcium medierte Genexpression (Nguyen et al. 1990; Kobierski et al. 1991). Für die transkriptionelle Aktivierung von CRE-2 ist die Bindung eines an Ser-133 phosphorylierten CRE-bindenden Proteins (CREB) erforderlich (Kobierski et al. 1999).

Die Phosphorylierung von CREB kann, wie oben dargestellt, durch die Proteinkinase A erfolgen. Alternativ aber ist es auch möglich, dass die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinasen (CaMK) II und IV, der Proteinkinase C (PKC) oder der mitogen-aktivierten-Proteinkinasen (MAPK) der Rsk-Familie zu einer Phosphorylierung von CREB führen (Yan et al. 1999). Die PPE mRNA Expression kann sowohl durch eine Erhöhung des intrazellulären Calcium-Spiegels und daraus resultierender Aktivierung der CaMK als auch durch die Aktivierung der PKC stimuliert werden (Kley und Loeffler). Für Dopamin D2-Rezeptoren wurde gezeigt, dass eine Stimulation mit Quinpirol in den Gehirnen von Mäusen und Ratten durch die gemeinsame Aktivierung von CaMK und PKC eine Phosphorylierung von CREB zum Ergebnis haben kann (Yan et al. 1999).

Man kann spekulieren, ob eine Stimulation von D2-Rezeptoren durch einen erhöhten Dopaminspiegel mittels Phosphorylierung von CREB zu einer erhöhten Expression von PPE mRNA zu führen vermag und somit den erhöhten Gehalt an PPE mRNA in den Striata von *COMT Met*^{108/158}-homozygoten Individuen erklären kann (siehe Abb. 5.2).

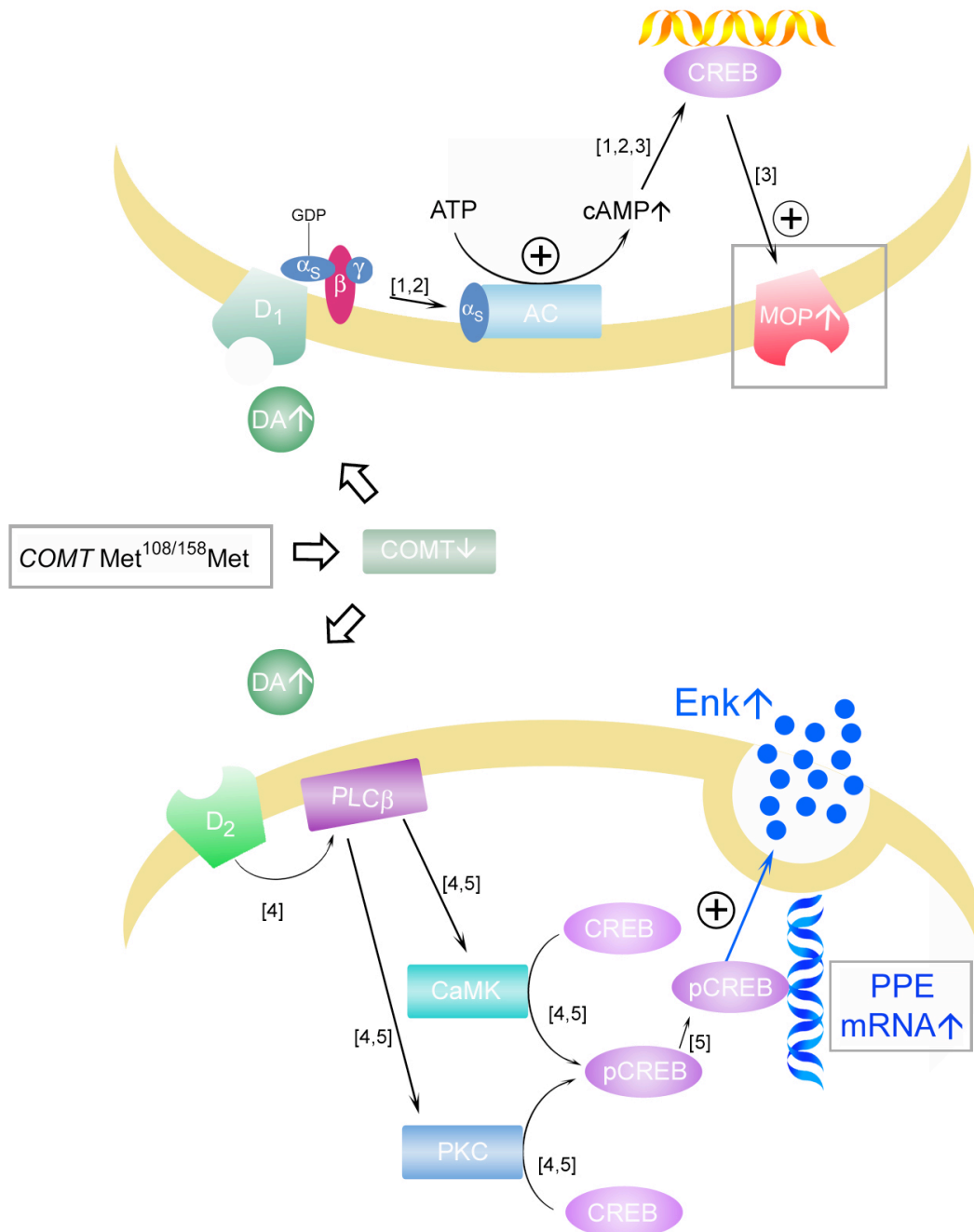


Abb. 5.2 Möglicher Mechanismus der Regulation der μ -Opioidrezeptor- und PPEmRNA- Expression durch den *COMT Val*^{108/158}*Met*-Genotyp im Striatum. Grau umrahmt sind die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Abkürzungen:

DA: Dopamin; AC: Adenylatcyclase; ATP: Adenosintriphosphat; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; CREB: cAMP response element binding protein; pCREB: phosphoryliertes CREB; PLC β : Phospholipase C beta; PKC: Proteinkinase C; CaMK: Calmodulin-abhängige Kinase; Quellen: [1] Brami-Cherrier et al. 2002 [2] Das et al. 1997 [3] Lee und Lee 2003 [4] Yan et al. 1999 [5] Kley und Loeffler 1993

Angesichts der Tatsache, dass neben Dopamin auch Noradrenalin ein wichtiges Substrat der COMT ist, scheint auch eine Regulation über eine Interaktion von noradrenergem und opioidergem System möglich, auch wenn in COMT knock-out Mäusen keine Veränderungen des Noradrenalinpiegels festzustellen waren (Gogos et al. 1998, Huotari et al. 2002).

5.1.3.4 Zusammenfassung

Zusammengefasst übt der *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus einen regulierenden Einfluss auf das Bindungsverhalten und die G-Proteinkopplung von μ -Opioidrezeptoren aus, sehr wahrscheinlich durch eine Veränderung des Dopaminspiegels. Diese Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression ist gleichgerichtet zu dieser Veränderung des Dopaminspiegels, was durch die Stimulation von D1-Rezeptoren, die die μ -Opioidrezeptor-Expression über den cAMP-Spiegel regulieren, erklärt werden könnte.

Im Gegensatz dazu kann die vermehrte μ -Opioidrezeptor-Expression bei Trägern des *COMT Met^{108/158}*-Allels nicht durch Veränderungen der PPE mRNA-Expression begründet werden, da die Ergebnisse der PPE mRNA *in situ* Hybridisierung eine ebenfalls gleichgerichtete Regulation von Enkephalin zeigen.

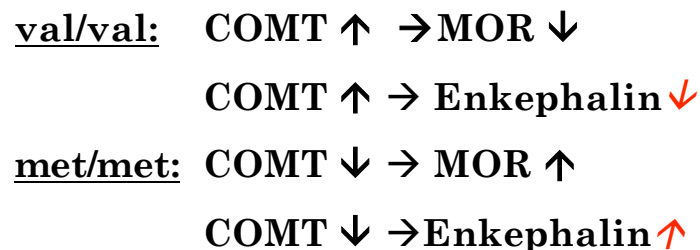


Abb. 5.3: Zusammenfassung der Ergebnisse im Sinne der Hypothese von Zubieta et al. (2003). Entgegen der Hypothese von Zubieta werden μ -Opioidrezeptoren und Enkephalin durch den COMT-Polymorphismus gleichsinnig reguliert.

Es bleibt zu spekulieren, ob die höhere PPE mRNA-Expression im Striatum von *COMT Met^{108/158}*-Homozygoten eine Erklärung dafür wäre, dass die μ -Opioidrezeptor-Expression hier niedriger ist als die von *COMT Val^{108/158}Met*-Heterozygoten und als durch Extrapolation der im Thalamus beobachteten linearen Korrelation für *COMT Met^{108/158}*-Homozygote zu erwarten wäre.

5.2 Pharmakologische und pathophysiologische Implikationen

Der *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus wird im Zusammenhang mit verschiedensten klinischen Fragestellungen diskutiert, allerdings konnten bislang noch keine eindeutigen Kausalzusammenhänge zwischen Polymorphismus und Erkrankung nachgewiesen werden. Zahlreiche Assoziationsstudien haben den Zusammenhang zwischen *COMT*-Genotyp und verschiedenen Erkrankungen untersucht. So scheinen einige Erkrankungen des schizophrenen Formenkreises mit der *COMT*^{LL}-Variante assoziiert zu sein (Strous et al. 1997, Lachmann et al. 1998, Karayiourgou et al. 1997), wohingegen andere Studien keinen Zusammenhang zwischen dem Vorliegen einer Schizophrenie und dem *COMT*-Genotyp zeigen konnten (CH Chen et al. 1996, Daniels et al. 1996, Riley et al. 1996, Wei et al. 1996). Paradoxaerwise berichteten Li et al. (1996), dass vorzugsweise das Allel der hohen *COMT*-Aktivität von Eltern an schizophrene Kinder weitergegeben wird.

Ähnlich verwirrend erscheint die Datenlage zum Zusammenhang von *COMT*-Genotyp und Depression. Einige Studien zeigen keinen Zusammenhang (BIOMED European Bipolar Collaborative Group 1997, Guitierrez et al. 1997, Kunugi et al. 1997), während andere von einem Überwiegen der *COMT*^{LL}-Variante bei Patienten mit endogener Depression berichten (Karege et al. 1987, Ohara et al. 1998). Wieder andere sehen einen Zusammenhang zu bipolaren manisch-depressiven Erkrankungen (Li et al. 1997). Insbesondere bei der sogenannten „rapid-cycling“ bipolaren affektiven Psychose, bei der es zu einer schnellen (1-2 Tage) Abfolge von manischen und depressiven Phasen kommt, scheint *COMT*^{LL} zu überwiegen (Kirov et al. 1998, Papolos et al. 1998).

Tiihonen und Kollegen (1999) berichteten von einer Assoziation des sogenannten „Late-onset-“ (Typ 1) Alkoholismus mit der *COMT*^{LL}-Variante in einem finnischen Kollektiv. Interessanterweise scheint bei polytoxikomanen Patienten der *COMT*^H-Typ häufiger vorzukommen (Vandenbergh et al. 1997). Auch in Migränepatienten ist *COMT*^H-Typ überrepräsentiert (Erdal et al. 2001)

Obwohl keine Assoziation zwischen *COMT*-Gen und Morbus Parkinson nachgewiesen werden konnte, scheint die *COMT*-Aktivität Auswirkungen sowohl auf das Ansprechen auf eine L-DOPA-Therapie als auch auf das Auftreten von Nebenwirkungen zu haben (Männistö und Kaakkola 1999).

Schließlich fand man bei Patientinnen mit Brustkrebs häufiger den *COMT*^L-Typ als in einem gesunden Vergleichskollektiv (Lavigne et al. 1997), während er hingegen möglicherweise protektiven Charakter gegen das Auftreten eines Myokardinfarktes hat (Eriksson et al. 2004).

5.2.1 Mögliche Effekte auf die supraspinale Nozizeption

5.2.1.1 Physiologie und funktionelle Neuroanatomie der supraspinalen Nozizeption

Schmerz wird von der internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) als ein „unangenehmes Sinnes- und Gefühlserlebnis“ definiert, das „mit einer aktuellen oder potentiellen Schädigung des Gewebes assoziiert ist oder als eine solche Schädigung beschrieben wird“ (IASP Task Force on Taxonomy 1994; Rainville 2002). Diese Definition impliziert, dass Schmerz eine subjektive Erfahrung sowohl mit einer sensorischen als auch einer affektiven Dimension ist, die gewöhnlich, jedoch nicht zwangsläufig, mit einer Gewebeschädigung assoziiert ist.

Dahingegen beschreibt der Begriff Nozizeption die Aufnahme, Weiterleitung und zentralnervöse Verarbeitung noxischer Signale (Schmidt 2002). Die Aufnahme solcher noxischen oder potentiell noxischen Signale erfolgt über sogenannte Nozizeptoren. Dies sind spezielle Rezeptoren des peripheren Nervensystems, die als freie Nervenendigungen nozizeptive Reize registrieren. Die Weiterleitung von durch die Erregung von Nozizeptoren entstehenden Aktionspotentialen erfolgt entweder über A δ - oder über C-Fasern, die segmental an Hinterhornneuronen im Rückenmark enden, wo sie auf ein zweites Neuron umgeschaltet werden.

Im Hinterhorn als erste zentrale Struktur der Verarbeitung eingehender nozizeptiver Signale ist über zentrale deszendierende Bahnen in der oberflächlich gelegenen *substantia gelatinosa* eine Abschwächung der nozizeptiven Transmission möglich (sog. Deszendierende Schmerzhemmung). Daneben können in Abhängigkeit der primär-afferenten Erregungsintensität durch Ansteuerung von Inter- und Motoneuronen polysynaptische Schutzreflexe ausgelöst werden. Ausgehend vom Hinterhorn ziehen die Fasern des zweiten Neurons nach ventral, kreuzen auf der gleichen Segmenthöhe nach kontralateral, von wo sie im Vorderseitenstrang, dem *tractus spinothalamicus*, zum Thalamus ziehen (Craig 2003; Derbyshire 1999).

Thalamus

Der Thalamus wird durch Faserzüge in vier größere Bereiche eingeteilt, die anteriore und die mediale Kerngruppe, die ventrale Kerngruppe als größte Thalamusstruktur sowie kaudal anschließend die posteriore Kerngruppe, genannt Pulvinar. Diese Zellgruppen beinhalten insgesamt nach heutigem Wissensstand etwa 120 Untergruppen. Als für die Schmerzverarbeitung relevant wird im wesentlichen der posteriore Anteil des ventralen Kerngebietes angesehen, das sich wiederum in mediale und laterale Kernuntergruppen aufteilen lässt (Hudson 2000).

Ein Teil der nozizeptiven Signale wird über laterale Kernanteile des Thalamus somatotopisch gegliedert zu den sensorischen Arealen S1 und S2 der Großhirnrinde weitergeschaltet, wo die sensorisch-diskriminative Komponente der Schmerzverarbeitung kodiert wird, welche Informationen über Lokalisation, Art (warm, kalt, mechanisch, chemisch etc.) und Intensität des Schmerzreizes umfasst. Im Gegensatz zu dieser als *laterales Schmerzsystem* bezeichneten Art der

Weiterleitung projiziert das sogenannte *mediale Schmerzsystem* nozizeptive Signale über den Ncl. mediodorsalis des Thalamus überwiegend auf limbische Hirnareale, wie zum Beispiel das Cingulum (Derbyshire 1999; Van Hoessen et al. 1993), die für die Ausprägung der affektiv-emotionalen Komponente zuständig sind. Diese affektiv-emotionale Komponente des Schmerzreizes ruft zumeist unlustbetonte Gefühle, also negativ getönte Emotionen, hervor und wirkt daher fast immer als ein Antrieb zur Vermeidung.

(Prä)frontaler Cortex

Des Weiteren werden nozizeptive Signale über das mediale System zum präfrontalen Cortex projiziert, dem die kognitive Verarbeitung des Schmerzreizes zugeschrieben wird. Auf Grund der zytoarchitektonischen Komplexität dieser anatomisch relativ großen Region und wegen der komplexen Konnektivität mit nahezu allen Gehirnregionen sind eindeutige Funktionszuordnungen nur schwer möglich (Hudson 2000). In Bildgebungsstudien wurden allerdings zwei für die Schmerzverarbeitung relevante Strukturen herausgearbeitet: Zum einen handelt es sich dabei um den dorsolateralen präfrontalen Cortex (DLPFC), der im wesentlichen die Regionen BA 9, 10 und 46 umfasst, zum anderen um den ventromedialen präfrontalen (VMPFC) und orbitofrontalen Cortex, bestehend aus den Regionen BA 10, 11 und 12 (Peyron et al. 2000).

Dem DLPFC als Sitz exekutiver Funktionen im Sinne eines Willensaktes wird im Rahmen der Schmerzverarbeitung die Zuwendung der Aufmerksamkeit zum Schmerzreiz zugeordnet (Ingvar 1999). Darüber hinaus gilt er als Sitz des sog. „Arbeitsgedächtnisses“, in dem kurzzeitig verhaltensrelevante Informationen gespeichert werden können, die mit durch eine Verbindung zum Hippocampus abrufbaren, früher gespeicherten Informationen verknüpft werden können (Hudson 2000).

Orbitofrontaler Cortex und VMPFC werden als Sitz der negativ-affektiven Bewertung des Schmerzerlebens angesehen, die durch Fentanyl-Gabe, also die Stimulation von μ -Opioidrezeptoren, vermindert werden kann (Adler et al. 1997). Möglicherweise üben orbitofrontaler Cortex und VMPFC zusammen mit dem anterioren cingulären Cortex (ACC; BA 24, 32) eine inhibitorische Kontrolle von schmerzbezogenen affektiven Signalen aus (Ingvar 1999).

Basalganglien

Die exakte Rolle der Basalganglien für die Schmerzwahrnehmung ist noch unklar. Allerdings zeigen Ergebnisse experimenteller und klinischer Studien, dass die Basalganglien an der Verarbeitung nozizeptiver Informationen beteiligt sind (Chudler und Dong 1995). Die neuroanatomischen Verbindungen der verschiedenen Kerngebiete der Basalganglien, das elektrophysiologische Antwortverhalten basalganglionärer Neurone, metabolische Veränderungen und Veränderungen des Blutflusses nach noxischer Stimulation, das veränderte

Schmerzverhalten von Tieren nach Läsionen, elektrischer Stimulation oder pharmakologischer Manipulation der Basalganglien sowie schließlich die Schmerzsymptome bei Erkrankungen der Basalganglien weisen auf verschiedene Funktionen der Basalganglien bei der Schmerzwahrnehmung hin.

Erstens haben die Basalganglien vermutlich einen Anteil an der sensorisch-diskriminativen Dimension der Schmerzverarbeitung, indem sie die Stärke der noxischen Stimulation kodieren und somit möglicherweise mit der Abstufung von Intensität oder Geschwindigkeit motorischer (Ausweich-)Reaktionen assoziiert sind. Nozizeptive Neurone der Basalganglien haben vergleichsweise große rezeptive Felder und spielen somit wahrscheinlich keine Rolle in der diskreten topographischen Zuordnung eines Schmerzreizes, zumal sie auch nicht somatotopisch gegliedert sind (Chudler und Dong 1995).

Zweitens basieren Erkenntnisse über den Anteil der Basalganglien an der affektiv-emotionalen Dimension zum einen auf dem Einfluss elektrischer Stimulationen auf das affektive Verhalten und zum anderen auf den neuralen Verschaltungen der Basalganglien mit Gehirnregionen, die mit emotionalen Verhaltensweisen assoziiert sind (z.B. mit dem PFC, ACC, Amygdala, mediale Thalamuskern) (Groenewegen et al. 1990; Shinonaga et al. 1992; Chudler und Dong 1995).

Drittens weisen klinische und experimentelle Berichte eines sensorischen Neglektes nach Basalganglienerkrankungen auf eine Funktion bei der kognitiven Dimension der Schmerzwahrnehmung hin.

Viertens scheinen die Basalganglien, angesichts der Tatsache, dass pharmakologische, elektrische und neurochirurgische Manipulationen der Substantia nigra und des Striatums Reaktionen auf noxische Stimuli beeinflussen können, in die Modulation nozizeptiver Informationen involviert zu sein (Chudler und Dong 1995). Dopamin, GABA und endogene Opioide in den Basalganglien agieren als tonische Inhibitoren thalamischer Aktivität. Ob diese Transmitter auch nozizeptive Signale im medialen Thalamus inhibieren können, ist unklar.

Supraspinale Antinozizeption

Die Schmerzwahrnehmung kann in mehrfacher Hinsicht und auf verschiedenen Ebenen der Transmission nozizeptiver Signale beeinflusst werden. Zentrale Schnittstelle dieses antinozizeptiven Systems ist das periaquäduktale Höhlengrau (PAG), das direkte Afferenzen aus dem Thalamus sowie aus dem limbischen System, darunter verschiedene Regionen der frontalen Großhirnrinde und aus der Amygdala, erhält. Das PAG kontrolliert indirekt die nozizeptive Transmission durch Verbindungen über Neurone der rostralen ventrolateralen Medulla (RVM) und das dorsolaterale pontine Tegmentum (DLPT). Diese zwei Regionen projizieren direkt über den Hinterseitenstrang (funiculus dorsolateralis) des Rückenmarks zu den Laminae des Hinterhorns, die die erste Umschaltstation der nozizeptiven Transmission enthalten (Fields 2004).

All diese supraspinalen Komponenten des antinozizeptiven Systems sind reich an μ -Opioidrezeptoren, darunter Inselcortex, Amygdala, Hypothalamus, PAG, DLPT, RVM und

Rückenmarkshinterhorn (Mansour et al. 1988, 1995; Arvidsson et al.). Die Injektion von MOP-Agonisten in jede dieser Strukturen inhibiert die Reaktionen auf noxische Stimulationen (Fields et al. 1991, Yaksh et al. 1978, Manning et al. 1994, Burkey et al.).

Darüber hinaus ist die Ausschüttung endogener Opiode in die serielle Verschaltung des antinozizeptiven Systems involviert. Der antinozizeptive Effekt durch Aktivierung des Systems an einer Stelle kann durch die Injektion eines μ -Opioidrezeptor-Antagonisten in eine nachgeschaltete Struktur aufgehoben werden (Fields 2004). Welches endogene Opioid diese Effekte vermittelt, ist zwar noch nicht geklärt, aber die antinozizeptiven Effekte von in die RVM injizierten Enkephalinase-Inhibitoren weisen auf die Beteiligung der Enkephaline hin (Al-Rhodan et al. 1990).

Im PAG inhibieren Opiode über μ - und δ -Opioidrezeptoren GABAerge Neuronen (Wang und Wessendorf 2002, Behbani et al. 1990, Vaughan und Christie 1997). Diese GABAergen Neurone inhibieren Projektionen vom PAG in die RVM, die also durch Opiode disinhibiert werden, was zu einer Aktivierung von sogenannten „off“-Zellen in der RVM führt, die wiederum die nozizeptive Transmission hemmen (Reichling und Basbaum 1990, Morgan et al. 2003, Cheng et al. 1986, Tortorici und Morgan 2002).

Flores et al. (2004) konnten kürzlich eine Beteiligung des dopaminergen Systems im PAG an der durch μ -Opioidrezeptoren vermittelten supraspinalen Antinozizeption zeigen. Die Läsion dopaminergener Neurone im PAG durch 6-Hydroxydopamin (6-OHDA) verringert deutlich die analgetische Potenz von μ -Opioidrezeptor-Agonisten. Dieser Effekt wird über D1-Rezeptoren vermittelt: Die Injektion von D1-, nicht aber von D2-Antagonisten zeigte die gleiche Wirkung wie die Läsion mit 6-OHDA.

5.2.1.2 Einfluss des COMT Val^{108/158}Met-Polymorphismus auf die supraspinale Nozizeption und Antinozizeption

Angesichts der Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit der Einfluss des COMT Val^{108/158}Met-Polymorphismus auf die Expression von μ -Opioidrezeptoren am deutlichsten im medialen Thalamus war, scheint auf Grund der funktionellen Verschaltung des medialen Schmerzsystems eine Beeinflussung vor allem der affektiv-emotionalen Komponente der Schmerzwahrnehmung plausibel. So fanden Zubieta et al. (2003) auch eine signifikante Korrelation zwischen dem COMT Val^{108/158}Met-Genotyp und der negativ-affektiven Bewertung des Schmerzreizes. Das Ausmaß der sensorischen und der affektiven Dimension des Schmerzreizes war in dieser Studie anhand des McGill-Fragebogens zur Schmerzbeurteilung (McGill pain questionnaire, MPQ), das emotionale Befinden mittels der *positive and negative affectivity scale* (PANAS) untersucht worden. Die dabei erzielten Werte des MPQ für die sensorische und die affektive Beurteilung sowie die negativ-affektiven PANAS-Werte waren für COMT Met^{108/158}-homozygote Probanden am höchsten, gefolgt von COMT Val^{108/158}Met-heterozygoten und COMT Val^{108/158}-homozygoten Individuen, wobei die Korrelation der Werte für die sensorische Dimension mit dem COMT Val^{108/158}Met-Genotyp keine statistische Signifikanz erreichten (Zubieta et al. 2003).

Schon frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass Opiode über das mediale Schmerzsystem in der Lage sind, selektiv die affektive Dimension akuter und chronischer noxischer Stimulationen zu inhibieren, während die sensorisch-diskriminative Dimension unbeeinflusst bleibt (Derbyshire 2002; Zubieta et al. 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit für den frontalen Cortex und das Striatum, hier insbesondere für den Ncl. accumbens und die ventralen Anteile von Caudatum und Putamen, lassen zudem einen Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps auf die kognitive Integration von Schmerzreizen vermuten.

Ob diese durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp hervorgerufenen Unterschiede in der Funktion des μ -Opioidrezeptor-Systems nur Zwischenschritte in der Schmerzverarbeitung sind oder tatsächlich relevante Unterschiede in der Schmerzwahrnehmung, beispielsweise durch eine unterschiedliche Ausprägung der affektiven, diskriminativen oder kognitiven Dimensionen, zur Folge haben, bleibt jedoch in weiteren Studien zu untersuchen.

Auch die Art des Schmerzreizes in experimentellen Schmerzstudien scheint eine Rolle zu spielen: Im Gegensatz zum von Zubieta et al. verwendeten Modell mit intramuskulären Injektionen einer hypertonen Salzlösung in den Masseter konnte in einer Studie mit epikutaner thermischer Stimulation kein Unterschied in der Schmerzwahrnehmung zwischen den *COMT Val^{108/158}Met*-Genotypen gezeigt werden (Kim et al. 2004)

Erdal et al. (2001) hatten in einer Assoziationsstudie mit türkischen Probanden einen Zusammenhang des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps mit der Prävalenz von Migräneerkrankungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass unter Migräne-Patienten im Vergleich mit dem gesunden Kontrollkollektiv das *COMT Met^{108/158}*-Allel überrepräsentiert ist. Die Rolle des dopaminergen Systems in der Pathogenese der Migräne ist unklar. Klinische und pharmakologische Studien weisen auf eine Hypersensitivität von Dopaminrezeptoren bei Migränepatienten hin (Lai et al. 1997). Erdal et al. führen in ihrer Diskussion an, dass für *COMT Val^{108/158}*-homozygote Patienten niedrigere Dopaminspiegel führe zu solch einer Rezeptorhypersensitivität. Allerdings können sie so nicht ihre Ergebnisse erklären, da nicht das *COMT Val^{108/158}*- sondern das *COMT Met^{108/158}*-Allel unter den Migränepatienten überrepräsentiert war.

Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis ist eine Modulation des antinozizeptiven Systems durch den *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus. Eine Störung dieses Systems wird als eine mögliche Komponente in der Pathogenese der Migräne diskutiert.

Armero et al. (2005) konnten in einer Fall-Kontrollstudie in einer spanischen Studienpopulation keinen Zusammenhang zwischen dem *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp und der Anfälligkeit (*susceptibility*) für neuropathischen Schmerz nachweisen. Im Vergleich von 144 Patienten mit neuropathischen Schmerzen und einem Kontrollkollektiv von 139 gesunden Probanden fand sich kein Unterschied in der Verteilung der drei *COMT Val^{108/158}Met*-Genotypen. Allerdings wurden in dieser Studie keinerlei Aussagen über das klinische Ausmaß, den Schweregrad, die affektive oder sensorische Dimension oder die Lebensqualität der Schmerzpatienten getroffen.

Von größerer klinischer Relevanz hingegen scheint eine Studie von Rakvåg und Kollegen (2005). An 207 Krebspatienten europäischer Herkunft (*caucasian*), die unter Tumorschmerzen litten und mit Morphin behandelt wurden, untersuchten die Autoren den Zusammenhang zwischen dem Morphinbedarf und den Serumkonzentrationen von Morphin und Morphinmetaboliten mit dem *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus. Die benötigte Morphindosis war dabei für *COMT Val^{108/158}*-homozygote Patienten signifikant höher als für *COMT Val^{108/158}Met*-heterozygote und *COMT Met^{108/158}*-homozygote Patienten. Dieser Unterschied war nicht durch andere Faktoren wie Geschlecht, Alter, Tumorlokalisation, Erkrankungsdauer oder Dauer der Schmerzbehandlung erklärbar. Die bestimmten Serumkonzentrationen von Morphin und seinen Metaboliten waren ebenfalls bei *COMT Met^{108/158}*-homozygoten Patienten am niedrigsten und bei *COMT Val^{108/158}*-homozygoten Patienten am höchsten, allerdings erreichten diese Unterschiede keine statistische Signifikanz. Die Autoren diskutieren als mögliche Ursache für den niedrigeren Morphinbedarf bei *COMT Met^{108/158}*-homozygoten Patienten eine höhere Effektivität von Morphin auf Grund der von Zubieta gefundenen höheren μ -Opioidrezeptordichte.

Diatchenko et al. (2005) konnten einen starken Einfluss der COMT-Enzymaktivität auf die Schmerzwahrnehmung zeigen. In genetischen Untersuchungen identifizierten sie drei Haplotypen mit niedriger (LPS), mittlerer (APS) und hoher (HPS) Schmerzempfindlichkeit. Dabei ist der LPS-Haplotyp mit einer deutlich höheren Enzymaktivität assoziiert als APS und HPS. Allerdings scheint der *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus allein nicht die entscheidende Determinante zu sein, sondern vielmehr in einer komplexen Interaktion mit anderen Polymorphismen innerhalb des COMT-Gens die o.g. drei Haplotypen zu generieren.

5.2.2 Suchterkrankungen

Sucht kann am besten definiert werden als ein Kontrollverlust über den Gebrauch von oder als das zwanghafte Suchen nach Substanzen (Medikamente oder Drogen) und deren Einnehmen trotz ihrer negativen Konsequenzen. Abhängigkeit wird hervorgerufen durch die Wirkungen suchterzeugender Substanzen auf ein vulnerables Gehirn. Dieser Prozess wird stark beeinflusst sowohl von der genetischen Ausstattung des jeweiligen Individuums als auch vom psychologischen und sozialen Kontext, in dem die Einnahme der Substanz erfolgt (Nestler 2001).

Der Interaktion von μ -Opioidrezeptoren mit Dopamin-Rezeptoren im ventralen Striatum, insbesondere im Ncl. accumbens wird eine zentrale Rolle in Suchtentstehung und -verstärkung zugeschrieben (Shippenberg und Herz, 1987, 1988; Shippenberg 1991, DiChiara und North 1992, H. Akil et al. 1998, Daunais et al. 2001).

Gemeinsame Endstrecke einer ganzen Reihe von sehr unterschiedlichen suchterzeugenden Drogen, darunter Opiate, Psychostimulantien wie Amphetamin und Kokain, Alkohol und Nikotin, ist dabei die Aktivierung des mesolimbischen Belohnungssystems durch eine Erhöhung

des extrazellulären Dopaminspiegels im Ncl. accumbens als positiver Verstärker im Sinne der operanten Konditionierung nach Skinner (Wise 1996).

Die Projektionen des mesolimbischen Dopaminsystems werden als das entscheidende neuroanatomische Substrat dieses Belohnungsystems angesehen. Sie nehmen ihren Ursprung im mesencephalen ventralen Tegmentum (*ventral tegmental area*, VTA) und projizieren zum Ncl. accumbens und anderen limbischen Strukturen, darunter dem Präfrontalen Cortex (PFC), den ventralen Anteilen von Caudatum und Putamen sowie in die Amygdala. Endogene Opioide, dabei vor allem die Enkephaline und β -Endorphin, spielen eine wichtige Rolle als modulierende Faktoren bei der Vermittlung der belohnenden Wirkung von Opiaten, Alkohol und vermutlich auch Nikotin (Koob und Nestler 1997; Nestler 2001, 2004; Gianoulakis 2001).

Als Drogen missbrauchte Opiate wie Heroin und Morphin führen durch eine Stimulation von μ -Opioidrezeptoren zu einer Hemmung von GABAergen Neuronen in der VTA, was zu einer Disinhibition des mesolimbischen Systems und somit zu einem Dopaminanstieg im Ncl. accumbens führt (Bals-Kubik et al. 1993, SW Johnson und North 1992, Leone et al. 1991).

Amphetamin und Kokain führen über eine Inhibition von Dopamintransportern zu einem erhöhten extrazellulären Dopaminspiegel (DiChiara und Imperato 1988). Außerdem konnte in Tierversuchen gezeigt werden, dass die Verabreichung von Kokain in Ratten zu einer Erhöhung der μ -Opioidrezeptordichte im Ncl. accumbens, der basolateralen Amygdala und dem rostralen Striatum führt (Unterwald et al. 1994). Ebenso war ein vermehrtes Signal im DAMGO-stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Binding im Ncl. accumbens, im Striatum und im cingulären Cortex nach wiederholter Kokaingabe nachweisbar (Schroeder et al. 2003). Auch die Koapplikation von Ethanol und Kokain bewirkte einen signifikanten Anstieg der μ -Opioidrezeptordichte in der *shell*-Region des Ncl. accumbens (Rosin et al. 2003). Dies alles sind deutliche Hinweise auf eine Beteiligung des μ -Opioidsystems an der Vermittlung von suchterzeugenden und suchtvorstärkenden Effekten von Kokain.

Angesichts der unterschiedlichen Verschaltung der Subregionen des Ncl. accumbens wird insbesondere der *shell*-Region eine entscheidende Rolle an den emotionalen und motivierenden Aspekten der Sucht zugeschrieben: Andere mit Suchterkrankungen assoziierte Hirnregionen, die mit der Abhängigkeit von beispielsweise Opiaten oder Kokain in Verbindung gebracht werden, wie zum Beispiel der laterale Hypothalamus oder der mediale präfrontale Cortex, sind mit der *shell*-Region verbunden (H. Akil et al 1998). Der caudale Anteil des ventralen Pallidum wird von Fasern ausschließlich aus der *shell*-Region erreicht (Heimer et al 1991). Dieser Teil des ventralen Pallidum wiederum ist involviert in die Entstehung und Aufrechterhaltung der Kokainabhängigkeit (Robledo und Koob 1993, PI Johnson et al. 1993).

Verhaltenspharmakologische Studien im Tierversuch haben mittels der selektiven Injektion von μ -Opioidrezeptor-Agonisten in das ventrale Striatum gezeigt, dass μ -Opioidrezeptoren in dieser Region an der lokomotorischen Kontrolle, am Futterverhalten und insbesondere an der Verarbeitung emotionaler und belohnungsbezogener Informationen beteiligt sind (Voorn et al

1996). Die Stimulation von μ -Opioidrezeptoren wirkt verstärkend im Rahmen sowohl der operanten als auch der klassischen Konditionierung (Shippenberg 1993).

Die in dieser und anderen Studien beobachtete deutlich höhere Dichte von μ -Opioidrezeptoren in der *shell*-Region im Vergleich zur *core*-Region des Ncl. accumbens einerseits, und andererseits der Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyps auf das Bindungsverhalten der μ -Opioidrezeptoren und der PPEmRNA-Expression in dieser Region, lassen eine Assoziation des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus mit einer erhöhten Prävalenz von Suchterkrankungen möglich erscheinen. So wurde eine erhöhte Frequenz des *COMT Val^{108/158}*-Allels bei polytoxikomanen Patienten berichtet (Vandenbergh et al. 1997), ein Ergebnis, das von Horowitz et al. (2000) in einer Untersuchung israelischer Heroinabhängiger bestätigt wurde. Allerdings sind weitere Untersuchungen von Nöten, um die von Vandenbergh et al. vermutete erhöhte Vulnerabilität von *COMT Val^{108/158}*-homozygoten Individuen für den Missbrauch von Drogen zu substantiieren. Die Autoren beider Studien können ein falsch positives Ergebnis durch die Stratifizierung von Fall- und Kontrollgruppen nicht ausschließen. Cao et al. (2003) beobachteten in einer groß angelegten Studie von chinesischen Heroinabhängigen keinerlei Assoziation mit dem *COMT Val^{108/158}Met*-Genotyp.

Einfluss des COMT Val^{108/158}Met-Genotyps auf die Prävalenz von Alkoholismus

Zahlreiche Studien weisen auf einen engen Zusammenhang zwischen der Alkoholabhängigkeit und dem endogenen Opioidsystem hin (Gianoulakis 2001). Es wird angenommen, dass Alkohol die Ausschüttung verschiedener endogener Opioider stimuliert, die wiederum über eine Disinhibition des mesolimbischen Belohnungssystems zu einem Dopaminanstieg im Ncl. accumbens und somit zu einer positiven Verstärkung führen (Spanagel et al. 1992, Acquas et al. 1993, De Waele et al. 1995, Jamensky et al. 1997, Koob et al. 1998). Dabei sind vermutlich gesteigerte β -Endorphin- und Enkephalinspiegel sowie eine erhöhte Dichte an μ - und/oder δ -Opioidrezeptoren in diesen Regionen besonders wichtig für die Entstehung und Aufrechterhaltung übermäßigen Alkoholkonsums (Gianoulakis 2001).

Epidemiologische und genetische Studien geben klare Hinweise darauf, dass genetische Faktoren und Familiengeschichte eine signifikante Rolle für die Vulnerabilität einer Person für übermäßigen Alkoholkonsum und Alkoholismus spielen. Das führte C. Gianoulakis (2001) zu der Vermutung, dass genetisch determinierte Unterschiede in der Aktivität des endogenen Opioidsystem die suchterzeugenden Effekte von Alkohol beeinflussen und somit zu Unterschieden in der Vulnerabilität für Alkoholismus führen.

In diesem Zusammenhang sei auf eine Studie von Tiihonen et al. (1999) verwiesen, die eine Assoziation des sogenannten „Late-onset-“ (Typ 1) Alkoholismus mit dem *COMT Met^{108/158}*-Allel in der finnischen Bevölkerung nachweisen konnte. Kauhainen et al. (2000) zeigten, dass der wöchentliche Alkoholkonsum in einem finnischen Kollektiv bei *COMT Met^{108/158}*-homozygoten Probanden signifikant höher war als der von *COMT Val^{108/158}Met*-heterozygoten oder *COMT*

Val^{108/158}-homozygoten Probanden. Wang et al. (2001) fanden weitere Hinweise für eine Beteiligung des *COMT Met*^{108/158}-Allels an der Entstehung von Alkoholismus in einer Untersuchung eines deutschen Probandenkollektivs. Während Ishiguro et al. (1999) keine generelle Assoziation zum Alkoholismus in der japanischen Bevölkerung zeigten, berichteten Nakamura et al. (2001) von deutlichen Unterschieden zwischen den drei *COMT Val*^{108/158}*Met*-Genotypen in Bezug auf die Ausprägung der Entzugssymptomatik, insbesondere des Delirium tremens bei japanischen Alkoholabhängigen.

Die erhöhte PPE mRNA-Expression im Striatum sowie die höhere Dichte von μ -Opioidrezeptoren bei *COMT Met*^{108/158}-homozygoten Individuen ist also möglicherweise ein genetisch determinierter Risikofaktor für Alkoholismus im Sinne des von C. Gianoulakis (2001) vermuteten Zusammenhangs.

5.2.3 Einfluss auf die Therapie des M. Parkinson

Assoziationsstudien konnten keinen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem *COMT Val*^{108/158}*Met* Polymorphismus und dem Auftreten des Morbus Parkinson nachweisen, wie aus einer Meta-Analyse von E.K. Tan et al. (2000) ersichtlich ist. Allerdings scheint es populationsspezifische Unterschiede zu geben: Während Studien an koreanischen (M.S. Lee et al. 2001), englischen (Hoda et al. 1996), polnischen (Bialecka et al. 2005) und weißen (=“kaukasischen“) nordamerikanischen (Hernán et al. 2002, Goudreau et al. 2002) Parkinson-Patienten keine eindeutige Assoziation aufzeigten, konnte in einer Studie mit japanischen Parkinson Patienten eine höhere Frequenz des Met-Allels im Vergleich zum gesunden Kontrollkollektiv nachgewiesen werden (Kunugi et al 1997).

In einer weiteren Studie an japanischen Patienten konnten Watanabe et al. (2003) darlegen, dass Träger des Met-Allels häufiger unter durch die L-Dopa-Therapie induzierten Dyskinesien litten.

5.2.3.1 L-Dopa-induzierte Dyskinesien

Diese L-Dopa-induzierten Dyskinesien (LID) stellen, neben der mit zunehmender Behandlungsdauer immer kürzer werdenden Wirkdauer einer L-Dopa-Dosis (dem sogenannten „wearing-off“-Phänomen), die limitierenden Faktoren der Effizienz der L-Dopa-Therapie des M. Parkinson dar, da sie die Lebensqualität der Patienten oft ebenso sehr beeinträchtigen wie Symptome ihrer Grunderkrankung (Fahn, 2000; Obeso et al. 2000).

Im Zentrum der Pathophysiologie des M. Parkinson steht ein aufgrund der Degeneration dopaminerg, melaninhaltiger Zellen der *Substantia nigra* entstehender Dopaminmangel an striatalen Rezeptoren. Diesen Dopaminmangel auszugleichen ist das Ziel der Therapie mit L-Dopa, einer ZNS-gängigen Vorstufe des Dopamins. Grundvoraussetzung für das Auftreten von LID scheinen nigrale Degeneration und striatales dopaminerges Defizit zu sein, da in gesunden (d.h. nicht an Parkinson erkrankten) Probanden durch L-Dopa-Gabe keine Dyskinesien auslösbar waren (Nutt 1990). Darüber hinaus ist das Auftreten von LID an eine intakte Funktion der übrigen Kerngebiete der Basalganglien gebunden; so lassen sich durch die Inhibition der neuronalen Aktivität in *Globus pallidus, pars interna (GPi)* oder im *Ncl. subthalamicus* durch

neurochirurgische Eingriffe oder Tiefe Hirnstimulation LID deutlich reduzieren (Krack et al. 1998, Tasker et al. 1997, Lozano et al. 1995). In zahlreichen Studien am Tiermodell wurden die biochemischen und molekularen Mechanismen untersucht, die den LID zugrunde liegen. Die Läsion der nigrostriatalen Projektionen durch 6-Hydroxy-Dopamin (6-OHDA) im Gehirn der Ratte und insbesondere durch 1-Methyl-4-Phenyl-1,2,3,6-Tetrahydropyridin (MPTP) im Primatenhirn sind dabei die wichtigsten Methoden in der tierexperimentellen Parkinsonforschung. Untersuchungen in post mortem Gewebe sowohl von Parkinson-Patienten als auch von MPTP-behandelten Affen ergaben einen deutlichen Anstieg an PPE mRNA im Striatum (Nisbet et al. 1995, Herrero et al. 1995). Im MPTP-Modell konnte nach Gabe von L-Dopa bzw. selektiven D1- oder D2-Agonisten ein Rückgang von PPE mRNA auf das Niveau gesunder Kontrollen beobachtet werden, allerdings nur bei Tieren, die keine dopaminerg induzierten Dyskinesien entwickelten. In Tieren mit Dyskinesien hingegen blieb die PPE Expression erhöht (Morissette et al. 1997, 1999, 2005). Ähnliche Ergebnisse ergaben auch Studien an 6-OHDA-läsionierten Ratten (Cenci et al. 1998, Johansson et al. 2001).

Ein signifikanter Anstieg von PPE-Transkripten wurde auch im lateralen Anteil des Putamens von L-Dopa-therapierten Parkinson-Patienten mit LID im Vergleich zu Patienten ohne LID gefunden (Calon et al. 2002). In einer PET-Studie konnten Piccini et al. (1997) ein deutlich erniedrigtes Bindungsverhalten von [¹¹C]Diprenorphin an striatalen Opioidrezeptoren in Parkinson-Patienten mit LID im Vergleich zu nicht-dyskinetischen Patienten nachweisen. Eine mögliche Erklärung für diese Reduktion ist die Verdrängung von [¹¹C]Diprenorphin von den Bindungsstellen durch endogene Liganden, beispielsweise durch Enkephalin. Diese Ergebnisse konnten von Johansson et al. (2001) im 6-OHDA-Rattenmodell bestätigt werden. Die Entwicklung von LID bei Ratten war mit einem verringerten [³H]Diprenorphin-Binding und einer erhöhten PPE mRNA Expression im Striatum assoziiert, wobei das Binding an μ - und δ -Opioidrezeptoren im Striatum keinen signifikanten Unterschied zeigte und im präfrontalen Cortex erhöht war. Chen und Kollegen (2005) hingegen zeigten in einer GTP γ S-Studie an Affen, dass LID mit einer signifikant höheren μ -Opioidrezeptor-vermittelten G-Protein-Aktivierung in Cortex und Basalganglien vergesellschaftet sind.

Die erhöhte enkephalinerge Aktivität im Putamen zusammen mit einer erhöhten Sensitivität von GABA_A-Rezeptoren für GABA im GPi führt vermutlich mit zu einer verminderten Aktivität von Neuronen im GPi. Dies wiederum hat eine Disinhibition von thalamischen Zielneuronen pallidaler Projektionen und somit eine thalamo-corticale Dysregulation zur Folge, die als Ursache dopaminerg induzierter Dyskinesien diskutiert wird (Calon et al. 2000, Calon und DiPaolo 2002). Die signifikant erhöhte PPE Expression in den Striata der *COMT* Met^{108/158}-Homozygoten unterstützt in diesem Zusammenhang die von Watanabe gefundene Assoziation von LID mit dem *COMT* Met-Allel und trägt möglicherweise zu einer erhöhten Vulnerabilität für LID bei.

5.2.3.2 Einfluss auf die Therapie mit COMT-Inhibitoren

Das in der Parkinsontherapie nach wie vor als „Goldstandard“ eingesetzte L-Dopa wird von zwei Enzymen abgebaut. Zum einen katalysiert die Dopa-Decarboxylase die Decarboxylierung von L-Dopa zu Dopamin, zum anderen wird L-Dopa durch die COMT zu 3-O-Methyldopa abgebaut. Beide Enzyme kommen sowohl peripher als auch zentral vor und verringern somit durch den Abbau von L-Dopa in der Peripherie die Bioverfügbarkeit von im ZNS wirksamem L-Dopa. Zur Verbesserung der Wirksamkeit von L-Dopa in der Parkinsontherapie wird heute L-Dopa standardmäßig mit peripheren Decarboxylasehemmern (Benserazid, Carbidopa) koappliziert.

Die Entwicklung neuer, selektiver Hemmstoffe der COMT in den 1990er Jahren weckte neue Hoffnungen, die Parkinson-Therapie weiter optimieren zu können.

Als Vertreter dieser neuen Substanzklasse sind bislang Tolcapon und Entacapon klinisch erprobt worden. Beide sind oral verfügbare, reversible Inhibitoren der COMT, wobei sich die Wirkung von Entacapon auf die Peripherie beschränkt, während Tolcapon sowohl peripher als auch zentral wirksam ist und auch den stärkeren Hemmeffekt besitzt. Die alleinige Gabe von Tolcapon konnte keine Verbesserung der Parkinsonsymptomatik zeigen, weswegen davon ausgegangen wird, dass die COMT-Hemmung im ZNS nicht wesentlich zum therapeutischen Effekt beiträgt.

Dagegen bewirken COMT-Inhibitoren bei der Koapplikation mit L-Dopa eine Verlängerung der Plasmahalbwertszeit und damit auch der Wirkungsdauer und der zentralen Verfügbarkeit von L-Dopa, ohne allerdings die maximale Plasmakonzentration einer Einzeldosis zu erhöhen (Kaakkola et al. 1994, Keränen et al. 1993). Dadurch führt eine COMT-Inhibition zu weniger Fluktuationen des L-Dopa-Plasmaspiegels und somit auch zu weniger Fluktuationen der L-Dopa-Wirkung (on-off-Symptomatik) (Münchau und Bhatia 2000). Die orale Gabe von Entacapon verbessert im Allgemeinen die Dauer der sog. „on“-Zeit (die Zeit, in der die Parkinsonsymptomatik durch die Wirkung von L-Dopa positiv beeinflusst wird) um 30-60 Minuten (Kieburtz und Rinne 1996, Ruottinen und Rinne 1996, Parkinson Study Group 1997, Rinne et al. 1998). Die sog. „off“-Zeit (die Zeit zwischen zwei L-Dopa-Gaben, in der die Parkinsonsymptomatik aufgrund eines Nachlassens der L-Dopa-Wirkung wieder überhand nimmt) wird durch Entacapon durchschnittlich um 1,3 Stunden verkürzt (Rinne et al. 1998). Die durchschnittliche L-Dopa-Tagesdosis kann um 12% gesenkt werden (Parkinson Study Group 1997, Rinne et al. 1998).

Zu den schwerwiegendsten Nebenwirkungen der COMT-Inhibitoren zählen durch eine verstärkte dopaminerge Stimulation erklärable unerwünschte Wirkungen, wie die Potenzierung von L-Dopa-induzierten Dyskinesien, Übelkeit und Erbrechen, orthostatische Hypotonie, Halluzinationen und Schlafstörungen (Kurth et al. 1997, Rajput et al. 1997, Rinne et al. 1998, Ruottinen und Rinne 1996, Baas et al. 1997, Parkinson Study Group 1997).

Der Einfluss des *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus auf die klinische Effektivität von COMT-Inhibitoren wurde bislang nur in einer einzigen Studie untersucht. Chong et al. (2000) konnten in einer Studie mit 24 Parkinsonpatienten in Kanada eine Korrelation mit dem *COMT Val^{108/158}Met*-

Genotyp weder für die klinische Verbesserung der Symptomatik durch Tolcapon, noch für die L-Dopa-Dosisersparnis, noch für die erforderliche Tolcapondosis zeigen. Allerdings wurde in dieser Studie nicht untersucht, ob es eine Assoziation zwischen dem *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus und dem Auftreten dopaminerg induzierter Nebenwirkungen von COMT-Inhibitoren gibt. Zudem sind weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven sowie in verschiedenen Populationen erforderlich, um genauere Aussagen über einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *COMT Val^{108/158}Met*-Polymorphismus und der Wirksamkeit von COMT-Inhibitoren treffen zu können.

Ebenso sehr bleibt es zukünftigen Studien vorbehalten, die Auswirkungen der Therapie mit COMT-Inhibitoren auf das Opioidsystem und auch die Schmerzwahrnehmung zu beleuchten.

6. Zusammenfassung

Die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) ist neben der Monoaminoxidase das entscheidende Enzym im Katabolismus der Katecholamine im Gehirn des Menschen. Die Enzymaktivität der COMT in menschlichen Geweben zeigt ein genetisch polymorphes Verhalten, als dessen Ursache die Substitution der Aminosäure Valin gegen Methionin an Position 108 (für das Isoenzym S-COMT) bzw. 158 (für das Isoenzym MB-COMT), bedingt durch einen *single nucleotide polymorphism* (SNP) identifiziert werden konnte. Die drei Genotypen dieses *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus sind in der mitteleuropäischen Bevölkerung annähernd gleichverteilt, wobei der Met/Met-Genotyp mit einer niedrigen, der Met/Val-Genotyp mit einer intermediären und der Val/Val-Genotyp mit einer hohen Enzymaktivität assoziiert ist.

Daten einer kürzlich publizierten Studie mit [¹¹C]-Liganden-PET zeigen, dass der *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus einen Einfluss auf die Expression von μ -Opioidrezeptoren (MOP) im menschlichen Gehirn sowie auf die zentrale Schmerzwahrnehmung und -verarbeitung ausübt.

Diese Ergebnisse werden in der vorliegenden Arbeit an einem weiteren Kollektiv (8 Met/Met, 6 Met/Val und 3 Val/Val) aus menschlichem *post mortem*-Gewebe unter Verwendung neurochemischer und molekularbiologischer Methoden validiert.

Das [³H]DAMGO-Liganden-Binding für μ -Opioidrezeptoren wurde auf histologischen Schnitten aus frontalem Cortex, Striatum (mit Ncl. caudatus, Putamen und Ncl. accumbens), Thalamus (Ncl. mediodorsalis) und neocerebellärem Cortex durchgeführt. Dabei zeigte sich eine höhere Expression von μ -Opioidrezeptoren bei *COMT* Met^{108/158}-Homozygoten und *COMT* Val^{108/158}Met-Heterozygoten als bei *COMT* Val^{108/158}-Homozygoten. Dieser Unterschied war statistisch signifikant im Ncl. caudatus, im Ncl. accumbens (jeweils Val/Met vs. Val/Val) und im Ncl. mediodorsalis thalami (Met/Met vs. Val/Val).

Im Ncl. mediodorsalis thalami wurde dieses Ergebnis durch einen DAMGO-stimulierten [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay, der die intrazelluläre Kopplung der μ -Opioidrezeptoren untersucht, statistisch signifikant bekräftigt. Statistische Regressions- und Korrelationsanalysen, die den möglichen Einfluss verschiedener Kovariablen untersuchen, bestätigten den *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus als den wichtigsten prädiktiven Faktor.

Als möglicher Mechanismus dieser Regulation - zumindest im Striatum - wurde ein Einfluss des *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus auf Enkephalin in der Literatur diskutiert, der wiederum reaktiv zu einer entgegengesetzten Regulation der μ -Opioidrezeptor-Expression führe. Daher wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine *in situ* Hybridisierung für Präproenkephalin (PPE) durchgeführt. Im Striatum ist die PPEmRNA-Expression bei *COMT* Met^{108/158}-Homozygoten signifikant höher, μ -Opioidrezeptor-Expression und PPEmRNA-Expression unterliegen somit also

einer gleichgerichteten Regulation durch den *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus. Zudem war im Thalamus keine PPEmRNA nachweisbar.

Somit muss ein anderer als ein Enkephalin-abhängiger Regulationsmechanismus für den Einfluss des *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus auf die Expression von μ -Opioidrezeptor-Rezeptoren im Gehirn des Menschen verantwortlich sein. In dieser Arbeit wird eine Möglichkeit diskutiert, wie diese Regulation über komplexe intrazelluläre Mechanismen erklärt werden kann.

Die in dieser Arbeit bestätigte Interaktion des *COMT* Val^{108/158}Met-Polymorphismus mit dem μ -Opioidrezeptorsystem hat unterschiedliche klinische Implikationen, wie zum Beispiel die affektive Schmerzverarbeitung, die Entwicklung von Suchterkrankungen oder die unterschiedliche Ausprägung von Nebenwirkungen in der dopaminergen Therapie des Morbus Parkinson.

7. Anhang

7.1 Chemikalien und Reagenzien

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

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

7.1.1 Anfertigen der Gefrierschnitte / Histologie

Poly-L-Lysin-Lösung:	0,01%w/v Poly-L-Lysin in H ₂ O _{DEPC}
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®:	Phenol/ Guanidiniumisothiocyanat-Gemisch (Invitrogen)
Chloroform:	(für die Molekularbiologie; Fa. Fluka)
Isopropanol 100%:	(für die Molekularbiologie)
Oligo dT ₁₂₋₁₈ :	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® (Fa. Invitrogen)
Taq DNA Polymerase:	Platinum® Taq DNA Polymerase (Fa. Invitrogen), der Kit enthält auch 10x PCR-Puffer und MgCl ₂ -Lösung (50mM)
TAE-Laufpuffer:	0,4 M Tris-Base, 0,2 M Essigsäure, 10 mM EDTA in H ₂ O _{dest}
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 ³H-DAMGO-Liganden-Binding

[³ H]DAMGO:	[³ H]-(D-Ala ₂ ,N-Me-Phe ₄ ,Gly ₅ -ol)Enkephalin (Fa. NEN Perkin Elmer)
Assay-Puffer:	50 mM Tris-HCl; pH 7,4

Naloxon: Naloxon (100mM) gelöst in H₂O

7.1.5 [³⁵S]GTP γ S-Bindungsassay

[³⁵S]GTP γ S: [³⁵S]-Guanosin-5'-(γ -Thio-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)

Assay-Puffer: 50 mM Tris-HCl, 3 mM MgCl₂, 0.2 mM EGTA, 100 mM NaCl; pH 7,4

GDP: Guanosin-Diphosphat

DAMGO: (D-Ala₂,N-Me-Phe₄,Gly₅-ol)Enkephalin (10 mM) gelöst in H₂O

7.1.6 *In situ* Hybridisierung

10x PBS (RNA): 1,3 M NaCl, 70 mM Na₂HPO₄, 30 mM NaH₂PO₄ in H₂O_{DEPC}

20x SSC: 3,0 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat; pH 7,0

TdT: Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (aus Kalbsthymus, 25U/ μ l; Fa. Roche Diagnostika) Kit enthält auch den TdT-Puffer und CoCl₂ (25 mM)

[³²P]dATP α S: [³²P]-Desoxyadenosin-5'-(α -Thio-)Triphosphat (Fa. NEN Perkin Elmer)

TNES-Puffer: 140 mM NaCl, 20 mM 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 H₂O_{DEPC}

Paraformaldehyd-Lsg.: 4%w/v Paraformaldehyd (Merck) wird in 1xPBS (RNA) 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

Hybridisierungspuffer: 50%v/v Formamide (Fa. Fluka), 10%w/v Dextran (MG>350.000g/mol; Fa. Fluka); 5x Denhardts Lösung (Fa. Fluka), 0,6 M NaCl, 60mM Na-Citrat, 25 mM Na₃PO₄, 1 mM Na₄P₂O₇, 200 mg/l Einzelstrang-DNA (hydrolysiert aus Lachs-Sperma), 100 mg/l Poly-Adenylyat; pH 7,0

Ethanol: zur Fixierung und Lagerung der Gewebeschnitte (70 bzw. 96%) wird 100% Ethanol (unvergällt, p.A., Fa. Merck) mit H₂O_{DEPC} verdünnt

7.1.7 Oligonukleotide und Primer

7.1.7.1 Primer zur PCR von COMT mRNA

sense

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

Länge: 20mer GC-Gehalt: 45% T_m: 54°C

antisense

5'-CCA GGT CTG ACA ACG GGT CA-3'

Länge: 20mer GC-Gehalt: 55% T_m: 54,0°C

7.1.7.2 Oligonukleotide zur in situ Hybridisierung von

Präproenkephalin (PPE) mRNA

5'- C CTT CTT CAT GAA GCC CCC ATA CCG CTT GGC GAG GAT CTC-3'

Länge: 34mer GC-Gehalt: 68% T_m: 57,6°C

7.1.8 Autoradiografie

¹⁴C-Polymer-Standards: Für die kürzeren Expositionszeiten (Stunden/Tage) wurden ¹⁴C-Standards von 0.1 bis 100 nCi/g (10 Werte) und für die längeren Expositionszeiten (Wochen/Monate) von 30 bis 860 nCi/g (8 Werte) verwendet (Fa. Amersham)

³H-Polymer-Standards: Es wurden ³H-Polymer-Standards von 0.07 bis 245 µCi/g verwendet (Fa. ARC Inc.)

Entwicklerlösung GBX: 1 : 3,75 Verdünnung mit H₂O_{dest} (Fa. Kodak)

Fixiererlösung GBX: 1 : 3,75 Verdünnung mit H₂O_{dest} (Fa. Kodak)

Entwickler D19: 160 g/l werden mit 37°C warmen H₂O_{dest} versetzt und gerührt und danach auf ca. 17°C abgekühlt (Fa. Kodak)

Fixierer RT2000: 1:9 Verdünnung mit H₂O_{dest} (Fa. Ilford)

7.2 Literaturverzeichnis

Acquas E., Meloni M. und Di Chiara G.

Blockade of delta-opioid receptors in the nucleus accumbens prevents ethanol-induced stimulation of dopamine release, *Eur J Pharmacol* 230 (1993) 239-241.

Adler L.J., Gyulai F.E., Diehl D.J., Mintun M.A., Winter P.M. und Firestone L.L.

Regional brain activity changes associated with fentanyl analgesia elucidated by positron emission tomography, *Anesth Analg* 84 (1997) 120-126.

Akil H., Mayer D.J. und Liebeskind J.C.

Comparison in the rat between analgesia induced by stimulation of periaqueductal gray matter and morphine analgesia, *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* 274 (1972) 3603-3605.

Akil H., Owens C., Gutstein H., Taylor L., Curran E. und Watson S.

Endogenous Opioids - Overview and current issues [Review], *Drug & Alcohol Dependence* 51 (1998) 127-140.

Akil M., Kolachana B.S., Rothmond D.A., Hyde T.M., Weinberger D.R. und Kleinman J.E.

Catechol-O-methyltransferase genotype and dopamine regulation in the human brain, *J Neurosci* 23 (2003) 2008-2013.

al-Rodhan N., Chipkin R. und Yaksh T.L.

The antinociceptive effects of SCH-32615, a neutral endopeptidase (enkephalinase) inhibitor, microinjected into the periaqueductal, ventral medulla and amygdala, *Brain Res* 520 (1990) 123-130.

Angulo J.A.

Involvement of dopamine D1 and D2 receptors in the regulation of proenkephalin mRNA abundance in the striatum and accumbens of the rat brain, *J Neurochem* 58 (1992) 1104-1109.

Armero P., Muriel C., Santos J., Sanchez-Montero F.J., Rodriguez R.E., Gonzalez-Sarmiento R.

COMT (Val158Met) polymorphism is not associated to neuropathic pain in a Spanish population, *Eur J Pain* 9 (2005) 229-232.

Arvidsson U., Riedl M., Chakrabarti S., Lee J.H., Nakano A.H., Dado R.J., Loh H.H., Law P.Y., Wessendorf M.W. und Elde R.

Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord, *J Neurosci* 15 (1995) 3328-3341.

Assal F., Spahr L., Hadengue A., Rubbia-Brandt L., Burkhard P.R. und Rubbici-Brandt L.

Tolcapone and fulminant hepatitis, *Lancet* 352 (1998) 958.

Aubert I., Ghorayeb I., Normand E. und Bloch B.

Phenotypical characterization of the neurons expressing the D1 and D2 dopamine receptors in the monkey striatum, *J Comp Neurol* 418 (2000) 22-32.

Axelrod J., Senoh S. und Witkop B.

O-Methylation of catechol amines in vivo, *J Biol Chem* 233 (1958) 697-701.

Axelrod J. und Tomchick R.

Enzymatic O-methylation of epinephrine and other catechols, *J Biol Chem* 233 (1958) 702-705.

Baas H., Beiske A.G., Ghika J., Jackson M., Oertel W.H., Poewe W. und Ransmayr G.

Catechol-O-methyltransferase inhibition with tolcapone reduces the "wearing off" phenomenon and levodopa requirements in fluctuating parkinsonian patients, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 63 (1997) 421-428.

Bals-Kubik R., Ableitner A., Herz A. und Shippenberg T.S.

Neuroanatomical sites mediating the motivational effects of opioids as mapped by the conditioned place preference paradigm in rats, *J Pharmacol Exp Ther* 264 (1993) 489-495.

Beckett A.H. und Casy A.F.

Synthetic analgesics: stereochemical considerations, *J Pharm Pharmacol* 6 (1954) 986-1001.

Behbehani M.M., Jiang M. und Chandler S.D.

The effect of [Met]enkephalin on the periaqueductal gray neurons of the rat: an in vitro study, *Neuroscience* 38 (1990) 373-380.

Bergson C., Mrzljak L., Smiley J.F., Pappy M., Levenson R. und Goldman-Rakic P.S.

Regional, cellular, and subcellular variations in the distribution of D1 and D5 dopamine receptors in primate brain, *J Neurosci* 15 (1995) 7821-7836.

Berthele A., Platzer S., Laurie D.J., Weis S., Sommer B., Zieglgänsberger W., Conrad B. und Tölle T.R.

Expression of metabotropic glutamate receptor subtype mRNA (mGluR1-8) in human cerebellum, *Neuroreport* 10 (1999) 3861-3867.

Berthele A., Platzer S., Weis S., Conrad B. und Tölle T.R.

Expression of GABA(B1) and GABA(B2) mRNA in the human brain, *Neuroreport* 12 (2001) 3269-3275.

Berthele A., Platzer S., Dworzak D., Schadrack J., Mahal B., Büttner A., Assmus H.P., Wurster K., Zieglängsberger W., Conrad B. und Tölle T.R.

[³H]-nociceptin ligand-binding and nociceptin opioid receptor mRNA expression in the human brain, *Neuroscience* 121 (2003) 629-640.

Bialecka M., Drozdziak M., Honczarenko K., Gawronska-Szklarz B., Stankiewicz J., Dabrowska E., Kubisiak M., Klodowska-Duda G. und Opala G.

Catechol-O-methyltransferase and monoamine oxidase B genes and susceptibility to sporadic Parkinson's disease in a Polish population, *Eur Neurol* 53 (2005) 68-73.

BIOMED

No association between bipolar disorder and alleles at a functional polymorphism in the COMT gene. Biomed European Bipolar Collaborative Group, *Br J Psychiatry* 170 (1997) 526-528.

Boudikova B., Szumlanski C., Maidak B. und Weinshilbom R.

Human liver catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics, *Clin Pharmacol Ther* 48 (1990) 381-389.

Bouras C., Taban C.H. und Constantinidis J.

Mapping of enkephalins in human brain. An immunohistofluorescence study on brains from patients with senile and presenile dementia, *Neuroscience* 12 (1984) 179-190.

Brami-Cherrier K., Valjent E., Garcia M., Pages C., Hipskind R.A. und Caboche J.

Dopamine induces a PI3-kinase-independent activation of Akt in striatal neurons: a new route to cAMP response element-binding protein phosphorylation, *J Neurosci* 22 (2002) 8911-8921.

Brandt W.

Struktur-Wirkungsbeziehungen von Opioiden, *Pharm Unserer Zeit* 31 (2002) 60-68.

Bunzow J.R., Saez C., Mortrud M., Bouvier C., Williams J.T., Low M. und Grandy D.K.

Molecular cloning and tissue distribution of a putative member of the rat opioid receptor gene family that is not a mu, delta or kappa opioid receptor type, *FEBS Lett* 347 (1994) 284-288.

Burkey A.R., Carstens E., Wenniger J.J., Tang J. und Jasmin L.

An opioidergic cortical antinociception triggering site in the agranular insular cortex of the rat that contributes to morphine antinociception, *J Neurosci* 16 (1996) 6612-6623.

Calon F., Grondin R., Morissette M., Goulet M., Blanchet P.J., Di Paolo T. und Bedard P.J.

Molecular basis of levodopa-induced dyskinesias, *Ann Neurol* 47 (2000) S70-78.

Calon F. und Di Paolo T.

Levodopa response motor complications--GABA receptors and preproenkephalin expression in human brain, *Parkinsonism Relat Disord* 8 (2002) 449-454.

Calon F., Birdi S., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Bedard P.J. und Di P.T.

Increase of preproenkephalin mRNA levels in the putamen of Parkinson disease patients with levodopa-induced dyskinesias, *J Neuropathol Exp Neurol* 61 (2002) 186-196.

Cao L., Li T. und Liu X.

Association study of heroin dependence and catechol-O-methyltransferase gene, *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi* 20 (2003) 127-130.

Cenci M.A., Lee C.S. und Bjorklund A.

L-DOPA-induced dyskinesia in the rat is associated with striatal overexpression of prodynorphin- and glutamic acid decarboxylase mRNA, *Eur J Neurosci* 10 (1998) 2694-2706.

Chen Y., Mestek A., Liu J., Hurley J.A. und Yu L.

Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain, *Mol Pharmacol* 44 (1993) 8-12.

Chen J.F., Aloyo V.J. und Weiss B.

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 (1993) 669-680.

Chen J.F., Aloyo V.J., Qin Z.H. und Weiss B.

Irreversible blockade of D2 dopamine receptors by fluphenazine-N-mustard increases D2 dopamine receptor mRNA and proenkephalin mRNA and decreases D1 dopamine receptor mRNA and mu and delta opioid receptors in rat striatum, *Neurochem Int* 25 (1994) 355-366.

Chen C.H., Lee Y.R., Liu M.Y., Wei F.C., Koong F.J., Hwu H.G. und Hsiao K.J.

Identification of a BglI polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT) gene, and association study with schizophrenia, *Am J Med Genet* 67 (1996) 556-559.

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. und Weinberger D.R.

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 (2004) 807-821.

Chen L., Togasaki D.M., Langston J.W., Di Monte D.A. und Quik M.

Enhanced striatal opioid receptor-mediated G-protein activation in L-DOPA-treated dyskinetic monkeys, *Neuroscience* 132 (2005) 409-420.

Cheng Z.F., Fields H.L. und Heinricher M.M.

Morphine microinjected into the periaqueductal gray has differential effects on 3 classes of medullary neurons, *Brain Res* 375 (1986) 57-65.

Childers S.R. und Snyder S.H.

Characterization of [³H]guanine nucleotide binding sites in brain membranes, *J Neurochem* 35 (1980) 183-192.

Childers S.R. und Snyder S.H.

Differential regulation by guanine nucleotides or opiate agonist and antagonist receptor interactions, *J Neurochem* 34 (1980) 583-593.

Chong D.J., Suchowersky O., Szumlanski C., Weinshilboum R.M., Brant R. und Campbell N.R.

The relationship between COMT genotype and the clinical effectiveness of tolcapone, a COMT inhibitor, in patients with Parkinson's disease, *Clin Neuropharmacol* 23 (2000) 143-148.

Chudler E.H. und Dong W.K.

The role of the basal ganglia in nociception and pain, *Pain* 60 (1995) 3-38.

Civelli O., Bunzow J.R. und Grandy D.K.

Molecular diversity of the dopamine receptors, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 33 (1993) 281-307.

Comb M., Birnberg N.C., Seasholtz A., Herbert E. und Goodman H.M.

A cyclic AMP- and phorbol ester-inducible DNA element, *Nature* 323 (1986) 353-356.

Comb M., Mermod N., Hyman S.E., Pearlberg J., Ross M.E. und Goodman H.M.

Proteins bound at adjacent DNA elements act synergistically to regulate human proenkephalin cAMP inducible transcription, *Embo J* 7 (1988) 3793-3805.

Connor M. und Christie M.J.

Opioid receptor signalling mechanisms [Review], *Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology* 26 (1999) 493-499.

Corbett A.D., Paterson S.J. und Kosterlitz H.W.

Selectivity of Ligands for Opioid Receptors. In "Opioids", Herz A. (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, 1993, Bd. 1, pp. 645-680.

Cortes R., Gueye B., Pazos A., Probst A. und Palacios J.M.

Dopamine receptors in human brain: autoradiographic distribution of D1 sites, *Neuroscience* 28 (1989) 263-273.

Craig A.D.

A new view of pain as a homeostatic emotion, *Trends Neurosci* 26 (2003) 303-307.

Craig A.D.

Pain mechanisms: labeled lines versus convergence in central processing, *Annu Rev Neurosci* 26 (2003) 1-30.

Curran E.J. und Watson S.J., Jr.

Dopamine receptor mRNA expression patterns by opioid peptide cells in the nucleus accumbens of the rat: a double in situ hybridization study, *J Comp Neurol* 361 (1995) 57-76.

Daniels J.K., Williams N.M., Williams J., Jones L.A., Cardno A.G., Murphy K.C., Spurlock G., Riley B., Scambler P., Asherson P., McGuffin P. und Owen M.J.

No evidence for allelic association between schizophrenia and a polymorphism determining high or low catechol O-methyltransferase activity, *Am J Psychiatry* 153 (1996) 268-270.

Das S., Grunert M., Williams L. und Vincent S.R.

NMDA and D1 receptors regulate the phosphorylation of CREB and the induction of c-fos in striatal neurons in primary culture, *Synapse* 25 (1997) 227-233.

Daunais J.B., Letchworth S.R., Sim-Selley L.J., Smith H.R., Childers S.R. und Porrino L.J.

Functional and anatomical localization of mu opioid receptors in the striatum, amygdala, and extended amygdala of the nonhuman primate, *J Comp Neurol* 433 (2001) 471-485.

De Santi C., Giulianotti P.C., Pietrabissa A., Mosca F. und Pacifici G.M.

Catechol-O-methyltransferase: variation in enzyme activity and inhibition by entacapone and tolcapone, *Eur J Clin Pharmacol* 54 (1998) 215-219.

de Waele J.P., Kiianmaa K. und Gianoulakis C.

Distribution of the mu and delta opioid binding sites in the brain of the alcohol-preferring AA and alcohol-avoiding ANA lines of rats, *J Pharmacol Exp Ther* 275 (1995) 518-527.

Delfs J.M., Kong H., Mestek A., Chen Y., Yu L., Reisine T. und Chesselet M.F.

Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level, *J Comp Neurol* 345 (1994) 46-68.

Derbyshire S.W.

Meta-Analysis of Thirty-Four Independent Samples Studied Using PET Reveals a Significantly Attenuated Central Response to Noxious Stimulation in Clinical Pain Patients, *Curr Rev Pain* 3 (1999) 265-280.

Derbyshire S.W.

Measuring our natural painkiller, *Trends Neurosci* 25 (2002) 67-68; discussion 69.

Di Chiara G. und Imperato A.

Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats, *Proc Natl Acad Sci U S A* 85 (1988) 5274-5278.

Di Chiara G. und North R.A.

Neurobiology of opiate abuse, *Trends Pharmacol Sci* 13 (1992) 185-193.

Drago J., Padungchaichot P., Accili D. und Fuchs S.

Dopamine receptors and dopamine transporter in brain function and addictive behaviors: insights from targeted mouse mutants, *Dev Neurosci* 20 (1998) 188-203.

Dupuis D.S., Pauwels P.J., Radu D. und Hall H.

Autoradiographic studies of 5-HT_{1A}-receptor-stimulated [³⁵S]GTPgammaS-binding responses in the human and monkey brain, *Eur J Neurosci* 11 (1999) 1809-1817.

Egan M.F., Goldberg T.E., Kolachana B.S., Callicott J.H., Mazzanti C.M., Straub R.E., Goldman D. und Weinberger D.R.

Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (2001) 6917-6922.

Erdal M., Herken H., Yilmaz M. und Bayazit Y.A.

Significance of the catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in migraine, *Brain Res Mol Brain Res* 94 (2001) 193-196.

Eriksson A.L., Skrtic S., Niklason A., Hulten L.M., Wiklund O., Hedner T. und Ohlsson C.

Association between the low activity genotype of catechol-O-methyltransferase and myocardial infarction in a hypertensive population, *Eur Heart J* 25 (2004) 386-391.

Evans C.J., Keith D.E., Jr., Morrison H., Magendzo K. und Edwards R.H.

Cloning of a delta opioid receptor by functional expression, *Science* 258 (1992) 1952-1955.

Fahn S.

The spectrum of levodopa-induced dyskinesias, *Ann Neurol* 47 (2000) S2-9; discussion S9-11.

Fields H.L., Heinricher M.M. und Mason P.

Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits, *Annu Rev Neurosci* 14 (1991) 219-245.

Fields H.

State-dependent opioid control of pain, *Nat Rev Neurosci* 5 (2004) 565-575.

Fishburn C.S., Belleli D., David C., Carmon S. und Fuchs S.

A novel short isoform of the D₃ dopamine receptor generated by alternative splicing in the third cytoplasmic loop, *J Biol Chem* 268 (1993) 5872-5878.

Flores J.A., El Banoua F., Galan-Rodriguez B. und Fernandez-Espejo E.

Opiate anti-nociception is attenuated following lesion of large dopamine neurons of the periaqueductal grey: critical role for D(1) (not D(2)) dopamine receptors, *Pain* 110 (2004) 205-214.

Friderichs E. und Strassburger W.

Opiatrezeptoren - Vom Schlüssel-Schloss-Modell zur molekularbiologischen Charakterisierung, *Pharm Unserer Zeit* 31 (2002) 32-39.

Fukuda K., Kato S., Mori K., Nishi M., Takeshima H., Iwabe N., Miyata T., Houtani T. und Sugimoto T.

cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family, *FEBS Lett* 343 (1994) 42-46.

Gabilondo A.M., Meana J.J. und Garcia-Sevilla J.A.

Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims, *Brain Res* 682 (1995) 245-250.

Gerfen C.R., Engber T.M., Mahan L.C., Susel Z., Chase T.N., Monsma F.J., Jr. und Sibley D.R.

D1 and D2 dopamine receptor-regulated gene expression of striatonigral and striatopallidal neurons, *Science* 250 (1990) 1429-1432.

Gianoulakis C.

Influence of the endogenous opioid system on high alcohol consumption and genetic predisposition to alcoholism, *J Psychiatry Neurosci* 26 (2001) 304-318.

Girault J.A. und Greengard P.

The neurobiology of dopamine signaling, *Arch Neurol* 61 (2004) 641-644.

Giros B., Sokoloff P., Martres M.P., Riou J.F., Emorine L.J. und Schwartz J.C.

Alternative splicing directs the expression of two D2 dopamine receptor isoforms, *Nature* 342 (1989) 923-926.

Gogos J.A., Morgan M., Luine V., Santha M., Ogawa S., Pfaff D. und Karayiorgou M.

Catechol-O-methyltransferase-deficient mice exhibit sexually dimorphic changes in catecholamine levels and behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 9991-9996.

Goudreau J.L., Maraganore D.M., Farrer M.J., Lesnick T.G., Singleton A.B., Bower J.H., Hardy J.A. und Rocca W.A.

Case-control study of dopamine transporter-1, monoamine oxidase-B, and catechol-O-methyl transferase polymorphisms in Parkinson's disease, *Mov Disord* 17 (2002) 1305-1311.

Groenewegen H.J., Berendse H.W., Wolters J.G. und Lohman A.H.

The anatomical relationship of the prefrontal cortex with the striatopallidal system, the thalamus and the amygdala: evidence for a parallel organization, *Prog Brain Res* 85 (1990) 95-116; discussion 116-118.

Gross C.E., Ravenscroft P., Dovero S., Jaber M., Bioulac B. und Bezdard E.

Pattern of levodopa-induced striatal changes is different in normal and MPTP-lesioned mice, *J Neurochem* 84 (2003) 1246-1255.

Gross-Isseroff R., Dillon K.A., Israeli M. und Biegon A.

Regionally selective increases in mu opioid receptor density in the brains of suicide victims, *Brain Res* 530 (1990) 312-316.

Guldberg H.C. und Marsden C.A.

Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role, *Pharmacol Rev* 27 (1975) 135-206.

Gutierrez B., Bertranpetit J., Guillamat R., Valles V., Arranz M.J., Kerwin R. und Fananas L.

Association analysis of the catechol O-methyltransferase gene and bipolar affective disorder, *Am J Psychiatry* 154 (1997) 113-115.

Guttenberg N.D., Klop H., Minami M., Satoh M. und Voorn P.

Co-localization of mu opioid receptor is greater with dynorphin than enkephalin in rat striatum, *Neuroreport* 7 (1996) 2119-2124.

Hagelberg N., Martikainen I.K., Mansikka H., Hinkka S., Nagren K., Hietala J., Scheinin H. und Pertovaara A.

Dopamine D2 receptor binding in the human brain is associated with the response to painful stimulation and pain modulatory capacity, *Pain* 99 (2002) 273-279.

Heijna M.H., Bakker J.M., Hogenboom F., Mulder A.H. und Schoffelmeer A.N.

Opioid receptors and inhibition of dopamine-sensitive adenylate cyclase in slices of rat brain regions receiving a dense dopaminergic input, *Eur J Pharmacol* 229 (1992) 197-202.

Heimer L., Zahm D.S., Churchill L., Kalivas P.W. und Wohltmann C.

Specificity in the projection patterns of accumbal core and shell in the rat, *Neuroscience* 41 (1991) 89-125.

Hernan M.A., Checkoway H., O'Brien R., Costa-Mallen P., De Vivo I., Colditz G.A., Hunter D.J., Kelsey K.T. und Ascherio A.

MAOB intron 13 and COMT codon 158 polymorphisms, cigarette smoking, and the risk of PD, *Neurology* 58 (2002) 1381-1387.

- Herrero M.T., Augood S.J., Hirsch E.C., Javoy-Agid F., Luquin M.R., Agid Y., Obeso J.A. und Emson P.C.**
Effects of L-DOPA on preproenkephalin and preprotachykinin gene expression in the MPTP-treated monkey striatum, *Neuroscience* 68 (1995) 1189-1198.
- Hilf G., Gierschik P. und Jakobs K.H.**
Muscarinic acetylcholine receptor-stimulated binding of guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) to guanine-nucleotide-binding proteins in cardiac membranes, *Eur J Biochem* 186 (1989) 725-731.
- Hiller J.M. und Fan L.Q.**
Laminar distribution of the multiple opioid receptors in the human cerebral cortex, *Neurochem Res* 21 (1996) 1333-1345.
- Hirai T. und Jones E.G.**
Distribution of tachykinin- and enkephalin-immunoreactive fibers in the human thalamus, *Brain Res Brain Res Rev* 14 (1989) 35-52.
- Hoda F., Nicholl D., Bennett P., Arranz M., Aitchison K.J., al-Chalabi A., Kunugi H., Vallada H., Leigh P.N., Chaudhuri K.R. und Collier D.A.**
No association between Parkinson's disease and low-activity alleles of catechol O-methyltransferase, *Biochem Biophys Res Commun* 228 (1996) 780-784.
- Hudson A.J.**
Pain perception and response: central nervous system mechanisms, *Can J Neurol Sci* 27 (2000) 2-16.
- Huotari M., Gogos J.A., Karayiorgou M., Koponen O., Forsberg M., Raasmaja A., Hyttinen J. und Männistö P.T.**
Brain catecholamine metabolism in catechol-O-methyltransferase (COMT)-deficient mice, *Eur J Neurosci* 15 (2002) 246-256.
- Hurd Y.L.**
Differential messenger RNA expression of prodynorphin and proenkephalin in the human brain, *Neuroscience* 72 (1996) 767-783.
- Hurd Y.L., Suzuki M. und Sedvall G.C.**
D1 and D2 dopamine receptor mRNA expression in whole hemisphere sections of the human brain, *J Chem Neuroanat* 22 (2001) 127-137.
- Hyman S.E., Comb M., Lin Y.S., Pearlberg J., Green M.R. und Goodman H.M.**
A common trans-acting factor is involved in transcriptional regulation of neurotransmitter genes by cyclic AMP, *Mol Cell Biol* 8 (1988) 4225-4233.
- Hyman S.E., Comb M., Pearlberg J. und Goodman H.M.**
An AP-2 element acts synergistically with the cyclic AMP- and phorbol ester-inducible enhancer of the human proenkephalin gene, *Mol Cell Biol* 9 (1989) 321-324.
- Inagaki S. und Parent A.**
Distribution of enkephalin-immunoreactive neurons in the forebrain and upper brainstem of the squirrel monkey, *Brain Res* 359 (1985) 267-280.
- Ingvar M.**
Pain and functional imaging, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354 (1999) 1347-1358.
- Ishiguro H., Haruo Shibuya T., Toru M., Saito T. und Arinami T.**
Association study between high and low activity polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcoholism, *Psychiatr Genet* 9 (1999) 135-138.
- Jamensky N.T. und Gianoulakis C.**
Content of dynorphins and kappa-opioid receptors in distinct brain regions of C57BL/6 and DBA/2 mice, *Alcohol Clin Exp Res* 21 (1997) 1455-1464.
- Jarvie K.R. und Caron M.G.**
Heterogeneity of dopamine receptors, *Adv Neurol* 60 (1993) 325-333.
- Johansson P.A., Andersson M., Andersson K.E. und Cenci M.A.**
Alterations in cortical and basal ganglia levels of opioid receptor binding in a rat model of l-DOPA-induced dyskinesia, *Neurobiol Dis* 8 (2001) 220-239.
- Johnson S.W. und North R.A.**
Opioids excite dopamine neurons by hyperpolarization of local interneurons, *J Neurosci* 12 (1992) 483-488.
- Johnson P.I., Stellar J.R. und Paul A.D.**
Regional reward differences within the ventral pallidum are revealed by microinjections of a mu opiate receptor agonist,

Neuropharmacology 32 (1993) 1305-1314.

Johnson E.E. und Lambert D.G.

Molecular pharmacology of the opioid/nociceptin system, *Current Anaesthesia & Critical Care* 13 (2002) 305.

Kaakkola S., Gordin A. und Männistö P.T.

General properties and clinical possibilities of new selective inhibitors of catechol O-methyltransferase, *Gen Pharmacol* 25 (1994) 813-824.

Kandel E.R. und Siegelbaum S.

Einführung in die synaptische Übertragung. In "Neurowissenschaften. Eine Einführung", Kandel E.R., Schwartz J.H. und Jessell T.M. (Hrsg.), Spektrum, Heidelberg-Berlin-Oxford, 1995, pp. 189-202.

Kaplan G.P., Hartman B.K. und Creveling C.R.

Immunohistochemical demonstration of catechol-o-methyltransferase in mammalian brain, *Brain Res* 167 (1979) 241-250.

Kaplan G.P., Hartman B.K. und Creveling C.R.

Localization of catechol-O-methyltransferase in the leptomeninges, choroid plexus and ciliary epithelium: implications for the separation of central and peripheral catechols, *Brain Res* 204 (1981) 353-360.

Karayorgou M., Altemus M., Galke B.L., Goldman D., Murphy D.L., Ott J. und Gogos J.A.

Genotype determining low catechol-O-methyltransferase activity as a risk factor for obsessive-compulsive disorder, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 4572-4575.

Karege F., Bovier P., Gaillard J.M. und Tissot R.

The decrease of erythrocyte catechol-O-methyltransferase activity in depressed patients and its diagnostic significance, *Acta Psychiatr Scand* 76 (1987) 303-308.

Karhunen T., Tilgmann C., Ulmanen I., Julkunen I. und Panula P.

Distribution of catechol-O-methyltransferase enzyme in rat tissues, *J Histochem Cytochem* 42 (1994) 1079-1090.

Karhunen T., Tilgmann C., Ulmanen I. und Panula P.

Catechol-O-methyltransferase (COMT) in rat brain: immunoelectron microscopic study with an antiserum against rat recombinant COMT protein, *Neurosci Lett* 187 (1995) 57-60.

Kastner A., Anglade P., Bounaix C., Damier P., Javoy-Agid F., Bromet N., Agid Y. und Hirsch E.C.

Immunohistochemical study of catechol-O-methyltransferase in the human mesostriatal system, *Neuroscience* 62 (1994) 449-457.

Kauhanen J., Hallikainen T., Tuomainen T.P., Koulu M., Karvonen M.K., Salonen J.T. und Tiihonen J.

Association between the functional polymorphism of catechol-O-methyltransferase gene and alcohol consumption among social drinkers, *Alcohol Clin Exp Res* 24 (2000) 135-139.

Kebabian J.W. und Calne D.B.

Multiple receptors for dopamine, *Nature* 277 (1979) 93-96.

Keränen T., Gordin A., Harjola V.P., Karlsson M., Korpela K., Pentikainen P.J., Rita H., Seppala L. und Wikberg T.

The effect of catechol-O-methyl transferase inhibition by entacapone on the pharmacokinetics and metabolism of levodopa in healthy volunteers, *Clin Neuropharmacol* 16 (1993) 145-156.

Khan Z.U., Gutierrez A., Martin R., Penafiel A., Rivera A. und de la Calle A.

Dopamine D5 receptors of rat and human brain, *Neuroscience* 100 (2000) 689-699.

Kieffer B.L., Befort K., Gaveriaux-Ruff C. und Hirth C.G.

The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 12048-12052.

Kim H., Neubert J.K., San Miguel A., Xu K., Krishnaraju R.K., Iadarola M.J., Goldman D., Dionne R.A.

Genetic influence on variability in human acute experimental pain sensitivity associated with gender, ethnicity and psychological temperament. *Pain* 109 (2004) 488-496.

King M.A., Bradshaw S., Chang A.H., Pintar J.E. und Pasternak G.W.

Potential of opioid analgesia in dopamine2 receptor knock-out mice: evidence for a tonically active anti-opioid system, *J Neurosci* 21 (2001) 7788-7792.

Kirov G., Murphy K.C., Arranz M.J., Jones I., McCandles F., Kunugi H., Murray R.M., McGuffin P., Collier D.A., Owen M.J. und Craddock N.

Low activity allele of catechol-O-methyltransferase gene associated with rapid cycling bipolar disorder, *Mol Psychiatry* 3 (1998) 342-345.

Kley N. und Loeffler J.

Molecular Mechanisms in Proenkephalin Gene Regulation. In "Opioids", Herz A. (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, 1993, Bd. 1, pp. 379-392.

Kobierski L.A., Chu H.M., Tan Y. und Comb M.J.

cAMP-dependent regulation of proenkephalin by JunD and JunB: positive and negative effects of AP-1 proteins, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 10222-10226.

Kobierski L.A., Wong A.E., Srivastava S., Borsook D. und Hyman S.E.

Cyclic AMP-dependent activation of the proenkephalin gene requires phosphorylation of CREB at serine-133 and a Src-related kinase, *J Neurochem* 73 (1999) 129-138.

Koob G.F. und Nestler E.J.

The neurobiology of drug addiction, *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 9 (1997) 482-497.

Koob G.F., Roberts A.J., Schulteis G., Parsons L.H., Heyser C.J., Hyytia P., Merlo-Pich E. und Weiss F.

Neurocircuitry targets in ethanol reward and dependence, *Alcohol Clin Exp Res* 22 (1998) 3-9.

Krack P., Pollak P., Limousin P., Hoffmann D., Benazzouz A., Le Bas J.F., Koudsie A. und Benabid A.L.

Opposite motor effects of pallidal stimulation in Parkinson's disease, *Ann Neurol* 43 (1998) 180-192.

Kunugi H., Vallada H.P., Hoda F., Kirov G., Gill M., Aitchison K.J., Ball D., Arranz M.J., Murray R.M. und Collier D.A.

No evidence for an association of affective disorders with high- or low-activity allele of catechol-o-methyltransferase gene, *Biol Psychiatry* 42 (1997) 282-285.

Kunugi H., Nanko S., Ueki A., Otsuka E., Hattori M., Hoda F., Vallada H.P., Arranz M.J. und Collier D.A.

High and low activity alleles of catechol-O-methyltransferase gene: ethnic difference and possible association with Parkinson's disease, *Neurosci Lett* 221 (1997) 202-204.

Kurth M.C., Adler C.H., Hilaire M.S., Singer C., Waters C., LeWitt P., Chernik D.A., Dörflinger E.E. und Yoo K.

Tolcapone improves motor function and reduces levodopa requirement in patients with Parkinson's disease experiencing motor fluctuations: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled trial. Tolcapone Fluctuator Study Group I, *Neurology* 48 (1997) 81-87.

Lachman H.M., Papolos D.F., Saito T., Yu Y.M., Szumlanski C.L. und Weinshilboum R.M.

Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders, *Pharmacogenetics* 6 (1996) 243-250.

Lachman H.M., Nolan K.A., Mohr P., Saito T. und Volavka J.

Association between catechol O-methyltransferase genotype and violence in schizophrenia and schizoaffective disorder, *Am J Psychiatry* 155 (1998) 835-837.

Lachowicz J.E., Shen Y., Monsma F.J., Jr. und Sibley D.R.

Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family, *J Neurochem* 64 (1995) 34-40.

Lai M., Loi V., Pisano M.R. und Del Zompo M.

Therapy of migraine by modulating dopamine hypersensitivity: its effect on mood and pain, *Int J Clin Pharmacol Res* 17 (1997) 101-103.

Lavigne J.A., Helzlsouer K.J., Huang H.Y., Strickland P.T., Bell D.A., Selmin O., Watson M.A., Hoffman S., Comstock G.W. und Yager J.D.

An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-O-methyltransferase and the risk for breast cancer, *Cancer Res* 57 (1997) 5493-5497.

Le Moine C., Normand E., Guitteny A.F., Fouque B., Teoule R. und Bloch B.

Dopamine receptor gene expression by enkephalin neurons in rat forebrain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (1990) 230-234.

Lee M.S., Lyoo C.H., Ulmanen I., Syvanen A.C. und Rinne J.O.

Genotypes of catechol-O-methyltransferase and response to levodopa treatment in patients with Parkinson's disease, *Neurosci Lett* 298 (2001) 131-134.

Lee P.W. und Lee Y.M.

Transcriptional regulation of mu opioid receptor gene by cAMP pathway, *Mol Pharmacol* 64 (2003) 1410-1418.

Leone P., Pocock D. und Wise R.A.

Morphine-dopamine interaction: ventral tegmental morphine increases nucleus accumbens dopamine release, *Pharmacol Biochem Behav* 39 (1991) 469-472.

Li T., Sham P.C., Vallada H., Xie T., Tang X., Murray R.M., Liu X. und Collier D.A.

Preferential transmission of the high activity allele of COMT in schizophrenia, *Psychiatr Genet* 6 (1996) 131-133.

Li T., Vallada H., Curtis D., Arranz M., Xu K., Cai G., Deng H., Liu J., Murray R., Liu X. und Collier D.A.
Catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism: frequency analysis in Han Chinese subjects and allelic association of the low activity allele with bipolar affective disorder, *Pharmacogenetics* 7 (1997) 349-353.

Lidow M.S., Wang F., Cao Y. und Goldman-Rakic P.S.
Layer V neurons bear the majority of mRNAs encoding the five distinct dopamine receptor subtypes in the primate prefrontal cortex, *Synapse* 28 (1998) 10-20.

Lord J.A., Waterfield A.A., Hughes J. und Kosterlitz H.W.
Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors, *Nature* 267 (1977) 495-499.

Lozano A.M., Lang A.E., Galvez-Jimenez N., Miyasaki J., Duff J., Hutchinson W.D. und Dostrovsky J.O.
Effect of GPi pallidotomy on motor function in Parkinson's disease, *Lancet* 346 (1995) 1383-1387.

Magnusson J.E. und Fisher K.
The involvement of dopamine in nociception: the role of D(1) and D(2) receptors in the dorsolateral striatum, *Brain Res* 855 (2000) 260-266.

Manning B.H., Morgan M.J. und Franklin K.B.
Morphine analgesia in the formalin test: evidence for forebrain and midbrain sites of action, *Neuroscience* 63 (1994) 289-294.

Mansour A., Khachaturian H., Lewis M.E., Akil H. und Watson S.J.
Anatomy of CNS opioid receptors, *Trends Neurosci* 11 (1988) 308-314.

Mansour A., Fox C.A., Akil H. und Watson S.J.
Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications, *Trends Neurosci* 18 (1995) 22-29.

Martin W.R., Eades C.G., Thompson J.A., Huppler R.E. und Gilbert P.E.
The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog, *J Pharmacol Exp Ther* 197 (1976) 517-532.

Mathieu-Kia A.M., Fan L.Q., Kreek M.J., Simon E.J. und Hiller J.M.
Mu-, delta- and kappa-opioid receptor populations are differentially altered in distinct areas of postmortem brains of Alzheimer's disease patients, *Brain Res* 893 (2001) 121-134.

Männistö P.T. und Kaakkola S.
Catechol-O-methyltransferase (COMT): biochemistry, molecular biology, pharmacology, and clinical efficacy of the new selective COMT inhibitors, *Pharmacol Rev* 51 (1999) 593-628.

Meinkoth J. und Wahl G.
Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports, *Anal Biochem* 138 (1984) 267-284.

Meng F., Xie G.X., Thompson R.C., Mansour A., Goldstein A., Watson S.J. und Akil H.
Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 9954-9958.

Meunier J.C., Mollereau C., Toll L., Suaudeau C., Moisand C., Alvinerie P., Butour J.L., Guillemot J.C., Ferrara P., Monsarrat B. und et al.
Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor, *Nature* 377 (1995) 532-535.

Michael-Titus A., Boussemame R. und Costentin J.
Stimulation of dopamine D2 receptors induces an analgesia involving an opioidergic but non enkephalinergic link, *Eur J Pharmacol* 187 (1990) 201-207.

Miller J.A., Hoffer B.J. und Zahniser N.R.
An improved calibration procedure for computer-based quantitative autoradiography utilizing a mathematical model for the non-linear response of camera and film, *J Neurosci Methods* 22 (1988) 233-238.

Miller J.A.
The calibration of 35S or 32P with 14C-labeled brain paste or 14C-plastic standards for quantitative autoradiography using LKB Ultrofilm or Amersham Hyperfilm, *Neurosci Lett* 121 (1991) 211-214.

Minami M., Toya T., Katao Y., Maekawa K., Nakamura S., Onogi T., Kaneko S. und Satoh M.
Cloning and expression of a cDNA for the rat kappa-opioid receptor, *FEBS Lett* 329 (1993) 291-295.

Minami M. und Satoh M.
Molecular biology of the Opioid Receptors - Structures, functions and distributions [Review], *Neuroscience Research* 23

(1995) 121-145.

Missale C., Nash S.R., Robinson S.W., Jaber M. und Caron M.G.

Dopamine receptors: from structure to function, *Physiol Rev* 78 (1998) 189-225.

Mollereau C., Parmentier M., Mailleux P., Butour J.L., Moisand C., Chalon P., Caput D., Vassart G. und Meunier J.C.

ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization, *FEBS Lett* 341 (1994) 33-38.

Morgan M.M., Clayton C.C. und Lane D.A.

Behavioral evidence linking opioid-sensitive GABAergic neurons in the ventrolateral periaqueductal gray to morphine tolerance, *Neuroscience* 118 (2003) 227-232.

Morissette M., Goulet M., Soghomonian J.J., Blanchet P.J., Calon F., Bedard P.J. und Di Paolo T.

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, *Brain Res Mol Brain Res* 49 (1997) 55-62.

Morissette M., Grondin R., Goulet M., Bedard P.J. und Di Paolo T.

Differential regulation of striatal preproenkephalin and preprotachykinin mRNA levels in MPTP-lesioned monkeys chronically treated with dopamine D1 or D2 receptor agonists, *J Neurochem* 72 (1999) 682-692.

Morissette M., Dridi M., Calon F., Tahar A.H., Meltzer L.T., Bedard P.J. und Di Paolo T.

Prevention of levodopa-induced dyskinesias by a selective NR1A/2B N-methyl-D-aspartate receptor antagonist in parkinsonian monkeys: Implication of preproenkephalin, *Mov Disord* (2005)

Morris B.J., Höllt V. und Herz A.

Dopaminergic regulation of striatal proenkephalin mRNA and prodynorphin mRNA: contrasting effects of D1 and D2 antagonists, *Neuroscience* 25 (1988) 525-532.

Morris B.J., Herz A. und Höllt V.

Localization of striatal opioid gene expression, and its modulation by the mesostriatal dopamine pathway: an in situ hybridization study, *J Mol Neurosci* 1 (1989) 9-18.

Morris B.J. und Hunt S.P.

Proenkephalin mRNA levels in rat striatum are increased and decreased, respectively, by selective D2 and D1 dopamine receptor antagonists, *Neurosci Lett* 125 (1991) 201-204.

Münchau A. und Bhatia K.P.

Pharmacological treatment of Parkinson's disease, *Postgrad Med J* 76 (2000) 602-610.

Nakamura A., Inada T., Kitao Y. und Katayama Y.

Association between catechol-O-methyltransferase (COMT) polymorphism and severe alcoholic withdrawal symptoms in male Japanese alcoholics, *Addict Biol* 6 (2001) 233-238.

Nestler E.J.

Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction, *Nat Rev Neurosci* 2 (2001) 119-128.

Nestler E.J.

Historical review: Molecular and cellular mechanisms of opiate and cocaine addiction, *Trends Pharmacol Sci* 25 (2004) 210-218.

Nguyen T.V., Kobiarski L., Comb M. und Hyman S.E.

The effect of depolarization on expression of the human proenkephalin gene is synergistic with cAMP and dependent upon a cAMP-inducible enhancer, *J Neurosci* 10 (1990) 2825-2833.

Nisbet A.P., Foster O.J., Kingsbury A., Eve D.J., Daniel S.E., Marsden C.D. und Lees A.J.

Preproenkephalin and preprotachykinin messenger RNA expression in normal human basal ganglia and in Parkinson's disease, *Neuroscience* 66 (1995) 361-376.

Nutt J.G.

Levodopa-induced dyskinesia: review, observations, and speculations, *Neurology* 40 (1990) 340-345.

Obeso J.A., Rodriguez-Oroz M.C., Chana P., Lera G., Rodriguez M. und Olanow C.W.

The evolution and origin of motor complications in Parkinson's disease, *Neurology* 55 (2000) S13-20; discussion S21-13.

Oeser E.

"Geschichte der Hirnforschung", Wissenschaftliche Buchgesellschaft, Darmstadt, 2002, Auflage.

Ohara K., Nagai M. und Suzuki Y.

Low activity allele of catechol-o-methyltransferase gene and Japanese unipolar depression, *Neuroreport* 9 (1998) 1305-1308.

Palmatier M.A., Kang A.M. und Kidd K.K.

Global variation in the frequencies of functionally different catechol-O-methyltransferase alleles, *Biol Psychiatry* 46 (1999) 557-567.

Papolos D.F., Veit S., Faedda G.L., Saito T. und Lachman H.M.

Ultra-ultra rapid cycling bipolar disorder is associated with the low activity catecholamine-O-methyltransferase allele, *Mol Psychiatry* 3 (1998) 346-349.

Parkinson-Study-Group

Entacapone improves motor fluctuations in levodopa-treated Parkinson's disease patients. Parkinson Study Group, *Ann Neurol* 42 (1997) 747-755.

Pasternak G.W.

Multiple morphine and enkephalin receptors: biochemical and pharmacological aspects, *Ann N Y Acad Sci* 467 (1986) 130-139.

Pasternak G.W.

Pharmacological mechanisms of opioid analgesics, *Clin Neuropharmacol* 16 (1993) 1-18.

Pasternak G.W.

Insights into mu opioid pharmacology - The role of mu opioid receptor subtypes, *Life Sciences* 68 (2001a) 2213-2219.

Pasternak G.W.

Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors, *Trends Pharmacol Sci* 22 (2001b) 67-70.

Peckys D. und Landwehrmeyer G.B.

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

Pert C.B. und Snyder S.H.

Opiate receptor: demonstration in nervous tissue, *Science* 179 (1973) 1011-1014.

Peyron R., Laurent B. und Garcia-Larrea L.

Functional imaging of brain responses to pain. A review and meta-analysis (2000), *Neurophysiol Clin* 30 (2000) 263-288.

Piccini P., Weeks R.A. und Brooks D.J.

Alterations in opioid receptor binding in Parkinson's disease patients with levodopa-induced dyskinesias, *Ann Neurol* 42 (1997) 720-726.

Pihlavisto P. und Reenilä I.

Separation methods for catechol O-methyltransferase activity assay: physiological and pathophysiological relevance, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781 (2002) 359-372.

Platzer S.C., Winkler A., Schadrack J., Dworzak D., Tölle T.R., Zieglgänsberger W. und Spanagel R.

Autoradiographic distribution of mu-, delta- and kappa 1-opioid stimulated [³⁵S]guanylyl-5'-O-(gamma-thio)-triphosphate binding in human frontal cortex and cerebellum, *Neurosci Lett* 283 (2000) 213-216.

Platzer S.C.

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

Porzig H. und Häusler G.

Pharmaka mit Wirkung auf das vegetative Nervensystem. In "Pharmakologie und Toxikologie", Estler C. (Hrsg.), Schattauer, Stuttgart, New York, 2000, pp. 46-120.

Rainville P.

Brain mechanisms of pain affect and pain modulation, *Curr Opin Neurobiol* 12 (2002) 195-204.

Rajput A.H., Martin W., Saint-Hilaire M.H., Dorflinger E. und Pedder S.

Tolcapone improves motor function in parkinsonian patients with the "wearing-off" phenomenon: a double-blind, placebo-controlled, multicenter trial, *Neurology* 49 (1997) 1066-1071.

Rakvag T.T., Klepstad P., Baar C., Kvam T.M., Dale O., Kaasa S., Krokan H.E., Skorpen F.

The Val158Met polymorphism of the human catechol-O-methyltransferase (COMT) gene may influence morphine requirements in cancer pain patients. *Pain* 116 (2005) 73-78.

Reichert H.

"Neurobiologie", Thieme, Stuttgart-New York, 2000, 2. Auflage,.

Reichling D.B. und Basbaum A.I.

Contribution of brainstem GABAergic circuitry to descending antinociceptive controls: II. Electron microscopic immunocytochemical evidence of GABAergic control over the projection from the periaqueductal gray to the nucleus raphe magnus in the rat, *J Comp Neurol* 302 (1990) 378-393.

Reilly D.K., Rivera-Calimlim L. und Van Dyke D.

Catechol-O-methyltransferase activity: a determinant of levodopa response, *Clin Pharmacol Ther* 28 (1980) 278-286.

Reinscheid R.K., Nothacker H.P., Bourson A., Ardati A., Henningsen R.A., Bunzow J.R., Grandy D.K., Langen H., Monsma F.J. und Civelli O.

Orphanin FQ - a Neuropeptide That Activates an Opioidlike G Protein-Coupled Receptor, *Science* 270 (1995) 792-794.

Riley B., Mogudi-Carter M., Jenkins T. und Williamson R.

No evidence for linkage of chromosome 22 markers to schizophrenia in southern African Bantu-speaking families, *Am J Med Genet* 67 (1996) 515-522.

Rinne U.K., Larsen J.P., Siden A. und Worm-Petersen J.

Entacapone enhances the response to levodopa in parkinsonian patients with motor fluctuations. Nomecomt Study Group, *Neurology* 51 (1998) 1309-1314.

Robledo P. und Koob G.F.

Two discrete nucleus accumbens projection areas differentially mediate cocaine self-administration in the rat, *Behav Brain Res* 55 (1993) 159-166.

Rodriguez-Puertas R., Gonzalez-Maeso J., Meana J.J. und Pazos A.

Autoradiography of receptor-activated G-proteins in post mortem human brain, *Neuroscience* 96 (2000) 169-180.

Rooney K.F. und Sewell R.D.

Evaluation of selective actions of dopamine D-1 and D-2 receptor agonists and antagonists on opioid antinociception, *Eur J Pharmacol* 168 (1989) 329-336.

Rosin A., Kitchen I. und Georgieva J.

Effects of single and dual administration of cocaine and ethanol on opioid and ORL1 receptor expression in rat CNS: an autoradiographic study, *Brain Res* 978 (2003) 1-13.

Ruottinen H.M. und Rinne U.K.

Entacapone prolongs levodopa response in a one month double blind study in parkinsonian patients with levodopa related fluctuations, *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 60 (1996) 36-40.

Scanlon P.D., Raymond F.A. und Weinshilboum R.M.

Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity, *Science* 203 (1979) 63-65.

Schadrack J., Willoch F., Platzer S., Bartenstein P., Mahal B., Dworzak D., Wester H.J., Zieglgänsberger W. und Tölle T.R.

Opioid receptors in the human cerebellum: evidence from [¹¹C]diprenorphine PET, mRNA expression and autoradiography, *Neuroreport* 10 (1999) 619-624.

Schmidt R.F.

Die Physiologie des Schmerzes, *Pharm Unserer Zeit* 31 (2002) 23-30.

Schoffelmeer A.N., Hansen H.A., Stoof J.C. und Mulder A.H.

Inhibition of dopamine-stimulated cyclic AMP efflux from rat neostriatal slices by activation of mu- and delta-opioid receptors: a permissive role for D-2 dopamine receptors, *Eur J Pharmacol* 118 (1985) 363-366.

Schoffelmeer A.N., Hogenboom F. und Mulder A.H.

Inhibition of dopamine-sensitive adenylate cyclase by opioids: possible involvement of physically associated mu- and delta-opioid receptors, *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 335 (1987) 278-284.

Schoffelmeer A.N., De Vries T.J., Hogenboom F., Hruby V.J., Portoghese P.S. und Mulder A.H.

Opioid receptor antagonists discriminate between presynaptic mu and delta receptors and the adenylate cyclase-coupled opioid receptor complex in the brain, *J Pharmacol Exp Ther* 263 (1992) 20-24.

Schroeder J.A., Niculescu M. und Unterwald E.M.

Cocaine alters mu but not delta or kappa opioid receptor-stimulated in situ [³⁵S]GTPgammaS binding in rat brain, *Synapse* 47 (2003) 26-32.

Shepherd G.

"Neurobiologie", Springer, Berlin-Heidelberg, 1993, 2. Auflage,.

Shibata T., Pavel S., Smit N.P. und Mishima Y.

Differences in subcellular distribution of catechol-O-methyltransferase and tyrosinase in malignant melanoma, *J Invest Dermatol* 100 (1993) 222S-225S.

Shield A.J., Thomae B.A., Eckloff B.W., Wieben E.D. und Weinshilbourn R.M.

Human catechol O-methyltransferase genetic variation: gene resequencing and functional characterization of variant allozymes, *Mol Psychiatry* 9 (2004) 151-160.

Shinonaga Y., Takada M. und Mizuno N.

Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the globus pallidus and substantia nigra in the cat, *Neuroscience* 51 (1992) 691-703.

Shippenberg T.S. und Herz A.

Place preference conditioning reveals the involvement of D1-dopamine receptors in the motivational properties of mu- and kappa-opioid agonists, *Brain Res* 436 (1987) 169-172.

Shippenberg T.S. und Herz A.

Motivational effects of opioids: influence of D-1 versus D-2 receptor antagonists, *Eur J Pharmacol* 151 (1988) 233-242.

Shippenberg T.S., Bals-Kubik R., Huber A. und Herz A.

Neuroanatomical substrates mediating the aversive effects of D-1 dopamine receptor antagonists, *Psychopharmacology (Berl)* 103 (1991) 209-214.

Shippenberg T.S.

Motivational Effects of Opioids. In "Opioids", Herz A. (Hrsg.), Springer, Berlin-Heidelberg-New York-London-Paris-Tokyo-Hong Kong-Barcelona-Budapest, 1993, *Bd.II*, pp. 633-650.

Sibley D.R. und Monsma F.J., Jr.

Molecular biology of dopamine receptors, *Trends Pharmacol Sci* 13 (1992) 61-69.

Sim L.J., Selley D.E. und Childers S.R.

In vitro autoradiography of receptor-activated G proteins in rat brain by agonist-stimulated guanylyl 5'-[gamma-³⁵S]thio]-triphosphate binding, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 7242-7246.

Simon E.J., Hiller J.M. und Edelman I.

Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (³H) Etorphine to rat-brain homogenate, *Proc Natl Acad Sci U S A* 70 (1973) 1947-1949.

Smit N.P., Latter A.J., Naish-Byfield S., Westerhof W., Pavel S. und Riley P.A.

Catechol-O-methyltransferase as a target for melanoma destruction?, *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 743-752.

Spanagel R., Herz A. und Shippenberg T.S.

Opposing tonically active endogenous opioid systems modulate the mesolimbic dopaminergic pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A* 89 (1992) 2046-2050.

Spielman R.S. und Weinshilbourn R.M.

Genetics of red cell COMT activity: analysis of thermal stability and family data, *Am J Med Genet* 10 (1981) 279-290.

Strange P.

Dopamine Receptors: Studies on Their Structure and Function. In "Advances in Drug Research", Testa B. und Meyer U. (Hrsg.), Academic Press, London, 1996, *Bd. 28*, pp. 384.

Strassburger W. und Friderichs E.

Opioidpeptide - Ironman, Muttermilch und Krötenhaut, *Pharm Unserer Zeit* 31 (2002) 52-58.

Strous R.D., Bark N., Parsia S.S., Volavka J. und Lachman H.M.

Analysis of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia: evidence for association with aggressive and antisocial behavior, *Psychiatry Res* 69 (1997) 71-77.

Strous R.D., Bark N., Woerner M. und Lachman H.M.

Lack of association of a functional catechol-O-methyltransferase gene polymorphism in schizophrenia, *Biol Psychiatry* 41 (1997) 493-495.

Syvanen A.C., Tilgmann C., Rinne J. und Ulmanen I.

Genetic polymorphism of catechol-O-methyltransferase (COMT): correlation of genotype with individual variation of S-COMT activity and comparison of the allele frequencies in the normal population and parkinsonian patients in Finland, *Pharmacogenetics* 7 (1997) 65-71.

Tai C.H. und Wu R.M.

Catechol-O-methyltransferase and Parkinson's disease, *Acta Med Okayama* 56 (2002) 1-6.

Tan E.K., Khajavi M., Thornby J.I., Nagamitsu S., Jankovic J. und Ashizawa T.

Variability and validity of polymorphism association studies in Parkinson's disease, *Neurology* 55 (2000) 533-538.

Tasker R.R., Lang A.E. und Lozano A.M.

Pallidal and thalamic surgery for Parkinson's disease, *Exp Neurol* 144 (1997) 35-40.

Tel B.C., Zeng B.Y., Cannizzaro C., Pearce R.K., Rose S. und Jenner P.

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 (2002) 1047-1058.

Tenhunen J., Salminen M., Jalanko A., Ukkonen S. und Ulmanen I.

Structure of the rat catechol-O-methyltransferase gene: separate promoters are used to produce mRNAs for soluble and membrane-bound forms of the enzyme, *DNA Cell Biol* 12 (1993) 253-263.

Tenhunen J., Salminen M., Lundstrom K., Kiviluoto T., Savolainen R. und Ulmanen I.

Genomic organization of the human catechol O-methyltransferase gene and its expression from two distinct promoters, *Eur J Biochem* 223 (1994) 1049-1059.

Terenius L.

Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 32 (1973) 317-320.

Thompson R.C., Mansour A., Akil H. und Watson S.J.

Cloning and pharmacological characterization of a rat mu opioid receptor, *Neuron* 11 (1993) 903-913.

Tiihonen J., Hallikainen T., Lachman H., Saito T., Volavka J., Kauhanen J., Salonen J.T., Ryyanen O.P., Koulu M., Karvonen M.K., Pohjalainen T., Syvalahti E. und Hietala J.

Association between the functional variant of the catechol-O-methyltransferase (COMT) gene and type 1 alcoholism, *Mol Psychiatry* 4 (1999) 286-289.

Tortorici V. und Morgan M.M.

Comparison of morphine and kainic acid microinjections into identical PAG sites on the activity of RVM neurons, *J Neurophysiol* 88 (2002) 1707-1715.

Traynor J.R. und Nahorski S.R.

Modulation by mu-opioid agonists of guanosine-5'-O-(3-[³⁵S]thio)triphosphate binding to membranes from human neuroblastoma SH-SY5Y cells, *Mol Pharmacol* 47 (1995) 848-854.

Unterwald E.M., Ho A., Rubinfeld J.M. und Kreek M.J.

Time course of the development of behavioral sensitization and dopamine receptor up-regulation during binge cocaine administration, *J Pharmacol Exp Ther* 270 (1994) 1387-1396.

Vallar L. und Meldolesi J.

Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor, *Trends Pharmacol Sci* 10 (1989) 74-77.

Van Hoessen G., Morecraft R. und Vogt B.

Connections of the monkey cingulate cortex. In "Neurobiology of cingulate cortex and limbic thalamus: A comprehensive handbook", Vogt B. (Hrsg.), Birkhäuser, Boston, 1993, Bd. , pp. 249-284.

Vandenbergh D.J., Rodriguez L.A., Miller I.T., Uhl G.R. und Lachman H.M.

High-activity catechol-O-methyltransferase allele is more prevalent in polysubstance abusers, *Am J Med Genet* 74 (1997) 439-442.

Vaughan C.W. und Christie M.J.

Presynaptic inhibitory action of opioids on synaptic transmission in the rat periaqueductal grey in vitro, *J Physiol* 498 (1997) 463-472.

Voorn P., Brady L.S., Berendse H.W. und Richfield E.K.

Densitometrical analysis of opioid receptor ligand binding in the human striatum--I. Distribution of mu opioid receptor defines shell and core of the ventral striatum, *Neuroscience* 75 (1996) 777-792.

Wang J.B., Imai Y., Eppler C.M., Gregor P., Spivak C.E. und Uhl G.R.

mu opiate receptor: cDNA cloning and expression, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 10230-10234.

Wang J.B., Johnson P.S., Imai Y., Persico A.M., Ozenberger B.A., Eppler C.M. und Uhl G.R.

cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant, *FEBS Lett* 348 (1994) 75-79.

Wang T., Franke P., Neidt H., Cichon S., Knapp M., Lichtermann D., Maier W., Propping P. und Nothen M.M.

Association study of the low-activity allele of catechol-O-methyltransferase and alcoholism using a family-based approach, *Mol Psychiatry* 6 (2001) 109-111.

Wang H. und Wessendorf M.W.

Mu- and delta-opioid receptor mRNAs are expressed in periaqueductal gray neurons projecting to the rostral ventromedial medulla, *Neuroscience* 109 (2002) 619-634.

Watanabe M., Harada S., Nakamura T., Ohkoshi N., Yoshizawa K., Hayashi A. und Shoji S.

Association between catechol-O-methyltransferase gene polymorphisms and wearing-off and dyskinesia in Parkinson's disease, *Neuropsychobiology* 48 (2003) 190-193.

Wei J., Ramchand C.N., Clark A.E. und Hemmings G.P.

A study of enzymes involved in catecholamine metabolism in parents of patients with schizophrenia, *Schizophr Res* 19 (1996) 27-32.

Wick M.J., Minnerath S.R., Lin X., Elde R., Law P.Y. und Loh H.H.

Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors, *Brain Res Mol Brain Res* 27 (1994) 37-44.

Wisden W. und Morris B.J.

In situ hybridization with oligonucleotide probes, *Int Rev Neurobiol* 47 (2002) 3-59.

Wise R.A.

Neurobiology of addiction, *Curr Opin Neurobiol* 6 (1996) 243-251.

Xie T., Ho S.L., Li L.S. und Ma O.C.

G/A1947 polymorphism in catechol-O-methyltransferase (COMT) gene in Parkinson's disease, *Mov Disord* 12 (1997) 426-427.

Yaksh T.L. und Rudy T.A.

Narcotic analgesics: CNS sites and mechanisms of action as revealed by intracerebral injection techniques, *Pain* 4 (1978) 299-359.

Yan Z., Feng J., Fienberg A.A. und Greengard P.

D(2) dopamine receptors induce mitogen-activated protein kinase and cAMP response element-binding protein phosphorylation in neurons, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999) 11607-11612.

Yasuda K., Raynor K., Kong H., Breder C.D., Takeda J., Reisine T. und Bell G.I.

Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain, *Proc Natl Acad Sci U S A* 90 (1993) 6736-6740.

Yoritaka A., Hattori N., Yoshino H. und Mizuno Y.

Catechol-O-methyltransferase genotype and susceptibility to Parkinson's disease in Japan. Short communication, *J Neural Transm* 104 (1997) 1313-1317.

Zadina J.E., Hackler L., Ge L.J. und Kastin A.J.

A Potent and Selective Endogenous Agonist For the Mu-Opiate Receptor, *Nature* 386 (1997) 499-502.

Zeng B.Y., Pearce R.K., MacKenzie G.M. und Jenner P.

Alterations in preproenkephalin and adenosine-2a receptor mRNA, but not preprotachykinin mRNA correlate with occurrence of dyskinesia in normal monkeys chronically treated with L-DOPA, *Eur J Neurosci* 12 (2000) 1096-1104.

Zhang S.P., Connell T.A., Price T., Simpson G.M., Zhou L.W. und Weiss B.

Continuous infusion of clozapine increases mu and delta opioid receptors and proenkephalin mRNA in mouse brain, *Biol Psychiatry* 37 (1995) 496-503.

Zhu B.T., Ezell E.L. und Liehr J.G.

Catechol-O-methyltransferase-catalyzed rapid O-methylation of mutagenic flavonoids. Metabolic inactivation as a possible reason for their lack of carcinogenicity in vivo, *J Biol Chem* 269 (1994) 292-299.

Zubieta J.K., Smith Y.R., Bueller J.A., Xu Y., Kilbourn M.R., Jewett D.M., Meyer C.R., Koeppe R.A. und Stohler C.S.

Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain, *Science* 293 (2001) 311-315.

Zubieta J.K., Heitzeg M.M., Smith Y.R., Bueller J.A., Xu K., Xu Y., Koeppe R.A., Stohler C.S. und Goldman D.

COMT val158met genotype affects mu-opioid neurotransmitter responses to a pain stressor, *Science* 299 (2003) 1240-1243.

Danksagung:

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Berthele für die Überlassung des Themas und die umfassende Unterstützung und stete Diskussionsbereitschaft während der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Conrad möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir ermöglicht hat, diese Arbeit in der von ihm geleiteten Klinik durchführen zu können.

Für die hervorragende Betreuung und Anleitung sowie die stete Bereitschaft zur Diskussion zu methodischen und wissenschaftlichen Fragestellungen schulde ich Herrn Dr. Platzer großen Dank.

Für die technische Assistenz bei den Laborarbeiten möchte ich mich bei Frau Nathmann ganz herzlich bedanken.

Im Besonderen möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die mir Studium und Promotion durch umfangreiche Unterstützung ermöglicht haben.