

**Wirkung von Cannabinoiden
und von short interfering RNA
auf Cannabinoid-CB₁- und μ -Opioid-Rezeptoren**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn

vorgelegt von

Karsten Flau

aus

Köln

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. med. Eberhard Schlicker
2. Referent: Prof. Dr. med. Klaus Mohr

Tag der Promotion: 04.03.2005

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. E. Schlicker für die Überlassung der Themen, die außerordentliche Betreuung sowie die zahlreichen wertvollen Tipps bedanken, die viel zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. K. Mohr danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Herrn Privatdozent Dr. M. Kathmann danke ich für die Überlassung der Themen und für viele Anregungen und Verbesserungsvorschläge sowie die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden und die Bindungs-Experimente.

Den technischen Assistentinnen Frau D. Petri und Frau P. Zeidler danke ich für ihre engagierte Unterstützung und viele wertvolle Tipps.

Herrn R. Gilsbach danke ich für zahlreiche wertvolle Tipps zu den Kinetik-Experimenten.

Herrn Professor Dr. H. Bönisch, Herrn Privatdozenten Dr. M. Brüss und Frau S. Combrink danke ich für die freundliche Überlassung von humaner 5-HT_{3A}-Rezeptor-cDNA und der Rezeptor-Liganden [³H]-GR 65630 sowie MDL 72222.

meiner Frau

Verzeichnis der Abbildungen	3
Verzeichnis der Tabellen	6
Verzeichnis der Abkürzungen	8
1 Einleitung	11
1.1 Cannabinoide.....	11
1.2 Cannabinoid-Rezeptoren.....	14
1.3 Endocannabinoid-System.....	19
1.4 Cannabinoide als Rauschmittel und Arzneimittel.....	22
1.5 μ -Opioid-Rezeptor.....	26
2 Ziele der Studie	29
2.1 Methodische Experimente.....	29
2.2 Radioligand-Bindungs-Experimente.....	29
2.3 Molekularbiologische Experimente.....	30
3 Methoden und Material	32
3.1 Membranpräparationen.....	32
3.2 Radioligand-Bindungs-Experimente.....	37
3.3 Molekularbiologische Methoden.....	61
3.4 Zellkultur.....	77
3.5 Bradford-Proteinbestimmung.....	80
3.6 Statistik.....	81
3.7 Verwendete Substanzen in alphabetischer Reihenfolge.....	83
3.8 Strukturformeln der verwendeten CB ₁ -Rezeptor-Liganden.....	89
3.9 Verwendete Geräte und Software in alphabetischer Reihenfolge.....	90
4 Ergebnisse	93
4.1 Ergebnisse der methodischen Experimente.....	93
4.2 Ergebnisse der Radioligand-Bindungs-Experimente.....	97
4.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Experimente.....	117
5 Diskussion	123
5.1 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf die [³⁵ S]-GTP γ S-Bindung.....	123

5.2 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf die [³ H]-SR 141716A-Bindung.....	124
5.3 Bindungsaffinitäten der Cannabinoide Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR am CB ₁ -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.....	125
5.4 Wirkung der Cannabinoide WIN 55,212-2, SR 141716A und VCHSR auf die [³⁵ S]-GTP γ S-Bindung im Hippocampus des Meerschweinchens.....	127
5.5 Einfluss der Cannabinoide Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR auf die Bindung von [³ H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte.....	130
5.6 Einfluss der Transfektion von NG 108-15 Zellen mit einer siRNA auf das Ausmaß der CB ₁ -Rezeptor-Expression	136
5.7 Nachweis des Funktionierens einer Methode zur transienten Transfektion einer cDNA des humanen 5-HT _{3A} -Rezeptors in HEK 293 Zellen mithilfe eines Radioligand-Bindungs-Experiments ..	138
6 Zusammenfassung	140
7 Literaturverzeichnis	143
8 Veröffentlichungen	157
9 Lebenslauf	159

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Strukturformeln und Syntheseweg der wichtigsten Cannabinoide der Hanfpflanze.....	11
Abb. 2	Strukturformeln der Endocannabinoide 2-Arachidonoylglycerol, Virodhamin, Anandamid, Noladinether und N-Arachidonoyldopamin.....	14
Abb. 3	Transmembranale Anordnung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.....	15
Abb. 4	Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Agonisten.....	16
Abb. 5	Das ternäre Modell nach Ehler (1988).....	56
Abb. 6	Sequenz der verwendeten CB ₁ -Rezeptor- und β-Actin-Primer der Ratte.....	69
Abb. 7	Sequenz der siRNA gegen die CB ₁ -Rezeptor-mRNA.....	71
Abb. 8	Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 6er-Well-Platte für den siRNA-Versuch.....	71
Abb. 9	Chemilumineszenz-Reaktion zur Detektion des sekundären Antikörpers.....	75
Abb. 10	Strukturformeln der verwendeten CB ₁ -Rezeptor-Liganden.....	89
Abb. 11	Dosis-Wirkungskurven für den Effekt von aufsteigenden Konzentrationen von WIN 55,212-2 auf die Zunahme der [³⁵ S]-GTPγS-Bindung.....	94
Abb. 12	Zwei Verdrängungskurven von [³ H]-SR 141716A mit unmarkiertem SR 141716A, die mit zwei unterschiedlichen Membranpräparationen erhalten wurden.....	96
Abb. 13	Sättigungs-Bindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³ H]-SR 141716A am CB ₁ -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.....	97
Abb. 14	Rosenthal-Plot der Sättigungs-Bindungsisotherme von [³ H]-SR 141716A am CB ₁ -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.....	98

Abb. 15	Verdrängung von 0,5 nM [³ H]-SR 141716A vom CB ₁ -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.....	99
Abb. 16	Veränderung der [³⁵ S]-GTPγS-Bindung durch VCHSR, SR 141716A und WIN 55,212-2 sowie durch Kombinationen dieser.....	102
Abb. 17	Zeitverlauf der Assoziation von 0,5 nM [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	103
Abb. 18	Sättigungs-Bindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	104
Abb. 19	Rosenthal-Plot der Sättigungs-Bindungsisotherme von [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	105
Abb. 20	Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	106
Abb. 21	Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte mit 10 μM Naloxon in Abwesenheit einer Testsubstanz.....	108
Abb. 22	Einfluss aufsteigender Konzentrationen von Δ ⁹ -THC auf die Dissoziations-Geschwindigkeit von [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte.....	109
Abb. 23	Einfluss aufsteigender Konzentrationen von CBD auf die Dissoziationsgeschwindigkeit von [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte.....	110
Abb. 24	Verdrängung von 0,5 nM [³ H]-DAMGO durch aufsteigende Konzentrationen von Δ ⁹ -THC und CBD vom μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	112

Abb. 25	Verdrängung von 0,5 nM [³ H]-DAMGO durch aufsteigende Konzentrationen von SR 141716A und VCHSR vom μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	112
Abb. 26	Zeitverlauf der Abnahme der [³ H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von Δ^9 -THC.....	114
Abb. 27	Zeitverlauf der Abnahme der [³ H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von CBD.....	114
Abb. 28	Zeitverlauf der Abnahme der [³ H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von SR 141716A...	115
Abb. 29	Zeitverlauf der Abnahme der [³ H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von VCHSR.....	115
Abb. 30	cDNA-Banden des CB ₁ -Rezeptors und von β -Actin.....	117
Abb. 31	Zeitverlauf der CB ₁ -Rezeptor-mRNA-Transkription über einen Zeitraum von 24 bis 72 Stunden nach dem Aussäen der NG 108-15 Zellen in 6er-Well-Platten.....	118
Abb. 32	Western Blots mit Proteinen von NG 108-15 Zellen mit und ohne siRNA-Behandlung sowie mit Proteinen des zerebralen Kortex der Ratte.....	119
Abb. 33	Verdrängungskurve der spezifischen Bindung von 1 nM [³ H]-GR 65630 am humanen 5-HT _{3A} -Rezeptor durch MDL 72222.....	121
Abb. 34	Totale Bindung von 1 nM [³ H]-GR 65630 an Proteinhomogenaten von nicht transfizierten und von mit dem humanen 5-HT _{3A} -Rezeptor transfizierten HEK 293 Zellen in Abwesenheit und Anwesenheit von 10 μ M des 5-HT _{3A} -Rezeptor-Antagonisten MDL 72222.....	122

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1	Verwendetes Programm des Thermo Cyclers für die PCR...	69
Tabelle 2	Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für den Western Blot.....	73
Tabelle 3	Einfluss von zwei Homogenisationsverfahren auf die maximale Zunahme der spezifischen [³⁵ S]-GTPγS-Bindung durch WIN 55,212-2.....	95
Tabelle 4	Einfluss von zwei Homogenisationsverfahren auf die IC ₅₀ -, K _D -, B _{max} -Werte und Hill-Koeffizienten.....	96
Tabelle 5	Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K _D von [³ H]-SR 141716A am CB ₁ -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens sowie maximale Bindungskapazität B _{max}	98
Tabelle 6	K _i - und IC ₅₀ -Werte aus den Kompetitions-Experimenten mit 0,5 nM [³ H]-SR 141716A am CB ₁ -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens sowie K _D - und B _{max} -Werte von [³ H]-SR 141716A, die aus der homologen Kompetition ermittelt wurden.....	100
Tabelle 7	Vergleich der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K _D und der maximalen Bindungskapazitäten B _{max} von [³ H]-SR 141716A am CB ₁ -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens aus den Sättigungs-Bindungs- und den homologen Kompetitions-Experimenten.....	101
Tabelle 8	Halbwertszeit der Assoziation t _{1/2on} von 0,5 nM [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor der Ratte und scheinbare Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k _{appon}	103
Tabelle 9	K _D -Wert von [³ H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor der Ratte sowie maximale Bindungskapazität B _{max} aus Sättigungs-Bindungs-Experimenten.....	105
Tabelle 10	Halbwertszeit der Dissoziation t _{1/2off} und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k _{off} der Dissoziation von 0,5 nM [³ H]-DAMGO vom μ-Opioid-Rezeptor der Ratte in Abwesenheit einer Testsubstanz.....	107

Tabelle 11	Gegenüberstellung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von [³ H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor der Ratte, die einmal mit der Sättigungs-Bindung und einmal aus den Ergebnissen der Assoziations- und Dissoziations-Experimente ermittelt wurden.....	107
Tabelle 12	EC ₅₀ -Werte und maximale Effekte für Δ^9 -THC und CBD auf die Veränderung der Dissoziationsgeschwindigkeit im Vergleich zur Dissoziationsgeschwindigkeit in Abwesenheit der Cannabinoide.....	111
Tabelle 13	IC ₅₀ -, K _i -, pK _i -Werte und Hill-Koeffizienten aus den Pseudo-Kompetitions-Experimenten von 0,5 nM [³ H]-DAMGO mit Δ^9 -THC, CBD und SR 141716A am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.....	113
Tabelle 14	Vergleich der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k _{off} aus den Dissoziations-Experimenten mit den scheinbaren Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k _{appoff} aus den Zeitverläufen der Änderung der Gleichgewichts-Bindung.....	116
Tabelle 15	Quotienten der densitometrischen Auswertung der CB ₁ -Rezeptor-Banden mit den zugehörigen α -Tubulin-Banden von NG 108-15 Zellen ohne und mit siRNA-Behandlung gegen die CB ₁ -Rezeptor-mRNA.....	120
Tabelle 16	Unspezifische Bindung von [³ H]-GR 65630 und Anteil der totalen Bindung an der zugesetzten Gesamtradioaktivität in Prozent für die Bindung von [³ H]-GR 65630 am humanen 5-HT _{3A} -Rezeptor von Membranhomogenaten transient transfizierter HEK 293 Zellen.....	122

Verzeichnis der Abkürzungen

2-AG	2-Arachidonoylglycerol
AEBSF	Aminoethylphenylsulfonylfluorid (Proteinase-Inhibitor)
AMV	avian myeloblastosis virus
app	apparent (scheinbar)
ATP	Adenosintriphosphat
5-HT	5-Hydroxytryptamin = Serotonin
Aqua dem	entmineralisiertes Wasser
B	spezifische Bindung
β -Act	β -Actin
BLU	Boehringer light units
B_{max}	maximale Bindungskapazität
BSA	bovines Serumalbumin (Rinderserumalbumin)
cAMP	zyklisches Adenosin-3', 5'-monophosphat
CB ₁ -R	CB ₁ -Rezeptor
CBD	Cannabidiol
CBN	Cannabinol
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CDS	Cell Dissociation Solution
Δ^9 -THC	(-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Adler Medium
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Konzentration, die 50 % des maximalen Effektes bewirkt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(β -aminoethylether) N, N, N', N' tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
F	Konzentration des freien Radioliganden
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat

GTP γ S	Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)
HAMs	Nährstoffsupplement
HAT	die Zelldifferenzierung unterdrückendes Supplement
HEK	Human Embryonic Kidney (293 cells)
hFKS	hitzeesterilisiertes fötales Kälberserumalbumin
I	Inhibitor (Synonyme: Kompetitor, Displacer)
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50 %ige Hemmung bewirkt
INN	international nonproprietary name (nicht geschützter Name)
IPTG	Isopropylthiogalactosid
k	Geschwindigkeitskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
K _i	Verdrängungskonstante
KO	knock-out
Ko.	Kontrolle
L	Ligand
L*	Radioligand
LB	Luria-Bertani
LSD	Lysergsäurediethylamid
MEt	2-Mercaptoethanol
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl der Experimente
NCBI	National Center for Biotechnology Information
n _H	Hill-Koeffizient
σ_{n-1}	Standardabweichung
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PS	Penicillin-Streptomycin
R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes

siRNA	short interfering Ribonukleinsäure
S.O.C.	hefehaltiges Kulturmedium für kompetente E. coli Bakterien
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBST	trisgepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tp B	Restriktionspuffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Cannabinoide

Cannabinoide ist die klassische Bezeichnung für eine heterogene Gruppe biogener und chemisch synthetisierter Substanzen, die ähnliche pharmakologische Eigenschaften aufweisen wie (-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) sowie weitere verwandte Inhaltsstoffe, die in der diözischen (zweihäusigen) Hanfpflanze - *Cannabis sativa*, *Cannabis indica* und *Cannabis ruderalis* - vorkommen. Aus pharmakologischer Sicht versteht man heute unter Cannabinoiden Substanzen, die an einen oder beide der zwei klonierten Cannabinoid-Rezeptoren CB₁ und CB₂, im folgenden CB₁- und CB₂-Rezeptor genannt, binden, und über diese Rezeptoren die für Cannabinoide typischen pharmakologischen Effekte vermitteln (siehe Kapitel 1.2). Δ^9 -THC, das in der Hanfpflanze in einer inaktiven Vorstufe als Δ^9 -THC-Säure (Carbonsäure) vorkommt, ist qualitativ sowie quantitativ betrachtet der wichtigste unter den bekannten psychogenen Inhaltsstoffen. In großer Menge kommt Δ^9 -THC-Säure in dem Harz vor, das ausschließlich weibliche Pflanzen an ihren Blütenspitzen und in geringerem Umfang an ihren oberen Laubblättern aus Drüsenköpfchen absondern. Neben Δ^9 -THC-Säure sind über 60 weitere Cannabinoide als Inhaltsstoffe der Hanfpflanze bekannt. Die wichtigsten neben Δ^9 -THC-Säure sind Cannabidiolsäure (CBD-Säure) und Cannabinolsäure (CBN-Säure) (Strukturformeln siehe Abb. 1).

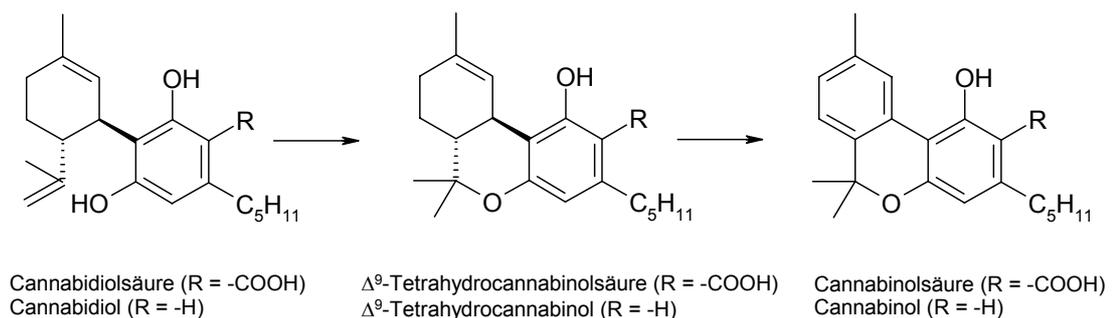


Abb. 1 Strukturformeln der wichtigsten Cannabinoide der Hanfpflanze.

Substanzen mit gleichem chemischen Grundgerüst wie Δ^9 -THC, das sind Verbindungen mit einem Dibenzopyranringsystem, werden als Tetrahydrocannabinole oder Cannabinole, in Abhängigkeit von der Anzahl der Doppelbindungen, bezeichnet. Durch Decarboxylierungsreaktionen unter Einwirkung von Sauerstoff und Wärme entstehen die säurefreien Formen Δ^9 -THC, CBD und CBN. Die Säureformen sowie CBD und CBN haben selbst keine psychogene Wirkung. CBD und CBN können jedoch pharmakologische Effekte von Δ^9 -THC modulieren.

Unter den verschiedenen Arten der Hanfpflanze ist Cannabis indica besonders reich an Δ^9 -THC. Neben der Art der Hanfpflanze ist die Menge an synthetisiertem Δ^9 -THC stark von den klimatischen Bedingungen des Anbaugebiets abhängig. Für eine gute Ausbeute bedarf es hoher mittlerer Tagestemperaturen sowie starker Sonneneinstrahlung. Die Hauptanbaugebiete von Hanf befinden sich in Teilen Nordafrikas und im Nahen sowie Fernen Osten.

Mit der Entdeckung der chemischen Struktur des Δ^9 -THC 1964 begann eine neue Ära der Erforschung von Cannabinoiden, nämlich die Suche nach weiteren, ähnlich wirksamen Substanzen sowie die Aufklärung ihrer pharmakologischen Wirkung. 1965 gelang Mechoulam und Mitarbeitern die Synthese von racemischem Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (Mechoulam und Gaoni, 1965). Bis heute sind eine Vielzahl von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden synthetisiert worden, die sich mehr oder weniger stark in ihrer chemischen Struktur von Δ^9 -THC unterscheiden. Ein Nachteil der meisten bisher bekannten Cannabinoid-Rezeptor-Liganden ist deren hohe Lipophilie. Dies hat eine schlechte Wasserlöslichkeit zur Folge, was wiederum ihren Einsatz in pharmakologischen Experimenten im Labor ebenso wie ihre mögliche Verwendung als potentielle Wirkstoffe in der Arzneitherapie erschwert. Daneben unterscheiden viele Cannabinoid-Rezeptor-Liganden nicht zwischen dem CB₁- und dem CB₂-Rezeptor und weisen darüber hinaus häufig gemischte pharmakologische Effekte auf, d.h. sie sind z.B. keine reinen Agonisten oder Antagonisten. Die hohe Lipophilie der Verbindungen hat auch zur Folge, dass die Liganden die Blut-Hirn-Schranke passiv überwinden können und dadurch bedingt immer auch zentrale Effekte auslösen, zumal sie an den besonders im ZNS exprimierten CB₁-Rezeptor

binden (siehe Kapitel 1.2). Für die Entwicklung neuer Cannabinoid-Rezeptor-Liganden galt demzufolge die Zielsetzung, Substanzen zu synthetisieren, die besser wasserlöslich und für einen Cannabinoid-Rezeptor-Subtyp selektiv sind sowie einen definierten pharmakologischen Effekt hervorrufen.

An dieser Stelle seien nur einige der für die experimentelle Pharmakologie wichtigen Cannabinoid-Rezeptor-Liganden genannt, die in dieser Arbeit verwendet wurden, nämlich Δ^9 -THC als CB₁-/CB₂-Rezeptor-Agonist, CBD als Ligand an CB₁-/CB₂-Rezeptoren mit geringer Bindungsaffinität, CP 55,940 und WIN 55,212-2 als CB₁-/CB₂-Rezeptor-Agonisten, SR 141716A als selektiver CB₁-Rezeptor-Antagonist/-inverser Agonist und VCHSR als neutraler CB₁-Rezeptor-Antagonist (Strukturformeln siehe Kapitel 3.8). Neben den beschriebenen Cannabinoiden der Hanfpflanze und den synthetisch hergestellten Substanzen werden Cannabinoide auch von Säugetier-Organismen synthetisiert und demzufolge als Endocannabinoide (endogene Cannabinoide) bezeichnet. Als erstes Endocannabinoid wurde Arachidonyl-ethanolamid (Anandamid) von Devane et al. (1992) entdeckt, isoliert und kurze Zeit später pharmakologisch charakterisiert (Fride und Mechoulam, 1993). Neben Anandamid ist 2-Arachidonoylglycerol (2-AG) als zweites Endocannabinoid vielfach pharmakologisch untersucht worden (van der Stelt und Di Marzo, 2003). Weitere potentielle Endocannabinoide wie z.B. Noladinether (Hanus et al., 2001), Virodhamin (Porter et al., 2002) und N-Arachidonoyldopamin (Bisogno et al., 2000) sind in letzter Zeit in einigen Säugetierspezies entdeckt worden. Eine umfassende pharmakologische Charakterisierung und abschließende Bewertung, ob es sich tatsächlich um Endocannabinoide handelt, steht jedoch noch weitgehend aus. Die Strukturformeln der genannten Endocannabinoide zeigt die Abb. 2.

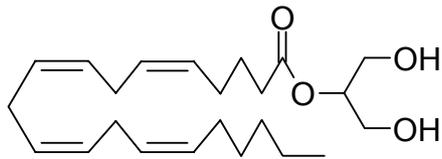
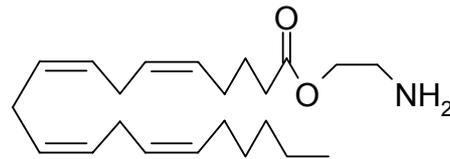
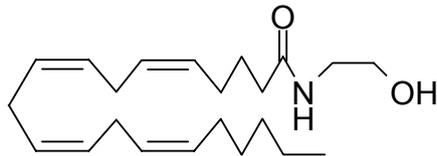
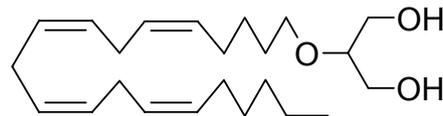
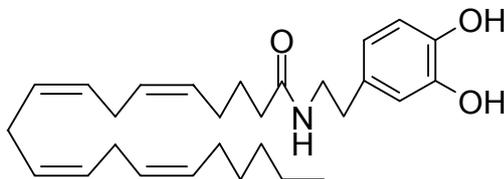
**2-Arachidonoylglycerol****Virodhamin****Anandamid****Noladinether****N-Arachidonoyldopamin**

Abb. 2 Strukturformeln der Endocannabinoide 2-Arachidonoylglycerol, Virodhamin, Anandamid, Noladinether und N-Arachidonoyldopamin.

Als Endocannabinoid bezeichnet man eine Substanz, die chemisch betrachtet ein Eicosanoid darstellt, im Organismus aus Arachidonsäure unter Einwirkung der Phosphodiesterasen Phospholipase C (Anandamid) oder Phospholipase D (2-AG) (Baker et al., 2003) gebildet wird, an CB₁- und/oder CB₂-Rezeptoren binden kann sowie für Cannabinoide typische pharmakologische Effekte hervorruft. Endocannabinoide werden - anders als Neurotransmitter wie z.B. Noradrenalin, Serotonin und Dopamin - nicht vesikulär gespeichert, sondern bei Bedarf aus Arachidonsäure gebildet und anschließend freigesetzt (Freund et al., 2003).

1.2 Cannabinoid-Rezeptoren

1988 wurde erstmals ein Cannabinoid-Rezeptor im Rattenhirn näher charakterisiert (Devane et al., 1988). Bisher sind zwei Cannabinoid-Rezeptor-Subtypen kloniert worden, nämlich der CB₁- und der CB₂-Rezeptor. Beide gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Matsuda

et al., 1990; Munro et al., 1993). G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind Funktionsproteine, die sieben transmembranale Schleifen formen, deren Raumstruktur wiederum eine α -Helix-Struktur aufweist (siehe Abb. 3).

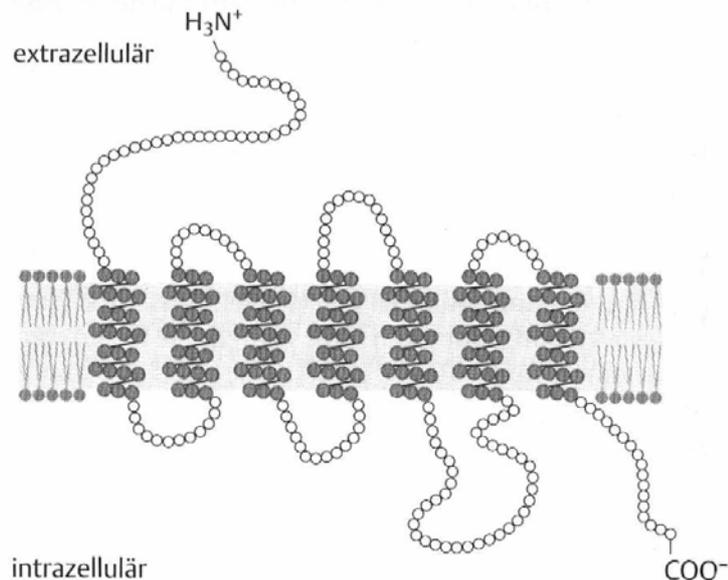


Abb. 3 Transmembranale Anordnung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors (Lüllmann und Mohr, 2004).

Namegebend für diese Rezeptoren ist deren Eigenschaft, eine Guanin-Nukleotid-bindende Untereinheit (kurz G-Protein) an die vom N-Terminus aus betrachtete dritte intrazelluläre Schleife binden zu können. Das G-Protein selbst besteht aus der $G\alpha$ - und der aus zwei Teilen zusammengesetzten $G\beta\gamma$ -Untereinheit.

Den gesamten Ablauf der Signalübertragung vom Extrazellular- in den Intrazellularraum via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren stellt man sich wie folgt vor (siehe auch Abb. 4): Durch die Bindung eines Rezeptor-Liganden mit intrinsischer Aktivität (Agonist) an einer definierten Bindungsstelle am Rezeptor kommt es zu einer Veränderung der Raumstruktur des Rezeptor-Proteins, die das intrazellulär gebundene G-Protein in die Lage versetzt, Guanosin-5'-triphosphat (GTP) unter Abspaltung von Guanosin-5'-diphosphat (GDP) an die $G\alpha$ -Untereinheit zu binden und anschließend in die $G\alpha$ - und die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten zu zerfallen. Die $G\alpha$ - sowie die $G\beta\gamma$ -Untereinheit können ihrerseits andere Proteine (Effektorproteine) in ihrer Funktion beeinflussen. Ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor kann nach seiner Aktivierung mehrere G-Proteine aktivieren, wodurch es zu einer

lawinenartigen Verstärkung des durch einen Agonisten ausgelösten Signals kommt. Nach der relativ rasch verlaufenden Hydrolyse des G-Protein-gebundenen GTP zu GDP im Zeitraum von Sekunden kommt es zu einer Wiedervereinigung der $G\alpha$ - mit der $G\beta\gamma$ -Untereinheit und das G-Protein kann sich entweder an einen nicht aktivierten Rezeptor anlagern oder an einen - z.B. durch einen Agonisten aktivierten - Rezeptor binden, um erneut aktiviert zu werden.

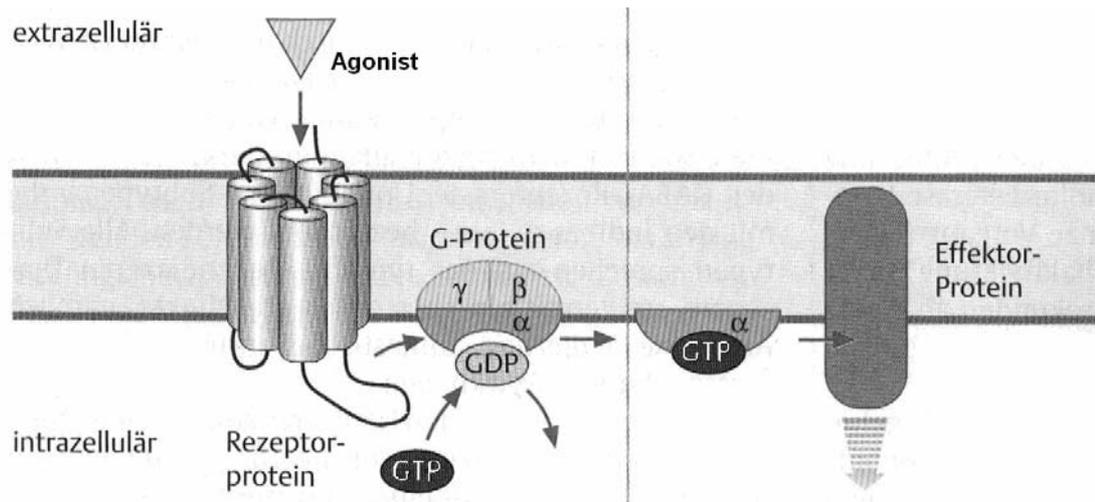


Abb. 4 Schematische Darstellung der intrazellulären Abläufe nach Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Agonisten (Lüllmann und Mohr, 2004; modifiziert).

Es existieren unterschiedliche $G\alpha$ -Untereinheiten, die nach ihrer Funktion klassifiziert werden können. Beide Cannabinoid-Rezeptoren sind $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren. $G\alpha_i$ ist das sog. inhibitorische (inhibitory) G-Protein, das die Adenylylzyklase hemmt (weitere Effekte siehe unten). $G\alpha_o$ ist das sog. andere (other) G-Protein, das in der Regel die gleichen Effekte wie das $G\alpha_i$ -Protein vermittelt (Forth et al., 2001). Der CB_1 -Rezeptor kommt vorwiegend im ZNS und dort in hoher Dichte im Hirngewebe vor (Herkenham et al., 1991; Pertwee, 1997). Im Vergleich zu anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weist der CB_1 -Rezeptor eine sehr hohe Rezeptor-Dichte in weiten Teilen des Hirnes auf, insbesondere im zerebralen Kortex, im Hippocampus, in den Basalganglien und im Cerebellum. Geringere Rezeptor-Dichten findet man dagegen im Hypothalamus und im Rückenmark. Die Abwesenheit von der CB_1 -Rezeptor-Radioligandbindung im Hirnstamm deckt sich mit der klinischen Beobachtung der geringen Letalität

von Cannabinoiden (Robson, 2001). Neben dem Vorkommen im ZNS wird der CB₁-Rezeptor auch von peripheren Neuronen exprimiert, und zwar sowohl von sensorischen als auch von Neuronen des autonomen Nervensystems, z.B. im Magen-Darm-Trakt (Pertwee et al., 1992, 1996). Daneben wurde der CB₁-Rezeptor auch in den Testes (Gerard et al., 1991) sowie in sehr geringem Umfang auch in Geweben des Immunsystems nachgewiesen (Galieue et al., 1995). Der CB₁-Rezeptor ist häufig präsynaptisch auf gabaergen (Szabo et al., 1998), glutamatergen (Shen et al., 1996), noradrenergen (Schlicker et al., 1997), dopaminergen (Schlicker et al., 1996), serotoninerger (Nakazi et al., 2000) und cholinergen (Kathmann et al., 2001) Neuronen lokalisiert.

Im Gegensatz zum CB₁- wird der CB₂-Rezeptor ausschließlich in der Peripherie exprimiert, und zwar vor allem von Geweben und Zellen des Immunsystems. Darunter befinden sich die Milz, der Thymus, das Knochenmark, die Tonsillen, die Lymphknoten sowie Immunzellen, insbesondere B-Lymphozyten und Makrophagen (Galieue et al., 1995). Die Aktivierung von CB₁-/CB₂-Rezeptoren kann durch Aktivierung des G_{i/o}-Proteins einen oder mehrere der folgenden intrazellulären Effekte zur Folge haben:

- die Hemmung spannungsabhängiger Kalziumkanäle vom N- (Mackie und Hille, 1992), P- und Q-Typ (Twitchell et al., 1997; Ameri, 1999) → Abnahme der intrazellulären Kalziumkonzentration → Hemmung kalziumabhängiger Effekte (nur beim CB₁-Rezeptor)
- die Hemmung der Adenylylzyklase (Howlett, 1985; Ameri, 1999) → Abnahme des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat-(cAMP-)Spiegels → Hemmung der Proteinkinase A (beim CB₁- und CB₂-Rezeptor)
- die Aktivierung spannungsabhängiger Kaliumkanäle vom A-Typ (Deadwyler et al., 1993) sowie die Aktivierung spannungsunabhängiger G-Protein-regulierter Kaliumkanäle, sog. GIRK (inwardly rectifying G-protein-coupled K⁺ channels) (Guo und Ikeda, 2004) → Abnahme des intrazellulären Kaliumspiegels → Hyperpolarisation (nur beim CB₁-Rezeptor)

- die Aktivierung der MAP-Kinase (Bouaboula et al., 1995; Ameri, 1999) (beim CB₁- und CB₂-Rezeptor)
- die Aktivierung der Phospholipase C durch die Gβγ-Untereinheit (Guzman et al., 2002) (nur beim CB₁-Rezeptor)
- Zunahme der hydrolytischen Spaltung von Sphingomyelin zu Ceramid und/oder Steigerung der Ceramid de-novo Synthese → Steigerung der Konzentration von Ceramid und damit Zunahme Ceramid-vermittelter Effekte (Sanchez et al., 1998; Guzman et al., 2001) (nur beim CB₁-Rezeptor).

Da der CB₁-Rezeptor vorwiegend präsynaptisch auf Neuronen des ZNS lokalisiert ist, und zwar auf gabaergen, glutamatergen, noradrenergen, cholinergen, serotonergen und dopaminergen Neuronen, und die Aktivierung der Cannabinoid-Rezeptoren zu einer Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration (Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle) führt, kommt es zu einer Hemmung der stimulierten Freisetzung der entsprechenden Transmitter. Aus der Hemmung sowohl inhibitorisch wie exzitatorisch wirksamer Neuronen sowie aus der Verteilung des CB₁-Rezeptors in den unterschiedlichen Hirnregionen erklärt sich die zum Teil komplexe und mitunter scheinbar widersprüchliche Wirkweise der Cannabinoide im lebenden Organismus. So können CB₁-Rezeptor-Agonisten wie Δ⁹-THC in geringer Dosierung zu einer Hyperaktivität führen, wohingegen eine höhere Dosierung eine Hypoaktivität und Katalepsie hervorruft (Chaperon und Thiebot, 1999). Zu den charakteristischen Wirkungen von Cannabinoiden wie Δ⁹-THC zählen die Hypoalgesie/Antinozizeption, die Verschlechterung kognitiver Fähigkeiten und des Kurzzeitgedächtnisses, die Änderung der Wahrnehmung, ferner Euphorie und Dysphorie, die Abnahme der spontanen Bewegungsaktivität, die Appetitsteigerung, die Verringerung der Darmmotilität und der Magensäuresekretion, die Spasmyolyse der glatten Muskulatur (z.B. Harnblase), die Abnahme des Augeninnendrucks, die Abnahme des Blutdrucks, die Zunahme der Herzfrequenz sowie neuroprotektive/antiexzitotoxische Effekte.

Ein großer Fortschritt in der Aufklärung der Cannabinoid-Rezeptor-Pharmakologie gelang mit der Klonierung der CB₁- und CB₂-Rezeptoren. Nach der Klonierung des CB₁-Rezeptors der Ratte (Matsuda et al., 1990)

gelang die Klonierung des humanen CB₁-Rezeptors (Gerard et al., 1991). Es folgte die Klonierung des humanen CB₂-Rezeptors (Munro et al., 1993). Neben der Möglichkeit der pharmakologischen Charakterisierung sowohl von nicht veränderten wie auch von mutierten Cannabinoid-Rezeptor-Varianten mit der Hilfe von transfizierten Zelllinien erschloss sich mit der Klonierung die Möglichkeit der Generierung von Cannabinoid-Rezeptor-Knockout-Mäusen (CB₁-Rezeptor-KO-Mäuse). KO-Mäuse haben die Besonderheit, dass ihnen ein oder mehrere Gene, z.B. das CB₁-Rezeptor-Gen, fehlt und demzufolge die entsprechenden, codierten Proteine nicht mehr exprimiert werden. Bei der von Zimmer et al. (1999) generierten CB₁-Rezeptor-KO-Maus ist die Sterblichkeit signifikant erhöht, und die CB₁-Rezeptor-KO-Mäuse (CB₁^{-/-}) sind zahlenmäßig unter den Nachkommen, die aus einer heterozygoten Verpaarung (das CB₁-Rezeptor-Gen ist bei der Mutter und dem Vater jeweils nur einmal vorhanden) hervorgehen, gegenüber den heterozygoten (CB₁^{+/-}) und den Wildtyp-Mäusen (WT, CB₁^{+/+}), gemessen an den Erwartungen, die sich nach den Mendelschen-Regeln ergeben, unterrepräsentiert.

Mit vergleichenden Untersuchungen der pharmakologischen Effekte sowohl in WT- wie auch in CB₁-Rezeptor-KO-Mäusen kann gezeigt werden, welche Effekte tatsächlich CB₁-Rezeptor vermittelt sind und wie sich der Verlust des CB₁-Rezeptors auf pharmakologische Effekte und/oder die Entwicklung sowie das Verhalten der Mäuse auswirkt. Einige wichtige Befunde, die mit CB₁-Rezeptor-KO-Mäusen erhoben wurden, sind der Nachweis von non-CB₁-/non-CB₂-Rezeptor-Effekten einiger Cannabinoide (z.B. Zimmer et al., 1999; Di Marzo et al., 2000; Baskfield et al., 2004), der Nachweis des Vorhandenseins eines endogenen Tonus des Endocannabinoid-Systems in bestimmten Geweben (z.B. Schlicker et al., 2003) sowie die Entschlüsselung der Bedeutung des Endocannabinoid-Systems bei der Belohnung und für die Abhängigkeitsentwicklung beim Konsum von Alkohol und Opioiden (Cossu et al., 2001; Racz et al., 2003).

1.3 Endocannabinoid-System

Seit der Entdeckung der endogenen Opioiden wurde postuliert, dass es zu jedem Rezeptor im Organismus mindestens einen endogenen Liganden geben müsse. Auf der Suche nach einem endogenen Liganden für den

zentralen CB₁-Rezeptor waren Devane et al. (1992) mit der Entdeckung des Anandamids erfolgreich. Heute gibt es zahlreiche Belege dafür, dass die Endocannabinoide Anandamid und 2-AG (sowie evtl. auch weitere Endocannabinoide) sowohl hinsichtlich physiologischer wie auch pathophysiologischer Prozesse eine Rolle spielen können. Die Endocannabinoide sind ein Teil des sog. Endocannabinoid-Systems. Darunter versteht man das Zusammenspiel von Endocannabinoiden als physiologischen Cannabinoid-Rezeptor-Liganden mit Cannabinoid-Rezeptoren und weiteren Angriffspunkten, wie z.B. VR₁-Vanilloid-Rezeptoren (Zygmunt et al., 1999) und nicht identifizierten Rezeptoren (Di Marzo et al., 2000) sowie die Enzymausstattung, die für die Synthese und den Abbau der Endocannabinoide notwendig ist. Des Weiteren zählen die bisher noch nicht näher geklärten Mechanismen zum Endocannabinoid-System, die der Freisetzung der Endocannabinoide in den synaptischen Spalt im Anschluss an ihre Synthese dienen. Neueste Untersuchungen lassen vermuten, dass der Transportvorgang von Endocannabinoiden durch die Zellmembran in beide Richtungen von ein und demselben Transporter bewerkstelligt wird (Petrocellis et al., 2004).

Ein wichtiger Schritt bei der Aufklärung der Bedeutung und Funktion des Endocannabinoid-Systems gelang mit der Synthese von SR 141716A (Rinaldi-Carmona et al., 1994). SR 141716A wurde zunächst als hochaffiner, reiner CB₁-Rezeptor-Antagonist pharmakologisch charakterisiert. Es stellte sich jedoch heraus, dass SR 141716A sowohl in in-vivo (Bouaboula et al., 1997; Colombo et al., 1998) als auch in in-vitro (Sim-Selley et al., 2001) Eigeneffekte in Abwesenheit eines exogen zugeführten CB₁-Rezeptor-Agonisten zeigte. Diese Eigeneffekte von SR 141716A sind zum Teil CB₁-Rezeptor vermittelt, da sie in einigen Experimenten an das Vorhandensein des CB₁-Rezeptors gebunden sind (Bensaid et al., 2003), und entsprechen den entgegengesetzten Effekten, die man für einen CB₁-Rezeptor-Agonisten erwarten würde. Die Eigenschaft eines Rezeptor-Liganden, entgegengesetzte Effekte im Vergleich zu einem Agonisten in Abwesenheit eines Agonisten auszulösen, findet in der Bezeichnung inverser Agonist Ausdruck. SR 141716A ist demnach korrekt bezeichnet ein CB₁-Rezeptor-Antagonist und CB₁-Rezeptor-inverser Agonist.

Obwohl Endocannabinoide nicht vesikulär gespeichert werden, können diese dennoch bedarfsgesteuert freigesetzt werden. Ein Beispiel für die bedarfsgesteuerte Freisetzung von Anandamid findet sich bei Marsicano et al. (2003). Diese Autoren konnten in einem in-vivo Mausmodell zeigen, dass die besonders im Hippocampus zum Tragen kommende schädigende Wirkung von exogen applizierter Kainsäure in Form von starken Krämpfen und einer erhöhten Sterberate bei WT-Mäusen deutlich geringer als bei Artgenossen ist, die den CB₁-Rezeptor nicht mehr auf Hauptneuronen des Vorderhirns (u.a. auf glutamatergen Neuronen im Hippocampus), aber noch auf begleitenden gabaergen Interneuronen exprimierten (sog. konditionaler CB₁-Rezeptor-KO). Das geringere Ausmaß der schädigenden Wirkungen von Kainsäure bei den WT-Mäusen wurde mit dem raschen Anstieg von Anandamid im Hippocampus und der CB₁-Rezeptor vermittelten Hemmung exzitatorischer, wahrscheinlich glutamaterger Neuronen erklärt. Das zuvor genannte Beispiel einer bedarfsgesteuerten Freisetzung von Anandamid veranschaulicht eine wichtige physiologische Funktion des Endocannabinoid-Systems, die in einer retrograden Hemmung sowohl inhibitorisch wie auch exzitatorisch wirksamer Neuronen besteht. Hierbei kommt es an Postsynapsen, ausgelöst durch einen Stimulus, wie z.B. einen kalziumvermittelten, postsynaptischen exzitatorischen oder inhibitorischen Strom, zu einer kalziumvermittelten Freisetzung von Endocannabinoiden in den synaptischen Spalt. Die freigesetzten Endocannabinoide wirken dann als Agonisten an präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptoren und hemmen die Freisetzung von GABA aus inhibitorischen (Wilson und Nicoll, 2001) sowie von Glutamat aus exzitatorischen Neuronen (Freund et al., 2003).

Des Weiteren spielt das Endocannabinoid-System eine Rolle bei der Steuerung der Nahrungsaufnahme (Di Marzo et al., 2001; Wang et al., 2003), von Stoffwechselprozessen (Cota et al., 2003), der Motorik (Costa und Colleoni, 1999), von Gedächtnisfunktionen (Bohme et al., 2000; Marsicano et al., 2002), bei der Schmerzwahrnehmung (Zimmer et al., 1999) und bei der Belohnung durch die Einnahme von Morphin (Cossu et al., 2001) und Alkohol (Wang et al., 2003). Die Wirkdauer von Endocannabinoiden an präsynaptisch lokalisierten CB₁-Rezeptoren wird durch die Wiederaufnahme aus dem synaptischen Spalt in Zellen und den enzymatischen Abbau durch die

Fettsäureamidhydrolase oder die Monoacylglycerollipase (Di Marzo et al., 1994; Cravatt et al., 1996; Dinh et al., 2002) limitiert. Neben der Stimulation präsynaptisch lokalisierter CB₁-Rezeptoren durch freigesetzte Endocannabinoide kann der CB₁-Rezeptor auch konstitutiv aktiv sein, d.h., dass die Aktivierung des Rezeptors in diesem Fall nicht an die Anwesenheit eines Agonisten gebunden ist. SR 141716A und andere strukturverwandte inverse Agonisten (Diarylpyrazole) am CB₁-Rezeptor vermögen konstitutiv aktive Rezeptoren zu hemmen (Bouaboula et al., 1997). Mit SR 141716A kann folglich ein experimenteller Nachweis geführt werden, inwieweit die Freisetzung von Neurotransmittern aus präsynaptischen Nervenendigungen, die CB₁-Rezeptoren aufweisen, durch einen endogenen Tonus der CB₁-Rezeptoren in Richtung einer Hemmung der Transmitterfreisetzung beeinflusst wird.

1.4 Cannabinoide als Rauschmittel und Arzneimittel

Aus dem Harz der weiblichen Hanfpflanze wird durch Trocknung an der Luft die Rauschdroge Haschisch gewonnen. Marihuana, häufig auch als Cannabis bezeichnet, wird dagegen aus den getrockneten Blättern und Blüten der weiblichen Hanfpflanze hergestellt und enthält weniger Δ^9 -THC. In Europa sind beide Formen als Rauschdrogen vertreten. Seltener wird Haschisch Öl als Rauschmittel verwendet, das durch Pressung der Pflanzenteile gewonnen wird. Übliche Formen der Verwendung von Haschisch sind das Mischen des zerkleinerten Harzes mit Tabak und das anschließende Rauchen (Joint) als auch das Vermischen mit Getränken und Speisen. Marihuana wird üblicherweise mit Tabak gemischt als Joint geraucht, oder auch als Tee aufgebrüht und unter Speisen gemengt.

Die Einfuhr und der Handel mit Haschisch und Marihuana unterliegen in Deutschland dem Betäubungsmittelgesetz und sind illegal. Für die Forschung, die Arzneimittelherstellung sowie die medizinische Anwendung von Cannabinoiden existieren Ausnahmeregelungen. Neben der weltweiten traditionellen Anwendung von Cannabiserzeugnissen als Rauschdroge gibt es zahlreiche Überlieferungen für deren medizinische Verwendung bereits im Altertum. In China, Indien, Ägypten und Assyrien wurde die Hanfpflanze schon in vorchristlichen Zeiten für medizinische Zwecke genutzt, wobei

interessanter Weise in Indien nur milde Sorten als Rauschmittel bei Festen und familiären Ereignissen verwendet wurden (Kalant 2001). Im Gefolge der napoleonischen Feldzüge 1798 in Ägypten gelangte Cannabis nach Europa. Während in Frankreich Cannabis zunächst hauptsächlich als Rauschmittel Verwendung fand, stand in England die medizinische Nutzung im Vordergrund (Kalant, 2001). Die damaligen medizinischen Indikationen entsprachen im Wesentlichen den heute erforschten bzw. propagierten. Dazu zählen die Anwendung von Cannabis als Sedativum, Analgetikum, Muskelrelaxans, Antikonvulsans und Antiemetikum. Der französische Psychiater Moreau de Tours erkannte um 1830 das Potential von Cannabis, Psychosen auszulösen und nutzte Cannabis zur Auslösung und Untersuchung von Modellpsychosen bereits ein ganzes Jahrhundert vor der wissenschaftlichen Entdeckung des Lysergsäurediethylamids (LSD) und des Meskalins (Kalant, 2001). In England wurde das medizinische Interesse für Cannabis unter anderem durch die Arbeiten des Mediziners O'Shaughnessy (um 1843), der in Indien die traditionelle medizinische Anwendung von Cannabis untersuchte, gefördert (Kalant, 2001).

Eine Monographie über den Cannabisextrakt gelangte in das Englische und Amerikanische Arzneibuch und der Cannabisextrakt fand eine breite Anwendung bis ins frühe 20. Jahrhundert. Die Monographien über Cannabisextrakt verschwanden 1932 aus dem Englischen und 1941 aus dem Amerikanischen Arzneibuch. Hauptursache für die Geringschätzung des medizinischen Nutzens von Cannabisextrakt waren die starken natürlichen Gehaltsschwankungen der Inhaltsstoffe und eine daraus resultierende schlecht kontrollierbare Wirkung sowie die Entdeckung besser wirksamer Substanzen, wie z.B. die Entdeckung des Morphiums. Dazu kam die starke, weltweite Zunahme des Missbrauchs von Cannabisergebnissen als Rauschmittel, denen internationale staatliche Bemühungen folgten, den Cannabishandel, -besitz und -konsum zu verbieten.

Die Wiederentdeckung des medizinischen Nutzens von Cannabis wurde letztlich durch regelmäßige Cannabis-Konsumenten und zahlreiche Einzelfallschilderungen Kranker, die sich durch den Cannabiskonsum Beschwerdelinderung verschafften, sowie durch den wissenschaftlichen Fortschritt, der zur Identifizierung und der Synthese einzelner Cannabinoide,

insbesondere des Δ^9 -THCs in den frühen 60er Jahren, und der Entschlüsselung der Cannabinoid-Rezeptor-Pharmakologie führte, vorangetrieben. Heute sind zwei Fertigarzneimittel auf dem amerikanischen Markt, nämlich in den USA Marinol[®], das synthetisches (-)-trans- Δ^9 -Tetrahydrocannabinol (INN Dronabinol) enthält, und in Kanada Cesamet[®], mit Hexahydrocannabinol (INN Nabilone) als Wirkstoff. Beide Fertigarzneimittel werden bei zytostatikainduzierter Übelkeit und zytostatikainduziertem Erbrechen eingesetzt, wenn andere Antiemetika (Serotonin 5-HT₃-Rezeptor-Antagonisten, Dexamethason, Dopamin D₂-Rezeptor-Antagonisten) keine ausreichende Wirkung zeigen. Eine weitere Indikation für Marinol[®] ist die Appetitstimulation beim Wasting-Syndrom von AIDS-Patienten, das von einem massiven Gewichtsverlust, starker Appetitlosigkeit sowie durch eine schlechte Prognose gekennzeichnet ist.

In Deutschland ist bis heute (Stand: August 2004) kein cannabinoidhaltiges Fertigarzneimittel auf dem Markt. Marinol[®] und Cesamet[®] können jedoch aufgrund einer ärztlichen Verordnung von Apotheken für einen Patienten importiert werden. Als kostengünstige Alternative bietet sich Dronabinol als Rezeptursubstanz an, die von Apotheken bezogen und zu Tropfen oder Kapseln zur Abgabe an einen Patienten verarbeitet werden kann. In Deutschland kann Dronabinol für wissenschaftlich begründbare Indikationen ärztlich auf einem Betäubungsmittelrezept verordnet werden. Vermutlich im Sommer 2004 wird Sativex[®] der Firma Bayer Health Care die europäische Zulassung für die Indikation neuropathische Schmerzen bei Multipler Sklerose erhalten. Es handelt sich um ein Sublingualspray, das einen definierten Cannabisextrakt mit den Hauptwirkstoffen Δ^9 -THC und CBD enthält.

Wahrscheinlich ab 2005 wird der inverse Agonist / CB₁-Rezeptor-Antagonist Rimonabant (SR 141716A) eine Zulassung erhalten. Zwei klinische Studien mit Rimonabant (vorgesehener Handelsname ist Acomplia[®]) der französischen Firma Sanofi-Synthelabo wurden in letzter Zeit abgeschlossen. In der RIO-Lipids-Studie wurde über ein Jahr der Wert einer Gabe von 5 bzw. 20 mg Rimonabant pro Tag gegen Placebo zur Unterstützung der Gewichtsreduktion sowie zur Verbesserung der Lipidparameter von 1036 Patienten mit einem Body Mass Index (BMI) zu Studienbeginn von 27 bis 40

kg/m² bestimmt. Unter der 20 mg Dosierung haben nach einem Jahr 72,9 % der Patienten 5 % und 44,3 % der Patienten 10 % an Körpergewicht verloren. Der Unterschied zwischen der Placebo und der 20 mg Gruppe war signifikant ($p < 0,001$). Die Lipidparameter besserten sich in der 20 mg Gruppe hinsichtlich des HDL um 23 %, die Triglyceride sanken um 15 %, das C-reaktive Protein (ein Entzündungsparameter und mutmaßlicher kardialer Risikofaktor) sank um 27 %. Die Anzahl der Patienten mit einem metabolischen Syndrom soll sich in der 20 mg Gruppe halbiert haben.

In der STRATUS-US-Studie wurde der Wert von Rimonabant zur Unterstützung der Raucherabstinenz untersucht. 787 Raucher, die 11 bis 24 Jahre im Durchschnitt 23 Zigaretten pro Tag geraucht haben, erhielten für 10 Wochen entweder 5 bzw. 20 mg Rimonabant oder Placebo. In den ersten zwei Wochen durften die Probanden weiterräumen, am 15. Tag sollte das Rauchen eingestellt werden. Die Abstinenz wurde durch den CO-Gehalt der Atemluft und durch Bestimmung des Cotinins im Plasma verifiziert. Das Abstinenzkriterium erfüllten 36,2 % der Probanden der 20 mg Gruppe und 20,6 % der Placebo Gruppe. Das Ergebnis der 5 mg Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Placebo Gruppe. Ein günstiger Begleiteffekt in der 20 mg Gruppe war, dass die Ex-Raucher dieser Gruppe im Durchschnitt 0,3 kg abnahmen, während die Ex-Raucher der Placebo Gruppe durchschnittlich um 1,1 kg an Gewicht zunahmen. Die wesentlichen Nebenwirkungen in der 20 mg Gruppe bei der RIO-Lipids- und der STRATUS-US-Studie waren Nausea mit 12,7 % *versus* 3,2 % unter Placebo und Schwindelgefühle mit 10,4 % *versus* 6,7 % unter Placebo (Quelle: www.medical-tribune.de, 2004).

Neben den beschriebenen gibt es weitere potentielle Indikationen für Cannabinoide, wie z.B. die Behandlung der Alkoholabhängigkeit, die Behandlung neuropathischer sowie akuter Schmerzen (allein oder in Kombination mit Opioiden und anderen Analgetika), die Behandlung von Spasmen der glatten Muskulatur, die als Folge neurologischer Störungen auftreten (z.B. bei Querschnittslähmungen, Multipler Sklerose), die Senkung des Augeninnendrucks beim Glaukom, die Behandlung chronischer Darmentzündungen sowie die symptomatische Behandlung des Morbus Huntington. Cannabinoid-Rezeptor-Antagonisten/-inverse Agonisten könn-

ten möglicherweise zur Verbesserung der kognitiven Fähigkeiten bei dementiellen Erkrankungen Bedeutung erlangen.

Die hier vorgelegte Arbeit ist insbesondere dem cannabinoidergem System gewidmet (siehe Abschnitte 1.1 bis 1.4). Ein Aspekt behandelt jedoch die Frage, ob bestimmte Cannabinoide eine Wirkung auf den μ -Opioid-Rezeptor aufweisen. Deshalb folgen an dieser Stelle noch Ausführungen zum μ -Opioid-Rezeptor.

1.5 μ -Opioid-Rezeptor

Beim μ (mu)-Opioid-Rezeptor handelt es sich, ebenso wie bei den Cannabinoid-Rezeptoren, um einen $G_{i/o}$ -Protein-gekoppelten Rezeptor, der sieben transmembranäre Domänen aufweist. Neben dem μ -Opioid-Rezeptor gibt es noch zwei weitere Subtypen von Opioid-Rezeptoren, nämlich den δ (delta)- und den κ (kappa)-Opioid-Rezeptor, die sich in ihren pharmakologischen Eigenschaften unterscheiden. Der μ -Opioid-Rezeptor kommt vorwiegend im ZNS und im Magen-Darm-Trakt vor. Die zellulären Effekte nach μ -Opioid-Rezeptor-Aktivierung durch einen Rezeptor-Liganden mit intrinsischer Aktivität (Agonist) ähneln in einigen Punkten denen, die auch nach einer CB_1 -Rezeptor-Aktivierung zu erwarten sind, und zwar in:

- der Blockade spannungsabhängiger Kalziumkanäle,
- der Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumkanälen und
- der Hemmung der Adenylylzyklase.

Im Folge einer μ -Opioid-Rezeptor-Aktivierung kommt es u.a. zu einer Verringerung der Depolarisationswahrscheinlichkeit von Nervenzellen und zu einer Abnahme der Freisetzung von Neurotransmittern, u.a. von Schmerzmediatoren wie der Substanz P aus den Nervenendigungen von Schmerzafferenzen des C-Faser-Typs bei der Weiterleitung von Schmerzimpulsen vom ersten auf das zweite Neuron. Das komplexe antinozizeptive Wirkungsprofil von Opioiden lässt sich zum einen über die unterschiedlichen Mechanismen, wie z.B. die verringerte Depolarisationswahrscheinlichkeit von Neuronen und die verringerte Freisetzung von Neurotransmittern, z.B. von Schmerzmediatoren, und zum anderen mit den unterschiedlichen Wirkorten, wie z.B. dem limbischen System, wo es zu einer Veränderung des Schmerzempfindens kommt, und dem Rückenmark, wo die

Schmerzleitung gehemmt wird, erklären. Neben den genannten gemeinsamen zellulären Effekten weisen Opioide und Cannabinoide auch gemeinsame pharmakologische Effekte auf, wie z.B.

- die Antinozizeption
- die Verringerung der Darmmotilität
- die Hypotension
- die Hemmung der spontanen Bewegungsaktivität und
- die Hypothermie.

Der μ -Opioid-Rezeptor ist der Hauptwirkungsort von zahlreichen Opioiden wie z.B. Morphin, Heroin und Fentanyl. Nach Rezeptor-Aktivierung werden über den μ -Opioid-Rezeptor die für Opioide typischen pharmakologischen Effekte ausgelöst, nämlich Analgesie, Atemdepression, Euphorie und Sucht. Mit Opioiden (Synonym: Opiate) bezeichnet man Substanzen, die natürlicher Herkunft sind oder halb- bzw. vollsynthetisch hergestellt werden und die pharmakologische Effekte über die Opioid-Rezeptoren vermitteln, die denen des Morphins, dem Hauptalkaloid des Opiums, ähneln. Neben den exogenen Opioiden gibt es auch endogene Opioide. Endogene Opioide sind Peptide, die vom Organismus aus größeren inaktiven Vorläufermolekülen gebildet und freigesetzt werden. Bei den endogenen Opioiden unterscheidet man zwischen Met- und Leu-Enkephalin, Dynorphin₁₋₁₇ und Dynorphin₁₋₈ sowie β -Endorphin. Dem endogenen Opioid-System, bestehend aus den Opioid-Rezeptoren, den endogenen Opioiden sowie den Enzymen, die zur Synthese und für den Abbau der endogenen Opioide verantwortlich sind, kommt eine physiologische Rolle u.a. bei der Schmerzwahrnehmung und der Befindlichkeit zu. Z.B. scheint die Aktivierung des endogenen Opioid-Systems eine Ursache für die geringere Schmerzempfindung und die gesteigerte Euphorie bei extremen körperlichen Belastungen (z.B. Extremsport) zu sein. Es gibt zahlreiche Arbeiten, die darauf hinweisen, dass das endogene Opioid- und das Endocannabinoid-System, obwohl es sich prinzipiell um zwei eigenständige Systeme handelt, sich in ihren Wirkungen gegenseitig beeinflussen können, wobei sowohl verstärkende wie auch abschwächende Effekte vorkommen (Manzanares et al., 1999). Am weitesten untersucht sind die Wechselwirkungen von Opioiden mit Cannabinoiden im Hinblick auf antinozizeptive Mechanismen und die Abhängigkeitsentwicklung. Einige

Effekte von Cannabinoiden wie von Opioiden sind an das Vorhandensein von Rezeptoren des jeweils anderen Systems gekoppelt. Z.B. konnte die antinozizeptive Wirkung, die durch intrathekal appliziertes Δ^9 -THC hervorgerufen wurde, durch eine Antisense-Oligodesoxynukleotid-Behandlung gegen den κ -Opioid-Rezeptor verhindert werden (Pugh et al., 1996). Ein weiteres Beispiel für eine Interaktion des Opioid-Systems mit dem Cannabinoid-System konnte an CB_1 -Rezeptor-KO-Mäusen gezeigt werden, bei denen die Gabe von Morphin nicht zu einer Selbstapplikation führte, wenn den CB_1 -Rezeptor-KO-Mäusen Morphin frei angeboten wurde (Cossu et al., 2001). Einen Nachweis für eine direkte Interaktion von Cannabinoid mit Opioid-Rezeptor-Liganden an μ - und δ -Opioid-Rezeptoren erbrachten Vaysse et al. (1987). Sie konnten zeigen, dass Δ^9 -THC und CBD in der Lage sind, auf eine nicht-kompetitive Art und Weise μ - und δ -Opioid-Rezeptor-Liganden vom jeweiligen Opioid-Rezeptor-Subtyp zu verdrängen, κ -Opioid-Rezeptor-Liganden hingegen nicht. Die Entschlüsselung der Interaktionen zwischen Opioiden und Cannabinoiden hat bereits zur Aufklärung einiger pharmakologischer Effekte von Opioiden und Cannabinoiden geführt, die nicht alleine über das Opioid- oder das Cannabinoid-System erklärt werden konnten. Möglicherweise bietet sich in Zukunft die Möglichkeit, durch eine gezielte gegenseitige Beeinflussung des einen durch das andere System Fortschritte in der medikamentösen Therapie, z.B. bei der Behandlung von Schmerzen und der Opioid-Abhängigkeit, zu erzielen.

2 Ziele der Studie

2.1 Methodische Experimente

In dieser Studie sollte untersucht werden, ob sich die Präparation des zerebralen Kortex der Maus mit zwei unterschiedlichen Methoden auf das Ausmaß der WIN 55,212-2-stimulierten Guanosin-5'-[γ - ^{35}S]-thiotriphosphat- (^{35}S]-GTP γ S-)Bindung am CB₁-Rezeptor auswirkt. Bauer (2002) hatte für die [^{35}S]-GTP γ S-Bindung hinsichtlich des maximalen Effekts einen Vorteil für eine Membranpräparationsmethode gezeigt, bei der das Kortexgewebe vor der standardmäßig angewendeten Homogenisierung mittels eines Potter-Elvehjem Homogenisators zusätzlich vorher bei -80 °C schockgefroren und in einem Mörser verrieben wurde. Die Frage war, ob sich das Ergebnis der modifizierten Methode in dem Ausmaß bestätigen lässt und ob diese Methode für [^{35}S]-GTP γ S-Bindungs-Experimente am CB₁-Rezeptor standardmäßig etabliert werden kann.

Ferner sollte der Einfluss des Homogenisationsverfahrens auf die Ergebnisse von Bindungsstudien mit [^3H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor von transfizierten Zellen in Zellkultur untersucht werden. Zweites Ziel der Studie war deshalb, herauszufinden, ob zwei unterschiedliche Homogenisierungsschritte während der Membranpräparation des zerebralen Kortex der Maus (Ultra-Turrax *versus* Potter-Elvehjem Homogenisator) Einfluss auf die Bindungseigenschaften von [^3H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor haben. Der Hintergrund dieser Fragestellung war, dass bei der Homogenisierung von Zellen in Zellkultur der Ultra-Turrax im Vergleich zum Potter-Elvehjem Homogenisator eine größere Proteinausbeute erbrachte und die Möglichkeit zu bedenken war, dass sich das veränderte Homogenisationsverfahren auf Bindungseigenschaften auswirken könne.

2.2 Radioligand-Bindungs-Experimente

Ein weiteres Ziel dieser Studie war es, Bindungsaffinitäten zum freien CB₁-Rezeptor (K_i -Werte) für Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR durch Radioligand-Kompetitions-Experimente mit Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens zu bestimmen. Insbesondere sollten zwei unterschiedliche Methoden zur Ermittlung der Gleichgewichts-

Dissoziationskonstanten (K_D) sowie der maximalen Bindungsstellen (B_{max}) von [3H]-SR 141716A, nämlich Sättigungs-Bindungsstudien *versus* homologe Kompetitions-Experimente, miteinander verglichen werden.

Diese Studie hatte ferner das Ziel, SR 141716A und VCHSR hinsichtlich ihrer Eigenschaften am hippocampalen CB_1 -Rezeptor des Meerschweinchens zu untersuchen. Die wichtigsten Fragen waren, ob VCHSR in der [^{35}S]-GTP γ S-Bindung als neutraler Antagonist wirkt und ob VCHSR den invers agonistischen Effekt von SR 141716A, der sich in einer Hemmung der basalen [^{35}S]-GTP γ S-Bindung zeigt (Bauer, 2002), antagonisieren kann.

Diese Studie sollte außerdem klären, in welchem Umfang und auf welche Art und Weise Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR die Bindung des selektiven μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten [3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte beeinflussen. Da von Vaysse et al. (1987) ein nicht kompetitiver, wahrscheinlich allosterischer Mechanismus für die Hemmung der μ -Opioid-Rezeptor-Bindung durch Δ^9 -THC und CBD gefunden wurde, sollte mit dieser Studie, insbesondere durch die Verwendung von kinetischen Bindungs-Experimenten, der Nachweis erbracht werden, ob es sich tatsächlich um eine allosterische Interaktion handelt und wenn ja, welches Ausmaß die allosterische Interaktion erreicht.

2.3 Molekularbiologische Experimente

Die zwei folgenden Fragestellungen wurden an NG 108-15 und HEK 293 Zellen durchgeführt. NG 108-15 Zellen exprimieren CB_1 -Rezeptoren spontan (Di Toro et al., 1998), während HEK 293 Zellen dies nicht tun.

An NG 108-15 Zellen sollte untersucht werden, ob sich die Transkription der CB_1 -Rezeptor-DNA in die entsprechende messenger Ribonukleinsäure (mRNA) über einen Beobachtungszeitraum von 48 Stunden spontan ändert. Diese Experimente dienen als Vorversuch für eine Versuchsreihe mit dem Ziel, den Effekt einer short interfering Ribonukleinsäure (siRNA) gegen die mRNA des CB_1 -Rezeptors, nach transienter Transfektion von NG 108-15 Zellen, auf das Ausmaß der CB_1 -Rezeptor-Expression zu bestimmen. Die Quantifizierung des CB_1 -Rezeptor-Proteins vor und nach der siRNA

Transfektion erfolgte mit Western Blots und einem gegen den CB₁-Rezeptor gerichteten Antikörper.

Diese Studie hatte schließlich das Ziel, als Vorbereitung für Experimente mit CB₁-Rezeptoren, das Funktionieren einer Methode zur transienten Transfektion einer Rezeptor-copy-Desoxyribonukleinsäure (Rezeptor-cDNA) in HEK 293 Zellen mithilfe eines Radioligand-Bindungs-Experiments zu überprüfen. Außerdem wurde eine vereinfachte Membranpräparation mit den transfizierten Zellen durchgeführt, um die Anwendbarkeit der Präparation zur Gewinnung von Membranen für Radioligand-Bindungs-Experimente zu verifizieren. Als Paradigma diente der humane Serotonin-5-HT_{3A}-Rezeptor, der mithilfe des Radioliganden [³H]-GR 65630 (Kilpatrick et al., 1989) untersucht wurde.

3 Methoden und Material

3.1 Membranpräparationen

3.1.1 Hippocampus Meerschweinchen für [³⁵S]-GTPγS-Bindung

Ein bis zwei männliche Dunkin-Hartley Meerschweinchen wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden sofort die Hirne entnommen und in 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Tris 50 mM, EDTA 5 mM) gelegt. Die Hippocampi wurden sofort präpariert, in ein tariertes Becherglas überführt und ausgewogen. Nach dem Zusatz von 20 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 (Tris 50 mM, EDTA 5 mM, Saccharose 10,27 %) wurden die Hippocampi in einen 30 ml Potter-Zylinder überführt, mit 10 Hüben in einer Minute bei 1200 U/min auf Eis homogenisiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (+ 5 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 zum Nachspülen). Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurde das erhaltene P2-Pellet gewaschen. Dazu wurden 15 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 auf das Pellet gegeben und das Pellet wurde mithilfe eines Spatels resuspendiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 4 °C mit 39000 x g zentrifugiert und der Überstand wurde anschließend verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Zuletzt wurde das P2-Pellet in 10 ml Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 (Tris 50 mM, EGTA 1 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 100 mM) resuspendiert und mit 10 Hüben in einer Minute bei 1200 U/min auf Eis homogenisiert. Die Suspension wurde in 15 ml Greiner Röhrchen abgefüllt (Endvolumen ca. 1 ml Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 pro 20 mg Hippocampus) und bei -80 °C eingefroren. Eine 100 µl Probe wurde zur Proteinbestimmung bei -20 °C in einem 1 ml Eppendorf Gefäß aufbewahrt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe der Bradford-Proteinbestimmung (siehe Kapitel 3.5) erfolgte die Einstellung mit Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 auf 50-100 µg/ml Protein.

3.1.2 Zerebraler Kortex Maus für [³⁵S]-GTPγS-Bindung

Männliche NMRI-Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden sofort die Hirne entnommen und in 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 gelegt. Der zerebrale Kortex wurde sofort präpariert und die Kortexpräparationen wurden mithilfe eines Skalpell in eine linke und eine rechte Hälfte geteilt. Je eine Kortexhälfte wurde in ein tariertes Becherglas überführt und ausgewogen. Eine Kortexhälfte wurde in einem vorgekühlten Porzellanmörser bei -80 °C für 10 Minuten eingefroren, die andere Hälfte wurde mithilfe des Potter-Elvehjem Homogenisators in 20 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 auf Eis homogenisiert (siehe Kapitel 3.1.1). Die bei -80 °C gefrorene Kortexhälfte wurde mit einem Pistill vorsichtig zerstoßen und verrieben, mit 20 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 in den 30 ml Potterzylinder überführt und dann mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert (siehe Kapitel 3.1.1). Beide Kortexhälften wurden getrennt voneinander weiter, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, behandelt.

3.1.3 Zerebraler Kortex Maus für [³H]-SR 141716A-Bindung

Männliche NMRI-Mäuse wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden sofort die Hirne entnommen und in 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 gelegt. Der zerebrale Kortex wurde sofort präpariert und je zwei Kortizes wurden in ein tariertes Becherglas überführt, ausgewogen und mit 25 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 gefüllt. Der Inhalt je eines Becherglases wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und auf Eis dreimal drei Sekunden mit einem Ultra-Turrax homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 20 Minuten zentrifugiert. Nach Entfernung der Überstände wurden die erhaltenen P2-Pellets gewaschen. Dazu wurden 15 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 auf die Pellets gegeben und die Pellets wurden mit einem Spatel resuspendiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 4 °C mit 39000 x g zentrifugiert und die Überstände wurden verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt. Je zwei gewaschene P2-Pellets

wurden mit 10 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 versetzt und mit 10 Hüben in einer Minute und 1200 U/min mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Die Homogenate wurden vereinigt, zu 25 ml mit Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 ergänzt und dann in 15 ml Greiner Röhrchen zu je 8-9 ml bei -80 °C eingefroren. Eine 100 µl Probe wurde zur Bradford-Proteinbestimmung in einem 1 ml Eppendorf Gefäß bei -20 °C aufbewahrt.

3.1.4 Zerebraler Kortex Maus und Ratte für [³H]-SR 141716A- und [³H]-DAMGO-Bindung

Männliche NMRI-Mäuse bzw. männliche Wistar-Ratten wurden durch Dekapitation getötet. Anschließend wurden sofort die Hirne entnommen und in 4 °C kalten Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 gelegt. Der zerebrale Kortex wurde sofort präpariert und je zwei Kortizes wurden in ein tariertes Becherglas überführt, ausgewogen und mit 25 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 gefüllt. Die Kortex-Präparationen wurden zusammen mit dem Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 in einen 30 ml Potter-Zylinder überführt, mit 10 Hüben in einer Minute bei 1200 U/min auf Eis homogenisiert und in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt (+ 5 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 zum Nachspülen). Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde jeweils in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 20 Minuten (Maus) bzw. 21000 x g für 25 Minuten (Ratte) zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstands wurden die erhaltenen P2-Pellets gewaschen. Dazu wurden 15 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Kortex der Maus) bzw. 15 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Tris 50 mM, Kortex der Ratte) auf die Pellets gegeben und die Pellets wurden mit einem Spatel resuspendiert. Anschließend wurde erneut für 10 Minuten bei 4 °C und 39000 x g (Kortex der Maus) bzw. 21000 x g (Kortex der Ratte) zentrifugiert und die Überstände anschließend verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt.

Je zwei gewaschene P2-Pellets wurden zu 10 ml mit Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Kortex der Maus) und 20 ml Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Kortex der Ratte) versetzt und erneut mit 10 Hüben in einer Minute bei 1200 U/min mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert. Die Homogenate

wurden vereinigt, zu 25 ml mit Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Kortex der Maus) bzw. zu 50 ml mit Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Kortex der Ratte) ergänzt und dann in 15 ml Greiner Röhrchen zu je 8-10 ml bei -80 °C eingefroren. Eine 100 µl Probe wurde zur Proteinbestimmung in einem 1 ml Eppendorf Gefäß bei -20 °C aufbewahrt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit der Bradford-Proteinbestimmung erfolgte ggf. die Einstellung der Proteinkonzentration mit Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (Kortex der Maus) bzw. Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Kortex der Ratte) auf ca. 0,5-1 mg/ml Protein.

3.1.5 HEK 293 Zellen für [³H]-GR 65630-Bindung

Das Kulturmedium von drei großen (175 cm²) konfluenten Kulturflaschen wurde vorsichtig abgegossen. Es folgte ein Waschschriff der adhärennten Zellen durch vorsichtiges Schwenken mit 5 ml phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS-Puffer) pH 7,4 (NaCl 136 mM, KCl 2 mM, Mg₂HPO₄·2H₂O 8,1 mM, K₂HPO₄ 1,5 mM). Die Zellen wurden mithilfe eines Gummischabers in 5 ml PBS pH 7,4 resuspendiert und mit einer Glaspipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Jede Kulturflasche wurde anschließend mit 5 ml PBS versetzt und kräftig geschwenkt, um die restlichen Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Die Zellsuspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen zu 30 ml Endvolumen gepoolt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 resuspendiert und mit dem Ultra-Turrax dreimal drei Sekunden auf Eis homogenisiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 30 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde anschließend gewaschen. Dazu wurden 15 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 auf das Pellet gegeben, und das Pellet wurde mithilfe eines Spatels resuspendiert. Anschließend wurde erneut in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschriff wurde einmal wiederholt. Zuletzt wurde das Pellet in 6 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 mithilfe einer Pipette resuspendiert und die Suspension wurde in ein 15 ml Greiner Röhrchen gefüllt. Bis zum Bindungs-Experiment wurde das Membranhomogenat bei

-80 °C eingefroren. Eine 100 µl Probe wurde zur Bradford-Proteinbestimmung bei -20 °C in einem 1 ml Eppendorf Gefäß aufbewahrt.

3.1.6 NG 108-15 Zellen für Western Blot

Das Kulturmedium von drei großen (175 cm²) konfluenten Kulturflaschen wurde abgegossen. Es folgte ein Waschschrift der adhärennten Zellen durch vorsichtiges Schwenken mit 5 ml PBS-Puffer pH 7,4. Die Zellen wurden mithilfe eines Gummischabers in 5 ml PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und mit einer Pipette in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Jede Kulturflasche wurde anschließend mit 5 ml PBS-Puffer pH 7,4 versetzt und kräftig geschwenkt, um die restlichen Zellen vom Flaschenboden abzulösen. Die Zellsuspensionen wurden in einem Zentrifugenröhrchen zu 30 ml Endvolumen gepoolt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde in 20 ml Tris-HCl-EDTA-Saccharose-Puffer pH 7,5 mithilfe eines Spatels resuspendiert. Die Suspension wurde mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator mit 1200 U/min und 10 Hüben eine Minute lang auf Eis homogenisiert. Das Homogenat wurde bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten in der Beckman Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C und mit 39000 x g für 20 Minuten zentrifugiert.

Nach Entfernung des Überstands wurde das erhaltene P2-Pellet gewaschen. Dazu wurden 15 ml des Tris-HCl-EDTA-Puffers pH 7,5 auf das P2-Pellet gegeben, und das Pellet wurde mithilfe eines Spatels resuspendiert. Anschließend wurde in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 39000 x g für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt.

Das erhaltene Pellet wurde mithilfe eine Pipette in einem Volumen < 1 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 in einem 2 ml Eppendorf Gefäß resuspendiert und bei -80 °C eingefroren. Eine 30 µl Probe wurde zur Bradford-Proteinbestimmung bei -20 °C in einem 1 ml Eppendorf Gefäß aufbewahrt. Nach der Proteinbestimmung erfolgte die Einstellung der Proteinkonzentration auf ca. 5 µg/µl Protein mit Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5.

3.2 Radioligand-Bindungs-Experimente

Allgemeine Prinzipien

Liganden sind chemische Verbindungen, die an bestimmte Zielstrukturen, in den meisten Fällen handelt es sich dabei um Proteine, die z.B. Rezeptoren oder Enzyme darstellen können, auf Grund von chemischen und/oder physikalischen Wechselwirkungen auf eine spezifische Art und Weise binden. Im Folgenden werden nur Rezeptor-Liganden näher betrachtet. Die Spezifität der Wechselwirkung zwischen einem Liganden und einem Rezeptor liegt in der chemischen Struktur sowohl des Liganden wie auch der Bindungsstelle am Rezeptor-Protein begründet (*Schlüssel-Schloss-Prinzip*). Liganden können aufgrund der Effekte, die sie nach ihrer Bindung an dem Rezeptor hervorrufen, klassifiziert werden. **Agonisten** sind Liganden, die eine Affinität für einen Rezeptor haben und gleichzeitig eine intrinsische Aktivität aufweisen, d.h., sie können den Rezeptor in seinen aktivierten Zustand versetzen. **Antagonisten** sind Liganden, die zwar ebenfalls eine Affinität für den Rezeptor aufweisen, jedoch keine intrinsische Aktivität besitzen. Nach Bindung eines Antagonisten an den Rezeptor bleibt das Rezeptor-Protein in seinem inaktiven Zustand. Ob ein Rezeptor in seinem aktiven oder inaktiven Zustand vorliegt, hängt von seiner Raumstruktur ab, die durch die dreidimensionale Anordnung der Peptidketten bestimmt wird. Agonisten können die Raumstruktur eines Rezeptors dahingehend verändern, dass nachgeschaltete intrazelluläre Effekte in Gang gebracht werden, Antagonisten vermögen dieses nicht. Durch die Besetzung der Agonist-Bindungsstelle am Rezeptor-Protein mit einem Antagonisten kann jedoch die Aktivierung des Rezeptor-Proteins durch einen Agonisten verhindert werden. Neben reinen Agonisten und Antagonisten gibt es auch Liganden, die zwar eine intrinsische Aktivität haben, die aber wiederum nicht das Ausmaß der eines reinen Agonisten erreicht. In diesem Fall handelt es sich um einen **Partialagonisten**. Ein besonderer Fall liegt vor, wenn ein Ligand in Abwesenheit eines weiteren Liganden Effekte an einem Rezeptor hervorruft, die den umgekehrten Effekten entsprechen, die ein Agonist an diesem Rezeptor auslösen würde. Diese Eigenschaft eines Liganden findet in der Bezeichnung **inverser Agonist** Ausdruck.

Das Grundprinzip von Radioligand-Bindungs-Experimenten besteht darin, dass ein Ligand, der idealerweise eine hohe Selektivität für einen Rezeptor-Subtyp besitzt, chemisch stabil und gut wasserlöslich ist, mit einem spontan zerfallenden Isotop - z.B. wie in dieser Arbeit [^3H] oder [^{35}S] - markiert wird, um das Ausmaß und den Zeitverlauf der Bindung dieses Liganden an einer Rezeptor-Population mit einem sensiblen Messsystem beobachten zu können. Der größte Vorteil der Verwendung von Radioliganden, abgesehen von der sehr empfindlichen Detektierbarkeit der Radioaktivität, besteht darin, dass die physikochemischen Eigenschaften eines Liganden durch Austausch eines [^1H]- gegen [^3H]- bzw. eines [^{32}S]- gegen [^{35}S]-Isotops nur unwesentlich verändert werden. Die Radioliganden verhalten sich demnach in pharmakologischen Experimenten in Bezug auf ihre Rezeptor-Interaktion wie die entsprechenden unmarkierten Liganden, und zwar sowohl in in-vivo wie auch in in-vitro Modellen.

Die Bindung von Liganden an Rezeptoren kann reversibel oder irreversibel sein. Nur im Fall einer reversiblen Bindung, wenn also gleichzeitig Assoziations- und Dissoziationsvorgänge stattfinden können, kommt es bei einer vorgegebenen Konzentration eines Liganden in der Rezeptor-Phase zur Einstellung eines Bindungsgleichgewichts. Ein Bindungsgleichgewicht liegt vor, wenn pro Zeiteinheit gleich viele Moleküle eines Liganden vom Rezeptor abdissoziieren wie sich an den Rezeptor anlagern, also die Geschwindigkeit der Dissoziation gleich der Geschwindigkeit der Assoziation ist. Formal lässt sich das Bindungsgleichgewicht eines Liganden an einem Rezeptor wie folgt beschreiben:



[R]: Rezeptor-Konzentration

[L]: Ligandkonzentration

[RL]: Konzentration des Rezeptor-Ligand-Komplexes

k_{on} : Geschwindigkeitskonstante der Assoziation

k_{off} : Geschwindigkeitskonstante der Dissoziation

Befindet sich die Gleichung (1) im Gleichgewicht, so gilt nach dem Massenwirkungsgesetz:

$$k_{on} \cdot [R] \cdot [L] = k_{off} \cdot [RL] \quad \text{Gleichung (2)}$$

k_{on} und k_{off} können unter der Gleichgewichts-Bedingung zu neuen Konstanten zusammengefasst werden, und zwar zu:

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} = \frac{[R] \cdot [L]}{[RL]} \quad \text{Gleichung (3)}$$

$$K_A = \frac{k_{on}}{k_{off}} = \frac{[RL]}{[R] \cdot [L]} \quad \text{Gleichung (4)}$$

K_D : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante

K_A : Gleichgewichts-Assoziationskonstante

Die Konstanten K_D und der Kehrwert von K_D , nämlich K_A , beschreiben die Lage eines Bindungsgleichgewichts. Ein großer K_D -Wert liegt z.B. vor, wenn ein großer Teil eines Liganden in seiner freien, nicht rezeptorgebundenen Form vorliegt, der Ligand also eine geringe Affinität zu dem Rezeptor besitzt. Die Gleichung (3) vereinfacht sich, wenn der Ligand in einer Konzentration vorliegt, die unter Gleichgewichts-Bedingungen zu einer Besetzung von genau 50 % der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen an den Rezeptoren führt. Für diesen Fall gilt $[RL] = [L]$ und daraus folgt:

$$K_D = [L]_{50} \quad \text{Gleichung (5)}$$

$[L]_{50}$: Konzentration eines Liganden, die genau 50 % der maximalen spezifischen Bindungsstellen besetzt

Die Stoffmenge des Liganden ist ebenso wie die Anzahl der Rezeptoren eine endliche Größe. Für die maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{max} gilt:

$$B_{max} = [R] + [RL] \quad \text{Gleichung (6)}$$

B_{max} : maximale Anzahl der spezifischen Bindungsstellen

3.2.1 Sättigungs-Bindungs-Experimente

Allgemeine Prinzipien und Auswertung

In der vorliegenden Arbeit wurden Sättigungs-Bindungs-Experimente mit Radioliganden durchgeführt, um die maximale Anzahl der Bindungsstellen B_{\max} einer Rezeptor-Population in einem Proteinhomogenat sowie die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D eines Radioliganden an einem Rezeptor-Subtyp zu ermitteln. Bei den Sättigungs-Bindungs-Experimenten wurden aufsteigende Konzentrationen eines Radioliganden zu einem Proteinhomogenat pipettiert, und nach erfolgter Gleichgewichts-Einstellung der Radioligand-Bindung am Rezeptor bei konstanter Umgebungstemperatur wurde die rezeptorgebundene Gesamtradioaktivität nach Filtration auf Glasfaserfilter durch Flüssigkeitsszintillationszählung ermittelt. Da der Radioligand neben der spezifischen Rezeptor-Bindung auch eine unspezifische Bindung, u.a. an den Gefäßwänden der Reaktionsröhrchen, an den Pipettenspitzen, an den inneren Oberflächen des Inotech Cell-Harvesters, an den Filtern und an anderen Proteinen in dem Reaktionsansatz aufweist, wurde die unspezifische Bindung im Reaktionsansatz durch Zusatz einer hohen Konzentration eines unmarkierten Rezeptor-Liganden, der eine Bindungsaffinität für den gleichen Rezeptor-Subtyp wie der Radioligand aufweist, ermittelt. Die Konzentration des unmarkierten Liganden wurde dabei so hoch gewählt (ca. $1000 \times K_i$), dass mit Sicherheit eine Sättigung aller spezifischen Bindungsstellen am fraglichen Rezeptor erzielt wurde und damit die unspezifisch gebundene Radioaktivität bestimmt werden konnte. Durch die Bildung der Differenz aus der totalen Bindung und der unspezifischen Bindung konnte auf die spezifische rezeptorgebundene Radioligandmenge geschlossen werden:

$$B_{spez} = B_{tot} - B_{unspez} \quad \text{Gleichung (7)}$$

B_{spez} :	spezifische rezeptorgebundene Radioaktivität
B_{tot} :	gesamtgebundene Radioaktivitätsmenge
B_{unspez} :	unspezifisch gebundene Radioaktivitätsmenge

Die Gleichgewichts-Bindung eines Liganden an einem Rezeptor, wie sie bei den Sättigungs-Bindungs-Experimenten der vorliegenden Arbeit ermittelt wurde, lässt sich mit der folgenden Gleichung beschreiben:

$$[RL] = \frac{B_{\max} \cdot [L]}{[L] + K_D} \quad \text{Gleichung (8)}$$

Die spezifische rezeptorgebundene Radioaktivität [RL] wurde als Radioaktivität pro mg Protein gegen die Konzentration des zugesetzten Radioliganden [L] aufgetragen. Lag eine spezifische Bindung an einem Rezeptor vor, so wurde eine hyperbolische Sättigungs-Bindungsisotherme erhalten, die sich mit zunehmender Radioligand-Konzentration einem maximalen Plateau annäherte, das der maximalen Bindung B_{\max} entspricht. Die Konzentration des Radioliganden, die genau zu einer 50 %igen Besetzung der maximalen Bindungsstellen führte, entspricht dem K_D -Wert des Radioliganden an dem Rezeptor-Subtyp. Die Gleichung (8) wurde zur computergestützten nicht-linearen Regression sowie zur Ermittlung der K_D - und B_{\max} -Werte mithilfe der Software GraphPad Prism[®] zur Auswertung der Sättigungs-Bindungs-Experimente herangezogen. Alternativ können K_D und B_{\max} auch nach Transformation der Gleichung (8) in eine linearisierte Form mithilfe der Rosenthal- (Rosenthal, 1967) oder Scatchard-Analyse (Scatchard, 1949) ermittelt werden. Die linearisierte Gleichung der Rosenthal- oder Scatchard-Analyse lautet:

$$\frac{[RL]}{[L]} = \frac{-[RL]}{K_D} + \frac{B_{\max}}{K_D} \quad \text{Gleichung (9)}$$

Im Gegensatz zur Scatchard- wird bei der Rosenthal-Analyse das Molekulargewicht und die Konzentration des Rezeptors nicht vorausgesetzt (Bylund und Yamamura, 1990). Aus diesem Grund wird die Transformation, wie sie in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, korrekterweise als Rosenthal-Analyse bezeichnet. Die Rosenthal-Analyse wurde in Ergänzung zur Erstellung der Sättigungs-Bindungsisothermen, zum Zweck der Plausibilitätsprüfung der Ergebnisse, durchgeführt. Im Falle des Vorliegens einer einheitlichen Rezeptor-Population ergibt der Rosenthal-Plot eine

Gerade. Die Steigung der Gerade entspricht dem negativen Reziprokwert des K_D -Wertes und der Schnittpunkt mit der x-Achse dem B_{max} -Wert. Zur Ermittlung von K_D und B_{max} ist die nicht-lineare Regression gegenüber der Transformation in eine linearisierte Form vorzuziehen, da sie genauere Ergebnisse liefert (Motulsky und Christopoulos, 2003).

3.2.1.1 [^3H]-SR 141716A, zerebraler Kortex, Meerschweinchen

Der Radioligand [^3H]-SR 141716A (spezifische Aktivität 44 Ci/mmol) wurde in acht aufsteigenden Konzentration eingesetzt (Endkonzentrationen 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2; 4 und 8 nM). Die Reaktionsansätze von je 500 μl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder Ansatz enthielt (Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 μl Reaktionsansatz):

- 50 μl [^3H]-SR 141716A in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5,
- 50 μl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (totale Bindung) **oder** 50 μl CP 55,940 (3 μM) in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (unspezifische Bindung),
- 300 μl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 und
- 100 μl Proteinhomogenat in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (entsprechend 49 bis 62 μg Protein im 500 μl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf unbehandelte Whatman GF/C-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten vier Waschschrte mit je 2 ml Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5. Die zu den Proben gehörigen Filter wurden mit einer Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt, mit 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Lumagel-Safe[®]) bedeckt und mit Schraubdeckeln verschlossen. Nach mindestens 12 Stunden auf dem Rüttler wurde die Radioaktivität der Proben durch Flüssigkeitsszintillationszählung (Beckman LS 6000TA) gemessen.

3.2.1.2 [³H]-DAMGO, zerebraler Kortex, Ratte

Der Radioligand [³H]-DAMGO (spezifische Aktivität 51 Ci/mmol) wurde in sechs aufsteigenden Konzentrationen eingesetzt (Endkonzentrationen 0,1; 0,5; 1; 3; 5; und 10 nM). Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder Ansatz enthielt (Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 µl Reaktionsansatz):

- 50 µl [³H]-DAMGO in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 50 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (totale Bindung) *oder* 50 µl Naloxon (10 µM, unspezifische Bindung),
- 50 µl Aminoethylphenylsulfonylfluorid (AEBSF, 0,1 mM) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 250 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und
- 100 µl Proteinhomogenat in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (entsprechend 85 µg Protein im 500 µl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten bei 25 °C auf dem vorgeheizten Wasserbad startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf GF/C-Filter (vorbehandelt mit 0,3 % Polyethylenimin (PEI)) mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschriffe mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.2 Kompetitions-Experimente

Allgemeine Prinzipien und Auswertung

Bei den Kompetitions-Experimenten wurde ein Radioligand in einer fixen Konzentration eingesetzt und mit aufsteigenden Konzentrationen eines unmarkierten Liganden von seinen spezifischen Bindungsstellen verdrängt. Der unmarkierte Ligand, auch Kompetitor, Inhibitor oder Displacer genannt, kann mit dem Radioliganden entweder um die gleiche Bindungsstelle am Rezeptor-Protein konkurrieren, dann handelt es sich um eine **orthosterische Interaktion** bzw. **kompetitive Hemmung**, oder er kann an eine andere Bindungsstelle am Rezeptor-Protein binden und durch eine Änderung der Raumstruktur des Rezeptor-Proteins eine Veränderung des Bindungsgleichgewichts des Radioliganden herbeiführen, was als **allosterische Interaktion** bzw. **nicht-kompetitive Hemmung** bezeichnet wird. Der Begriff orthosterische Interaktion bezeichnet die Wechselwirkung von einem Rezeptor-Protein mit mindestens zwei Rezeptor-Liganden, die ausschließlich eine Bindungsaffinität für ein und dieselbe Bindungsstelle am Rezeptor besitzen. Bei orthosterischen Kompetitions-Experimenten kann entweder die bei einer fixen Konzentration rezeptorgebundene Menge eines Radioliganden mit steigenden Konzentrationen seiner analogen unmarkierten Verbindung verdrängt werden (**homologe Competition**), oder es wird ein Kompetitor mit andersartiger chemischer Struktur als der des Radioliganden, aber mit Bindungsaffinität zur gleichen Bindungsstelle, verwendet (**heterologe Competition**).

Die Lage der Gleichgewichts-Bindung von zwei Rezeptor-Liganden (z.B. einem Radioliganden und einem heterologen oder homologen Kompetitor) mit unterschiedlicher Bindungsaffinität zur orthosterischen Bindungsstelle an einem Rezeptor wird durch die Hill-Gleichung beschrieben:

$$B_{tot} = B_{unspez} + \frac{Max - Min}{1 + \left(\frac{IC_{50}}{[I]} \right)^{n_H}} \quad \text{Gleichung (10)}$$

B_{tot} :	Gesamtbindung des Radioliganden
B_{unspez} :	unspezifisch gebundene Radioaktivitätsmenge
Max:	Radioligandbindung in Abwesenheit des Inhibitors (oberes Kurvenplateau)
Min:	Radioligandbindung in Anwesenheit hoher Konzentrationen des Inhibitors (unteres Kurvenplateau)
IC_{50} :	die Konzentration des Inhibitors, die zu einer Abnahme von 50 % der spezifisch gebundenen Radioligandmenge vom Rezeptor führt
[I]:	Konzentration des Inhibitors
n_H :	Hill-Koeffizient (Maß für die Steilheit der sigmoiden Kurve; sollte sich bei orthosterischen Kompetitions-Experimenten nicht signifikant von -1 unterscheiden)

Sowohl bei den heterologen wie auch bei den homologen Kompetitions-Experimenten wurde die spezifisch gebundene Radioligandmenge gegen den Logarithmus der Kompetitorkonzentration in ein Diagramm aufgetragen. Die computergestützte nicht-lineare Regression, die einen sigmoiden Kurvenverlauf ergab, wurde unter Verwendung der Gleichung (10) mit der Software GraphPad Prism[®] durchgeführt. Liegt eine kompetitive Hemmung vor, so ergibt sich bei Anwendung der Gleichung (10) ein Hill-Koeffizient von -1. Ein signifikant von -1 unterschiedlicher Hill-Koeffizient deutet auf eine nicht-kompetitive Interaktion oder z.B. auf das Vorhandensein unterschiedlicher Rezeptor-Konformere hin, die unterschiedliche Affinitäten der Liganden am Rezeptor zur Folge haben. Zur Überprüfung, ob es sich im Einzelfall um eine kompetitive oder nicht-kompetitive Hemmung handelt, wurden für jedes Experiment die Genauigkeiten von zwei Kurvenanpassungen, die jeweils mit der Hill-Gleichung, aber einmal mit einem konstanten Hill-Koeffizienten von -1 und einmal mit einem variablen Hill-Koeffizienten erhalten wurden, miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.6). Die

Bindungsaffinität (K_i -Wert) eines heterologen Kompetitors zum Rezeptor wurde mithilfe der Gleichung nach Cheng und Prusoff (1973) bestimmt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[L^*]}{K_D}} \quad \text{Gleichung (11)}$$

K_i : Verdrängungskonstante

$[L^*]$: Konzentration des Radioliganden

Da bei den homologen Kompetitions-Experimenten der Radioligand und die homologe unmarkierte Verbindung mit gleicher Bindungsaffinität um die gleiche Bindungsstelle des Rezeptors konkurrieren, gilt $K_i = K_D$. Durch Einsetzen von $K_i = K_D$ in Gleichung (11) und Umformung erhält man folgende Gleichung:

$$K_D = IC_{50} - [L^*] \quad \text{Gleichung (12)}$$

Gleichung (12) wurde zur Berechnung der K_D -Werte bei der Auswertung der homologen Kompetitions-Experimente verwendet. Die Anzahl der maximalen Bindungsstellen B_{\max} wurde bei den homologen Kompetitions-Experimenten mit der Gleichung von De Blasi (1989) bestimmt:

$$B_{\max} = \frac{B_0 \cdot IC_{50}}{[L^*]} \quad \text{Gleichung (13)}$$

B_{\max} : Anzahl der Bindungsstellen

B_0 : spezifische Bindung des Radioliganden in Abwesenheit des Kompetitors

3.2.2.1 [^3H]-SR 141716A, zerebraler Kortex, Maus, Meerschweinchen

Die Reaktionsansätze von je 500 μl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder

Ansatz enthielt (Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 µl Reaktionsansatz):

- 50 µl einer von 10 aufsteigenden Konzentrationen (1×10^{-10} bis 3×10^{-6} M) SR 141716A in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 *oder* 50 µl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (totale Bindung) *oder* 50 µl CP 55,940 (3 µM, unspezifische Bindung) in Tris-HCl-EDTA-Puffer,
- 50 µl [^3H]-SR 141716A (0,5 nM; spezifische Aktivität 44 Ci/mmol) in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5,
- 300 µl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 und
- 100 µl Proteinhomogenat in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (entsprechend 40 bis 70 µg Protein im 500 µl Reaktionsansatz).

Der gesamte Reaktionsansatz beim Meerschweinchen enthielt zusätzlich 0,5 % Rinderserumalbumin (BSA).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf unbehandelte Whatman GF/C-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten vier Waschschriffe mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.2.2 [^3H]-GR 65630, HEK 293 Zellen

Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder Ansatz enthielt (Konzentrationen sind Endkonzentrationen im 500 µl Reaktionsansatz):

- 50 µl einer von 14 aufsteigenden Konzentrationen MDL 72222 (1×10^{-11} bis 3×10^{-5} M) in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 *oder* 50 µl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (totale Bindung) *oder* MDL 72222 (100 µM, unspezifische Bindung),
- 50 µl [^3H]-GR 65630 (1 nM, spezifische Aktivität 77,2 Ci/mmol) in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5,

- 300 µl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 und
- 100 µl Proteinhomogenat in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 (entsprechend 180 µg Protein im 500 µl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten bei Raumtemperatur startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm® abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf unbehandelte Whatman GF/B-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschriffe mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben

3.2.3 Allosterische Modulation

Allgemeine Prinzipien

Im Gegensatz zum Kompetitor bei einer orthosterischen Kompetition beeinflusst ein allosterischer Modulator das Bindungsgleichgewicht eines orthosterischen Liganden durch Bindung an eine räumlich getrennte, sog. allosterische Bindungsstelle. Das Prinzip der allosterischen Modulation findet sich u.a. bei zahlreichen Enzymen, deren Aktivität durch Anlagerung allosterischer Modulatoren, z.B. zweiwertiger Kationen, beeinflusst werden kann, ohne dass es zu einer chemischen Modifikation des Enzymmoleküls kommt. Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren weisen eine allosterische Modulation auf, da es durch Bindung eines Agonisten an die orthosterische Bindungsstelle des jeweiligen Rezeptors zu einer Änderung der Raumstruktur des Rezeptor-Proteins kommt, die das G-Protein, das an eine andere Position am Rezeptor bindet, in die Lage versetzt, GTP im Austausch gegen GDP zu binden und in die Untereinheiten zu zerfallen. Der allosterische Modulator kann das Bindungsgleichgewicht des orthosterischen Liganden auf zweierlei Arten beeinflussen. Zum einen kann der allosterische Modulator die Assoziation bzw. die Dissoziation eines orthosterischen Liganden an bzw. von der Bindungsstelle durch sterische Hinderung beeinträchtigen. Dieses ist besonders dann wahrscheinlich, wenn die

allosterische Bindungsstelle in unmittelbarer räumlicher Nachbarschaft zur orthosterischen Bindungsstelle lokalisiert ist und es sich beim allosterischen Modulator um ein großes Molekül handelt. Zum anderen kann der allosterische Modulator durch Bindung an eine allosterische Bindungsstelle eine Änderung der Raumstruktur des Rezeptors herbeiführen, die die orthosterische Bindungsstelle dahingehend modifiziert, dass sich die Assoziations- und/oder die Dissoziationskinetik eines orthosterischen Liganden verändert. Ist ein Rezeptor-Ligand in der Lage, konzentrationsabhängig die Dissoziationsgeschwindigkeit eines orthosterischen Liganden von der orthosterischen Bindungsstelle zu verändern, so handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um einen allosterischen nicht-kompetitiven Effekt, der im Fall einer beschleunigten Dissoziationskinetik durch eine Änderung der Raumstruktur des Rezeptors bedingt ist (Christopoulos und Kenakin, 2002).

3.2.3.1 Assoziationskinetik

Allgemeine Prinzipien und Auswertung

Die Assoziationskinetik von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor wurde in dieser Studie ermittelt, um zum einen die Ergebnisse aus den Dissoziations-Experimenten überprüfen zu können, und zum anderen, um die Inkubationszeit zu bestimmen, die notwendig ist, damit die [³H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor den Gleichgewichtszustand erreicht. Zur Bestimmung der Assoziationskinetik wurde eine fixe Konzentration von [³H]-DAMGO zum Zeitpunkt Null Minuten der Ansatzlösung, die das Proteinhomogenat enthielt, zugesetzt, und die gesamtgebundene Radioaktivitätsmenge (spezifisch + unspezifisch gebundener Anteil) wurde nach verschiedenen Zeitpunkten ermittelt. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurde jeweils ein paralleler Versuchsansatz durchgeführt, der zusätzlich 10 μ M des Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon enthielt. [³H]-DAMGO unterliegt am μ -Opioid-Rezeptor Assoziations- und Dissoziationsvorgängen, wobei zu Beginn des Experiments die Assoziationsvorgänge zahlenmäßig überwiegen. Die Assoziations- und Dissoziationsvorgänge erreichen mit der Zeit ein dynamisches

Gleichgewicht, d.h. die Assoziations- und die Dissoziations-Geschwindigkeit weisen dann gleiche Werte auf und die rezeptorgebundene Radioligandmenge bleibt nach außen hin betrachtet unverändert. Der Assoziationsvorgang ist eine Reaktion erster Ordnung und die Experimente wurden durch eine computergestützte nicht-lineare Regression mit der Funktion des einphasigen monoexponentiellen Wachstums mithilfe der Software GraphPad Prism[®] analysiert. Die angewendete Gleichung lautet:

$$\frac{d[LR]}{dt} = k_{\text{appon}} \cdot [LR] \quad \text{Gleichung (14)}$$

k_{appon} : scheinbare Assoziations-Geschwindigkeitskonstante des Radioliganden

t: Zeit

Zur Auswertung der Assoziations-Experimente wurde die gesamtgebundene Radioaktivitätsmenge um den unspezifisch gebundenen Anteil reduziert und anschließend gegen die Zeit in ein Diagramm aufgetragen. Die scheinbare Halbwertszeit der Assoziation $t_{\text{app}1/2\text{on}}$ - das ist die Zeit, bei der genau die Hälfte der bei der gegebenen Radioligandkonzentration im Bindungsgleichgewicht maximal besetzten Bindungsstellen mit dem Radioliganden besetzt ist - wurde aus der nicht-linearen Regression ermittelt. Die scheinbare Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{appon} wurde durch Einsetzen von $t_{\text{app}1/2\text{on}}$ in die Gleichung (17) in Analogie zur Berechnung von k_{off} bestimmt. Mithilfe der Gleichung (15) wurde die wirkliche Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{on} von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor aus der scheinbaren Assoziations-Geschwindigkeitskonstante und der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante berechnet:

$$k_{\text{on}} = \frac{k_{\text{appon}} - k_{\text{off}}}{[L^*]} \quad \text{Gleichung (15)}$$

k_{off} : Geschwindigkeits-Dissoziationskonstante des Radioliganden

3.2.3.1.1 [³H]-DAMGO, Assoziationskinetik, zerebraler Kortex, Ratte

Die in den Experimenten verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen (die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen):

I) Ansatzlösung

- 3000 µl Membranhomogenat (ca. 0,2 mg/ml Protein) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 9000 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und
- 1500 µl AEBSF (0,1 mM) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4.

Das Gesamtvolumen der Ansatzlösung betrug 13500 µl. Die Ansatzlösung wurde in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert, mit einem Deckel verschlossen, auf das vorgeheizte Wasserbad (25 °C) gestellt und so lange mit einem Magnetrührer gerührt, bis die Temperatur der Lösung 25 °C betrug.

II) Reaktionslösung

Das Assoziations-Experiment wurde durch die Zugabe von 1500 µl [³H]-DAMGO (0,5 nM; spezifische Aktivität 51 Ci/mmol) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 zur Ansatzlösung zum Zeitpunkt Null Minuten gestartet. Das Volumen der Reaktionslösung nach Zugabe von [³H]-DAMGO betrug 15000 µl. Nach 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90 und 120 Minuten wurden jeweils zweimal 500 µl der Reaktionslösung in 2 ml Reaktionsröhrchen ohne Deckel pipettiert und durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf Whatman GF/C-Filterstreifen (vorbehandelt mit 0,3 % PEI) mit 400 mbar Restdruck gesogen. Im Anschluss wurden die Filter zweimal mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gespült. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.3.2 Dissoziationskinetik

Allgemeine Prinzipien und Auswertung

Bei der Dissoziation handelt es sich - ebenso wie bei der Assoziation - um eine Reaktion 1. Ordnung. Die Gleichung, die den Dissoziationsvorgang beschreibt, lautet demnach:

$$-\frac{d[LR]}{dt} = k_{off} \cdot [LR] \quad \text{Gleichung (16)}$$

Um die Dissoziationskinetik von [³H]-DAMGO isoliert von parallel ablaufenden Assoziationsvorgängen untersuchen zu können, wurden die Experimente so durchgeführt, dass in einer ersten Phase des Experiments die Assoziation von [³H]-DAMGO bis zur Gleichgewichtseinstellung stattfand und in einer zweiten Phase ein großer Überschuss des Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon (> 1000 x K_i) zugesetzt wurde, um die Messung des Dissoziationsvorgangs einzuleiten; damit wurde eine erneute Assoziation von [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor verhindert. Zunächst wurde in Kontroll-Experimenten die Dissoziation von [³H]-DAMGO vom μ-Opioid-Rezeptor mit Naloxon in Abwesenheit weiterer Rezeptor-Liganden ermittelt. Im Anschluss wurden die Experimente in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Cannabinoide während der Dissoziationsphase wiederholt.

Zur Auswertung wurde die gebundene Radioaktivität in Prozent des Ausgangswerts zum Zeitpunkt Null Minuten des Dissoziations-Experiments gegen die Zeit aufgetragen und durch computergestützte nicht-lineare Regression mit der Funktion des mono- oder biphasischen monoexponentiellen Zerfalls mithilfe der Software GraphPad Prism[®] analysiert. Die unspezifische Bindung wurde als der Wert definiert, der dem unteren Plateau der nicht-linearen Kurvenanpassung aus den Kontroll-Experimenten entspricht. Die Halbwertszeiten der Dissoziation t_{1/2off} aller Dissoziations-Experimente wurden aus der nicht-linearen Regression, die mit der monophasischen oder der biphasischen monoexponentiellen Funktion erhalten wurde, zeichnerisch ermittelt (siehe Abb. 20). Dazu wurde die Halbwertszeit der Dissoziation als der Zeitpunkt definiert, bei der genau 50 % der zu Beginn des Dissoziations-Experiments spezifisch gebundenen

Radioaktivität vom Rezeptor abdissoziiert sind. Im Fall der nicht-linearen Regression mit der biphasischen monoexponentiellen Funktion wurden die beiden Halbwertszeiten $t_{1/2off1}$ und $t_{1/2off2}$, die aus den zwei Phasen des biphasischen monoexponentiellen Zerfalls resultieren, zu einer Halbwertszeit der Dissoziation $t_{1/2off}$ zusammengefasst. Streng genommen müsste die zusammengefasste Halbwertszeit beider Phasen als scheinbare Halbwertszeit $t_{app1/2off}$ bezeichnet werden, worauf hier aus Gründen der Übersichtlichkeit jedoch verzichtet wurde. Diese Vereinfachung der Auswertung war notwendig, da die Halbwertszeiten der einzelnen Dissoziations-Experimente mit denen der Kontroll-Experimente verglichen werden mussten, wobei unter den zu vergleichenden Experimenten sowohl monophasische als auch biphasische Kurvenverläufe vorkamen. Die Dissoziations-Halbwertszeiten wurden nicht aus der Gesamtkurve aller Einzelexperimente, sondern als Mittelwert aus den nicht-linearen Regressionen der vier Experimente in Doppelbestimmung (Kontroll-experimente) bzw. der drei Experimente in Doppelbestimmung (siehe Kapitel 4.2.3.4) bzw. der zwei Experimente in Doppelbestimmung (siehe Kapitel 3.2.3.3.2) ermittelt. Mit Hilfe der Gleichung (17), die die Beziehung zwischen der Dissoziations-Halbwertszeit $t_{1/2off}$ und der Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten k_{off} wiedergibt, wurde k_{off} berechnet:

$$k_{off} = \frac{\ln 2}{t_{1/2off}} \quad \text{Gleichung (17)}$$

$t_{1/2off}$: Dissoziations-Halbwertszeit

3.2.3.2.1 [³H]-DAMGO, Dissoziationskinetik, zerebraler Kortex, Ratte

Die in den Experimenten verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen (die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen):

I) Ansatzlösung (Phase I des Experiments)

- 3000 µl Membranhomogenat (ca. 0,2 mg/ml Protein) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Tris 50 mM),
- 7500 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 1500 µl AEBSF (0,1 mM) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und

- 1500 μl ^3H -DAMGO (0,5 nM; spezifische Aktivität 51 Ci/mmol) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4.

Das Gesamtvolumen der Ansatzlösung betrug 13500 μl . Die Ansatzlösung wurde in einen 50 ml Erlenmeyerkolben pipettiert, mit einem Deckel verschlossen und für 45 Minuten auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 25 °C unter ständigem Rühren mit einem Magnetrührer inkubiert.

II) Reaktionslösung (Phase II des Experiments)

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden zur Bestimmung der maximalen [^3H]-DAMGO-Gleichgewichts-Bindung vor Start des Dissoziations-Experiments zweimal 500 μl der Ansatzlösung in 2 ml Reaktionsröhrchen ohne Deckel pipettiert und durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf Whatman GF/C-Filterstreifen (vorbehandelt mit 0,3 % PEI) mit 400 mbar Restdruck gesogen. Die Filter wurden zweimal mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-Puffer pH 7,4 gespült und mit einer Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt. Sofort im Anschluss wurde das Dissoziations-Experiment durch Zugabe entweder von 1500 μl Naloxon in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (10 μM , Kontroll-Experiment) *oder* 1500 μl einer Lösung, bestehend aus 750 μl Naloxon (10 μM) und 750 μl einer Testsubstanz in Tris-HCl-Puffer pH 7,4, zur Ansatzlösung zum Zeitpunkt Null Minuten gestartet. Das Gesamtvolumen der Reaktionslösung nach dem Start des Dissoziations-Experiments betrug 14000 μl . Die Reaktionslösung wurde über die komplette Versuchszeit auf dem Wasserbad bei 25 °C mit einem Magnetrührer gerührt. Nach 1, 3, 5, 7, 10, 15, 30, 45, 60, 75, 90 und 120 Minuten wurden jeweils zweimal 500 μl aus der Reaktionslösung mit einer Eppendorf Pipette entnommen und, wie oben beschrieben, auf Whatman GF/C-Filterstreifen (vorbehandelt mit 0,3 % PEI) gesogen, die mit einer Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt wurden. Zwischen den Entnahmezeiten wurde die Reaktionslösung zum Schutz vor Verdunstung mit einem Deckel verschlossen. Die Auswertung der Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben

3.2.3.3 Gleichgewichts-Bindung

Allgemeine Prinzipien

Das Ziel dieser Experimente war die Bestimmung des Ausmaßes der Verdrängung von [³H]-DAMGO aus der Gleichgewichts-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor durch die Cannabinoide Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR. In einer Serie von Experimenten, die in Analogie zu den orthosterischen Kompetitions-Experimenten der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden und daher im folgenden als Pseudo-Kompetitions-Experimente bezeichnet werden, wurde der rezeptorgebundene Anteil einer fixen Konzentration von [³H]-DAMGO in Abwesenheit und in Gegenwart steigender Konzentrationen der Cannabinoide nach der Einstellung eines Bindungsgleichgewichts am μ -Opioid-Rezeptor ermittelt. Mithilfe einer zweiten Serie von Experimenten wurde die Kinetik der Änderung der Gleichgewichts-Bindung von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor durch die Zugabe aufsteigender Konzentrationen der Cannabinoide bestimmt. Für die Beschreibung der Wechselwirkung zwischen einem Rezeptor, einem orthosterischen und einem allosterischen Liganden beim Vorliegen einer allosterischen Interaktion kann das ternäre Modell nach Ehlert (1988) herangezogen werden, das in Abb. 5 dargestellt ist:

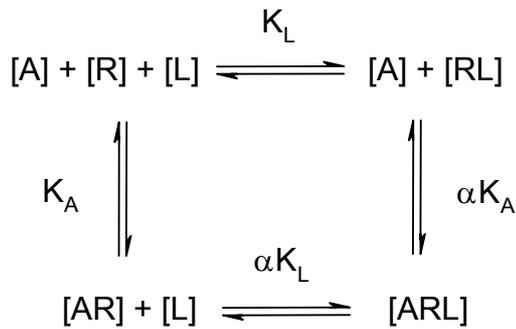


Abb. 5 Das ternäre Modell dargestellt nach Ehlert (1988).

- A: allosterischer Ligand (in dieser Studie ein Cannabinoid)
 L: orthosterischer Ligand (in dieser Studie [³H]-DAMGO)
 R: Rezeptor (in dieser Studie der μ -Opioid-Rezeptor)
 K_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung
 K_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden
 α : Kooperativitätsfaktor
 αK_L : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Radioligand-Bindung am mit dem allosterischen Liganden besetzten Rezeptor
 αK_A : Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden am mit dem Radioliganden besetzten Rezeptor

An dieser Stelle ist zu bemerken, dass K_A auch als Kürzel für die Gleichgewichts-Assoziationskonstante verwendet wurde, im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit aber immer Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des allosterischen Liganden meint.

Als Maß zur Beschreibung der allosterischen Modulation der Bindung eines orthosterischen durch einen allosterischen Liganden kann der Kooperativitätsfaktor α (siehe Abb. 5) herangezogen werden. Mit Kooperativität bezeichnet man die Eigenschaft zweier Liganden, sich gegenseitig in ihrem Bindungsgleichgewicht an den jeweiligen Bindungsstellen zu beeinflussen. Eine **negative Kooperativität** liegt vor, wenn ein allosterischer Modulator die Gleichgewichts-Bindung eines orthosterischen Liganden reduziert, wobei $\alpha > 1$ ist. Von einer **positiven Kooperativität** wird gesprochen, wenn ein allosterischer Modulator die Gleichgewichts-Bindung eines orthosterischen Liganden steigert, wobei $\alpha < 1$ ist. Liegt eine **neutrale Kooperativität** vor, so verändert sich die

Gleichgewichts-Bindung des orthosterischen Liganden nicht und es gilt $\alpha = 1$. Aus dem ternären Modell nach Ehlert lässt sich die Funktion von Ehlert herleiten:

$$\frac{Y}{Y_0} = \frac{[L] + K_L}{[L] + K_L \left(\frac{K_A + [A]}{K_A + \frac{[A]}{\alpha}} \right)} \quad \text{Gleichung (18)}$$

- [A]: Konzentration des allosterischen Liganden (in dieser Studie ein Cannabinoid)
- [L]: Konzentration des orthosterischen Liganden (in dieser Studie [³H]-DAMGO)
- Y: Bindung von L in Gegenwart von A
- Y₀: Bindung von L in Abwesenheit von A
- K_L, K_A, α: siehe oben

Die Funktion von Ehlert wurde bezüglich ihrer Anwendbarkeit zur Auswertung der Pseudo-Kompetitions-Experimente getestet. Zu diesem Zweck wurde die spezifische rezeptorgebundene Radioaktivität in Prozent der Kontrolle, die in Abwesenheit einer Testsubstanz ermittelt wurde, gegen den Logarithmus der Konzentration des zugesetzten allosterischen Liganden in ein Diagramm aufgetragen. Mithilfe einer computergestützten nicht-linearen Regression mit der Software GraphPad Prism[®] unter Verwendung der Funktion von Ehlert sollte ein sigmoider Kurvenverlauf erhalten werden, wenn es sich um eine allosterische Modulation handelt, aus dem dann der Kooperativitätsfaktor α und die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor bestimmt werden sollte. Neben der Funktion von Ehlert wurden zwei weitere Kurvenanpassungen, und zwar eine mit der Funktion der einseitigen Kompetition und eine mit der Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung, bezüglich ihrer Anwendbarkeit getestet.

3.2.3.3.1 [³H]-DAMGO, Pseudo-Kompetitions-Experimente, zerebraler Kortex, Ratte

Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert, die in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt wurden. Jeder Ansatz enthielt (die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen):

- 50 µl einer bestimmten Konzentration einer Testsubstanz in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 *oder* 50 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (totale Bindung) *oder* 50 µl Naloxon (10 µM, unspezifische Bindung) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 50 µl [³H]-DAMGO (0,5 nM; spezifische Aktivität 51 Ci/mmol) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 50 µl AEBSF (0,1 mM) in Tris-HCl-Puffer pH 7,4,
- 250 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4 und
- 100 µl Proteinhomogenat in Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (entsprechend 100 bis 140 µg Protein im 500 µl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 120 Minuten auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 25 °C startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf Whatman GF/C-Filter (vorbehandelt mit 0,3 % PEI) mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-Puffer pH 7,4. Im Anschluss wurden die zu den Proben gehörigen Filter mit einer Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.3.3.2 [³H]-DAMGO, Zeitverlauf der Änderung der Gleichgewichts-Bindung, zerebraler Kortex, Ratte

Die Experimente wurden in Analogie zu den Dissoziations-Experimenten mit der Ausnahme durchgeführt, dass nach der 45minütigen Vorinkubation ausschließlich je eine Konzentration eines Cannabinoids, gelöst in 1500 µl Tris-HCl-Puffer pH 7,4, zur Reaktionslösung zum Zeitpunkt Null Minuten

zugemischt wurde. Zur Durchführung der Dissoziations-Experimente siehe Kapitel 3.2.3.2.1.

3.2.4 [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimente

Allgemeine Prinzipien und Auswertung

GTPγS ist eine hydrolysestabile Analogsubstanz zu GTP und kann anstelle von GTP an rezeptoraktivierte G-Proteine im Austausch zu GDP binden. Im Gegensatz zu GTP bindet GTPγS jedoch irreversibel an G-Proteine. Der Radioligand [³⁵S]-GTPγS kann dazu verwendet werden, das Ausmaß der Rezeptor-Aktivierung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors durch einen Agonisten zu ermitteln. Je stärker die Aktivierung durch einen Agonisten ausfällt, umso mehr G-Proteine binden [³⁵S]-GTPγS, und die gebundene Radioaktivität, die nach Filtration des Reaktionsansatzes bestimmt wird, nimmt zu. Da GTPγS irreversibel an die G-Proteine bindet, handelt es sich bei den [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimenten um Reaktionen, bei denen es nicht zu einer Gleichgewichts-Einstellung kommt. Entscheidend für die Durchführung der Versuche ist daher eine exakte Einhaltung der Inkubationszeit und der Reaktionsbedingungen. Die Vorschrift für die Bindungs-Experimente wurde der Promotionsschrift von Bauer (2002) entnommen. Die Art der Auswertung der [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimente wird im Ergebnisteil beschrieben.

3.2.4.1 [³⁵S]-GTPγS-Bindung, zerebraler Kortex, Maus

Die Reaktionsansätze von je 500 µl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder Ansatz enthielt (die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen):

- 50 µl einer von 10 aufsteigenden Konzentrationen von WIN 55,212-2 (1×10^{-9} bis 3×10^{-5} M) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA *oder* 50 µl Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA (basale Bindung) *oder* 50 µl GTPγS

(10 μM , unspezifische Bindung) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA,

- 50 μl [^{35}S]-GTP γS (0,05 nM; spezifische Aktivität 1250 Ci/mmol) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4,
- 50 μl GDP (30 μM) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4,
- 300 μl Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 und
- 50 μl Proteinhomogenat in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 (entsprechend 5 bis 10 μg Protein im 500 μl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 30 °C startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Vor Ablauf der Inkubationszeit wurde ein unbehandelter Whatman GF/B-Filter in den Inotech Cell-Harvester eingelegt und einmal mit ca. 500 μl Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA je Reaktionsröhrchen gespült. Dieser Schritt diente der Reduzierung von unspezifischen Bindungsstellen an den inneren Oberflächen des Cell-Harvesters. Der Filter wurde verworfen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Proben durch Vakuumfiltration mithilfe des Inotech Cell-Harvesters auf unbehandelte Whatman GF/B-Filter mit 400 mbar Restdruck gesogen. Es folgten drei Waschschrte mit je 2 ml kaltem Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5. Im Anschluss wurden die zu den Proben gehörigen Filter mit einer Pinzette in Poly-Q-Vials[®] überführt. Die Auswertung der gebundenen Radioaktivität erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.4.2 [^{35}S]-GTP γS -Bindung, Hippocampus, Meerschweinchen

Die Reaktionsansätze von je 500 μl Gesamtvolumen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße ohne Deckel pipettiert und in 24er-Lochplatten (4 Reihen mit je 6 Bohrungen), passend für den Inotech Cell-Harvester, gesteckt. Jeder Ansatz enthielt (die angegebenen Konzentrationen entsprechen den Endkonzentrationen):

- 50 μl einer Testsubstanz *oder* einer Kombination von zwei Testsubstanzen in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA (SR 141716A und VCHSR 1×10^{-7} bis 3×10^{-6} M; WIN 55,212-2 3×10^{-6} M) *oder* 50 μl Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer

pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA (basale Bindung) *oder* 50 µl GTP γ S (10 µM, unspezifische Bindung) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 mit zusätzlich 0,5 % BSA,

- 50 µl [³⁵S]-GTP γ S (0,05 nM) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4,
- 50 µl GDP (30 µM) in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4,
- 300 µl Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 und
- 50 µl Proteinhomogenat in Tris-HCl-EGTA-Reaktionspuffer pH 7,4 (entsprechend 5 bis 10 µg Protein im 500 µl Reaktionsansatz).

Die Inkubationszeit von 60 Minuten auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 30 °C startete mit der Zugabe des Proteins. Im Anschluss an die Proteinzugabe wurden die Proben mit Parafilm[®] abgedeckt und gründlich gemischt. Der weitere Versuchsverlauf erfolgte wie unter Kapitel 3.2.4.2 beschrieben.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Transiente Transfektion, humaner 5-HT_{3A}-Rezeptor, HEK 293 Zellen

3.3.1.1 Transformation von E. coli JM 109

Die cDNA des humanen 5-HT_{3A}-Rezeptors im Plasmidvektor pcDNA 3.1 lag in einer Konzentration von 1 µg/µl in entmineralisiertem Wasser (Aqua dem) gelöst vor. Der verwendete 5-HT_{3A}-Rezeptor wurde in der Arbeit von Brüss et al. (2000) charakterisiert. Insgesamt zwei Ansätze wurden zur Transformation von E. coli Bakterien JM109 vorbereitet. Die E. coli JM109 Bakteriensuspension wurde auf Eis aufgetaut und jeweils 100 µl Suspension wurden vorsichtig in zwei 15 ml Greiner Röhren pipettiert. 1 µl einer frisch angesetzten Mercaptoethanol-(MEt-)Verdünnung (1:11 in hitzesterilisiertem Aqua dem) wurden zu jedem Ansatz dazupipettiert. Die Ansätze wurden für 10 Minuten auf Eis inkubiert und alle zwei Minuten vorsichtig geschüttelt. Jeweils 10 µl einer Plasmidverdünnung wurden zu jedem Ansatz wie folgt dazugegeben:

Ansatz 1: 10 µl einer 1:50 Verdünnung der cDNA in pcDNA3 (entsprechend 0,2 µg DNA)

Ansatz 2: 10 µl einer 1:5 Verdünnung der cDNA in pcDNA3 (entsprechend 2 µg DNA)

Die Ansätze wurden nach der Plasmidzugabe für 30 Minuten auf Eis inkubiert und in zehnmütigen Intervallen vorsichtig geschüttelt. Anschließend wurden die Ansätze für 45 Sekunden in ein 42 °C warmes Wasserbad überführt und danach sofort für zwei Minuten auf Eis gestellt. Unter der Laminar-airflow wurden 900 µl hefehaltiges Kulturmedium für kompetente E. coli Bakterien (S.O.C.-Medium) zu jedem Ansatz dazugegeben, und die Ansätze wurden bei 37 °C unter ständigem Schütteln für eine Stunde inkubiert.

3.3.1.2 Identifizierung transformierter Klone

Je 200 µl der Bakteriensuspension in S.O.C.-Medium (siehe Kapitel 3.3.1.1) wurden auf eine mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) und Isopropylthiogalactosid (IPTG) präparierte Agarplatte mithilfe einer über einer Flamme gebogenen Spitze einer Pasteurpipette ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden jeweils sechs positive Klone (weiße Klone) von beiden Ansätzen mit einer sterilen 100 µl Eppendorf Pipettenspitze gepickt und zusammen mit der Pipettenspitze in jeweils ein mit 4 ml Luria-Bertani-(LB-) Medium + 8 µl 50 mg/ml Ampicillin gefülltes 15 ml Greiner Röhrchen überführt. Die Bakteriensuspensionen wurden über Nacht bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.

3.3.1.3 Miniprep

Zweimal 1,5 ml wurden von jeder Bakteriensuspension (siehe Kapitel 3.3.1.2) nacheinander in jeweils einem 2 ml Eppendorf Gefäß gepoolt. Dazu wurde zweimal bei Raumtemperatur in einer Eppendorf Zentrifuge mit 14000 U/min fünf Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils vorsichtig abpipettiert. Die gesammelten Pellets wurden in 200 µl Lysepuffer (Glucose 50 mM, Tris 25 mM, EDTA, 10 mM, Lysozym 4 mg/ml) resuspendiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden zu jedem

Ansatz 400 µl einer Mischung aus 200 mM NaOH mit 1 % Natriumdodecylsulfat (SDS) dazupipettiert und fünf Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurden zu jedem Ansatz 300 µl einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung pH 7,8 dazugegeben. Jeder Ansatz wurde drei Sekunden lang gemischt und anschließend für 10 Minuten bei -20 °C ins Gefrierfach gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppendorf Zentrifuge mit 14000 U/min für 20 Minuten. Die Überstände wurden in jeweils ein neues 2 ml Eppendorf Gefäß überführt, mit 500 µl -20 °C kaltem Isopropanol versetzt, dreimal über Kopf gekippt und für 30 Minuten bei -20 °C ins Gefrierfach gestellt. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppendorf Zentrifuge mit 14000 U/min für 15 Minuten - die Überstände wurden verworfen. Jeweils 500 µl 4 °C kaltes 70 %iges (V/V) Ethanol (EtOH) in Aqua dem wurden auf die Pellets gegeben, die mithilfe einer Pipette resuspendiert wurden. Es folgte eine Zentrifugation bei Raumtemperatur in der Eppendorf Zentrifuge mit 14000 U/min für fünf Minuten. Die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert und es wurde gewartet, bis das restliche EtOH bei Raumtemperatur verdunstet war. Auf die Pellets wurden 30 µl Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 + 0,2 % (V/V) RNase gegeben, und die Lösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Lagerung der gelösten DNA erfolgte in den 2 ml Eppendorf Gefäßen bei -20 °C im Gefrierschrank. Die Reste der Bakteriensuspensionen aus Kapitel 3.3.1.2 wurden mit 300 µl 30 % (V/V) Glycerol versetzt, für drei Sekunden gemischt und bei -20 °C über Nacht oder bei -80 °C über einen längeren Zeitraum eingefroren.

3.3.1.4 Restriktionsanalyse

Die plasmidgebundene DNA der zwei Ansätze aus Kapitel 3.3.1.1 wurde durch Restriktionsanalyse untersucht. Dazu wurden in je ein 2 ml Eppendorf Gefäß pipettiert:

- 7 µl DNA aus Kapitel 3.3.1.3
- 0,5 µl EcoRI (entsprechend 20 U)
- 0,5 µl BamHI (entsprechend 20 U)
- 1 µl Tp B-Puffer (Restriktionspuffer)
- 1 µl Aqua dem steril

Nach 1,5 Stunden bei 37 °C auf dem Wasserbad wurde zu jedem Ansatz 1 µl Gel-Loading-Buffer hinzugefügt und 10 µl von jedem Ansatz wurden neben einem DNA-Ladder (DNA-Referenz mit verschiedenen Molekulargewichten) auf ein großes Agarose-Gel (1,3 % Agarose in Tris-Acetat-EDTA-(TAE-) Puffer pH 8,3: Tris 2 M, Essigsäure 1 M, EDTA 0,1 M + 8 µl Ethidiumbromid (EtBr)) aufgetragen. Die Proben wurden durch Gelelektrophorese über 60 Minuten mit 130 Volt in einer mit TAE-Puffer pH 8,3 gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Das fertige Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen, auf einem UV-Tisch durchleuchtet und digital fotografiert. Die Glycerolgemische von vier positiv transformierten Bakteriensuspensionen (siehe Kapitel 3.3.1.3), wurden bei -80 °C bis zur späteren Verwendung eingefroren.

3.3.1.5 Midiprep, Quantum-Prep[®], Bio-Rad

Das Glycerolgemisch einer Bakteriensuspension (siehe Kapitel 3.3.1.4) wurde auf Eis aufgetaut und 100 µl der Bakteriensuspension wurden in 100 ml LB-Medium + 200 µl Ampicillin (50 mg/ml) in eine 500 ml Glasflasche mit Deckel pipettiert. Die Bakteriensuspension wurde unter ständigem Schütteln über Nacht bei 37 °C für 18 Stunden inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Bakteriensuspension in zwei Schritten auf zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und jeweils in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 3000 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Zu den gesammelten Pellets wurden nach der Anweisung der Firma Bio-Rad nacheinander zugesetzt:

- 5 ml "Cell Resuspension Solution" - die Röhrchen wurden gut geschüttelt,
- 5 ml "Cell Lysis Solution" - die Röhrchen wurden achtmal über Kopf gedreht,
- 5 ml "Neutralization Solution" - die Röhrchen wurden achtmal über Kopf gedreht.

Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 7500 x g für 15 Minuten. Die Überstände wurden in je ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die "Quantum Prep Matrix" wurde drei Sekunden gemischt und anschließend wurde je 1 ml zu jedem Überstand

hinzugefügt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 7500 x g für fünf Minuten - die Überstände wurden vorsichtig abpipettiert. Die Pellets wurden durch Schütteln in 10 ml "Wash Buffer" resuspendiert, und die Suspension wurde bei 4 °C in der Beckman Kühlzentrifuge mit 7500 x g für fünf Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen. Mithilfe einer Eppendorf Pipette wurden die Pellets in je 600 µl "Wash Buffer" resuspendiert und auf Filter (sog. „Tips“) pipettiert, die auf 2 ml Eppendorf Gefäße aufgesteckt wurden. Der "Wash Buffer" wurde durch eine Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 13000 x g für eine Minute in einer Mikrozentrifuge durch die Filter gedrückt und im Eppendorf Gefäß aufgefangen. Das Filtrat wurde verworfen. Die oberhalb des Filters verbliebene Matrix wurde erneut mit 500 µl "Wash Buffer" gewaschen und der zuvor genannte Zentrifugationsschritt einmal wiederholt. Das Filtrat wurde erneut verworfen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt der aufgesetzten Filter mit 13000 x g für zwei Minuten zur Entfernung des restlichen "Wash Buffers". Die Filter wurden auf zwei neue Eppendorf Gefäße aufgesetzt und die matrixgebundene DNA wurde mit 600 µl hitzesterilisiertem Aqua dem gelöst und durch einen Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur mit 13000 x g für eine Minute in einer Mikrozentrifuge durch den Filter gedrückt und in den Eppendorf Gefäßen gesammelt. Zuletzt wurde die erhaltene Plasmid-DNA in den Eppendorf Gefäßen bei -20 °C eingefroren. Die Plasmid-DNA wurde erneut durch eine Restriktionsanalyse (siehe Kapitel 3.3.1.4) untersucht.

3.3.1.6 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der Plasmid-DNA (siehe Kapitel 3.3.1.5) wurde photometrisch bestimmt. Bei dieser Methode dient eine doppelsträngige DNA-Lösung (50 µg/ml) als Referenz, die bei einer Wellenlänge von 260 nm - das entspricht dem Absorptionsmaximum einer doppelsträngigen DNA - einen Absorptionswert von Eins aufweist. Gleichzeitig wurde die Reinheit der Plasmid-DNA in Bezug auf Proteinrückstände bestimmt. Die aromatischen Aminosäuren von Proteinen zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 280 nm. Durch die Bildung des Koeffizienten der Absorptionswerte bei 280 und 260 nm konnte die Proteinmenge geschätzt werden. Zur DNA Bestimmung wurde 1 µl DNA-Lösung aus dem Midiprep

mit 99 µl Aqua dem in einer Quarzküvette gemischt. Der Leerwert wurde mit 100 µl Aqua dem bestimmt.

3.3.1.7 Transfektion von HEK 293 Zellen mit Lipofectamine®2000

Alle Arbeitsschritte wurden im Zelllabor unter der Laminar-airflow durchgeführt. Folgende Ansätze wurden für die Transfektion vorbereitet:

- 1) 500 µl der Plasmid-DNA (0,5 µg/µl) wurden mit Dulbecco's modifiziertem Adler Medium, das zusätzlich das Nährstoffsupplement HAMS F12 der Firma Sigma-Aldrich enthielt (DMEM HAMS F12) gemischt.
- 2) 500 µl Lipofectamine®2000 Transfektionsreagenz wurden mit 13,125 ml DMEM HAMS F12 Nährmedium gemischt.
- 3) Die Ansätze **1)** und **2)** wurden nach 5 Minuten bei Raumtemperatur in einem 50 ml Greiner Röhrchen vereint und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Drei große (175 cm²), zu 80-90 % mit HEK 293 Zellen konfluente Kulturflaschen, wurden mit 43 ml DMEM HAMS F12 Medium + 10 % hitzesterilisiertem fötalen Kälberserumalbumin (hFKS) ohne Penicillin-Streptomycin-(PS-)Lösung befüllt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden alle Flaschen mit je 9,1 ml Ansatz **3)** versehen und vorsichtig geschwenkt. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ für vier Stunden inkubiert. Danach wurde ein Mediumwechsel mit 30 ml DMEM HAMS F12 + 10 % hFKS ohne PS durchgeführt und die Zellen wurden für weitere 44 Stunden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Membranaufbereitung (siehe Kapitel 3.1.5) inkubiert.

3.3.2 Quantifizierung der CB₁-Rezeptor-mRNA-Expression

3.3.2.1 Isolierung der mRNA aus NG 108-15 Zellen

Die Kultivierung der NG 108-15 Zellen erfolgte in 6er-Well-Platten wie unter Kapitel 3.4.4 beschrieben. Jeweils die Zellen der beiden oberen und unteren Reihen von zwei 6er-Well-Platten wurden voneinander getrennt zu den angegebenen Zeitpunkten mithilfe einer 1 ml Eppendorf Pipette abgelöst, in je

einem 15 ml Greiner Röhrchen gepoolt und bis zur im Anschluss durchgeführten mRNA-Isolierung auf Eis gestellt.

Zur Isolierung der mRNA wurden 10 bis 30 mg Zellen in 10 ml PBS-Puffer pH 7,4 mithilfe eines Gummischabers aufgenommen, in ein 30 ml Zentrifugenröhrchen überführt und in der Beckman Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 1500 x g für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit einer Eppendorf Pipette in 1 ml PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorf Gefäß überführt. Es folgte ein Zentrifugationsschritt bei Raumtemperatur mit 13000 x g für 1 Minute in einer Eppendorf Zentrifuge. Der Überstand wurde verworfen. 1 ml Tripure[®]-Reagenz wurde auf das Pellet gegeben. Das Tripure[®]-Reagenz erlaubt die Isolierung von totaler RNA, DNA und Protein der gleichen Gewebeprobe in einer Flüssigphasentrennung nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987).

Das Pellet wurde mit einer Eppendorf Pipette durch sechsmaliges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Suspension wurde für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. 200 µl Chloroform wurden zugesetzt, das Gemisch wurde 15 Sekunden lang geschüttelt und anschließend für 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 13000 x g für 15 Minuten. Der klare Überstand wurde vorsichtig in ein neues Eppendorf Gefäß abpipettiert. 500 µl Isopropanol wurden zu dem Überstand gegeben und das Eppendorf Gefäß wurde zweimal über Kopf gedreht. Es folgte ein Zentrifugationsschritt in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 13000 x g für 10 Minuten, der Überstand wurde abpipettiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem EtOH gewaschen und erneut in der Eppendorf Kühlzentrifuge bei 4 °C mit 7500 x g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und es wurde gewartet, bis das restliche EtOH an der Luft verdunstet war (ca. 15 Minuten). Das Pellet wurde zuletzt in 30 µl Aqua dem + 0,1 % (V/V) Diethylpyrocarbonat (DEPC, RNase-Inhibitor) aufgenommen, für mindestens 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann bei -80 °C eingefroren.

3.3.2.2 Reverse Transkription von NG 108-15 mRNA in cDNA

Als Vorbereitung für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde die mRNA (siehe Kapitel 3.3.2.1) in die entsprechende cDNA mithilfe der reversen Transkriptase aus dem "avian myeloblastosis virus" (RT AMV) umgeschrieben. Das Reaktionsgemisch mit einem Endvolumen von 50 μ l setzte sich wie folgt zusammen:

- 10 μ l RNA (5 μ g),
- 1 μ l Hexaprimer (0,5 μ g),
- 10 μ l RT AMV Reaktionspuffer 5x,
- 4 μ l Desoxynukleotidgemisch (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM),
- 0,5 μ l RT AMV (20 U),
- 1 μ l RNase Inhibitor (2,5 U),
- 23,5 μ l Aqua dem.

Die Ansätze wurden in ein 1,5 ml Eppendorf GefäÙe pipettiert und für 1,5 Stunden auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 42 °C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden bei Raumtemperatur 5 μ l 0,2 % RNase A in Tris-HCl-EDTA-Puffer pH 7,5 zu jedem Ansatz zugesetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

3.3.2.3 PCR der cDNA des CB₁-Rezeptors und von β -Actin

Die Reaktionsgemische für die PCR setzten sich wie folgt zusammen:

- 15 μ l cDNA (siehe Kapitel 3.3.2.2),
 - 1 μ l sense Primer (β -Actin (Ratte) oder CB₁ (Ratte)),
 - 1 μ l antisense Primer (β -Actin (Ratte) oder CB₁ (Ratte)),
 - 2,5 μ l dNTP,
 - 5 μ l Taq Polymerase Reaktionspuffer 10x,
 - 20,5 μ l Aqua dem,
 - 5 μ l Taq Polymerase (0,25 U).
- } siehe Abb. 6

Es wurde folgendes Programm für die PCR verwendet:

Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3
94 °C, 1 min	94 °C, 1 min 56 °C, 1 min 72 °C, 1 min	72 °C, 3 min
	35 Zyklen	

Tabelle 1 Verwendetes Programm des Thermo Cyclers für die PCR.

Die Primer (siehe Abb. 6) wurden in einer Konzentration von je 0,25 µM eingesetzt.

CB₁-Rezeptor Ratte:	
sense	
Primer	5' TGC AGG CCT TCC TAC CAC TTC ATC 3'
antisense	
Primer	5' GAC GTG TGG ATG ATG ATG CTC TTC 3'
Die Primer für den CB ₁ -Rezeptor der Ratte entsprechen Position 600-623 (sense) und 1097-1120 (antisense); Genbank NM_012784.	
β-Actin Ratte:	
sense	
Primer	5' TGC AGG CCT TCC TAC CAC TTC ATC 3'
antisense	
Primer	5' GAC GTG TGG ATG ATG ATG CTC TTC 3'
Die Primer für β-Actin der Ratte entsprechen Position 1457-1480 (sense) und 2529-2552 (antisense); Genbank J00691.	

Abb. 6 Sequenz der verwendeten CB₁-Rezeptor- und β-Actin-Primer der Ratte.

3.3.2.4 Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Analyse der PCR-Produkte wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein großes Agarose-Gel (1,3 % Agarose in 150 ml TAE-Puffer pH 8,3 + 8 µl EtBr) gegossen, in das während der Erkaltungs-

phase zwei Probenkämme (einer an der Seite, einer in der Mitte des Gels) gesteckt wurden. Je 10 µl von jeder cDNA-Probe + 1 µl "Loading-Buffer" wurden einmal in jeder Reihe in eine Geltasche pipettiert. Zusätzlich wurde in eine Tasche in jeder Reihe 1 µl DNA-Ladder + 9 µl Aqua dem + 1 µl "Loading-Buffer" eingefüllt. Die Laufzeit betrug 45 Minuten bei 120 Volt in einer mit TAE-Puffer pH 8,3 gefüllten Elektrophoresekammer. Das fertige Gel wurde aus der Elektrophoresekammer genommen, auf einem UV-Tisch durchleuchtet und digital fotografiert. Die densitometrische Auswertung der cDNA-Banden erfolgte mithilfe der Software Lumi-Analyst® 3.0.

3.3.3 Transfektion von NG 108-15 Zellen mit einer siRNA

Allgemeine Prinzipien der siRNA-Methode

Bei einer siRNA handelt es sich um kurze doppelsträngige RNA. In zahlreichen Prokaryonten sowie Eukaryonten sind Mechanismen des posttranskriptionalen mRNA-Abbaus beschrieben worden, die durch doppelsträngige RNA Stücke induziert werden (Elbashir et al., 2002). Die Mechanismen des mRNA-Abbaus können sowohl unspezifisch als auch spezifisch sein. siRNAs mit einer Größe von über 30 Basenpaaren lösen in den Zellen Mechanismen aus, die zum unspezifischen Abbau von mRNAs führen. siRNAs mit einer Größe von weniger als 30 Basenpaaren hingegen führen in der Hauptsache zu einem Abbau von mRNAs, mit denen eine homologe Basenpaarung möglich ist. Die siRNA-Methode kann heute gezielt eingesetzt werden, um bestimmte mRNAs posttranskriptional abzubauen. Für diesen Zweck sind siRNAs mit 21 Basenpaaren und einem zwei Nukleotid 3'-Überhang am besten geeignet. Für diese Arbeit wurde mithilfe der Genbank des "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) eine Sequenz aus der CB₁-Rezeptor-mRNA der Ratte ausgewählt und eine entsprechende homologe siRNA bei der Firma MWG bestellt. Die Sequenz der siRNA entspricht Position 252-272 der CB₁-Rezeptor-mRNA der Ratte, Genbank NM_012784 - dies ist Position 100 nach dem Startcodon - und somit den Auswahlkriterien nach Elbashir et al. (2002).

Die siRNA wurde transient in NG 108-15 Zellen transfiziert, die sowohl eine CB₁-Rezeptor-Transkription als auch eine CB₁-Rezeptor-Expression aufweisen (Di Toro et al., 1998). Die CB₁-Rezeptor-Expression wurde mithilfe eines Western Blots mit einem Antikörper gegen den CB₁-Rezeptor der Ratte untersucht, der in der Arbeit von Twitchell et al. (1997) beschrieben wurde.

3.3.3.1 Transfektion von NG108-15 Zellen

Die Kultivierung der NG 108-15 Zellen erfolgte wie im Kapitel 3.4.4 beschrieben. Ein Tag nach dem Aussäen der Zellen in sechs 6er-Well-Platten mit DMEM + 10 % hFKS + HAT-Supplement (ein die Zelldifferenzierung unterdrückender Zusatz) ohne PS folgte die Transfektion mit der siRNA gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA. Die Sequenz der verwendeten siRNA zeigt die Abb. 7.

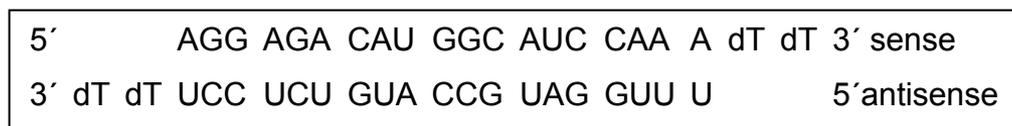


Abb. 7 Sequenz der siRNA gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA. dT: Desoxythymidin.

Jeweils die untere Reihe einer 6er-Well-Platte erhielt den Transfektionsansatz mit der siRNA, die obere Reihe diente als Kontrolle (Ko.) und erhielt keine siRNA (siehe Abb. 8).

Ko. Opti-Mem®	Ko. Opti-Mem®	Ko. Opti-Mem®
siRNA Opti-Mem®	siRNA Opti-Mem®	siRNA Opti-Mem®

Abb. 8 Schematische Darstellung des Pipettierschemas einer 6er-Well-Platte für den siRNA Versuch.

Nachfolgend ist die Transfektion für ein Well einer 6er-Well-Platte beschrieben. Insgesamt wurden in einem Experiment 18 Wells (drei Wells je Platte, sechs Platten) transfiziert. Alle Arbeitsschritte wurden unter der Laminar-airflow durchgeführt.

- A)** 100 µl Opti-Mem[®] wurden mit 6 µl siRNA Oligo-Duplex (20 µM) in einem Eppendorf Gefäß gemischt und fünfmal über Kopf gekippt.
- B)** In einem zweiten Eppendorf Gefäß wurden 24 µl Opti-Mem[®] mit 6 µl Oligofectamine[®] gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- C)** Die Lösung aus **A)** wurde zur Lösung aus **B)** pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
- D)** 64 µl Opti-Mem[®] wurden zur Lösung aus **C)** pipettiert.
- E)** 200 µl der Lösung aus **D)** wurden in ein Well, das die NG 108-15 Zellen und 2000 µl DMEM Medium + 10 % hFKS ohne PS enthielt, pipettiert. Die Kontrolle erhielt 200 µl Opti-Mem[®] anstelle der Lösung aus **D)**.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen je eines Wells in eine große (175 cm²) Kulturflasche umgesetzt. Dem neuen Kulturmedium wurde 1% PS zugesetzt. Nach 48 weiteren Stunden wurde ein Mediumwechsel mit PS-haltigem Medium durchgeführt. Weitere 24 Stunden später (insgesamt 120 Stunden nach der Transfektion) wurden die Zellen von je drei großen Kulturflaschen aufbereitet (siehe Kapitel 3.1.6).

3.3.3.2 Western Blot mit einem Antikörper gegen den CB₁-Rezeptor

A) Probenvorbereitung

950 µl Bio-Rad-Probenpuffer (Laemmli[®] Sample Buffer) wurden mit 50 µl MEt gemischt. Die auf eine Konzentration von ca. 5 µg/µl eingestellten Proteinproben (siehe Kapitel 3.1.6) wurden im Volumenverhältnis 1:1 mit dem mit MEt gemischten Probenpuffer in ein 1 ml Eppendorf Gefäß pipettiert. Zur Denaturierung der Proteine wurden die Eppendorf Gefäße für drei Minuten auf einen auf 95 °C vorgeheizten Heizblock gestellt. Anschließend wurden die Eppendorf Gefäße bis zum Gel-Auftrag der Proben auf Eis gestellt.

B) Gel-Elektrophorese zur Proteinauftrennung

Zwei Gele wurden in zwei 15 ml Greiner Röhrrchen (I und II) angesetzt:

	I) 10% Gel	II) Stacking Gel	
Aqua dem	4,85 ml	3,17 ml	
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml	-	
0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)	-	1,25 ml	
10 % SDS	100 µl	50 µl	
Acrylamid/Bis 40 %	2,5 ml	0,5 ml	
10 % Ammoniumpersulfat	50 µl	25 µl	→ Start der
TEMED	5 µl	5 µl	Polymerisation

Tabelle 2 Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für den Western Blot.

Nach der Einleitung der Polymerisation wurden die zwei 10 % Acrylamid-Gele (**I**) mit einer 1 ml Eppendorf Pipette luftblasenfrei zwischen je zwei Glasplatten in einer Haltevorrichtung pipettiert. Ein Streifen von ca. 1 cm wurde nach oben für die Stacking Gele und die Kunststoffkämme freigelassen. Zum Schutz vor Austrocknung der Gele während der Polymerisation wurden 100 µl 100 % Isopropanol auf die Geloberflächen pipettiert. Nach ca. 30 Minuten wurde das Isopropanol sorgfältig mit Papierstreifen abgezogen. Anschließend wurden die Stacking Gele (**II**) nach Einleitung der Polymerisation mit einer 1 ml Eppendorf Pipette auf die 10 % Acrylamid-Gele pipettiert und je ein Kunststoffkamm wurde luftblasenfrei in jedes Stacking Gel geschoben. Nach der Polymerisation (ca. 15 Minuten) wurden die Kunststoffkämme vorsichtig entfernt und die zwischen den Glasplatten befindlichen Gele wurden in eine Halterung eingespannt, die in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurde. Der Raum zwischen den beiden Gelen wurde mit Lauf-Puffer pH 8,3 (Tris 125 mM, Glycin 960 mM, SDS 0,5 % (m/V)) aufgefüllt. Die äußere Kammer wurde mit Lauf-Puffer pH 8,3 bis ca. 1 cm unterhalb der Oberkante der Glasplatten befüllt. Die vorbereiteten Proben aus **A**) wurden in der errechneten Volumenmenge (max. 20 µl) in die einzelnen Geltaschen pipettiert. In einer zusätzlichen Geltasche wurden 3 µl des Protein Längenstandards (Kaleidoskop-Ladder, 7,6-216 kDa) pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde mit 200 V über einen Zeitraum von 40 Minuten durchgeführt.

C) Proteintransfer

Die Gele aus **B)** wurden vorsichtig aus den Glasplatten gelöst, einmal in Transfer-Puffer pH 8,3 (Tris 25 mM, Glycin 192 mM, Methanol 20 % (V/V)) gespült und luftblasenfrei in Gelsandwichhalterungen gelegt. Von oben nach unten betrachtet setzten sich die Sandwiches wie folgt zusammen:

- weiße Seite der Halterung,
- Schaumstoffschwamm (befeuchtet mit Transfer-Puffer pH 8,3),
- unbehandelter Whatman GF/C Filter (befeuchtet mit Transfer-Puffer pH 8,3),
- mit Methanol equilibrierte Membran (Hybond-P[®]),
- Gel, luftblasenfrei,
- unbehandelter Whatman GF/C Filter (befeuchtet mit Transfer-Puffer pH 8,3),
- Schaumstoffschwamm (befeuchtet mit Transfer-Puffer pH 8,3),
- schwarze Seite der Halterung.

Die Sandwichhalterungen wurden in die vorgesehene Kassette eingeschoben, die in die Elektrophoresekammer eingesetzt wurde. Die Kammer wurde mit 4 °C kaltem Transfer-Puffer pH 8,3 gefüllt, so dass die Sandwiches vollständig mit Puffer bedeckt waren. Zur Kühlung der Kammer wurde ein -20 °C kaltes Kühlelement eingesetzt und der Transfer-Puffer wurde mit einem Magnetrührer gerührt. Der Transfer erfolgte mit 100 Volt über einen Zeitraum von 90 Minuten.

D) Blocken der Membranen

Die Membranen aus **C)** wurden aus dem Sandwich genommen und mit der beladenen Seite nach innen zeigend in je ein 50 ml Greiner Röhrchen eingerollt, ohne dass sich Teile der Membran dabei überlagerten. Jeweils 15 ml 5 %ige TBST-Milch pH 7,6 (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1 % (V/V), fettfreies Milchpulver 5 % (m/V)) wurden in die Greiner Röhrchen pipettiert, und die Röhrchen wurden über Nacht bei 4 °C im Kühlraum rotiert.

E) Primärer Antikörper (Anti-CB₁-Rezeptor)

Die TBST-Milch wurde verworfen und es folgten drei Waschschrte (1x15, 1x10, 1x5 Minuten) mit je 10 ml TBST-Puffer pH 7,6 (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, Tween-20 0,1 % (V/V)) bei Raumtemperatur, wobei die Röhrcen rotiert wurden. Der primäre Antikörper wurde 1:20000 in 5 %iger TBST-Milch pH 7,6 verdünnt (1 µl in 20 ml TBST-Milch). Jeweils 10 ml der Antikörperverdünnung wurden in die Greiner Röhrcen pipettiert, und die Röhrcen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert.

F) Sekundärer Antikörper (goat anti rabbit)

Die Lösung des primären Antikörpers wurde verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit je 10 ml TBST-Puffer pH 7,6 bei Raumtemperatur, wobei die Röhrcen rotiert wurden. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 in 5 %iger TBST-Milch pH 7,6 verdünnt (2 µl in 20 ml TBST-Milch). Jeweils 10 ml der Antikörperverdünnung wurden in die Greiner Röhrcen pipettiert, und die Röhrcen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert. Die Lösung des sekundären Antikörpers wurde verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit TBST-Puffer pH 7,6.

G) Auswertung am LUMI-IMAGER

Die zwei Membranen aus **F)** wurden nacheinander entwickelt. Jeweils eine Membran wurde mit der beladenen Seite nach oben in eine Plastikschaie gelegt. Das Chemilumineszenz-System der Firma Roche ermöglicht die Detektion von Peroxidase-markierten sekundären Antikörpern unter Umsetzung folgender Reaktion:

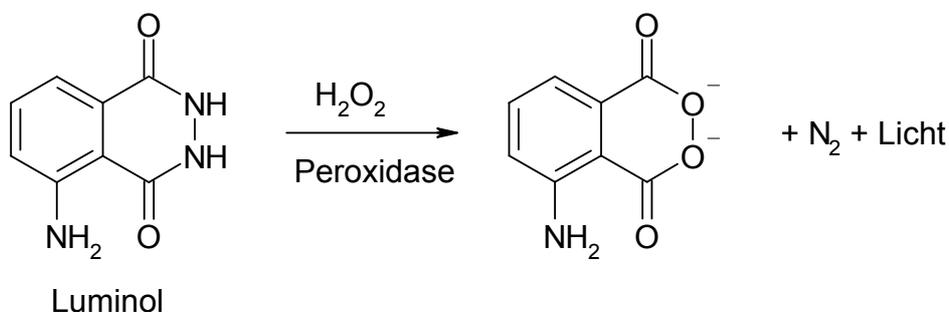


Abb. 9 Chemilumineszenz-Reaktion zur Detektion des sekundären Antikörpers.

Zusätzlich zu dem in der Lumineszenz-Substratlösung A enthaltenen Luminol ist 4-Jodophenol zugefügt, das zu einer Verstärkung der Lichtemission führt. 10 µl Startlösung B wurden zu 1000 µl Lumineszenz-Substratlösung A in ein 1 ml Eppendorf Gefäß gegeben und die Lösung wurde dreimal über Kopf gekippt. Die Membran wurde mit der Lösung benetzt und mit einer Pinzette eine Minute lang in der Plastikschaale bewegt, damit sich die Lösung gleichmäßig auf der Oberfläche verteilen konnte. Anschließend wurde die Membran in Frischhaltefolie eingeschlagen und mit der beladenen Seite nach oben auf den LUMI-IMAGER gelegt. Nach fünf Minuten Expositionszeit erfolgte die computergestützte densitometrische Auswertung der Banden mit der Software Lumi-Analyst[®] 3.0.

H) Strippen und Blocken der Membranen

Die Membranen wurden in zwei Plastikschaalen gelegt und zweimal für jeweils 10 Minuten bei 50 °C in 15 ml Strip-Puffer pH 6,7 (Tris 62,5 mM, MET 100 mM, SDS 2 % (m/V)) auf einem vorgeheizten Wasserbad hin und her bewegt. Anschließend wurden die Membranen mit der beladenen Seite nach innen zeigend in zwei 50 ml Greiner Röhrchen überführt. Es folgten zwei Waschschrte mit 10 ml 5 %iger TBST-Milch pH 7,6 für jeweils 10 Minuten, wobei die Röhrchen bei Raumtemperatur rotiert wurden. Die Membranen wurden anschließend wie unter **D)** beschrieben über Nacht geblockt.

I) Primärer Antikörper (Anti- α -Tubulin)

Die TBST-Milch wurde verworfen und es folgten drei Waschschrte mit je 10 ml TBST-Puffer pH 7,6 bei Raumtemperatur, wobei die Röhrchen rotiert wurden. Der primäre Antikörper wurde 1:20000 in 5 %iger TBST-Milch pH 7,6 verdünnt (1 µl in 20 ml TBST-Milch). Jeweils 10 ml der Antikörperverdünnung wurden in die Greiner Röhrchen pipettiert und die Röhrchen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert.

J) Sekundärer Antikörper (goat anti mouse)

Die Lösung des primären Antikörpers wurde verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit je 10 ml TBST-Puffer pH 7,6 bei Raumtemperatur, wobei die Röhrchen rotiert wurden. Der sekundäre Antikörper wurde 1:10000 in

5 %iger TBST-Milch pH 7,6 verdünnt (2 µl in 20 ml TBST-Milch). Jeweils 10 ml der Antikörperverdünnung wurden in die Greiner Röhrchen pipettiert und die Röhrchen wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur rotiert. Die Lösung des sekundären Antikörpers wurde verworfen und es folgten drei Waschschrte mit TBST-Puffer pH 7,6.

K) Auswertung am LUMI-IMAGER

Die Entwicklung und Auswertung der Membranen mit dem Anti- α -Tubulin-Antikörper erfolgte wie unter Punkt **G)** beschrieben. Die Expositionszeit betrug abweichend eine Minute.

L) Quantifizierung der CB₁-Rezeptor-Expression

Zur Ermittlung des Ausmaßes der CB₁-Rezeptor-Expression wurde mithilfe der Software Lumi-Analyst[®] der Quotient aus den densitometrisch ermittelten Werten für die CB₁-Rezeptor-Banden mit den dazugehörigen α -Tubulin-Banden gebildet.

3.4 Zellkultur

3.4.1 Verwendete Kulturmedien

Für die Kultur der humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) wurden DMEM mit zusätzlich HAM's F12 und 10 % hFKS verwendet.

Die Maus-Neuroblastoma x Ratte-Glioma Hybridzelllinie (NG 108-15) wurde in DMEM mit zusätzlich 10 % hFKS und einem die Differenzierung der Zellen unterdrückenden Substrat (HAT-Supplement) kultiviert.

Zum Ausschluss bakterieller Kontaminationen wurde den Kulturmedien 1 % PS-Lösung zugesetzt.

3.4.2 Mediumwechsel

Alle Arbeitsschritte - mit Ausnahme der Zentrifugationsschritte - wurden unter der Laminar-airflow durchgeführt. Das alte Medium wurde mithilfe einer hitzesterilisierten Edelstahlkanüle durch Vakuumabsaugung entfernt. Nach dem Erwärmen des neuen Mediums auf 37 °C auf dem Wasserbad wurde das Medium mithilfe einer wasserdampfsterilisierten 20 ml Vollpipette und einer automatischen Pipettierhilfe vorsichtig in die Kulturflasche eingefüllt. Folgende Volumina Kulturmedium wurden für die jeweiligen Kulturflaschen eingesetzt:

- kleine Flasche (25 cm²)
- mittlere Flasche (80 cm²)
- große Flasche (175 cm²)

Zur Entfernung von Antibiotikarückständen auf den Zelloberflächen unmittelbar vor einer Transfektion wurden die Zellen nach Entfernung des alten Mediums mit hitzesterilisiertem PBS-Puffer pH 7,4 gewaschen. Zu diesem Zweck wurden 3 ml PBS-Puffer pH 7,4 in eine große Kulturflasche mit einer 1 ml Eppendorf Pipette pipettiert, und die Flasche wurde vorsichtig geschwenkt, bis der komplette Boden mit PBS-Puffer pH 7,4 benetzt war. Der Puffer wurde anschließend mit der hitzesterilisierten Edelstahlkanüle durch Vakuumabsaugung entfernt. Anschließend wurde das antibiotikafreie Medium zugesetzt.

3.4.3 Zellen umsetzen / teilen / einfrieren / auftauen

Alle Arbeitsschritte wurden unter der Laminar-airflow durchgeführt. Das alte Medium wurde entfernt. Die Zellen wurden mit "Cell Dissociation Solution" (CDS) abgelöst. Zu diesem Zweck wurden folgende Volumina CDS in die unterschiedlichen Kulturflaschen pipettiert:

- kleine Kulturflasche (25 cm²): 0,5 ml
- mittlere Kulturflasche (80 cm²): 1 ml
- große Kulturflasche (175 cm²): 3 ml

Nach der Zugabe von CDS wurden die Flaschen geschwenkt, bis der komplette Boden mit CDS benetzt war. Die Flaschen wurden dann für fünf Minuten mit verschlossenen Deckeln in den Brutschrank bei 37 °C gestellt. Durch Schütteln der Flaschen wurden die Zellen abgelöst. Nach Ergänzung

des Volumens auf 15 ml mit neuem Kulturmedium wurden die Zellsuspensionen in 50 ml Greiner Röhrchen mithilfe von hitzesterilisierten Glaspipetten überführt, mit Deckeln verschlossen und in einer Beckman CL-GP Zentrifuge bei Raumtemperatur mit 1000 U/min für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden mit einer hitzesterilisierten Edelstahlkanüle durch Vakuumabsaugung entfernt. Die Zellpellets wurden im erforderlichen Volumen des neuen Kulturmediums resuspendiert und mit einer Vollpipette auf bereitgestellte, mit dem erforderlichen Volumen an Kulturmedium bestückten, neuen Kulturflaschen aufgeteilt.

Zum Einfrieren der Zellen - zwecks Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum - wurde das Pellet einer großen konfluenten Kulturflasche in 5 ml neuem Kulturmedium mit einem Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Kristallisationsschutz) resuspendiert. Die Suspension wurde mithilfe einer 5 ml Vollpipette zu gleichen Anteilen in drei Kryovials eingefüllt. Die Kryovials wurden in einem besonderen Behälter (Mr. Frosty) mit einer Temperaturabsenkung von 1 °C/min auf -80 °C gekühlt und bei -80 °C bis zu einem Jahr oder in flüssigem Stickstoff über einen längeren Zeitraum aufbewahrt.

Zum Auftauen der eingefrorenen Zellen wurde ein Kryovial auf dem vorgeheizten Wasserbad bei 37 °C unter ständigem Schwenken schnell aufgetaut. Die Zellsuspension wurde sofort in ein 50 ml Greiner Röhrchen überführt und mit auf 37 °C erwärmtem Kulturmedium auf 15 ml ergänzt. Die Zellen wurden wie oben beschrieben pellettiert und in eine neue Kulturflasche ausgesät.

3.4.4 Zellkultur von NG 108-15 Zellen in 6er-Well-Platten

Alle Arbeitsschritte - bis auf das Ernten der Zellen für die RNA-Isolierung und den Zentrifugationsschritt - wurden unter der Laminar-airflow durchgeführt. Für die Experimente der Quantifizierung der CB₁-Rezeptor-mRNA-Expression und der Transfektion von NG 108-15 Zellen mit der siRNA wurden NG 108-15 Zellen in 6er-Well-Platten kultiviert. Das Kulturmedium einer 90 % konfluenten großen Kulturflasche wurde entfernt. Die adhärennten Zellen wurden, wie oben beschrieben, mit PBS-Puffer pH 7,4 gewaschen und mit CDS abgelöst. Nach dem Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in

100 ml Kulturmedium ohne PS mithilfe einer 20 ml Glaspipette resuspendiert. Je 2 ml der Zellsuspension wurden in ein Well von insgesamt sechs 6er-Well-Platten pipettiert. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und erhielten bei Bedarf 2 ml neues Kulturmedium (ohne PS) je Well. Das alte Medium wurde durch Vakuumabsaugung mithilfe einer hitzesterilisierten Stahlkanüle entfernt. Bei den Experimenten zur Quantifizierung der CB₁-Rezeptor-mRNA-Expression und zur Transfektion der NG 108-15 Zellen mit der siRNA wurden die Zellen jeweils einer Well-Reihe (obere Reihe = Kontrolle, untere Reihe = siRNA) von zwei 6er-Well-Platten zu den angegebenen Zeitpunkten mithilfe einer 1 ml Eppendorf Pipette abgelöst, in 15 ml Greiner Röhrchen gepoolt und bis zur im Anschluss durchgeführten mRNA-Isolierung bzw. Membranaufbereitung auf Eis gestellt.

3.5 Bradford-Proteinbestimmung

Die Methode zur Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) beruht auf der Farbänderung des roten Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G 250 bei der Ausbildung eines blauen stabilen Protein-Farbstoff-Komplexes. Zur Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen verwendet:

A) 0,1 g Coomassie Brilliant Blue G 250 wurden in 50 ml 50 %igem Ethanol (V/V) gelöst. 100 ml 85 %ige Phosphorsäure wurden dazugegeben und es wurde mit Aqua dem auf 250 ml aufgefüllt. Diese Stammlösung wurde vor dem Erstgebrauch vier Wochen im Kühlschrank bei 4 °C stehen gelassen.

B) Ein Volumenteil **A)** wurde mit 16 Volumenteilen Aqua dem gemischt und die Lösung wurde durch einen Faltenfilter filtriert.

Maximal 0,15 ml Proteinlösung (Probe oder BSA-Standard), die 1 bis höchstens 15 µg Protein enthalten konnte, wurde in Sarstedt Kunststoff-Küvetten pipettiert, auf 0,15 ml mit Aqua dem aufgefüllt und mit 2,0 ml der Arbeitsverdünnung **B)** gemischt. Nach fünf bis 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Absorption im Beckman Spektralphotometer bei 595 nm gemessen. Die Kalibriergerade wurde mit einer 0,1 µg/µl BSA-Lösung in Aqua dem im Bereich von 1 bis 15 µg Protein aufgenommen. Zur Bestimmung des Leerwertes wurden 0,15 ml Aqua dem in einer Küvette mit

2 ml Arbeitsverdünnung **B**) gemischt. Die Kalibriergerade wurde in Doppelbestimmung erstellt und die Absorption der Proben in Dreifachbestimmung gemessen.

3.6 Statistik

Alle Ergebnisse in Form von Zahlenwerten werden in der vorliegenden Arbeit als arithmetischer Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus n Messwerten (Experimenten) angegeben. Der arithmetische Mittelwert ist definiert als:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \text{Gleichung (19)}$$

\bar{x} : Arithmetischer Mittelwert

n : Anzahl der Messwerte (Experimente)

x_i : Einzelmesswert (Einzelexperiment)

Die Standardabweichung s wurde wie folgt berechnet:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad \text{Gleichung (20)}$$

Der Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wurde wie folgt berechnet:

$$SEM = \frac{s}{\sqrt{n}} \quad \text{Gleichung (21)}$$

Zur Überprüfung der besseren Eignung unterschiedlicher Kurvenanpassungen mittels computergestützter Regression wurde ein F-Test durchgeführt. Der F-Test basiert auf der folgenden Gleichung:

$$F = \frac{\frac{SS_1 - SS_2}{df_1 - df_2}}{\frac{SS_2}{df_2}} \quad \text{Gleichung (22)}$$

ss₁: Summe der Abweichungsquadrate der Kurvenanpassung 1

ss₂: Summe der Abweichungsquadrate der Kurvenanpassung 2

df₁: Anzahl der Freiheitsgrade der Kurvenanpassung 1

df₂: Anzahl der Freiheitsgrade der Kurvenanpassung 2

Zum Vergleich von Mittelwerten aus unterschiedlichen Versuchsreihen wurde der zweiseitige gepaarte oder ungepaarte t-Test durchgeführt. Bei allen statistischen Tests wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p = 0,05$ zugrunde gelegt, d.h. ein Wert von $p < 0,05$ wurde als signifikant betrachtet.

3.7 Verwendete Substanzen in alphabetischer Reihenfolge

40 % Acrylamid/Bis Lösung, 29:1 (3,3 % C), Acrylamid: N,N'-Methylen-bisacrylamid, Katalog-Nr. 161-0146, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Agarose, Katalog-Nr. 162-0126, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

4-(2-Aminoethyl)phenylsulfonylfluorid (AEBSF), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Ammoniumpersulfat, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

BamHI, Restriktionsenzym, Konzentration 10 U/μl, Roche, Mannheim, Deutschland

Bio-Rad Probenpuffer (Laemmli[®]), Katalog-Nr. 161-0737, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche, Indianapolis, USA

Cannabidiol, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Cell Dissociation solution (CDS), Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Coomassie Brilliant Blue (G250), C.I. 42655 Serva, Heidelberg, Deutschland

1(-)-cis-3-[2-Hydroxy-4-(1,1-dimethylheptyl)phenyl]-trans-4-(3-hydroxypropyl) cyclohexanol (CP 55,940), Tocris-Cookson / Biotrend, Köln, Deutschland

[³H]-CP 55940 [Seitenkette -2,3,4(N)-³H], Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

[Tyrosyl-3,5-³H(N)]-DAMGO, Tyr^{*}-D-Ala-Gly-N-Methyl-Phe-Gly-ol, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

Diethylpyrocarbonat (DEPC), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

DMEM/HAM's, Dulbeccos's Modified Eagle's Medium nutrient mixture F-12 HAM, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Dimethylsulfoxid (DMSO), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

EcoRI, Restriktionsenzym, Konzentration 40 U/μl, Roche, Mannheim, Deutschland

Essigsäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethylenglycol-bis-(β-aminoethylether) N, N, N', N' tetraessigsäure (EGTA), Merck, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromid (EtBr), Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Fötale Kälberserumalbumin (FKS), Sigma, München, Deutschland

Gel-Loading-Buffer, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Glycin, Merck, Darmstadt, Deutschland

Goat Anti-Mouse, IgG (H+L)-HRP Conjugate, Katalog-Nr. 170-6516, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Goat Anti-Rabbit, IgG (H+L)-HRP Conjugate, Katalog-Nr. 170-6515, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

[³H]-GR 65630, 3-(5-Methyl-1H-imidazol-4-yl)-1-(1-methyl-³H₃-1H-indol-3-yl)-1-propanon, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

Guanosin-5'-diphosphat-natriumsalz, Sigma, München, Deutschland

Guanosin-5'-O-(3-thiotriphosphat)-tetralithiumsalz, (GTPγS), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Guanosin-5'-γ-[³⁵S]thiotriphosphat-tetralithiumsalz, [³⁵S]-GTPγS, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

HAT-Supplement, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Hexaprimer, p(dN)₆, Roche, Mannheim, Deutschland

Isopropylthiogalactosid (IPTG), Sigma-Aldrich, München

Kaleidoskop Prestained Standard, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Kaliumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Kaliumdihydrogenphosphat, Merck, Darmstadt, Deutschland

LB Agar, Katalog-Nr. L-2897, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

LB Broth powder, Katalog-Nr. L-3022, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Lipofectamine[®] 2000, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Lumagel-Safe[®], Lumac*LSC, Groningen, Niederlande

Magnesiumchlorid-hexahydrat, Merck, Darmstadt, Deutschland

3-Tropanyl-3,5-dichlorbenzoat (MDL 72222), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2-Mercaptoethanol, Sigma-Aldrich, München

Naloxon-hydrochlorid, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Natriumchlorid, Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (SDS)-Lösung 10 %, Katalog-Nr. 161-0416, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Non fat dry milk (fettfreie Trockenmilch), Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Oligofectamine[®], Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

OPTI-Mem[®], GIBCO-BRL, Gaithersbury, USA

pcDNA 3.1, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Penicillin-Streptomycin Lösung (PS, Penicillin 5000 IE/ml und Streptomycin 5 mg/ml in NaCl 0,9 %), Sigma, München, Deutschland

Polyethylenimin, Konzentration 50 % m/V in Aqua dem, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Quantum-Prep[®] Midi-Prep, Katalog-Nr. 732-6120, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Restriktionspuffer TpB, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

Rinderserumalbumin (Bovine-Serum Albumin, BSA), 98-99 % Albumin, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

RNase-Inhibitor, Konzentration 40 U/µl, Roche Diagnostics, Indianapolis, USA

RT-AMV, Reverse Transkriptase AMV (avian myeloblastosis virus), Roche, Mannheim, Deutschland

RT-AMV Reaktionspuffer (250 mM Tris-HCl, 40 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 5 mM Dithio-1,4-treitol, pH 8,5), Roche, Mannheim, Deutschland

Saccharose, Merck, Darmstadt, Deutschland

Salzäure, Merck, Darmstadt, Deutschland

siRNA (short interfering RNA), gerichtet gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA der Ratte, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland

S.O.C. Medium, Katalog-Nr. 15544-034, GIBCO Life-Technologies, New York, USA

N-Piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorphenyl)-4-methyl-3-pyrazolcarboxamid (SR 141716A), Sanofi, Montpellier, Frankreich

[³H]-SR 141716A, Perkin Elmer Life Sciences, Boston, USA

Taq DNA Polymerase, Konzentration 5 U/µl, Roche, Mannheim, Deutschland

Taq DNA Polymerase Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl, pH 8,3), Roche, Mannheim, Deutschland

TEMED, N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Δ^9 -THC, Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Tripure[®] Reagenz, Boehringer, Mannheim, Deutschland

Trizma Base (Tris), Sigma, München, Deutschland

R(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-[(morpholinyl)methyl]pyrrolo[1,2,3-de]-1,4-benzoxacin-yl)-(1-naphthalenyl)methanonmesylat (WIN 55,212-2), RBI /Biotrend, Köln, Deutschland

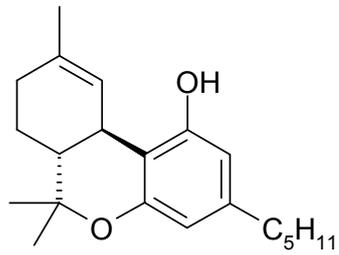
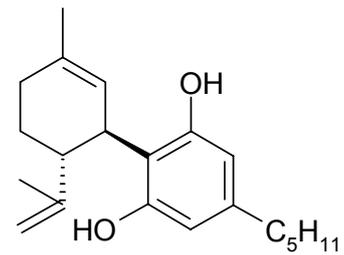
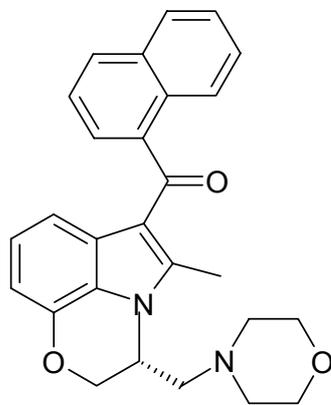
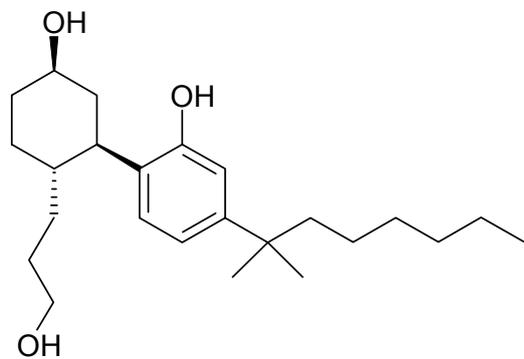
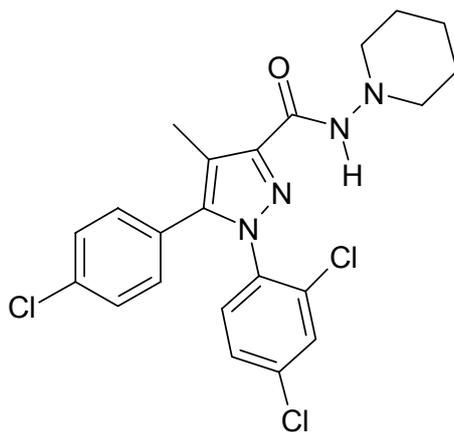
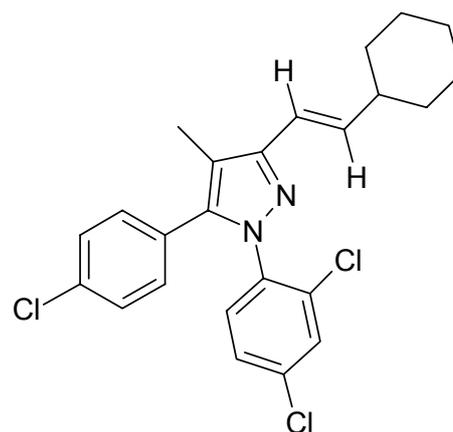
5-(4-Chlorophenyl)-3-[(E)-2-cyclohexylethenyl]-1-(2,4-dichlorphenyl)-4-methyl-1H-pyrazol (VCHSR) (Herbert H. Seltzman, RTI International, Research Triangle Park, NC, USA)

5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid (X-Gal), Sigma-Aldrich, München, Deutschland

Die NG 108-15 und die HEK 293 Zellen für die Zellkultur wurden von ECACC, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, England, bezogen.

Die männlichen NMRI-Mäuse, die männlichen Wistar-Ratten sowie die männlichen Dunkin-Hartley Meerschweinchen wurden von Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland, bezogen.

Die Primer wurden bei MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland, bestellt.

3.8 Strukturformeln der verwendeten CB₁-Rezeptor-Liganden**Δ⁹-THC****CBD****WIN 55,212-2****CP 55,940****SR 141716A****VCHSR****Abb. 10** Strukturformeln der verwendeten CB₁-Rezeptor-Liganden.

3.9 Verwendete Geräte und Software in alphabetischer Reihenfolge

Analysenwaage Sartorius 2004 MP6, Göttingen, Deutschland

Beckman Spektralphotometer, Typ DU[®]-64, München, Deutschland

Beckman Kühlzentrifuge, Typ J2-21 GJ 2559, München, Deutschland

Beckman Zentrifuge, Typ CL-GP, München, Deutschland

Blast 2 Sequences (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/bl2.html)

Cell Harvester Inotech IH 120, Wohlen, Schweiz

Eppendorf Gefäße mit Deckel, 1 und 2 ml, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Kühlzentrifuge, Typ 5402, Hamburg, Deutschland

Eppendorf Zentrifuge, Typ 5415C, Hamburg, Deutschland

Flüssigkeitsszintillationszähler Beckman LS 6000 TA, Fullerton, CA, USA

GF/B Filter Whatman Nr. 1821915, Maidstone, England

GF/C Filter Whatman Nr. 1822915, Maidstone, England

GraphPad Prism[®] 3.0, San Diego, Calif., USA

Greiner Röhrchen, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Homogenisator Potter-Elvehjem Braun 853302/4, Melsungen, Deutschland

Hybond-P[®], Nitrocellulose-Filter, Amersham Life Sciences, England

Küvetten Sarstedt 67.741, Nümbrecht, Deutschland

Laborwaage Sartorius L 610, Göttingen, Deutschland

Lumi-Imager F1, Boehringer, Mannheim, Deutschland

Lumi-Analyst[®] 3.0, Boehringer Mannheim, Deutschland

Magnetrührer IKA RH 464995, Staufen i. Br., Deutschland

Mikroliterpipette Eppendorf Nr. 4780, Hamburg, Deutschland

Mikrozentrifuge, Typ MC-13, Heraeus Instruments, Osterode, Deutschland

Mini Poly-Q-Vials[®] Beckman Nr. 592928, München, Deutschland

Multipette Eppendorf Nr. 4710 und passende Pipetten, Hamburg, Deutschland

Parafilm[®] M, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA

pH-Meter Knick 762, München, Deutschland

pH 211 Microprocessor pH Meter, Hanna Instruments, Kehl am Rhein, Deutschland

Pipetten Eppendorf, 10-100 µl, 100-1000 µl, 1000-5000 µl, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Pumpe Inotech F 923, Wohlen, Schweiz

Reaktionsgefäße 2 ml Biozym 710075, Oldendorf, Deutschland

Reaktionsgefäße 1,5 ml Eppendorf Nr. 3810, Hamburg, Deutschland

Reaktionsgefäße 2 ml Eppendorf Nr. 2343, Hamburg, Deutschland

Schüttler Köttermann 4010, Hänigsen, Deutschland

Thermo Cycler, Hybaid, Heidelberg, Deutschland

Thermostat Julabo, Typ MP, Seelbach, Deutschland

Vakuum Controller Inotech IH 195, Wohlen, Schweiz

Vortex Mixer Heidolph Reax 2000, München, Deutschland

Wasserbad GFL 1003, Burgwedel, Deutschland

Wasserbad Memmert WB 10, Memmert GmbH und Co. KG, Schwabach,
Deutschland

Zellkultur Flaschen und Platten, NUNC GmbH und Co. KG, Wiesbaden,
Deutschland

4 Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der methodischen Experimente

4.1.1 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf das Ausmaß der [³⁵S]-GTPγS-Bindung

Die Abb. 11 zeigt die Dosis-Wirkungskurven für den Effekt steigender Konzentrationen von WIN 55,212-2 auf die Zunahme der spezifischen [³⁵S]-GTPγS-Bindung in Prozent der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung (Kontrolle) am CB₁-Rezeptor des zerebralen Kortex der Maus, die mit zwei unterschiedlichen Membranpräparationen erhalten wurden. Beide Membranpräparationen wurden, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, hergestellt, und die eigentlichen Bindungs-Experimente wurden unter identischen Bedingungen durchgeführt. Zur Auswertung der Messergebnisse mittels computergestützter nicht-linearer Regression unter Verwendung der Software GraphPad Prism[®] und der Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve wurde die spezifisch gebundene Radioaktivität gegen den Logarithmus der Konzentration von WIN 55,212-2 in ein Diagramm aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μM unmarkiertem GTPγS bestimmt und betrug etwa 29 % der gesamtgebundenen Radioaktivitätsmenge (Kontrolle).

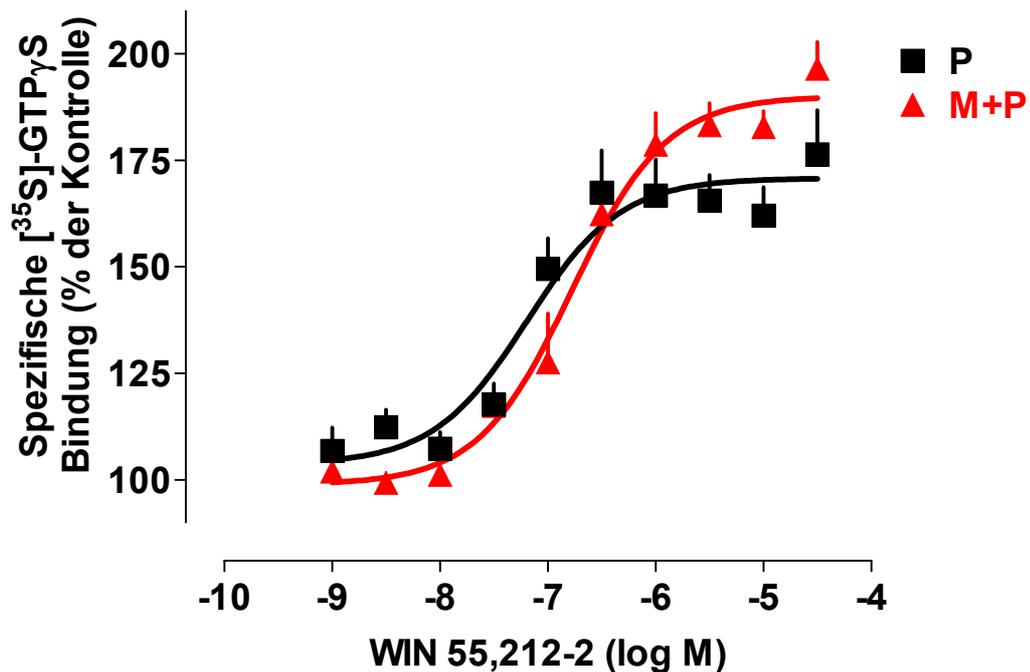


Abb. 11 Dosis-Wirkungskurven für den Effekt steigender Konzentrationen von WIN 55,212-2 auf die Zunahme der spezifischen $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S-Bindung in Prozent der basalen Bindung (Kontrolle) am CB_1 -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Maus, die entweder nur mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator hergestellt (P) oder zusätzlich davor bei -80°C schock-gefroren und anschließend gemörsert wurden (M+P).

Die Tabelle 3 zeigt die maximale Zunahme der $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S-Bindung durch WIN 55,212-2 am CB_1 -Rezeptor, die aus der nicht-linearen Kurvenanpassung (siehe Abb. 11) aus der Spanne zwischen dem unteren und dem oberen Plateau der Kurve als Mittelwert aus acht Einzelerperimenten in Doppelbestimmung für jede Membranpräparation ermittelt wurde. Zum Vergleich der Mittelwerte der Zunahme der $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S-Bindung, der pEC_{50} -Werte und der unspezifischen Bindung, die für beide Membranpräparationen aus den Einzelerperimenten ermittelt wurden, wurde ein zweiseitiger gepaarter t-Test durchgeführt. Es stellte sich heraus, dass das intensivere Homogenisationsverfahren (M+P) zu einer signifikant höheren maximalen Zunahme der $[^{35}\text{S}]$ -GTP γ S-Bindung führte als das einfachere Verfahren (P). Hinsichtlich des pEC_{50} -Wertes und der unspezifischen Bindung ergaben sich hingegen keine Unterschiede.

	P	M+P	(M+P)/P	t-Test
Maximale Zunahme der spezifischen [³⁵ S]-GTPγS-Bindung	69 ± 8 %	92 ± 5 %	1,33	p = 0,003
pEC ₅₀ -Wert	7,13 ± 0,11	6,83 ± 0,07	0,96	p = 0,108
unspezifische Bindung in % der gesamtgebundenen Radioaktivitätsmenge	29 ± 3 %	28 ± 2 %	0,97	p = 0,729

Tabelle 3 Einfluss von zwei Homogenisationsverfahren auf die maximale Zunahme der spezifischen [³⁵S]-GTPγS-Bindung durch WIN 55,212-2 im Vergleich zur basalen Bindung (Kontrolle), die pEC₅₀-Werte und die unspezifische Bindung. (P) steht für Membranen, die nur mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator, (M+P) für Membranen, die zusätzlich zuvor bei -80 °C schockgefroren und gemörsert wurden.

4.1.2 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf die homologe Kompetition von [³H]-SR 141716A

Die Abb. 12 zeigt die beiden Verdrängungskurven, die mit 0,5 nM [³H]-SR 141716A und mit 10 aufsteigenden Konzentrationen von unmarkiertem SR 141716 A in vier Experimenten in Dreifachbestimmung mit zwei unterschiedlichen Membranpräparationen erhalten wurden. Bei einer Präparation wurde ein Ultra-Turrax sowie zusätzlich ein Potter-Elvehjem Homogenisator (T+P; siehe Kapitel 3.1.3), bei der anderen ausschließlich ein Potter-Elvehjem Homogenisator verwendet (P; siehe Kapitel 3.1.4). Beide Membranpräparationen wurden parallel unter identischen Bedingungen in den Bindungs-Experimenten eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.2.1).

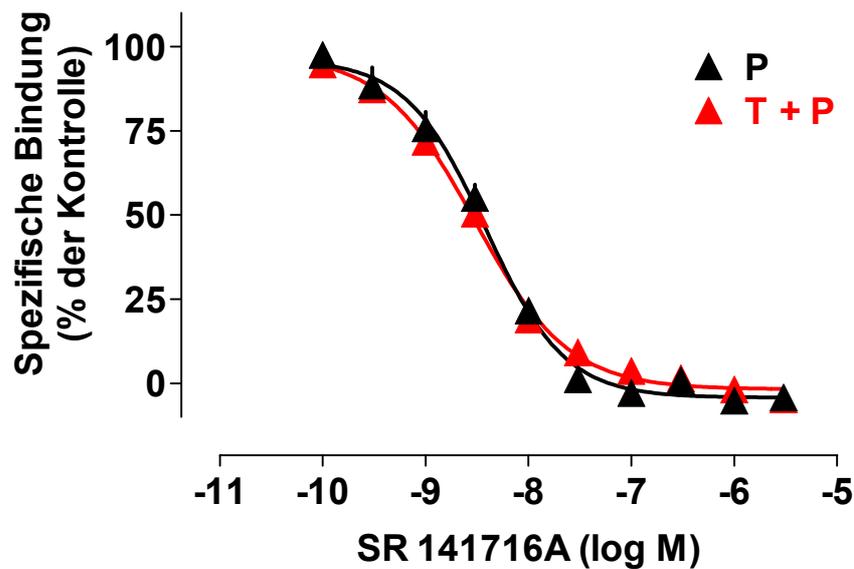


Abb. 12 Zwei Verdrängungskurven von [³H]-SR 141716A mit unmarkiertem SR 141716A am CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Maus, die zwecks Homogenisierung einmal ausschließlich mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator (P) und einmal zusätzlich mit einem Ultra-Turrax behandelt wurden (T+P).

Die Tabelle 4 fasst die Ergebnisse der Bindungs-Experimente zusammen. Für keinen der vier untersuchten Parameter ergab sich ein Unterschied.

	P	T+P	t-Test
IC₅₀	4,0 ± 0,7 nM	3,4 ± 0,6 nM	p = 0,49
K_D	3,5 ± 0,7 nM	2,9 ± 0,6 nM	p = 0,49
Hill-Koeffizient	1,1 ± 0,1	1,0 ± 0,1	p = 0,62
B_{max} (fmol/mg Protein)	442 ± 68	449 ± 75	p = 0,90

Tabelle 4 Einfluss von zwei Homogenisationsverfahren auf die IC₅₀-, K_D-, B_{max}-Werte und Hill-Koeffizienten von homologen Kompetitionsexperimenten mit unmarkiertem SR 141716A gegen [³H]-SR 141716A. (P) steht für Membranen, die nur mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator, (T+P) für Membranen, die zusätzlich mit einem Ultra-Turrax homogenisiert wurden.

4.2 Ergebnisse der Radioligand-Bindungs-Experimente

4.2.1 Wirkung von Cannabinoiden auf die [³H]-SR 141716A-Bindung im zerebralen Kortex des Meerschweinchens

4.2.1.1 Sättigungs-Bindung

Die Abb. 13 zeigt die Sättigungs-Bindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens, die als Gesamtkurve aus vier Experimenten in Doppelbestimmung erhalten wurde. Zur computer-gestützten nicht-linearen Regression wurde die Funktion der einseitigen Bindung (Hyperbel) angewendet. Den entsprechenden Rosenthal-Plot zeigt Abb. 14.

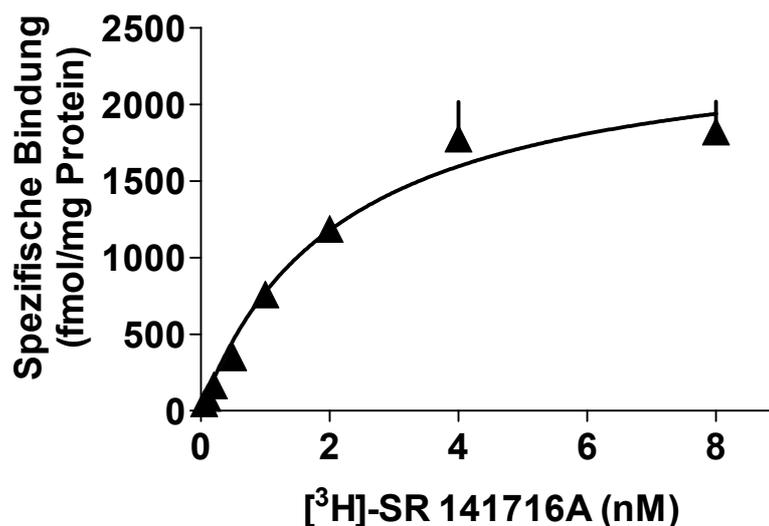


Abb. 13 Sättigungs-Bindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.

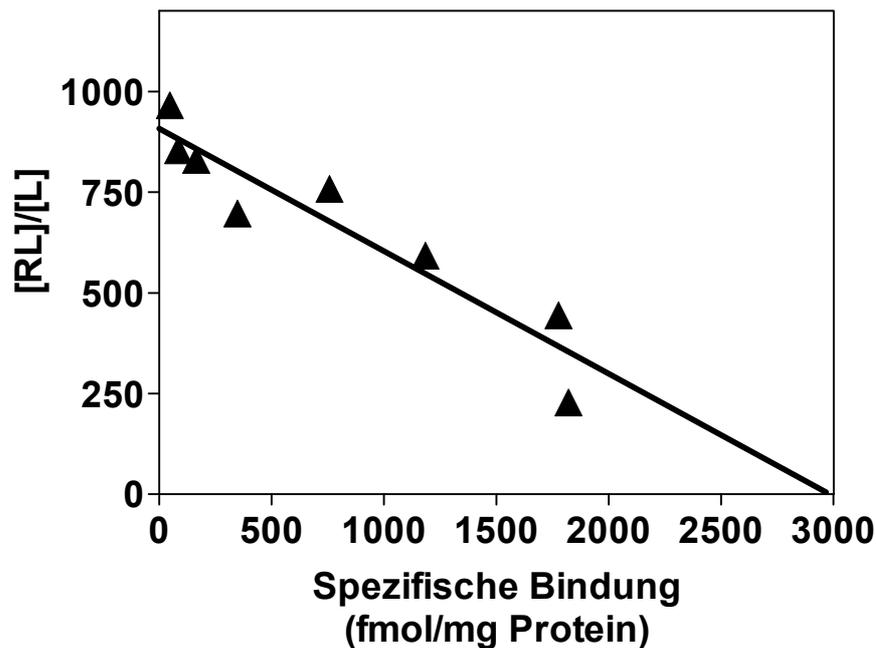


Abb. 14 Rosenthal-Plot der Sättigungs-Bindungsisotherme von [^3H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens. $[\text{RL}]/[\text{L}]$ ist der Quotient aus den Konzentrationen des gebundenen (RL) und des freien Radioliganden (L).

Der K_D - und der B_{max} -Wert für [^3H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens wurden nicht aus dem Rosenthal-Plot der Gesamtkurve, sondern für jedes der vier Experimente aus der nicht-linearen Regression der Sättigungs-Bindungsisotherme ermittelt und anschließend als Mittelwert aus den vier Experimenten berechnet. Die Ergebnisse zeigt die Tabelle 5.

K_D (nM)	$2,12 \pm 0,56$
B_{max} (fmol/mg Protein)	2340 ± 424

Tabelle 5 Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D von [^3H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens sowie maximale Bindungskapazität B_{max} .

4.2.1.2 Kompetitions-Experimente

Die Abb. 15 zeigt die Verdrängungskurven, die aus vier Kompetitions-Experimenten in Dreifachbestimmung mit 0,5 nM [³H]-SR 141716A und steigenden Konzentrationen von vier Cannabinoid-Rezeptor-Liganden am CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens erhalten wurden. Im Einzelnen wurden die Cannabis-Inhaltsstoffe Δ⁹-THC und CBD sowie der inverse CB₁-Rezeptor-Agonist (unmarkiertes) SR 141716A und der neutrale CB₁-Rezeptor-Antagonist VCHSR untersucht.

Zur computergestützten nicht-linearen Regression mit der Software GraphPad Prism[®] wurde die Funktion der einseitigen Competition verwendet, die zu signifikant besseren Kurvenanpassungen führte als die Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung.

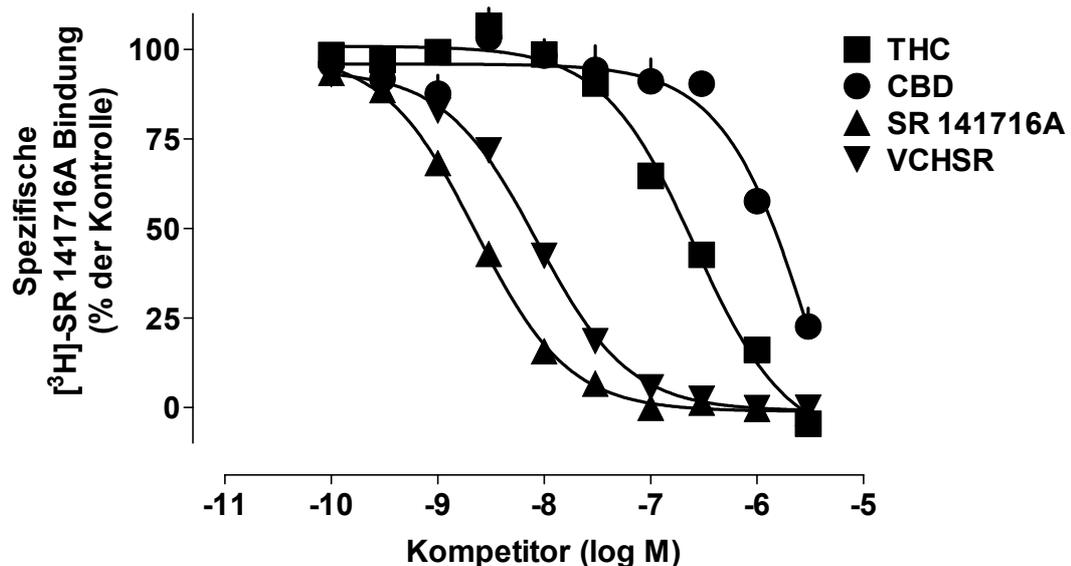


Abb. 15 Verdrängung von 0,5 nM [³H]-SR 141716A vom CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens.

Die IC₅₀-Werte wurden aus der nicht-linearen Regression ermittelt. Aus den IC₅₀-Werten wurden die Bindungsaffinitäten (K_i-Werte) mithilfe der Gleichung (11) durch Einsetzen der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D (siehe Kapitel 4.2.1.1) berechnet. Aus dem IC₅₀-Wert der homologen Kompetitions-Experimente wurde die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D von SR 141716A mithilfe der Gleichung (12) bestimmt. Aus dem zuletzt

genannten K_D -Wert wurde der zugehörige B_{max} -Wert mithilfe der Gleichung (13) bestimmt. Die Ergebnisse der Kompetitions-Experimente zeigt die Tabelle 6. Der Anteil der unspezifischen Bindung an der totalen Bindung wurde mit 3 μ M CP 55,940 bestimmt und lag für 0,5 nM [3 H]-SR 141716A bei 27 %.

Kompetitor	
heterolog	K_i (nM)
Δ^9 -THC	240,7 \pm 8,9
CBD	2954 \pm 727
VCHSR	7,8 \pm 1,3
homolog	
SR 141716A	IC_{50} (nM) 2,40 \pm 0,35
	K_D (nM) 1,90 \pm 0,35
	B_{max} (fmol/mg Protein) 1225 \pm 78

Tabelle 6 K_i - und IC_{50} -Werte aus den Kompetitions-Experimenten mit 0,5 nM [3 H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens sowie K_D - und B_{max} -Werte von [3 H]-SR 141716A, die aus der homologen Kompetition ermittelt wurden.

Die Tabelle 7 zeigt den Vergleich der Werte für die Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D und die Anzahl der maximalen Bindungsstellen B_{max} von [3 H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens aus den Sättigungs-Bindungs- und den homologen Kompetitions-Experimenten. Die K_D -Werte unterschieden sich nicht voneinander, während der B_{max} -Wert bei der Sättigungs-Bindung höher war als derjenige bei der homologen Kompetition.

[³H]-SR 141716A	Sättigung	Kompetition	t-Test
K_D (nM)	2,12 ± 0,56	1,90 ± 0,35	p = 0,677
B_{max} (fmol/mg Protein)	2340 ± 424	1225 ± 78	p = 0,051

Tabelle 7 Vergleich der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D und der maximalen Bindungskapazitäten B_{max} von [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens aus den Sättigungs-Bindungs- und den homologen Kompetitions-Experimenten.

4.2.2 Wirkung von Cannabinoid-Rezeptor-Liganden auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung im Hippocampus des Meerschweinchens

Die Abb. 16 zeigt die Veränderung der totalen basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung unter dem Einfluss steigender Konzentrationen von SR 141716A und VCHSR. Der Basalwert der [³⁵S]-GTPγS-Bindung wurde in Abwesenheit eines Cannabinoid-Rezeptor-Liganden ermittelt und wurde gleich Null Prozent gesetzt. Als 100-Prozent-Wert wurde die Höhe des Effekts festgelegt, die eine Konzentration von 3 μM WIN 55,212-2 auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung hat. Die Ergebnisse wurden aus drei Experimenten in Dreifachbestimmung ermittelt.

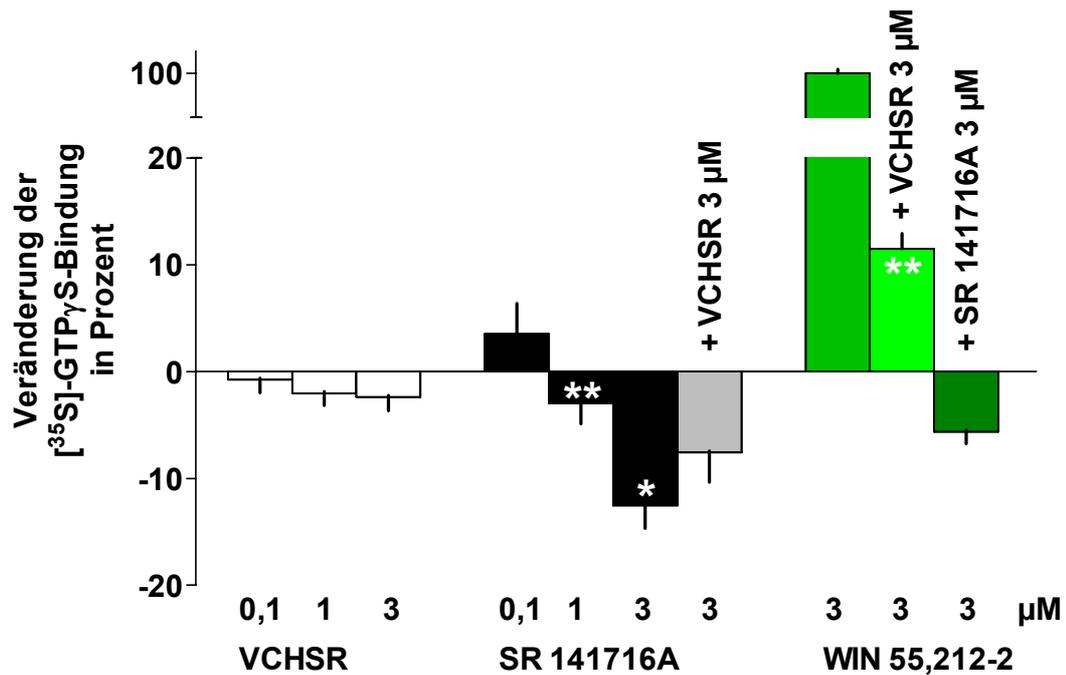


Abb. 16 Veränderung der [³⁵S]-GTPγS-Bindung durch VCHSR, SR 141716A und WIN 55,212-2 sowie durch Kombinationen dieser. * p < 0,05, ** p < 0,03, verglichen mit dem Basalwert der [³⁵S]-GTPγS-Bindung (Kontrolle).

Die Abb. 16 zeigt, dass VCHSR keine signifikante Wirkung auf die basale [³⁵S]-GTPγS-Bindung hatte, während SR 141716A eine schwache Hemmung hervorrief. Die steigernde Wirkung von WIN 55,212-2 auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung wurde durch VCHSR und SR 141716A extrem stark abgeschwächt bzw. ganz aufgehoben. VCHSR führte in der Tendenz auch zu einer Abschwächung der hemmenden Wirkung von SR 141716A.

4.2.3 Bindungsstudien mit [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor

4.2.3.1 Zeitverlauf der Assoziation von 0,5 nM [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte

Die Abb. 17 zeigt den Zeitverlauf der Assoziation von 0,5 nM [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte als Gesamtkurve, die aus drei Experimenten in Doppelbestimmung ermittelt wurde. Zur computergestützten nicht-linearen Regression mit der Software GraphPad Prism[®] wurde die Funktion der monophasischen Assoziation verwendet. Die

Halbwertszeit der Assoziation $t_{1/2on}$ wurde aus der nicht-linearen Regression ermittelt. Die Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{on} wurde mithilfe der Gleichung (15) aus der beobachteten Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{appon} und der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{off} (siehe Kapitel 4.2.3.3) berechnet.

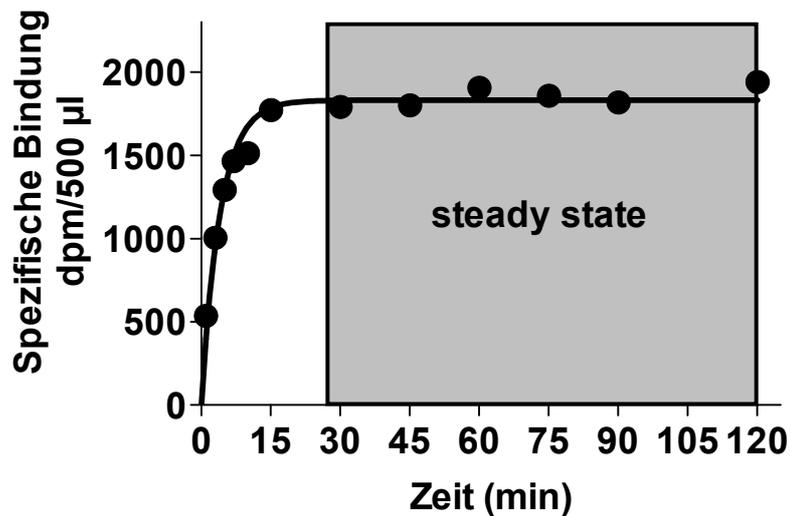


Abb. 17 Zeitverlauf der Assoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte. Der grau unterlegte Kasten markiert den Zeitraum, in dem keine Änderung der [^3H]-DAMGO-Bindung mehr beobachtet werden konnte (Assoziations-Geschwindigkeit = Dissoziations-Geschwindigkeit \rightarrow steady state).

Die Tabelle 8 fasst die Ergebnisse der Assoziations-Experimente zusammen, die mit 0,5 nM [^3H]-DAMGO erhalten wurden.

$t_{1/2on}$ (min)	$2,69 \pm 0,09$
k_{appon} (min^{-1})	$0,258 \pm 0,009$

Tabelle 8 Halbwertszeit der Assoziation $t_{1/2on}$ von 0,5 nM [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor der Ratte und scheinbare Assoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{appon} .

4.2.3.2 Sättigungs-Bindung mit [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte

Die Abb. 18 zeigt die Sättigungs-Bindungsisotherme, die mit aufsteigenden Konzentrationen von [³H]-DAMGO als Gesamtkurve aus vier Experimenten in Dreifachbestimmung erhalten wurde. Der entsprechende Rosenthal-Plot ist in der Abb. 19 dargestellt.

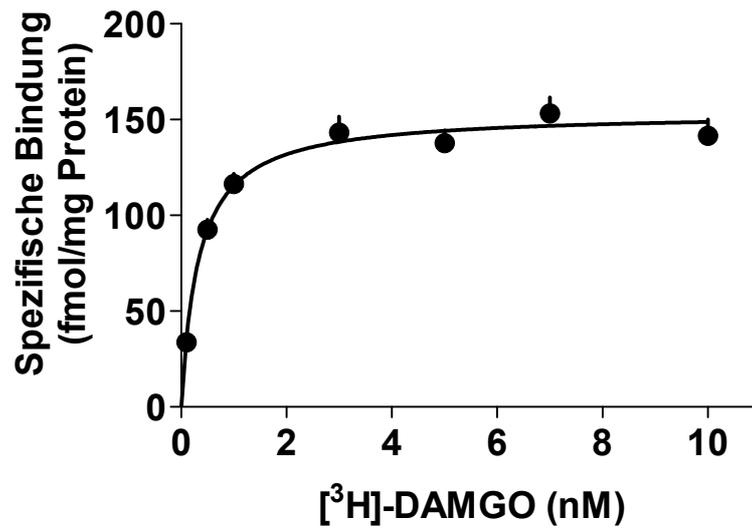


Abb. 18 Sättigungs-Bindungsisotherme der spezifischen Bindung von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.

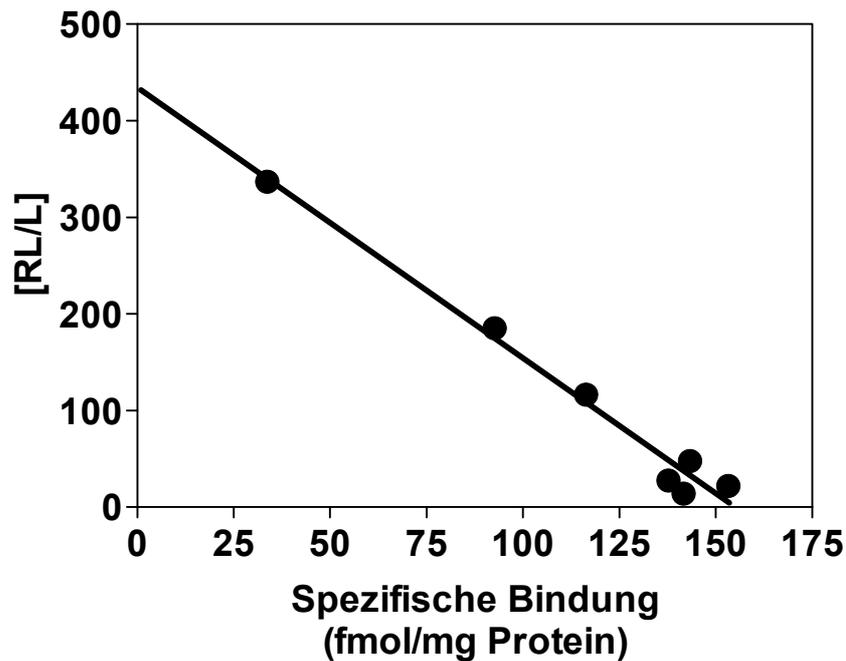


Abb. 19 Rosenthal-Plot der Sättigungs-Bindungsisotherme von [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte. $[\text{RL}]/[\text{L}]$ ist der Quotient aus den Konzentrationen des gebundenen (RL) und des freien Radioliganden (L).

Der K_D - und der B_{max} -Wert für [^3H]-DAMGO wurden nicht aus dem Rosenthal-Plot, sondern als Mittelwert aus den nicht-linearen Regressionen der Einzelexperimente ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 9 zusammengefasst.

K_D (nM)	$0,68 \pm 0,02$
B_{max} (fmol/mg Protein)	$203,1 \pm 7,0$

Tabelle 9 K_D -Wert von [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte sowie maximale Bindungskapazität B_{max} aus Sättigungs-Bindungs-Experimenten.

4.2.3.3 Dissoziationskinetik von 0,5 nM [^3H]-DAMGO

Die Abb. 20 zeigt den Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO nach der Zugabe des Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon in der Endkonzentration von 10 μM in Abwesenheit einer Testsubstanz (Kontroll-

Experiment). Zur Auswertung der Experimente wurde die zum jeweiligen Zeitpunkt gebundene Radioaktivität in Prozent der maximalen Bindung gegen die Zeit aufgetragen. Die computergestützte nicht-lineare Regression wurde mit der Software GraphPad Prism[®] unter Verwendung der Funktion des monophasischen oder biphasischen monoexponentiellen Zerfalls durchgeführt. Als 100-Prozent-Wert der Bindung wurde die Radioligand-Gleichgewichts-Bindung vor der Zugabe des Antagonisten definiert. Die unspezifische Bindung entspricht dem unteren Plateau der Kurvenanpassung.

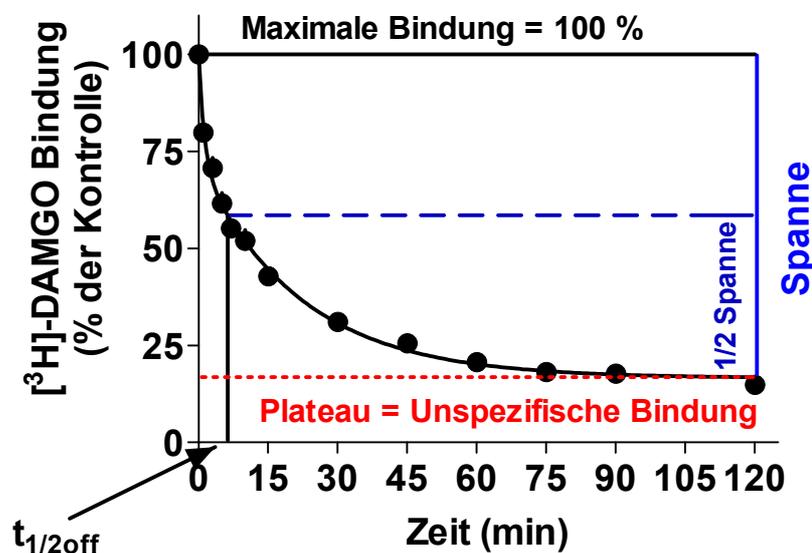


Abb. 20 Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte, dargestellt als Gesamtkurve, die aus vier Experimenten in Doppelbestimmung erhalten wurde.

Die Tabelle 10 zeigt die Ergebnisse der Dissoziations-Experimente von 0,5 nM [³H]-DAMGO in Abwesenheit der Testsubstanzen (Kontroll-Experimente). Mithilfe der Gleichung (17) wurde aus der Dissoziations-Halbwertszeit $t_{1/2off}$ die Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{off} berechnet.

$t_{1/2\text{off}}$ (min)	$7,0 \pm 0,9$
k_{off} (min^{-1})	$0,106 \pm 0,017$
Unspezifische Bindung (% der maximalen Bindung)	$15,89 \pm 1,26$

Tabelle 10 Halbwertszeit der Dissoziation $t_{1/2\text{off}}$ und Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{off} der Dissoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO vom μ -Opioid-Rezeptor in Abwesenheit einer Testsubstanz aus vier Experimenten in Doppelbestimmung (Kontroll-Experimente) sowie Ausmaß der unspezifischen Bindung in Prozent der maximalen Bindung.

Die Tabelle 11 zeigt den Vergleich der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von [^3H]-DAMGO, die einmal mit der Sättigungs-Bindung und einmal aus den Ergebnissen der Assoziations- und Dissoziations-Experimente (Kinetik) ermittelt wurden. Bei der Berechnung von K_D aus den kinetischen Experimenten wurde die Gleichung (3) verwendet. Die auf unterschiedliche Weise ermittelten K_D -Werte liegen relativ nahe beieinander.

[^3H]-DAMGO	Sättigung	Kinetik
K_D (nM)	$0,68 \pm 0,02$	0,35

Tabelle 11 Gegenüberstellung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten von [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor der Ratte, die einmal mit der Sättigungs-Bindung und einmal aus den Ergebnissen der Assoziations- und Dissoziations-Experimente (Kinetik) ermittelt wurden.

4.2.3.4 Veränderung der Dissoziationskinetik von 0,5 nM [^3H]-DAMGO durch Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR

Die Abb. 21 zeigt den Einfluss der höchsten untersuchten Konzentrationen der Cannabinoide Δ^9 -THC (100 μM), CBD (100 μM), SR 141716A (10 μM) und VCHSR (3 μM) auf den Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO. Für jede untersuchte Konzentration eines Cannabinoids wurden drei Experimente in Doppelbestimmung durchgeführt. Aufgrund der schlechten Wasserlöslichkeit der Cannabinoide wurden die Lösungen der Cannabinoide erst unmittelbar vor dem Start des jeweiligen Experiments

angesetzt. Alle Experimente wurden wie die Kontroll-Experimente ausgewertet (siehe Kapitel 3.2.3.2). Die Kontrollkurve wurde in Abwesenheit einer Testsubstanz ermittelt (siehe Kapitel 4.2.3.3). Zur Beobachtung spontaner Änderungen der [^3H]-DAMGO-Bindung über den Zeitraum des Dissoziations-Experiments wurden vier Experimente in Doppelbestimmung in Abwesenheit von Naloxon und Testsubstanzen mit Tris-HCl-Puffer pH 7,4 durchgeführt. Die Abb. 21 zeigt, dass der Zeitverlauf der Dissoziation von [^3H]-DAMGO durch Δ^9 -THC und insbesondere durch CBD beschleunigt, durch SR 141716A und VCHSR jedoch praktisch nicht beeinflusst wird. Erwartungsgemäß verändert sich das Ausmaß der Bindung über die Zeit nicht, wenn Tris-HCl-Puffer pH 7,4 anstelle von Naloxon zugesetzt wurde.

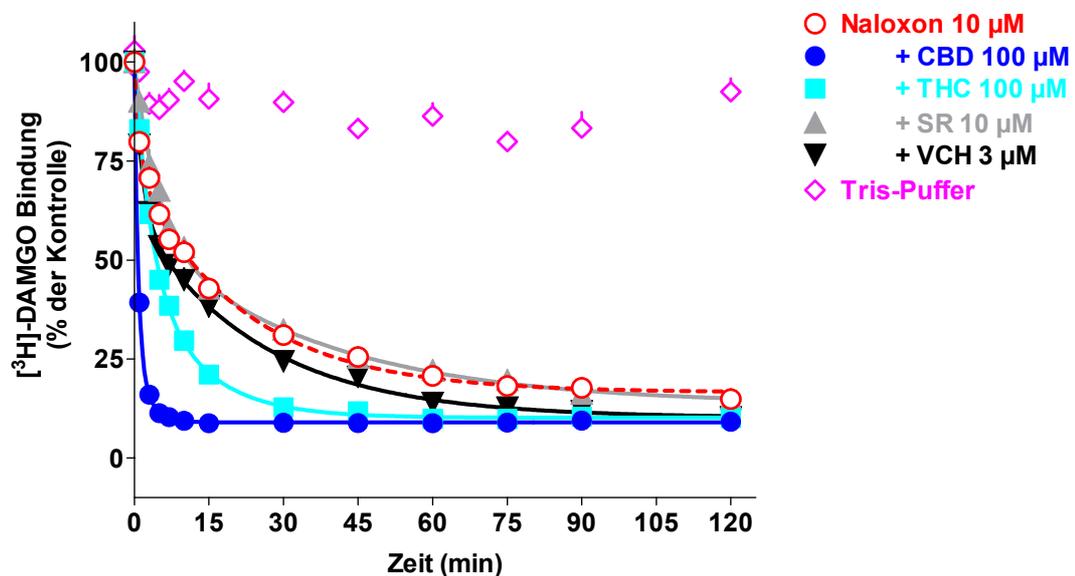


Abb. 21 Zeitverlauf der Dissoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte mit 10 μM Naloxon in Abwesenheit einer Testsubstanz (Kontrollkurve = rote, gestrichelte Linie) und in Anwesenheit der höchsten untersuchten Konzentrationen von Δ^9 -THC (THC 100 μM), CBD (100 μM), SR 141716A (SR 10 μM) und VCHSR (VCH 3 μM), sowie die spontane Änderung der [^3H]-DAMGO-Bindung bei der Zugabe von Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (Tris-Puffer) in Abwesenheit von Naloxon und Testsubstanzen.

Die Abb. 22 und Abb. 23 zeigen den Einfluss steigender Konzentrationen von Δ^9 -THC bzw. von CBD auf die Geschwindigkeit der Dissoziation von 0,5 nM

[³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor in Prozent der Kontrolle. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde die Geschwindigkeitskonstante, die für jede untersuchte Konzentration eines Cannabinoids als Mittelwert aus drei Dissoziations-Experimenten ermittelt wurde, gegen die Konzentration des Cannabinoids in Prozent der Geschwindigkeitskonstanten der Kontrollkurve aufgetragen. Die Dosis-Wirkungskurven wurden durch eine computer-gestützte nicht-lineare Regression mit der Software GraphPad Prism[®] unter Verwendung der Funktion einer sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung erhalten.

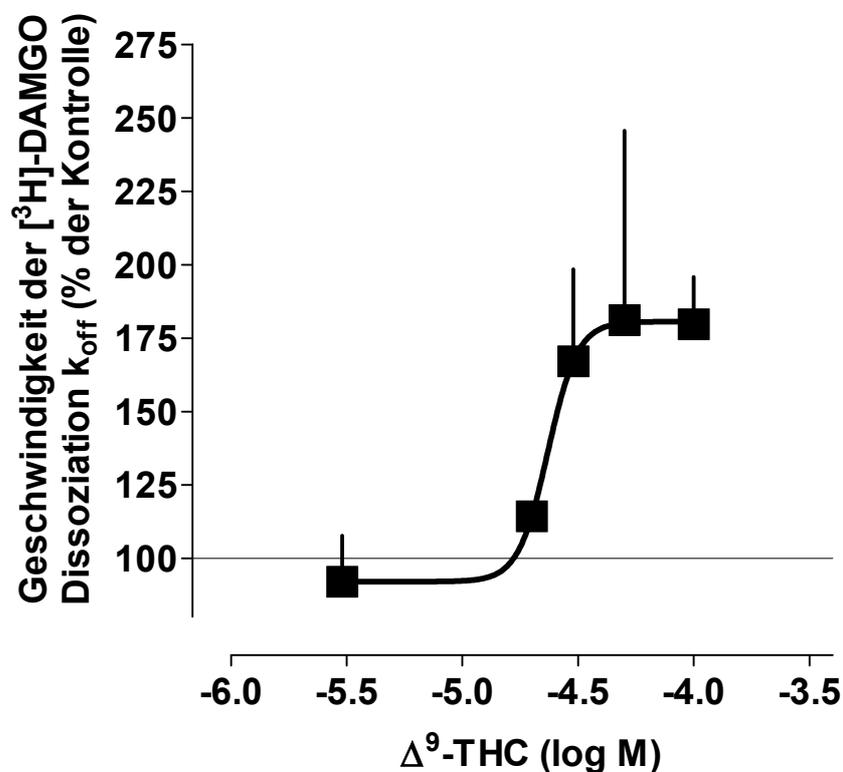


Abb. 22 Einfluss steigender Konzentrationen von Δ^9 -THC auf die Dissoziations-Geschwindigkeit von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte. Die dünne Linie entspricht der Dissoziations-Geschwindigkeit in Abwesenheit von Δ^9 -THC.

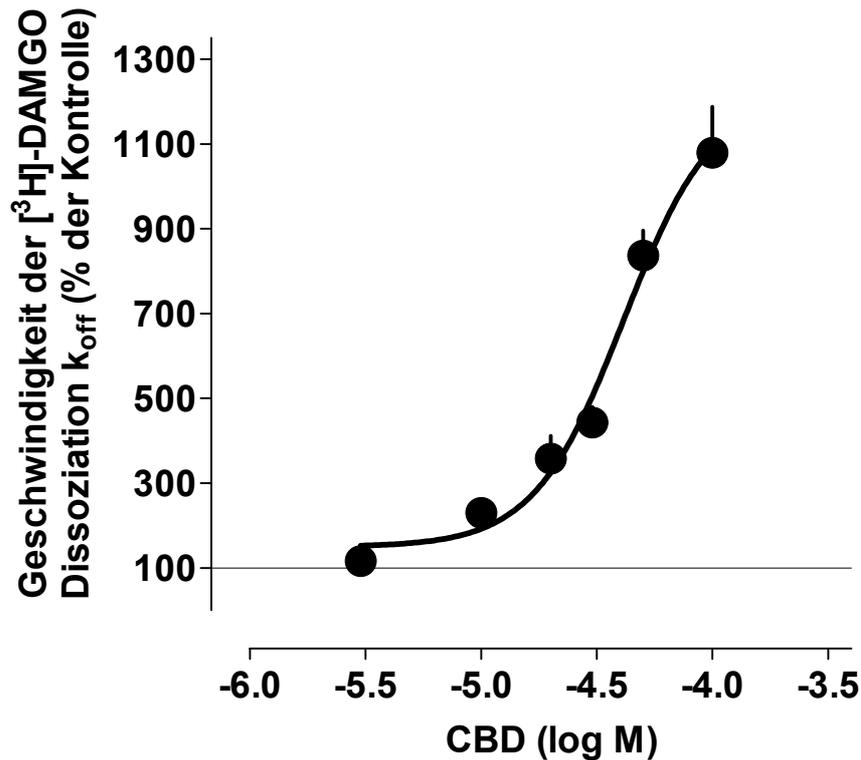


Abb. 23 Einfluss steigender Konzentrationen von CBD auf die Dissoziations-Geschwindigkeit von [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte. Die dünne Linie entspricht der Dissoziations-Geschwindigkeit in Abwesenheit von CBD.

Die beiden Abbildungen zeigen, dass Δ^9 -THC und CBD etwa in gleichen Konzentrationsbereichen wirken. Dies schlägt sich auch in den ähnlichen EC_{50} -Werten nieder (siehe Tabelle 12). Allerdings ist der EC_{50} -Wert für CBD nicht absolut präzise bestimmbar, da der Maximaleffekt bei 100 μ M, der höchsten untersuchten Konzentration, noch nicht erreicht wurde. Hinsichtlich des Maximaleffekts unterscheiden sich die beiden Substanzen extrem. Δ^9 -THC erhöhte die Dissoziations-Geschwindigkeit etwa auf das Doppelte, CBD hingegen auf mindestens das Zwölfwache.

	Δ^9 -THC	CBD
EC₅₀ (μM)	23,4 ± 1,0	41,2 ± 1,2
Maximaler Effekt (k_{off} in Prozent der Kontrolle)	180,6 ± 1,0	1218 ± 193

Tabelle 12 EC₅₀-Werte und maximale Effekte für Δ^9 -THC und CBD auf die Veränderung der Dissoziations-Geschwindigkeit im Vergleich zur Dissoziations-Geschwindigkeit in Abwesenheit der Cannabinoide (Kontrolle = 100 %) von 0,5 nM [³H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.

4.2.3.5 Effekte von Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR auf die Gleichgewichts-Bindung von [³H]-DAMGO

4.2.3.5.1 Pseudo-Kompetitions-Experimente

Die Abbildungen Abb. 24 und Abb. 25 zeigen die Verdrängungskurven, die mit 0,5 nM [³H]-DAMGO und aufsteigenden Konzentrationen der Cannabinoide in den Pseudo-Kompetitions-Experimenten am μ -Opioid-Rezeptor erhalten wurden. Zur Auswertung der Experimente wurde die spezifisch gebundene Radioaktivität in Prozent der Kontrolle gegen den Logarithmus der Konzentration der untersuchten Cannabinoide aufgetragen. Die unspezifische Bindung wurde mit 10 μM Naloxon bestimmt und betrug im Mittel 6,6 %. Bei der computergestützten nicht-linearen Regression mit der Software GraphPad Prism[®] wurde für jedes Cannabinoid überprüft, welche Funktion zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung führt. Insgesamt wurden drei Funktionen ausgetestet, nämlich die der einseitigen Konkurrenz, die der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung und schließlich die Funktion von Ehlert (siehe Gleichung (18)). In allen Fällen führte die Verwendung der Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung - im Vergleich zu den anderen Funktionen - zu signifikant besseren Kurvenanpassungen.

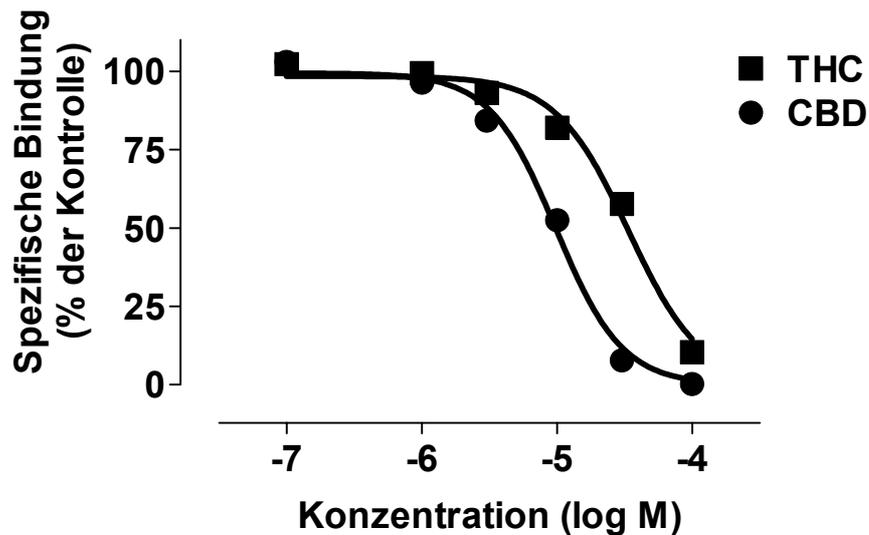


Abb. 24 Verdrängung von 0,5 nM [³H]-DAMGO durch aufsteigende Konzentrationen von Δ⁹-THC (THC) und CBD vom μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.

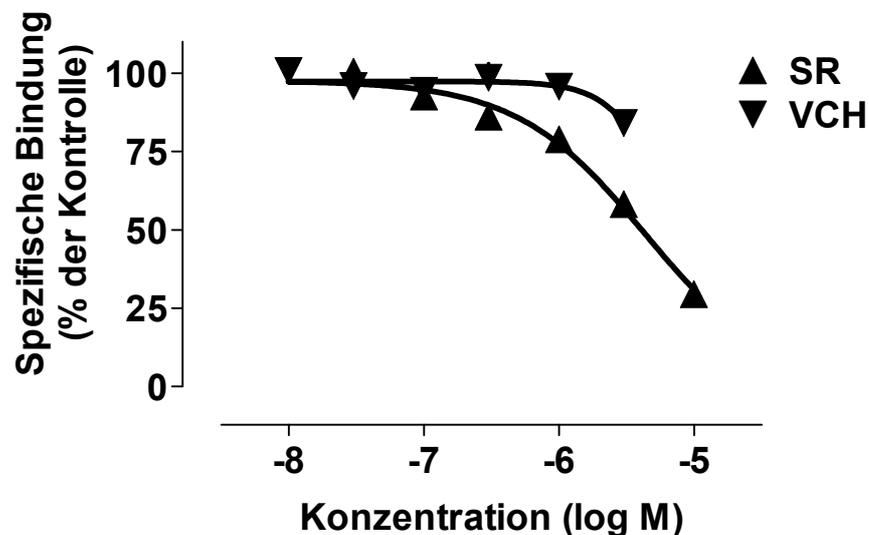


Abb. 25 Verdrängung von 0,5 nM [³H]-DAMGO durch aufsteigende Konzentrationen von SR 141716A (SR) und VCHSR (VCH) vom μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.

Die Abbildungen zeigen, dass Δ⁹-THC und CBD im untersuchten Konzentrationsbereich zu einer nahezu vollständigen bzw. zu einer vollständigen Hemmung der [³H]-DAMGO-Gleichgewichts-Bindung führen, wobei beide Kurven eine hohe Steilheit aufweisen. SR 141716A zeigt in dem

untersuchten Konzentrationsbereich nur eine partielle Hemmung, die entsprechende Kurve verläuft sehr flach. Bei VCHSR ist überhaupt keine Hemmung nachzuweisen. Die Tabelle 13 fasst die Ergebnisse der Pseudo-Kompetitions-Experimente für die drei wirksamen Substanzen zusammen, die aus den computergestützten nicht-linearen Regressionen mit der Funktion der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung erhalten wurden. Bei den nicht-linearen Regressionen der Experimente mit Δ^9 -THC und CBD wurde das obere Plateau mit 100 Prozent und das untere Plateau mit Null Prozent als Konstanten definiert, um eine bessere Kurvenanpassung zu erhalten.

Kompetitor	IC ₅₀ (µM)	K _i (µM)	pK _i	n _H
Δ^9 -THC	32,88 ± 3,61	18,95 ± 2,08	4,72 ± 0,04	-1,60 ± 0,16
CBD	10,08 ± 0,50	5,81 ± 0,29	5,24 ± 0,03	-1,46 ± 0,15
SR 141716A	4,72 ± 0,91	2,73 ± 0,53	5,56 ± 0,07	-0,73 ± 0,07

Tabelle 13 IC₅₀-, K_i-, pK_i-Werte und Hill-Koeffizienten aus den Pseudo-Kompetitions-Experimenten von 0,5 nM [³H]-DAMGO mit Δ^9 -THC, CBD und SR 141716A am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte.

4.2.3.5.2 Kinetik der Änderung der Gleichgewichts-Bindung

Die Abb. 26 bis Abb. 29 zeigen den Zeitverlauf der Änderung der Gleichgewichts-Bindung von 0,5 nM [³H]-DAMGO durch unterschiedliche Konzentrationen der Cannabinoide Δ^9 -THC, CBD, SR 141716A und VCHSR. Die Experimente wurden in Analogie zu den Dissoziations-Experimenten mit der Ausnahme durchgeführt, dass in Abwesenheit des Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon gearbeitet wurde. Zum besseren Vergleich der Kurvenanpassungen dieser Experimente mit denen der Dissoziations-Experimente sind in jeder Abbildung zusätzlich die spontane Änderung der [³H]-DAMGO-Bindung nach Zugabe des Tris-HCl-Puffers pH 7,4 sowie die Gesamtkurve aus den Kontroll-Experimenten dargestellt (siehe Kapitel 4.2.3.4).

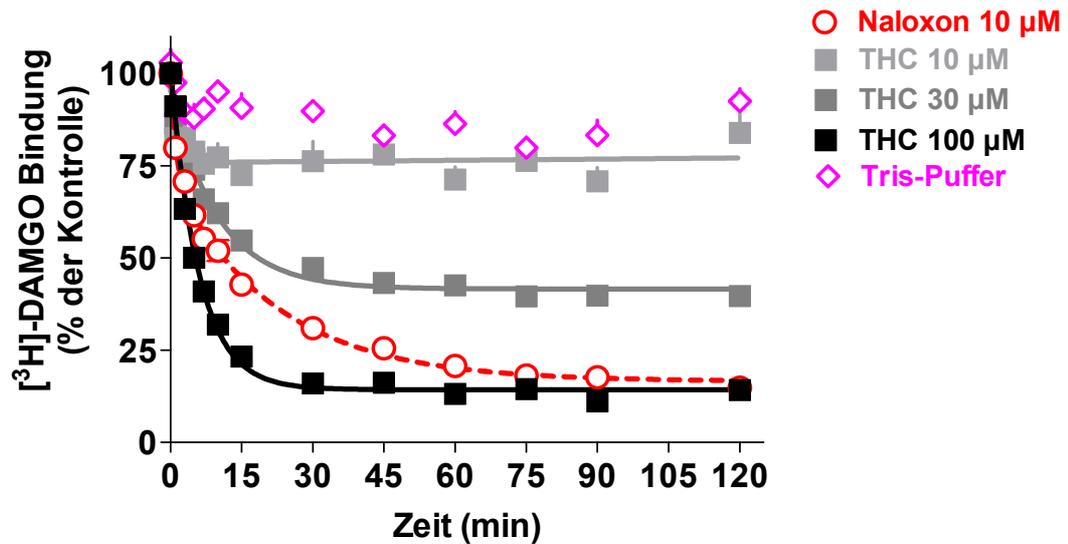


Abb. 26 Zeitverlauf der Abnahme der [^3H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von Δ^9 -THC (THC 10, 30 und 100 μM) sowie Kontrollkurve aus dem Dissoziations-Experiment (Naloxon 10 μM) und spontane Änderung der Bindung durch Zugabe von Tris-HCl- Puffer pH 7,4 (Tris-Puffer).

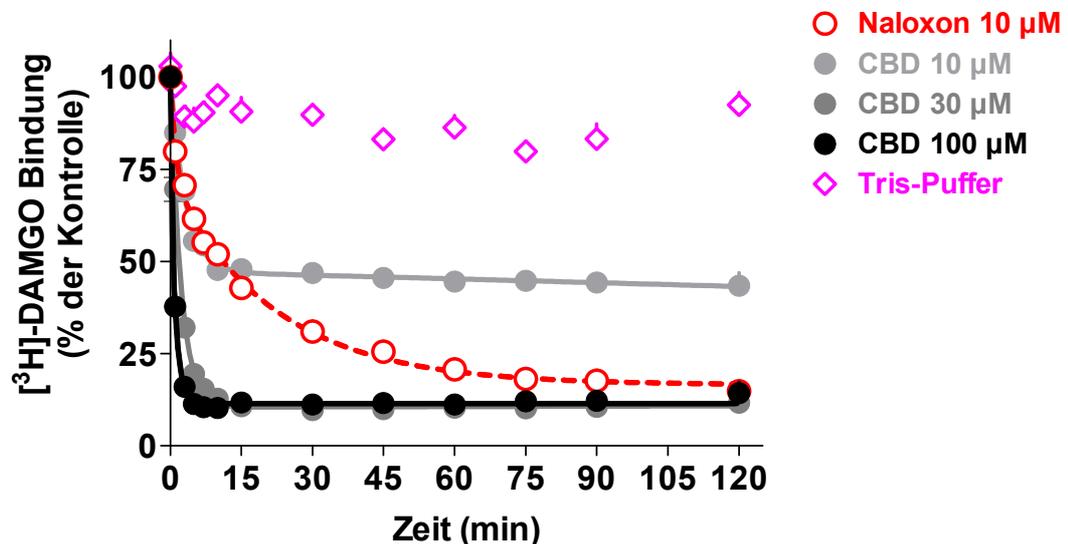


Abb. 27 Zeitverlauf der Abnahme der [^3H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von CBD (CBD 10, 30 und 100 μM) sowie Kontrollkurve aus dem Dissoziations-Experiment (Naloxon 10 μM) und spontane Änderung der Bindung durch Zugabe von Tris-HCl- Puffer pH 7,4 (Tris-Puffer).

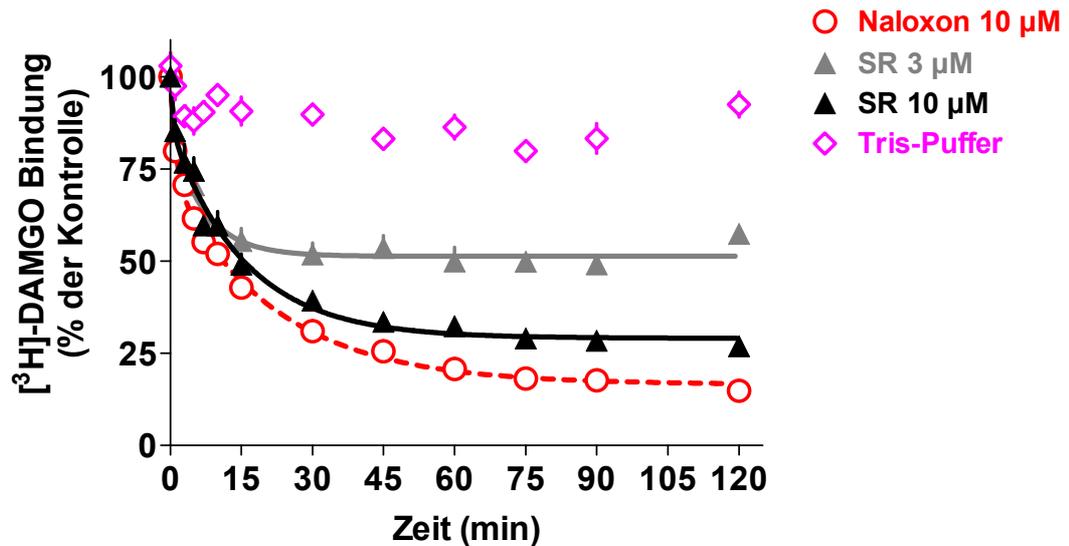


Abb. 28 Zeitverlauf der Abnahme der [³H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von SR 141716A (SR 3 und 10 μ M) sowie Kontrollkurve aus dem Dissoziations-Experiment (Naloxon 10 μ M) und spontane Änderung der Bindung durch Zugabe von Tris-HCl- Puffer pH 7,4 (Tris-Puffer).

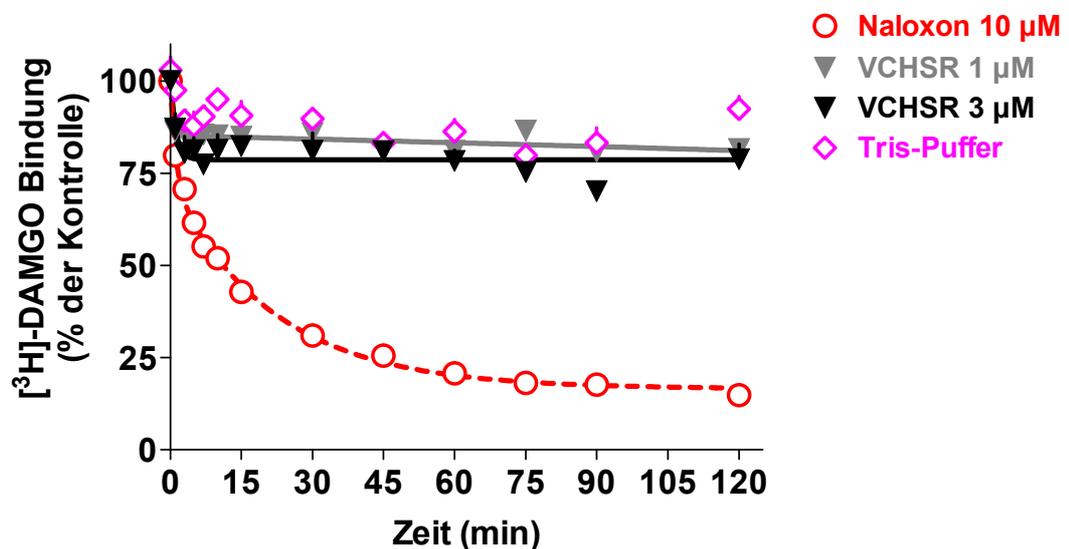


Abb. 29 Zeitverlauf der Abnahme der [³H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte in Gegenwart von VCHSR (VCHSR 1 und 3 μ M) sowie Kontrollkurve aus dem Dissoziations-Experiment (Naloxon 10 μ M) und spontane Änderung der Bindung durch Zugabe von Tris-HCl- Puffer pH 7,4 (Tris-Puffer).

Die Tabelle 14 zeigt die Gegenüberstellung der scheinbaren Geschwindigkeitskonstanten k_{appoff} für die Änderung der Gleichgewichts-Bindung von [^3H]-DAMGO in Abwesenheit von Naloxon mit den Geschwindigkeitskonstanten k_{off} , die in den Dissoziations-Experimenten in Anwesenheit von Naloxon ermittelt worden sind (siehe Kapitel 4.2.3.4). Zur Bestimmung von k_{appoff} wurde aus der Kurvenanpassung die scheinbare Halbwertszeit der Änderung der Gleichgewichts-Bindung $t_{\text{app}1/2\text{off}}$ bestimmt. $t_{\text{app}1/2\text{off}}$ wurde als der Zeitpunkt definiert, bei dem genau die Hälfte der Radioaktivität, die sich aus der Spanne zwischen der maximalen Bindung zum Zeitpunkt Null Minuten und dem unteren Plateau der Kurvenanpassung ergibt, vom Rezeptor abdissoziiert ist. Die mit beiden Verfahren ermittelten Geschwindigkeitskonstanten unterschieden sich nicht deutlich voneinander.

Substanz	Konzentration [μM]	k_{off} [min^{-1}]	k_{appoff} [min^{-1}]	t-Test (p)
Δ^9 -THC	30	$0,177 \pm 0,019$	$0,105 \pm 0,014$	0,075
	100	$0,190 \pm 0,017$	$0,170 \pm 0,008$	0,437
CBD	10	$0,243 \pm 0,035$	$0,271 \pm 0,027$	0,612
	30	$0,469 \pm 0,040$	$0,442 \pm 0,003$	0,633
	100	$1,142 \pm 0,115$	1,100	n.b.
SR 141716A	3	n.b.	$0,204 \pm 0,019$	n.b.
	10	$0,091 \pm 0,015$	$0,087 \pm 0,015$	0,866

Tabelle 14 Vergleich der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{off} aus den Dissoziations-Experimenten mit den scheinbaren Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten k_{appoff} aus den Zeitverläufen der Änderung der Gleichgewichts-Bindung. n.b., nicht bestimmbar.

4.3 Ergebnisse der molekularbiologischen Experimente

4.3.1 Ermittlung der mRNA-Transkription des CB₁-Rezeptors über einen Zeitraum von 48 Stunden

Die Abb. 30 zeigt die cDNA-Banden des CB₁-Rezeptors und von β -Actin als Vergleichsstandard aus drei Experimenten, die nach Durchführung von zwei reverse Transkriptase PCRs (RT-PCRs) und anschließender Agarose-Gelelektrophorese unter UV-Licht betrachtet und digital fotografiert wurden. Zur Quantifizierung der cDNA-Menge - respektive des Ausmaßes der Transkription der CB₁-Rezeptor-mRNA - wurde, nach der densitometrischen Auswertung aller Banden mithilfe der Software Lumi-Analyst[®], der Quotient aus den Flächen der CB₁-Rezeptor-Banden mit denen der zugehörigen β -Actin-Banden gebildet. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung zeigt die Abb. 31. Im Zeitraum von 24 bis 72 Stunden änderte sich die CB₁-Rezeptor-mRNA-Transkription - verglichen mit der β -Actin-mRNA-Transkription - nicht.

	1a	2a	3a	1b	2b	3b
	CB ₁ -R β -Act					
24 h						
28 h						
48 h						
72 h						

Abb. 30 cDNA-Banden des CB₁-Rezeptors (CB₁-R) und von β -Actin (β -Act) für drei Experimente (1-3) und zwei RT-PCRs (a und b), die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Aussäen der NG 108-15 Zellen in 6er-Well-Platten erhalten wurden. Die Amplifikation des CB₁-Rezeptors entsprach 520 bp, die Amplifikation von β -Actin entsprach 650 bp.

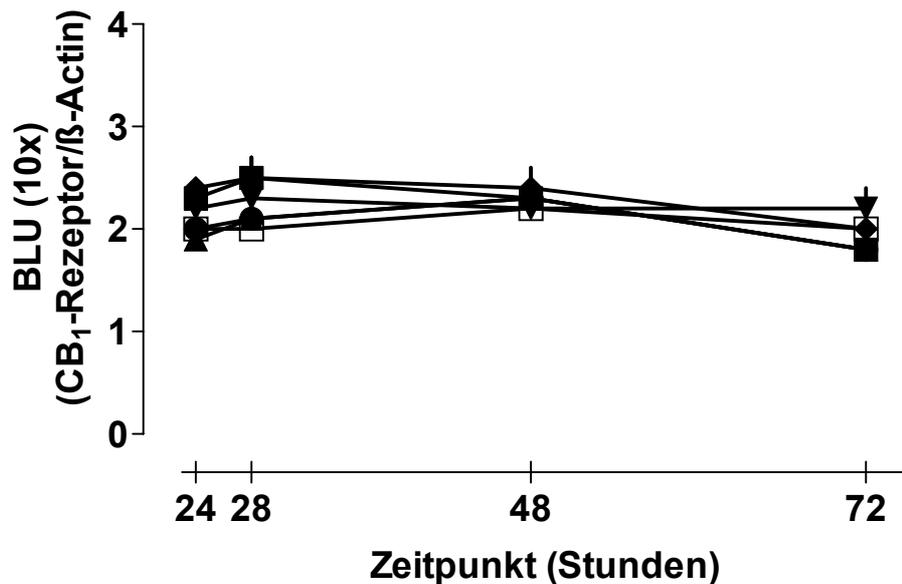


Abb. 31 Zeitverlauf der CB_1 -Rezeptor-mRNA-Transkription über einen Zeitraum von 48 Stunden, dargestellt als Quotient aus den Werten der densitometrischen Auswertung der cDNA-Banden (Boehringer Light Units, BLU, 10x) des CB_1 -Rezeptors und von β -Actin nach RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese, ermittelt aus drei Experimenten und zwei RT-PCRs.

4.3.2 Wirkung einer gegen CB_1 -Rezeptor-mRNA gerichteten siRNA auf die Expression von CB_1 -Rezeptor-Protein

Die Abb. 32 zeigt die Ergebnisse von zwei Western Blot Experimenten, die nach den Lumineszenz-Reaktionen mit dem Lumi-Imager erhalten wurden. In den Western Blots wurde die Membranpräparation eines Experiments untersucht, in dem NG 108-15 Zellen mit einer siRNA, die gegen die CB_1 -Rezeptor-mRNA gerichtet ist, transient transfiziert wurden. Zu Vergleichszwecken wurde die Expression von CB_1 -Rezeptor-Protein und α -Tubulin auch im zerebralen Kortex der Ratte ermittelt.

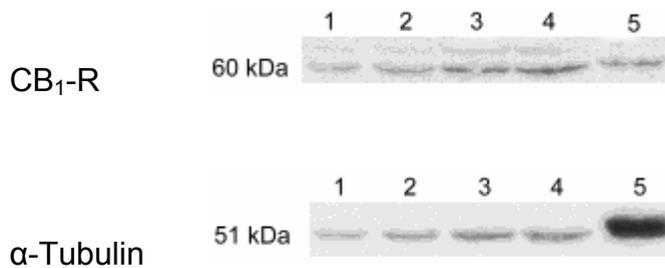
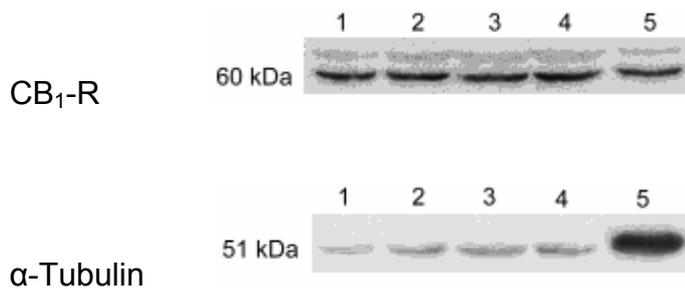
Blot 1**Blot 2**

Abb. 32 Western Blots mit Proteinen von NG 108-15 Zellen (NG) mit siRNA-Behandlung (siRNA) und ohne (Ko.) sowie mit Proteinen des zerebralen Kortex der Ratte (CC). Das obere Teilbild zeigt die Antikörperreaktion des CB₁-Rezeptors (CB₁-R), das untere Teilbild die Antikörperreaktion von α-Tubulin. Es wurden folgende Proben aufgetragen: 20 µg Protein NG (Ko., 1), 20 µg Protein NG (siRNA, 2), 30 µg Protein NG (Ko., 3), 30 µg Protein NG (siRNA, 4), 10 µg Protein CC (5).

Die Tabelle 15 zeigt die Quotienten der BLU der CB₁-Rezeptor-Banden mit den zugehörigen α-Tubulin-Banden als Maß für die Menge an exprimiertem CB₁-Rezeptor-Protein in NG 108-15 Zellen, die ohne (Ko.) oder mit einer siRNA (siRNA) gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA behandelt wurden. Zur computergestützten densitometrischen Auswertung mithilfe der Software Lumi-Analyst[®] wurde die 60 kDa Bande für den CB₁-Rezeptor und die 51 kDa Bande für α-Tubulin herangezogen. Aus der Tabelle 15 ist ersichtlich, dass die siRNA-Behandlung die Expression des CB₁-Rezeptors nicht beeinflusste.

Protein	BLU (CB ₁ -R/ α -Tubulin)
NG (Ko.)	2,26 \pm 0,70
NG (siRNA)	1,99 \pm 0,40

Tabelle 15 Quotienten der densitometrischen Auswertung der CB₁-Rezeptor-Banden mit den zugehörigen α -Tubulin-Banden von NG 108-15 Zellen (NG) ohne (Ko.) und mit siRNA-Behandlung (siRNA) gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA.

4.3.3 Verdrängung von [³H]-GR 65630 vom humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor von transient transfizierten HEK 293 Zellen

Die Abb. 33 zeigt die Verdrängung der spezifischen Bindung von 1 nM [³H]-GR 65630 am humanen Serotonin 5-HT_{3A}-Rezeptor von transient transfizierten HEK 293 Zellen durch aufsteigende Konzentrationen MDL 72222. Als unspezifische Bindung wurde die [³H]-GR 65630 Bindung in Anwesenheit von 100 μ M MDL 72222 definiert. Aus der nicht-linearen Regression mit der Funktion einer sigmoiden Dosis-Wirkungskurve mit variabler Steigung ergab sich ein Hill-Koeffizient, der sich nicht signifikant von -1 unterscheidet und ein IC₅₀-Wert von 0,49 nM.

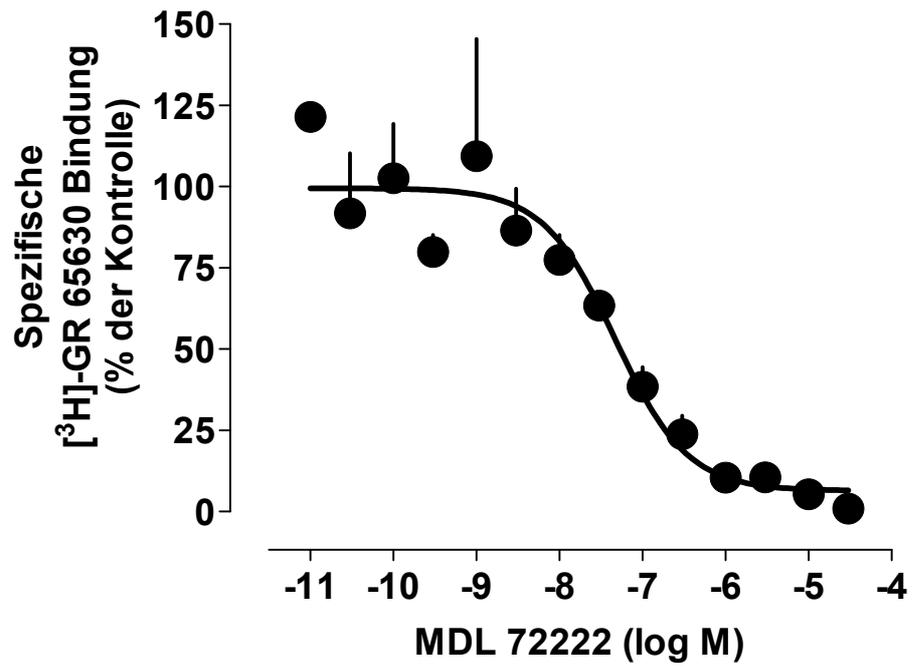


Abb. 33 Verdrängungskurve der spezifischen Bindung von 1 nM $[^3\text{H}]\text{-GR 65630}$ am humanen $5\text{-HT}_{3\text{A}}$ -Rezeptor durch MDL 72222.

Für ein Kontroll-Experiment wurde ein Proteinhomogenat von nicht transfizierten HEK 293 Zellen verwendet, bei dem keine spezifische [³H]-GR 65630 Bindung nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 34).

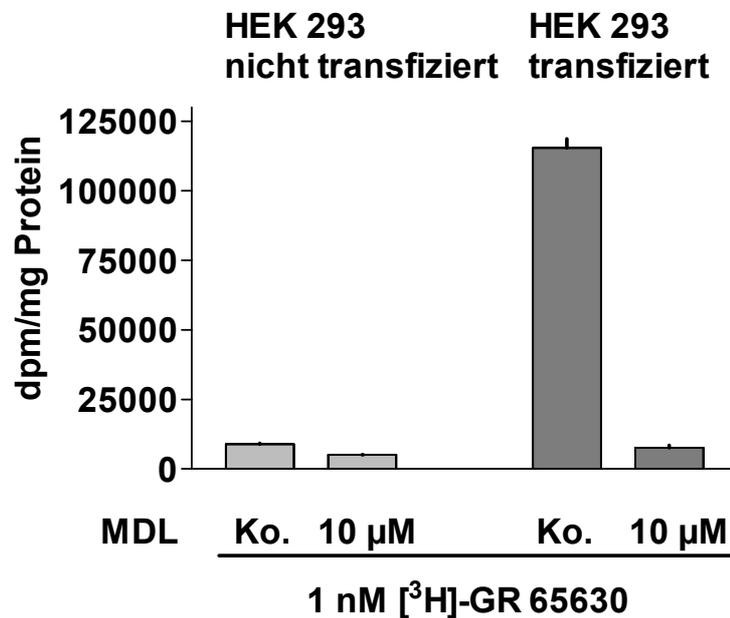


Abb. 34 Totale Bindung von 1 nM [³H]-GR 65630 an Proteinhomogenaten von nicht transfizierten und von mit dem humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor transfizierten HEK 293 Zellen in Abwesenheit (Ko.) und Anwesenheit von 10 μM des 5-HT_{3A}-Rezeptor-Antagonisten MDL 72222.

Die Tabelle 16 zeigt die Werte für das Ausmaß der unspezifischen Bindung von [³H]-GR 65630 in Prozent der totalen Bindung sowie den Anteil der totalen Bindung (spezifische + unspezifische Bindung) an der zugesetzten Gesamtradioaktivität (Stoffmenge) in Prozent.

Unspezifische Bindung (% der totalen Bindung)	9,0 %
Totale Bindung (% der zugesetzten Stoffmenge)	20,7 %

Tabelle 16 Unspezifische Bindung von [³H]-GR 65630 in Prozent der totalen Bindung und Anteil der totalen Bindung an der zugesetzten Gesamtradioaktivität (Stoffmenge) in Prozent für die Bindung von [³H]-GR 65630 am humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor von transient transfizierten HEK 293 Zellen.

5 Diskussion

5.1 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung

In der Arbeit von Bauer (2002) hatte sich bei der Austestung unterschiedlicher Membranpräparationen ein Vorteil hinsichtlich des Ausmaßes der WIN 55,212-2-stimulierten [³⁵S]-GTPγS-Bindung am CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Maus für eine Methode gezeigt, bei der das Hirngewebe während der Membranpräparation zunächst bei -80 °C schockgefroren, anschließend gemörsert und dann mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator homogenisiert wurde. Mit der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, ob sich dieser Befund verifizieren lässt, um ggf. eine optimierte Methode für die Membranaufbereitung von Hirngewebe für die [³⁵S]-GTPγS-Bindung zu etablieren. Um die Experimente dieser Studie mit denen von Bauer (2002) vergleichen zu können, wurden die Methoden für die Membranpräparationen und für die [³⁵S]-GTPγS-Bindung vollständig übernommen.

In allen Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde eine Zunahme der WIN 55,212-2-stimulierten [³⁵S]-GTPγS-Bindung durch die Methode des zusätzlichen Schockgefrierens und Mörserns des Hirngewebes gegenüber der ausschließlichen Verwendung des Potter-Elvehjem Homogenisators festgestellt. Da, bedingt durch die Methode der Versuchsauswertung, eine Vergleichbarkeit der Werte für die Zunahme der stimulierten [³⁵S]-GTPγS-Bindung in Prozent über der basalen Bindung nur gegeben ist, wenn der Anteil der unspezifischen Bindung an der basalen Bindung in allen in die Auswertung einbezogenen Versuchen vergleichbar ist, wurden aus einer Versuchsreihe der vorliegenden Arbeit sechs Versuche in Doppelbestimmung ausgewählt, bei denen der Anteil der unspezifischen Bindung an der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung im Mittel bei 28 bis 29 % lag. Die in der vorliegenden Arbeit gefundenen Werte für die Zunahme der [³⁵S]-GTPγS-Bindung über der basalen Bindung sind für beide Membranpräparationen geringer als die in der Arbeit von Bauer (2002) ermittelten, nämlich 69 % *versus* 80 % für die Membranhomogenisierung ausschließlich mit dem

Potter-Elvehjem Homogenisator und 92 % *versus* 165 % für die zusätzliche Schockgefrierung und Mörserung des Hirngewebes. Das unterschiedliche Ausmaß der unspezifischen Bindung von 28 % bei der vorliegenden Arbeit *versus* 20 % in der Arbeit von Bauer (2002) kann als Ursache für die Unterschiede bei den Werten für die Zunahme der [³⁵S]-GTPγS-Bindung ausgeschlossen werden, da eine höhere unspezifische Bindung die Zunahme der [³⁵S]-GTPγS-Bindung scheinbar vergrößern würde. Auch konnte der große Vorteil, der sich in der Arbeit von Bauer (2002) für die zusätzliche Schockgefrierung und Mörserung des Hirngewebes zeigte, nicht bestätigt werden. Der Quotient, der aus beiden Membranpräparationen ermittelten Werte für die Zunahme der [³⁵S]-GTPγS-Bindung zugunsten der Methode des zusätzlichen Schockgefrierens und Mörserns war 2 in der Arbeit von Bauer (2002) *versus* 1,33 in der vorliegenden Arbeit.

Da in der vorliegenden Arbeit zwar ein signifikanter Unterschied, aber kein großer Vorteil für die Methode des zusätzlichen Schockgefrierens und Mörserns des Hirngewebes gefunden werden konnte, wurde für die weiteren [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimente der vorliegenden Arbeit die standardmäßige Membranpräparationsmethode, bei der ausschließlich der Potter-Elvehjem Homogenisator zwecks Homogenisierung der Hirngewebe verwendet wird, gewählt.

5.2 Einfluss unterschiedlicher Membranpräparationen auf die [³H]-SR 141716A-Bindung

Diese Studie diente dazu zu zeigen, ob sich unterschiedliche Homogenisierungsschritte während der Membranpräparation des zerebralen Kortex der Maus, nämlich die ausschließliche Verwendung eines Potter-Elvehjem Homogenisators oder die zusätzliche Anwendung eines Ultra-Turrax, auf die Bindungseigenschaften von [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor auswirken. Der Hintergrund war die Suche nach einer geeigneten Methode zur Membranpräparation von Zellen aus Zellkulturen, bei der sich die Anwendung eines Ultra-Turrax bei der Homogenisierung der Zellen hinsichtlich des Zerkleinerungsgrades und der Proteinausbeute als effektiver erwies als die alleinige Anwendung eines Potter-Elvehjem Homogenisators.

Da Bindungs-Experimente mit [³H]-SR 141716A an CB₁-Rezeptoren mit Membranpräparationen von transfizierten Zellen aus Zellkulturen durchgeführt werden sollten, stellte sich die Frage, ob eine abgeänderte Membranpräparation die Bindungseigenschaften des CB₁-Rezeptors verändern könnte. Da keine mit einem CB₁-Rezeptor transfizierten Zellen für die Untersuchung zur Verfügung standen, wurden die unterschiedlichen Methoden der Membranpräparation am zerebralen Kortex der Maus durchgeführt. Aus den Ergebnissen der homologen Kompetitionsexperimente von 0,5 nM [³H]-SR 141716A mit unmarkiertem SR 141716A konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Membranpräparationen hinsichtlich der Anzahl der maximalen Bindungsstellen B_{max} und der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D von [³H]-SR 141716A festgestellt werden. Die Werte für B_{max}, die mit [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor bestimmt wurden (442 ± 68 fmol/mg Protein) stimmen sehr gut mit denen überein, die von unserer Arbeitsgruppe früher mit dem Radioliganden [³H]-WIN 55,212-2, ebenfalls am zerebralen Kortex der Maus, gefunden worden sind (444 ± 52 fmol/mg Protein; Nakazi et al., 2000). Aus den Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Anwendung des Ultra-Turrax zum Aufschluss und zur Homogenisierung von Zellen aus Zellkulturen eine geeignete Methode ist, um eine große Proteinausbeute bei der Membranpräparation zu erhalten. Eine Änderung der Bindungseigenschaften hinsichtlich Anzahl der maximalen Bindungsstellen und der Affinität von Rezeptor-Liganden am CB₁-Rezeptor ist gegenüber der standardmäßig angewendeten Membranpräparation - ausschließlich mit dem Potter-Elvehjem Homogenisator - jedoch nicht zu erwarten.

5.3 Bindungsaffinitäten der Cannabinoide Δ⁹-THC, CBD, SR 141716A und VCHSR am CB₁-Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens

Diese Studie hatte das Ziel, die Affinitäten von Δ⁹-THC, CBD, SR 141716A und VCHSR zum freien CB₁-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex des Meerschweinchens zu bestimmen und zwei unterschiedliche Methoden zur Bestimmung der Gleichgewichts-

Dissoziationskonstanten K_D , nämlich Sättigungsbindungs- und homologe Kompletions-Experimente, miteinander zu vergleichen.

Zur Ermittlung der Affinität von [^3H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor wurden zunächst Sättigungs-Bindungs-Experimente durchgeführt. Die signifikant bessere Kurvenanpassung, die sich bei der computergestützten Regression für die spezifische Bindung von [^3H]-SR 141716A mit der Funktion einer einseitigen Bindung gegenüber der Funktion einer zweiseitigen Bindung ergab sowie der entsprechende Rosenthal-Plot, der eine Gerade zeigte, deuten auf eine sättigbare Bindung an nur einer Bindungsstelle hin. Der Wert der Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_D aus den Sättigungs-Bindungs-Experimenten ist mit $2,12 \pm 0,56$ nM praktisch gleich groß wie der nachfolgend durch homologe Kompletions-Experimente ermittelte K_D -Wert von $1,9 \pm 0,3$ nM. Im Gegensatz zu den K_D -Werten unterschieden sich die Werte für die maximalen Bindungsstellen B_{max} , die aus beiden Experimenten ermittelt wurden, signifikant ($p = 0,036$, ungepaarter zweiseitiger t-Test). Der mit den Sättigungs-Bindungs-Experimenten ermittelte B_{max} -Wert war etwa doppelt so hoch wie der mit der homologen Kompetition und nachfolgend mit der Gleichung (13) ermittelte (2340 ± 424 versus 1160 ± 106 fmol/mg Protein). Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen B_{max} -Werte aus beiden Experimenten könnte darin liegen, dass bei den Sättigungs-Bindungs- im Gegensatz zu den homologen Kompletions-Experimenten kein BSA als Lösungsvermittler in den Reaktionsansätzen vorhanden war. Der Zusatz von BSA bei den homologen Kompletions-Experimenten hat möglicherweise das Ausmaß der unspezifischen Bindung von [^3H]-SR 141716A, u.a. durch eine Reduktion von unspezifischen Bindungsstellen an den verwendeten Glasfaserfiltern herbeigeführt und so zu einer geringeren unspezifischen Bindung beigetragen, die sich wiederum in einem kleineren Wert bei den ermittelten maximalen Bindungsstellen niederschlägt. Der K_D -Wert von [^3H]-SR 141716A am CB_1 -Rezeptor des Meerschweinchens zeigt eine gute Übereinstimmung mit dem K_D -Wert, der in der vorliegenden Arbeit am CB_1 -Rezeptor der Maus, ebenfalls durch homologe Kompletions-Experimente, gefunden wurde ($1,90 \pm 0,35$ nM versus $3,5 \pm 0,7$ nM).

In den Radioligand-Kompletions-Experimenten zeigten alle untersuchten Cannabinoide eine Affinität zum CB_1 -Rezeptor des Meerschweinchens.

SR 141716A ($pK_D = 8,72 \pm 0,06$) und VCHSR ($pK_i = 8,11 \pm 0,07$) wiesen eine hohe, Δ^9 -THC mit einem pK_i -Wert von $6,62 \pm 0,02$ eine mittlere und CBD mit einem pK_i -Wert von $5,53 \pm 0,10$ eine geringe Affinität zum freien CB₁-Rezeptor auf. Die Hill-Koeffizienten der nicht-linearen Regressionen der Verdrängungskurven für die untersuchten Cannabinoide unterschieden sich nicht signifikant von -1, was der Modellvorstellung einer einseitigen Kompetition von [³H]-SR 141716A mit den untersuchten Cannabinoiden am CB₁-Rezeptor entspricht.

5.4 Wirkung der Cannabinoide WIN 55,212-2, SR 141716A und VCHSR auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung im Hippocampus des Meerschweinchens

Ziel dieser Studie war, die Effekte des CB₁-Rezeptor-Antagonisten/-inversen Agonisten SR 141716A sowie des neutralen CB₁-Rezeptor-Antagonisten VCHSR, der eine Analogsubstanz zu SR 141716A mit fehlender Carboxamid-Gruppe am C3-Atom des Pyrazolrings darstellt (siehe Abb. 10), auf das Ausmaß der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung in Membranhomogenaten des Meerschweinchens Hippocampus zu untersuchen. In einer früheren Arbeit unserer Arbeitsgruppe (Schlicker et al., 1997) konnte in Superfusionsstudien ein steigender Effekt von SR 141716A auf die elektrisch stimulierte Noradrenalinfreisetzung aus Neuronen des Meerschweinchens Hippocampus gefunden werden. Diese Wirkung von SR 141716A wurde als ein invers agonistischer Effekt an tonisch aktivierten, präsynaptischen CB₁-Rezeptoren gedeutet. In der Arbeit von Bauer (2002) wurden bereits, in Ergänzung zu der genannten und zu weiteren Superfusionsstudien, [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimente mit SR 141716A am CB₁-Rezeptor des Meerschweinchens Hippocampus durchgeführt, jedoch keine Bindungsstudien mit VCHSR. Die Bindungs-Experimente der vorliegenden Arbeit sollten zum einen zeigen, ob sich VCHSR auch bei der [³⁵S]-GTPγS-Bindung im Meerschweinchens Hippocampus als neutraler Antagonist verhält, wie es von Hurst et al. (2002) für VCHSR an humanen CB₁-Rezeptoren mithilfe von transfizierten Zelllinien und der Messung von Kalziumströmen gezeigt wurde, und ob VCHSR den invers agonistischen Effekt von SR 141716A am CB₁-Rezeptor antagonisieren kann.

Für SR 141716A wurde, in Einklang mit den Ergebnissen der Arbeit von Bauer (2002), eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung gefunden, die bei der höchsten Konzentration von 3 μM etwa 13 % betrug. VCHSR zeigte bei der höchsten untersuchten Konzentration von 3 μM allenfalls eine tendenzielle Abschwächung der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung, die jedoch im Vergleich zur basalen Bindung nicht signifikant war. Ein Lösungsmiteleinfluss kann für diesen Effekt praktisch ausgeschlossen werden, da die Endkonzentration von 1 % Ethanol, die im Reaktionsansatz bei 3 μM VCHSR vorlag, keinen signifikanten Einfluss auf die basale Bindung hatte (nicht gezeigte Ergebnisse) und die leichte Abnahme der [³⁵S]-GTPγS-Bindung auch beobachtet werden konnte, wenn den Kontrollansätzen ebenfalls 1 % Ethanol zugesetzt wurde. In einigen Experimenten reduzierte 3 μM VCHSR scheinbar den Effekt von 3 μM SR 141716A. Der Unterschied gegenüber dem Effekt, den 3 μM SR 141716A alleine verursachte, war jedoch nicht signifikant. Aus den Affinitäten von SR 141716A und VCHSR, die am CB₁-Rezeptor des zerebralen Kortex des Meerschweinchens ermittelt wurden (siehe Kapitel 5.3), kann geschlossen werden, dass für eine merkliche antagonistische Wirkung von VCHSR auf den Effekt von SR 141716A ein deutlicher Überschuss von VCHSR vorliegen müsste, um SR 141716A in nennenswertem Umfang vom CB₁-Rezeptor zu verdrängen und um damit den invers agonistischen Effekt, der in Form der Abnahme der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung in Erscheinung tritt, zu hemmen. Aufgrund der starken Lipophilie von VCHSR war es jedoch nicht möglich, Endkonzentrationen größer 3 μM VCHSR auszutesten. Zum anderen konnte der Einfluss von 3 μM VCHSR auf kleinere Konzentrationen von SR 141716A nicht bestimmt werden, weil der Effekt, der von SR 141716A Konzentrationen kleiner 3 μM hervorgerufen wurde, kaum zu einer signifikanten Abnahme der basalen [³⁵S]-GTPγS-Bindung führte.

Die Ergebnisse der [³⁵S]-GTPγS-Bindung der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den Ergebnissen von Hurst et al. (2002). Hurst und Mitarbeiter untersuchten u.a. den Einfluss von WIN 55,212-2, SR 141716A und VCHSR auf Kalziumströme mithilfe der Patch-clamp Methode in Nervenzellen, die mit dem humanen CB₁-Rezeptor Wildtyp oder einer Rezeptor Mutante

transfiziert waren. Sie konnten zeigen, dass die Hemmung des Kalziumstroms, hervorgerufen durch den CB₁-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 in einer Konzentration von 1 µM durch 1 µM VCHSR abgeschwächt, aber nicht vollständig geblockt wird und dass VCHSR selbst zu einer tendenziellen Steigerung des Kalziumstroms führt, die jedoch nicht signifikant war. SR 141716A selbst führte zu einer signifikanten Steigerung der Kalziumströme und war gleichzeitig in der Lage, den hemmenden Effekt von WIN 55,212-2 auf die Kalziumströme vollständig zu antagonisieren, wenn gleiche Konzentrationen von WIN 55,212-2 und von SR 141716A verwendet wurden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Wirkung von WIN 55,212-2 durch SR 141716A (und auch durch VCHSR) vermindert wird. Die Affinitäten von SR 141716A und VCHSR am CB₁-Rezeptor des Menschen (Hurst et al., 2002) und dem des Meerschweinchens (vorliegende Arbeit) sind ähnlich (siehe Tabelle 17).

	CB₁-R Mensch (Hurst et al. 2002)	CB₁-R Meerschweinchen (eigene Daten)
K_D (SR 141716A)	2,3 ± 1,1 nM	2,12 ± 0,56 nM
K_i (VCHSR)	31,3 ± 9,6 nM	7,8 ± 1,3 nM

Tabelle 17 K_D-Werte von SR 141716A aus Sättigungs-Bindungs-Experimenten und K_i-Werte von VCHSR aus Radioligand-Kompetitions-Experimenten mit [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor des Menschen (Hurst et al., 2002) und des Meerschweinchens (eigene Daten).

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von SR 141716A und VCHSR am CB₁-Rezeptor des Menschen fanden Hurst et al. (2002). Mithilfe einer computergestützten Rezeptor-Modelling-Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehungen von humanen CB₁-Rezeptor-Varianten mit SR 141716A bzw. VCHSR, durch vergleichende Untersuchungen der Affinitäten beider Substanzen an den CB₁-Rezeptor-Varianten und der Untersuchung des Einflusses beider Substanzen auf die Kalziumströme von Zellen mit CB₁-Rezeptor-Varianten konnten Hurst et al. (2002) zeigen, dass der C3-Substituent des Pyrazolrings mit der Aminosäure Lysin (Position 3.28(192)) eine Wechselwirkung eingehen kann. Im Fall von SR 141716A kommt es durch die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung zwischen dem

Sauerstoffatom der Carbonylgruppe des C3-Substituenten und dem Lysin an Position 3.28(192) zur Ausbildung einer zusätzlichen Bindungsstelle neben den aromatischen Wechselwirkungen beider Substanzen mit dem CB₁-Rezeptor, und zwar beim Vorliegen einer räumlichen Anordnung des CB₁-Rezeptors, die der des nicht-aktivierten Rezeptors entspricht. Das Resultat ist eine höhere Affinität von SR 141716A zum nicht-aktivierten CB₁-Rezeptor, wodurch der invers agonistische Effekt erklärt werden kann. VCHSR ist aufgrund der fehlenden Carboxylamidgruppe am C3-Substituenten des Pyrazolrings nicht zur Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung zusätzlich zu den aromatischen Wechselwirkungen am CB₁-Rezeptor befähigt, weist daher keine unterschiedliche Affinität zur inaktiven oder aktiven räumlichen Struktur des CB₁-Rezeptors auf und zeigt folglich auch keinen invers agonistischen Effekt.

Abschließend können aus dieser Studie folgende Schlüsse gezogen werden. SR 141617A zeigt in den [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experimenten am CB₁-Rezeptor des Meerschweinchen Hippocampus einen konzentrationsabhängigen, invers agonistischen Effekt. VCHSR zeigt bis zu einer Konzentration von 3 μM keine invers agonistischen Effekt, d.h. VCHSR verhält sich im [³⁵S]-GTPγS-Bindungs-Experiment am konstitutiv aktiven CB₁-Rezeptor des Meerschweinchen Hippocampus als neutraler Antagonist. Die Tatsache, dass VCHSR den Effekt von SR 141716A auf die [³⁵S]-GTPγS-Bindung bei der Verwendung gleicher Konzentrationen nur der Tendenz nach antagonisieren konnte, liegt wahrscheinlich in der geringen Affinität von VCHSR zum CB₁-Rezeptor begründet.

5.5 Einfluss der Cannabinoide Δ⁹-THC, CBD, SR 141716A und VCHSR auf die Bindung von [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor des zerebralen Kortex der Ratte

Ziel dieser Studie war, den Einfluss der Cannabinoide Δ⁹-THC, CBD, SR 141716A und VCHSR auf die Bindung des selektiven μ-Opioid-Rezeptor-Agonisten [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor von Membranhomogenaten des zerebralen Kortex der Ratte mittels verschiedener Radioligand-Bindungs-Experimente zu untersuchen. Die wichtigsten Fragen waren, ob ein Nachweis für eine allosterische Modulation der [³H]-DAMGO-Bindung am

μ -Opioid-Rezeptor der Ratte durch Δ^9 -THC und CBD, die in der Arbeit von Vaysse et al. (1987) unter Verwendung von [3 H]-Dihydromorphin als μ -Opioid-Rezeptor-Ligand für beide Cannabinoide postuliert wurde, mithilfe von kinetischen Studien erbracht werden kann und ob SR 141716A sowie die strukturverwandte Verbindung VCHSR ebenfalls diese Eigenschaft aufweisen.

Zunächst wurde die Assoziationskinetik von 0,5 nM [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor bestimmt. Die hohe Affinität von [3 H]-DAMGO zeigte sich in einer raschen Assoziationskinetik mit einer Halbwertszeit der Assoziation von 2,69 Minuten und einer scheinbaren Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten von 0,258 min⁻¹. Als nächstes wurde die Affinität von [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor mithilfe von Sättigungs-Bindungs-Experimenten ermittelt. Die signifikant bessere computergestützte Kurvenanpassung für die Sättigungs-Bindungsisotherme ergab sich bei der Verwendung der Funktion einer einseitigen gegenüber der einer zweiseitigen Bindung, was auf nur eine sättigbare Bindungsstelle hinweist. Ein weiterer Hinweis für das Vorhandensein von nur einer sättigbaren Bindungsstelle ist der Rosenthal-Plot, der eine Gerade ergab. Der niedrige K_D -Wert von 0,68 nM zeigt die sehr hohe Affinität von [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor der Ratte. Im Vergleich zum CB₁-Rezeptor des Meerschweinchens weist der μ -Opioid-Rezeptor im zerebralen Kortex der Ratte eine vergleichsweise geringe Rezeptor-Dichte auf, die mit einer maximalen Anzahl der Bindungsstellen für [3 H]-DAMGO mit 203,1 fmol/mg Protein bestimmt wurde. Im Anschluss wurden die Bindungs-Experimente durchgeführt, mit deren Hilfe eine allosterische Modulation durch die Cannabinoide am μ -Opioid-Rezeptor nachgewiesen werden sollte. Die sicherste und einfachste Methode zur Identifizierung einer allosterischen Modulation ist die Erbringung des Nachweises, dass die Dissoziationskinetik eines selektiven Rezeptor-Liganden (hier: [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor) durch eine Testsubstanz (hier: ein Cannabinoid) konzentrationsabhängig verändert wird, wobei es entweder zu einer Verlangsamung oder zu einer Beschleunigung der Dissoziationskinetik kommen kann (Christopoulos und Kenakin, 2002). Im Gegensatz zu den oben genannten Assoziations-Experimenten, wo Assoziations- und Dissoziationsvorgänge parallel ablaufen und es zu einer

Zunahme der Rezeptor-Ligandbindung mit der Zeit bis zum Erreichen einer maximalen Plateauphase kommt, bei der die Assoziations- und die Dissoziationsgeschwindigkeit gleich große konstante Werte aufweisen (steady state), wird bei den Dissoziations-Experimenten durch den Zusatz eines großen Überschusses eines orthosterischen Antagonisten (hier: Naloxon) die Reassoziations des Radioliganden, dessen Dissoziation verfolgt wird, nahezu vollständig unterbunden. Da sich der Dissoziationsvorgang durch die Funktion eines monoexponentiellen Zerfalls beschreiben lässt, kann aus der computergestützten nicht-linearen Regression des zeitlichen Verlaufs des Dissoziationsvorgangs die Halbwertszeit der Dissoziation und damit die entsprechende Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante k_{off} ermittelt werden.

Als Kontrollkurve wurde die Dissoziation von 0,5 nM [^3H]-DAMGO in Gegenwart von 10 μM Naloxon und Abwesenheit einer Testsubstanz (Cannabinoid) bestimmt. Bei der computergestützten nicht-linearen Regression führte die Kurvenanpassung des Diagramms, bei dem die restgebundene Radioaktivität gegen die Zeit aufgetragen wurde, bei der Verwendung der Funktion des biphasischen monoexponentiellen Zerfalls häufig zu einer signifikant besseren Kurvenanpassung als bei der Verwendung der Funktion eines monophasischen exponentiellen Zerfalls, und zwar im Fall der Kontroll-Experimente und der Dissoziations-Experimente in Gegenwart von niedrigen Konzentrationen der Cannabinoide. Dies deutet darauf hin, dass der μ -Opioid-Rezeptor-Agonist [^3H]-DAMGO zwischen zwei Bindungsstellen am μ -Opioid-Rezeptor, nämlich einer hochaffinen und einer niedrigaffinen, unterscheiden kann. In der ersten Phase der Dissoziation kommt es vor allem zu einer Abnahme der Bindung an der niedrigaffinen, in der zweiten Phase zu einer Abnahme hauptsächlich der hochaffinen Bindung. Dieser Befund, dass [^3H]-DAMGO einen biphasischen Dissoziationsverlauf aufweist, ist auch in der Arbeit von Christopoulos und Kenakin (2002) dargestellt. In einigen Dissoziations-Experimenten wurde in Gegenwart der Cannabinoide, vor allem bei hohen Konzentration von Δ^9 -THC und CBD, ein monophasischer, teilweise auch ein biphasischer, monoexponentieller Kurvenverlauf gefunden.

Da die Dissoziationskurven in Gegenwart der Testsubstanzen mit der Kontrollkurve verglichen werden mussten, um eine Veränderung der Dissoziationsgeschwindigkeit feststellen zu können, wurden alle Dissoziationskurven, die mit jeweils einer der beiden Kurvenanpassungen (mono- oder biphasisch) erhalten wurden, auf eine einheitliche Art und Weise ausgewertet. Hierbei wurde beim Vorliegen eines biphasischen Kurvenverlaufs eine Vereinfachung in der Art vorgenommen, dass die zwei Halbwertszeiten der beiden Phasen zu einer Halbwertszeit der Dissoziation zusammengefasst wurden. Alle Halbwertszeiten wurden dann, wie in Abb. 20 dargestellt, zeichnerisch anhand der Dissoziationskurven ermittelt. Ein Beleg dafür, dass diese Vereinfachung zu einer guten Annäherung führt, ist die Tatsache, dass sich der K_D -Wert, der sich aus dem Quotienten von k_{off} mit k_{on} ergibt, gut mit dem K_D -Wert korreliert, der durch Sättigungs-Bindung bestimmt wurde (0,68 nM *versus* 0,35 nM).

Sowohl für Δ^9 -THC als auch für CBD konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten gefunden werden. Während sich die pEC_{50} -Werte der sigmoiden Dosis-Wirkungskurve für die Steigerung der Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten durch steigende Konzentrationen der Testsubstanzen für Δ^9 -THC und CBD mit 4,63 und 4,38 nur geringfügig unterschieden, fiel der maximale Effekt von Δ^9 -THC deutlich kleiner aus als der für CBD (zweifache *versus* mindestens zwölffache Dissoziationsgeschwindigkeit der Kontrollkurve). Die höchsten untersuchten Konzentrationen von SR 141716A (10 μ M) und VCHSR (3 μ M) führten zu keiner signifikanten Änderung der Dissoziationsgeschwindigkeit von [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor.

In Pseudo-Kompetitions-Experimenten zeigten Δ^9 -THC und CBD, wie schon aufgrund der Ergebnisse aus den Dissoziations-Experimenten zu erwarten, eine Verdrängung der [3 H]-DAMGO-Bindung am μ -Opioid-Rezeptor. Überraschenderweise zeigte aber auch SR 141716A, nicht aber VCHSR, ebenfalls eine Verdrängung der [3 H]-DAMGO-Bindung. Der pK_i -Wert von SR 141716A war sogar mit 5,56 größer als der von Δ^9 -THC (4,72) und vergleichbar mit dem von CBD (5,24). Aus den sigmoiden Kurvenanpassungen der Ergebnisse der Pseudo-Kompetitions-Experimente wurden für Δ^9 -THC und CBD Hill-Koeffizienten gefunden, die signifikant

kleiner als -1 waren, was ein weiterer Hinweis für eine nicht-kompetitive Interaktion ist. Im Gegensatz dazu war der Hill-Koeffizient der Verdrängungskurven für SR 141716A geringfügig größer als -1, was eher für eine kompetitive Interaktion spricht.

Die Kurvenanpassung mit der Funktion von Ehlert führte in keinem Fall zu plausiblen Ergebnissen, da eine sehr große Schwankungsbreite für den Kooperativitätsfaktor α und für die Gleichgewichts-Assoziationskonstante K_A des allosterischen Modulators zum freien Rezeptor gefunden wurde. Eine mögliche Erklärung für diesen Befund ist, dass die [3 H]-DAMGO-Bindung in Gegenwart der höchsten untersuchten Konzentration von Δ^9 -THC und CBD nach Gleichgewichtseinstellung unter dem Niveau der unspezifischen Bindung lag, die mit 10 μ M Naloxon bestimmt wurde. Dieses Ergebnis lässt sich nicht ausschließlich über einen allosterischen Effekt hinreichend erklären.

Des Weiteren wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, bei denen der Einfluss der Cannabinoide auf den Zeitverlauf der Änderung der Gleichgewichts-Bindung von [3 H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor ermittelt wurde. Diese Experimente wurden in Analogie zu den Dissoziations-Experimenten mit dem Unterschied durchgeführt, dass in Abwesenheit von Naloxon gearbeitet wurde. Für die höchste Konzentration von Δ^9 -THC (100 μ M) und für 30 und 100 μ M CBD konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kurven aus den Dissoziations-Experimenten und den Kurven der Zeitverläufe der Änderung der Gleichgewichts-Bindung von [3 H]-DAMGO gefunden werden. Der letzte Befund könnte ein Hinweis darauf sein, dass hohe Konzentrationen von Δ^9 -THC und CBD nicht nur über eine allosterische Bindungsstelle die Dissoziationsgeschwindigkeit von [3 H]-DAMGO beschleunigen und dadurch zu einer Abnahme der Radioligand-Bindung führen, sondern zusätzlich auch die orthosterische Bindungsstelle am μ -Opioid-Rezeptor besetzen können. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit wäre, dass hohe Konzentrationen von Δ^9 -THC und CBD nicht nur die Dissoziation von [3 H]-DAMGO durch eine allosterische Modulation der orthosterischen Bindungsstelle beschleunigen, sondern darüber hinaus auch die Assoziation von [3 H]-DAMGO an der orthosterischen Bindungsstelle durch eine allosterische Modulation verlangsamen. Zur Klärung dieser Möglichkeiten

könnte es hilfreich sein, den Einfluss der Cannabinoide auf die Assoziations-Geschwindigkeit von [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor zu untersuchen. Mithilfe der für die jeweiligen Konzentrationen der Cannabinoide in den Dissoziations-Experimenten ermittelten Dissoziations-Geschwindigkeitskonstanten könnten dann die wirklichen Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten unter dem Einfluss der Cannabinoide aus den gemessenen scheinbaren Assoziations-Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden.

Bei niedrigeren Konzentrationen von Δ^9 -THC (30 μM) und von CBD (10 μM) war das untere Plateau der Kurvenanpassung bei den Zeitverläufen der Änderung der Gleichgewichts-Bindung signifikant höher als das der entsprechenden Dissoziations-Experimente in Gegenwart von Naloxon, was zeigt, dass neben den beschleunigten Dissoziations- weiterhin Assoziationsvorgänge von [^3H]-DAMGO stattfanden. Interessanterweise unterschieden sich die Kurvenanpassungen für die Kontrollkurve der Dissoziations-Experimente und die in Gegenwart von 10 μM SR 141716A für den Zeitverlauf der Änderung der Gleichgewichts-Bindung erhaltene Kurvenanpassung nur geringfügig hinsichtlich des unteren Kurvenplateaus. Dabei war die Halbwertszeit der Abnahme der [^3H]-DAMGO-Bindung in beiden Fällen nicht signifikant unterschiedlich. Dieser Befund ist ein weiteres Indiz dafür, dass SR 141716A eher eine kompetitive Interaktion mit [^3H]-DAMGO am μ -Opioid-Rezeptor als eine allosterische Interaktion eingeht. Für VCHSR konnte lediglich bei der höchsten untersuchten Konzentration von 3 μM in den Pseudo-Kompetitions-Experimenten eine geringe Abnahme der [^3H]-DAMGO-Bindung beobachtet werden. Um welche Art der Interaktion von VCHSR mit dem μ -Opioid-Rezeptor und dem gebundenen [^3H]-DAMGO es sich dabei handelt, kann aus den Ergebnissen nicht hinreichend erklärt werden.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Effekte von SR 141716A und VCHSR ist die Tatsache, dass VCHSR wesentlich lipophiler als SR 141716A ist und daher ein größerer Anteil von VCHSR unspezifisch an innere Oberflächen der Versuchsanordnung gebunden wird und sich VCHSR darüber hinaus vermehrt in Zellmembranen einlagert. In jedem Fall ist die effektive Konzentration von VCHSR gegenüber der von SR 141716A am μ -Opioid-Rezeptor geringer.

5.6 Einfluss der Transfektion von NG 108-15 Zellen mit einer siRNA auf das Ausmaß der CB₁-Rezeptor-Expression

Ziel dieser Studie an NG 108-15 Zellen, die CB₁-Rezeptoren spontan exprimieren (Di Toro et al., 1998), war es zu untersuchen, ob eine transiente Transfektion von NG 108-15 Zellen mit einer siRNA, die gegen die CB₁-Rezeptor-mRNA gerichtet ist, das Ausmaß der CB₁-Rezeptor-Expression beeinflusst. Kommt es nämlich durch die siRNA zu einem spezifischen Abbau der CB₁-Rezeptor-mRNA, so würde man auch eine Abnahme der CB₁-Rezeptor-Expression erwarten können. Die siRNA-Methode ist eine relative neue Methode, die das Methodenspektrum zur gezielten Ausschaltung von Genen - neben den Knockout- und Antisense-Oligodesoxynukleotid-Techniken - erweitert. Im Gegensatz zur Knockout-Technik bietet sie den Vorteil, dass in pharmakologischen Modellen Effekte, die durch den Ausfall eines Gens hervorgerufen werden, beobachtet werden können, ohne dass diese Effekte von kompensatorischen Effekten überlagert werden, die aus dem langandauernden bzw. von Geburt an bestehenden Fehlen eines Gens resultieren würden.

In einem Vorversuch wurde zunächst untersucht, ob die Gesamtmenge an transkribierter CB₁-Rezeptor-mRNA in NG 108-15 Zellen über einen Untersuchungszeitraum von 48 Stunden konstant ist oder ob es zu spontanen Änderungen der CB₁-Rezeptor-DNA-Transkription bzw. zu einer spontanen Änderung der CB₁-Rezeptor-mRNA-Degradation kommt. Diese Vorversuche waren nötig, um den Einfluss spontaner Änderungen der CB₁-Rezeptor-mRNA-Gesamtmenge auf eine zu beobachtende Änderung der CB₁-Protein-Expression ausschließen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Zellen - mit Ausnahme des Schrittes der transienten Transfektion - mit dem gleichen Protokoll behandelt wie die Zellen, die in den späteren Experimenten mit der siRNA transient transfiziert wurden. Wie die Ergebnisse der sechs RT-PCRs von drei Experimenten für die nicht transfizierten NG 108-15 Zellen zeigen, traten keine signifikanten spontanen Änderungen bei der transkribierten CB₁-Rezeptor-mRNA-Gesamtmenge über den gesamten Beobachtungszeitraum von 48 Stunden auf.

Der Einfluss der siRNA auf die CB₁-Rezeptor-mRNA von NG 108-15 Zellen sollte indirekt über die Bestimmung des CB₁-Rezeptor-Proteins mithilfe eines

Western Blots unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen den CB₁-Rezeptor der Ratte gerichtet ist, nachgewiesen werden. Bei dem Vergleich der CB₁-Rezeptor-Expression von nicht transfizierten mit der von transfizierten NG 108-15 Zellen aus einem Transfektions-Experiment konnte mithilfe der zwei Western Blots kein Unterschied bezüglich des Ausmaßes der CB₁-Rezeptor-Proteinmenge gefunden werden. Auch in weiteren Transfektions-Experimenten mit der siRNA, die zur Optimierung der Proteinmenge für den Western Blot durchgeführt wurden (nicht gezeigte Daten) gab es keinen Hinweis auf eine Abnahme der CB₁-Rezeptor-Expression durch die eingesetzte siRNA.

Eine abschließende Bewertung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNA hinsichtlich ihrer Eignung zum gezielten Abbau der CB₁-Rezeptor-mRNA in NG 108-15 Zellen kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht vorgenommen werden. Es müssten weitere Experimente unter Verwendung verschiedener Transfektionsprotokolle und Austestung unterschiedlicher Zeiträume für die Zeit zwischen der Transfektion und der Proteinaufbereitung durchgeführt werden. Andererseits besteht eine nicht geringe Wahrscheinlichkeit dafür, dass die verwendete siRNA, obwohl sie alle zwingend notwendigen strukturellen Merkmale für eine optimierte siRNA erfüllt, keinen messbaren Effekt auf die CB₁-Rezeptor-mRNA Gesamtmenge von NG 108-15 Zellen zeigt. Aus anderen Arbeiten ist bekannt, dass die gezielte Verminderung der Expression eines stark exprimierten Gens mit einer siRNA sehr schwierig sein kann. So beträgt die Trefferquote - trotz Einhaltung optimierter Versuchsbedingungen und sorgfältiger Auswahl der siRNA - nur rund 50 % (Harborth et al., 2001). Es scheint daher nahe liegend, auch weitere siRNAs, die gegen andere Sequenzen der CB₁-Rezeptor-mRNA gerichtet sind, auszutesten. Andererseits hat diese Studie gezeigt, dass ein Nachweis der CB₁-Rezeptor-Proteinmenge mit dem Western Blot Verfahren und dem verwendeten Antikörper gegen den CB₁-Rezeptor der Ratte möglich ist.

5.7 Nachweis des Funktionierens einer Methode zur transienten Transfektion einer cDNA des humanen 5-HT_{3A}-Rezeptors in HEK 293 Zellen mithilfe eines Radioligand-Bindungs-Experiments

Diese Studie hatte das Ziel, eine Methode zur transienten Transfektion einer cDNA (humaner 5-HT_{3A}-Rezeptor im Plasmidvektor pcDNA 3.1) in HEK 293 Zellen zu testen und eine vereinfachte Membranpräparationsmethode zu etablieren bei der, im Gegensatz zu den übrigen Membranpräparationen der vorliegenden Arbeit, statt eines P2-Pellets ein P1-Pellet erzeugt wurde und anstelle des Potter-Elvehjem Homogenisators ausschließlich ein Ultra-Turrax zur Homogenisierung verwendet wurde. Der Erfolg der transienten Transfektion sollte durch ein Radioligand-Kompetitions-Experiment mit einem spezifischen Radioliganden (5-HT_{3A}-Rezeptor-Antagonist [³H]-GR 65630) am exprimierten Rezeptor-Protein von Membranhomogenaten der transfizierten HEK 293 Zellen nachgewiesen werden.

An dem exprimierten humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor von Membranhomogenaten der transient transfizierten HEK 293 Zellen wurde mit einer fixen Konzentration von 1 nM [³H]-GR 65630 und aufsteigenden Konzentrationen von MDL 72222 (5-HT_{3A}-Rezeptor-Antagonist) eine sigmoide einseitige Verdrängungskurve mit einem Hill-Koeffizienten erhalten, der sich nicht signifikant von -1 unterscheidet, was auf eine kompetitive Verdrängung von [³H]-GR 65630 durch MDL 72222 schließen lässt. Der pIC₅₀-Wert für MDL 72222 lag bei 7,33. Als Negativkontrolle für das Transfektions-Experiment wurde das Ausmaß der Bindung von [³H]-GR 65630 - einmal in Abwesenheit und einmal in Anwesenheit von 10 µM MDL 72222 - mit Membranhomogenaten von nicht transfizierten HEK 293 Zellen bestimmt. Das Ausmaß der Bindung von [³H]-GR 65630 bei den nicht transfizierten HEK 293 Zellen entsprach dem Ausmaß der unspezifischen Bindung des Radioligand-Kompetitions-Experiments, das mit Membranhomogenaten von transient transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt wurde (ca. 9,0 % der totalen Bindung). Dieses Ergebnis zeigt, dass nicht transfizierte HEK 293 Zellen keine humanen 5-HT_{3A}-Rezeptoren aufweisen und dass eine transiente Transfektion mit einem plasmidgebundenen humanen 5-HT_{3A}-Rezeptor durch Verwendung des beschriebenen Versuchsprotokolls möglich ist.

Der Anteil der totalen Bindung von 1 nM [³H]-GR 65630 an der Gesamtmenge der zugesetzten Radioaktivität ist mit 20,7 % sehr hoch, was zu Schwierigkeiten führt, wenn z.B. die Gleichgewichts-Dissoziationskonstante K_D und die Anzahl der maximalen Bindungsstellen B_{max} durch homologe Konkurrenz unter vergleichbaren Bedingungen wie bei dem gezeigten Wettbewerbs-Experiment, aber mit GR 65630 anstelle von MDL 72222 bestimmt werden sollen. Die mathematischen Gleichungen für die Berechnung von Bindungsparametern, in die die freie Konzentration des Radioliganden als Wert eingesetzt wird, sollten nur angewendet werden, wenn der gebundene Anteil des Radioliganden an der Gesamtmenge der zugesetzten Stoffmenge weniger als 10 % beträgt (Bennett und Yamamura, 1985). Ansonsten müsste die wirkliche freie Konzentration des Radioliganden jeweils separat bestimmt werden, was bei einem Bindungs-Experiment jedoch sehr aufwendig ist. Eventuell kann durch eine Veränderung der Radioligandkonzentration ein niedrigerer Anteil der total gebundenen Radioaktivität erzielt werden.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden zum einen methodische Experimente durchgeführt, um bestehende Methoden zur Aufbereitung von Membranfraktionen zu optimieren, und zum anderen Radioligand-Bindungs-Experimente, die die Ermittlung der Bindungseigenschaften von CB₁-Rezeptor-Liganden an CB₁-Rezeptoren und μ -Opioid-Rezeptoren zum Ziel hatten. Ein weiteres Ziel bestand darin, die CB₁-Rezeptor-Expression in NG 108-15 Zellen durch "Gene Silencing" gezielt zu hemmen.

Bei der Austestung von zwei Methoden zur Präparation des zerebralen Kortex der Maus ergab sich eine geringe Zunahme der Agonist-stimulierten [³⁵S]-GTP γ S-Bindung am CB₁-Rezeptor für die Methode, bei der das Hirngewebe vor der Homogenisierung mit einem Potter-Elvehjem Homogenisator zusätzlich bei -80 °C schockgefroren und anschließend gemörsert wurde. Die modifizierte aufwendigere Methode wurde aufgrund des ungünstigen Aufwand-Nutzen-Verhältnisses nicht als Standardprotokoll übernommen.

Die Austestung von zwei unterschiedlichen Homogenisierungsschritten während der Membranpräparation des zerebralen Kortex der Maus (Potter-Elvehjem Homogenisator alleine oder zusätzlich mit Ultra-Turrax) ergab keine Unterschiede für die Bindungseigenschaften (K_D und B_{max}) von [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor, die in homologen Kompetitionsexperimenten unter Verwendung beider Membranpräparationen in parallelen Versuchsansätzen ermittelt wurden. Beide Membranpräparationen können daher zur Proteingewinnung für Bindungsstudien am CB₁-Rezeptor als adäquat betrachtet werden.

Die Ergebnisse der Radioligand-Kompetitionsexperimente mit dem selektiven CB₁-Rezeptor-Antagonisten/-inversen Agonisten [³H]-SR 141716A am CB₁-Rezeptor des Meerschweinchens zeigen, dass alle untersuchten Cannabinoide durch eine kompetitive Hemmung [³H]-SR 141716A aus seiner spezifischen Bindung verdrängen. Die Affinitäten der untersuchten Cannabinoide am CB₁-Rezeptor des Meerschweinchens betragen in absteigender Reihenfolge: SR 141716A $8,72 \pm 0,06$ (pK_D), VCHSR $8,11 \pm 0,07$ (pK_i), Δ^9 -THC $6,62 \pm 0,02$ (pK_i) und CBD $5,53 \pm 0,10$ (pK_i). Die Affinitäten von [³H]-SR 141716A am CB₁-

Rezeptor des zerebralen Kortex von Meerschweinchen und Maus, die beide durch homologe Kompletions-Experimente in der vorliegenden Arbeit bestimmt wurden, sind einander sehr ähnlich ($1,90 \pm 0,35$ nM *versus* $3,5 \pm 0,7$ nM).

Bei der Untersuchung des Einflusses des CB₁-Rezeptor-Antagonisten/-inversen Agonisten SR 141716A und des neutralen CB₁-Rezeptor-Antagonisten VCHSR auf das Ausmaß der [³⁵S]-GTPγS-Bindung an tonisch aktiven CB₁-Rezeptoren des Meerschweinchen Hippocampus wurde gefunden, dass die basale [³⁵S]-GTPγS-Bindung durch SR 141716A gehemmt, durch VCHSR nicht beeinflusst und durch den Cannabinoid-Rezeptor-Agonisten WIN 55,212-2 gesteigert wurde. Obwohl VCHSR die agonistische Wirkung von WIN 55,212-2 stark verminderte, zeigte es gegenüber der invers agonistischen Wirkung von SR 141716A nur eine angedeutete (nicht signifikante) Abschwächung.

Mithilfe verschiedener Radioligand-Bindungs-Experimente mit dem selektiven μ-Opioid-Rezeptor-Agonisten [³H]-DAMGO konnte eine allosterische Modulation der orthosterischen Bindung von [³H]-DAMGO durch die Cannabinoide CBD und Δ⁹-THC nachgewiesen werden, wobei beide Verbindungen zu einer konzentrationsabhängigen Beschleunigung der Dissoziations-Geschwindigkeit von [³H]-DAMGO am μ-Opioid-Rezeptor führten ($1218,0 \pm 193,1$ % *versus* $180,6 \pm 1,0$ % der Dissoziationsgeschwindigkeit der Kontrollkurve in Abwesenheit der Cannabinoide). Für SR 141716A wurde keine Beschleunigung der Dissoziationskinetik von [³H]-DAMGO, aber trotzdem eine konzentrationsabhängige Verdrängung der spezifischen [³H]-DAMGO-Bindung in Pseudo-Kompletions-Experimenten gefunden ($IC_{50} = 4,72 \pm 0,91$ μM), bei der es sich vermutlich um eine kompetitive Interaktion an der orthosterischen Bindungsstelle des μ-Opioid-Rezeptors mit [³H]-DAMGO handelt. VCHSR zeigte weder eine Beschleunigung der Dissoziationskinetik von [³H]-DAMGO noch eine Verdrängung der spezifischen [³H]-DAMGO-Bindung in den Pseudo-Kompletions-Experimenten.

In NG 108-15 Zellen bewirkte eine siRNA, die gegen die mRNA des CB₁-Rezeptors der Ratte gerichtet ist, keine Abnahme der CB₁-Rezeptor-Expression nach einer Zeitdauer von 120 Stunden nach der Transfektion.

Der in den Western Blots verwendete Antikörper gegen den CB₁-Rezeptor der Ratte kann für die Bestimmung der CB₁-Rezeptor-Expression verwendet werden. Die Spezifität des Antikörpers wurde mit parallel untersuchten Proteinproben des zerebralen Kortex der Ratte verifiziert und die erhaltenen Banden stimmen mit denen in der Arbeit von Twitchell et al. (1997) gezeigten überein. Zur erfolgreichen Ausschaltung der CB₁-Rezeptor-mRNA sollten weitere siRNAs, die gegen andere Sequenzen der CB₁-Rezeptor-mRNA gerichtet sind, ausgetestet werden.

Schließlich wurde im Hinblick auf eine zukünftig geplante transiente Transfektion von HEK 293 Zellen mit hCB₁-Rezeptor-cDNA überprüft, ob eine bestimmte Versuchsvorschrift die Transfektion grundsätzlich erlaubt. Durch den Nachweis der spezifischen Bindung des selektiven Serotonin 5-HT_{3A}-Rezeptor-Antagonisten [³H]-GR 65630 an Membranhomogenaten von transient transfizierten HEK 293 Zellen konnte der Nachweis erbracht werden, dass das verwendete Transfektionsprotokoll in der Tat geeignet ist, einen plasmidgebundenen Rezeptor transient in HEK 293 Zellen zu transfizieren.

7 Literaturverzeichnis

Ameri (1999)

The effects of cannabinoids on the brain.

Prog. Neurobiol. 58: 315-348.

Baker, D., G. Pryce, G. Giovannoni, A.J. Thompson (2003)

The therapeutic potential of cannabis.

Lancet Neurol. 2: 291-98.

Baskfield, C. Y., B. R. Martin, J. L. Wiley (2004)

Differential effects of delta9-tetrahydrocannabinol and methanandamide in CB₁ knockout and wild-type mice.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 309: 86-91.

Bauer, U. (2002)

Wirkung von Cannabinoiden sowie eines Antisense Oligodesoxynukleotids und einer hCB₁ Rezeptor Mutation auf Cannabinoid CB₁ Rezeptoren.

Dissertationsschrift. Math.-Nat. Fakultät, Universität Bonn.

Bennett, J.P., H.I. Yamamura (1985)

Neurotransmitter, hormone or drug receptor binding methods.

In: Yamamura, H.I. (Hrsg.): Neurotransmitter Receptor Binding. 2. Auflage; New York: Raven Press. pp 61-89.

Bensaid, M., M. Gary-Bobo, A. Esclangon, J.P. Maffrand, G. Le Fur, F. Oury-Donat, P. Soubrie (2003)

The cannabinoid CB₁ receptor antagonist SR 141716 increases Acrp30 mRNA expression in adipose tissue of obese fa/fa rats and in cultured adipocyte cells.

Mol. Pharmacol. 63: 908-14.

Bisogno, T., D. Melck, M.Y. Bobrov, N.M. Gretskaya, V.V. Bezuglov, L. De Petrocellis, V. Di Marzo (2000)

N-acyl-dopamines: novel synthetic CB₁ cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo.

Biochem. J. 351: 817-824.

Bohme, G. A., M. Laville, C. Ledent, M. Parmentier, A. Imperato (2000)

Enhanced long-term potentiation in mice lacking cannabinoid CB₁ receptors. Neuroscience 95: 5-7.

Bouaboula, M., C. Poinot-Chazel, B. Bourrie, X. Canat, B. Calandra, M. Rinaldi-Carmona, G. Le Fur, P. Casellas (1995)

Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB₁.

Biochem. J. 312: 637-41.

Bouaboula, M., S. Perrachon, L. Milligan, X. Canat, M. Rinaldi-Carmona, M. Portier, F. Barth, B. Calandra, F. Pecceu, J. Lupker, J.P. Maffrand, G. Le Fur, P. Casellas (1997)

A selective inverse agonist for central cannabinoid receptor inhibits mitogen-activated protein kinase activation stimulated by insulin or insulin-like growth factor 1. Evidence for a new model of receptor/ligand interactions.

J. Biol. Chem. 272: 22330-39.

Bradford, M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal. Biochem. 72: 248-54.

Brüss, M., T. Eucker, M. Göthert, H. Bönisch (2000)

Exon-intron organization of the human 5-HT_{3A} receptor gene.

Neuropharmacology 39: 308-315.

Bylund, D.B., H.I. Yamamura (1990)

Methods for receptor binding.

In: Yamamura, H.I. (Hrsg.): Methods in Neurotransmitter Receptor Analysis. New York: Raven Press. pp 1-35.

Chaperon, F., M. H. Thiebot (1999)

Behavioral effects of cannabinoid agents in animals.

Crit. Rev. Neurobiol. 13: 243-81.

Cheng Y.C., W.H. Prusoff (1973)

Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 percent inhibition (IC_{50}) of an enzymatic reaction.

Biochem. Pharmacol. 22: 3099-3108.

Chomczynski P., N. Sacchi (1987)

Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.

Anal. Biochem. 162: 156-159.

Christopoulos, A., T. Kenakin (2002)

G protein-coupled receptor allosterism and complexing.

Pharmacol. Rev. 54: 323-374.

Colombo, G., R. Agabio, G. Diaz, C. Lobina, R. Reali, G.L. Gessa (1998)

Appetite suppression and weight loss after the cannabinoid antagonist SR 141716.

Life Sci. 63: L113-L117.

Cossu, G., C. Ledent, L. Fattore, A. Imperato, G.A. Bohme, M. Parmentier, W. Fratta (2001)

Cannabinoid CB_1 receptor knockout mice fail to self-administer morphine but not other drugs of abuse.

Behav. Brain Res. 118: 61-65.

Costa, B., M. Colleoni (1999)

SR 141716A induces in rats a behavioral pattern opposite to that of CB₁ receptor agonists.

Zhongguo Yao Li Xue Bao 20: 1103-08.

Cota, D., G. Marsicano, M. Tschop, Y. Grubler, C. Flachskamm, M. Schubert, D. Auer, A. Yassouridis, C. Thone-Reineke, S. Ortmann, F. Tomassoni, C. Cervino, E. Nisoli, A.C. Linthorst, R. Pasquali, B. Lutz, G.K. Stalla, U. Pagotto (2003)

The endogenous cannabinoid system affects energy balance via central orexigenic drive and peripheral lipogenesis.

J. Clin. Invest. 112: 423-31.

Cravatt, B.F., D.K. Giang, S.P. Mayfield, D.L. Boger, R.A. Lerner, N.B. Gilula (1996)

Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides.

Nature 384: 83-87.

Deadwyler, S.A., R.E. Hampson, B.A. Bennett, T.A. Edwards, J. Mu, M.A. Pacheco, S.J. Ward, S.R. Childers (1993)

Cannabinoids modulate potassium current in cultured hippocampal neurons.

Receptors Channels 1: 121-34.

De Blasi, A., K. O'Reily, H.J. Motulsky (1989)

Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor.

Trends Pharmacol. Sci. 10: 227-229.

Devane, W.A., F.A. Dysarz, M.R. Johnson, L.S. Melvin., A.C. Howlett (1988)

Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain.

Mol. Pharmacol. 34: 605-13.

Devane, W.A., L. Hanus, A. Breuer, R.G. Pertwee, L.A. Stevenson, G. Griffin, D. Gibson, A. Mandelbaum, A. Etinger, R. Mechoulam (1992)

Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor.

Science (Wash. DC) 258: 1946-1949.

Di Marzo, V., A. Fontana, H. Cadas, S. Schinelli, G. Cimino, J.C. Schwartz, D. Piomelli (1994)

Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons.

Nature 372: 686-91.

Di Marzo, V., C.S. Breivogel, Q. Tao, D.T. Bridgen, R.K. Razdan, A.M. Zimmer, A. Zimmer, B.R. Martin (2000)

Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB₁ cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB₁, non-CB₂ receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain.

J. Neurochem. 75: 2434-2444.

Di Marzo, V., S.K. Goparaju, L. Wang, L. Liu, S. Batkai, Z. Jarai, F. Fezza, G.I. Miura, R.D. Palmiter, T. Sugiura, G. Kunos (2001)

Leptin-regulated endocannabinoids are involved in maintaining food intake.

Nature 410: 822-25.

Dinh, T.P., T.F. Freund, D. Piomelli (2002)

A role for monoglyceride lipase in 2-arachidonoylglycerol inactivation.

Chem. Phys. Lipids 121: 149-158.

Di Toro, R., G. Campana, V. Sciaretta, G. Murari, S. Spampinato (1998)

Regulation of delta opioid receptors by delta9-tetrahydrocannabinol in NG108-15 hybrid cells.

Life Sci. 63: L197-L204.

Ehlert F.J. (1988)

Estimation of the affinities of allosteric ligands using radioligand binding and pharmacological null methods.

Mol. Pharmacol. 35: 187-194.

Elbashir, S.M., J. Harborth, K. Weber, T. Tuschl (2002)

Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs.

Methods 26: 199-213.

Forth, W., D. Henschler, W. Rummel, U. Förstermann, K. Starke (2001)

Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Urban & Fischer Verlag (München), 8. Auflage.

Freund, T.F., I. Katona, D. Piomelli (2003)

Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling.

Physiol. Rev. 83: 1017-66.

Fride, E., R. Mechoulam (1993)

Pharmacological activity of the cannabinoid receptor agonist, anandamide, a brain constituent.

Eur. J. Pharmacol. 231: 313-14.

Galiegue, S., S. Mary, J. Marchand, D. Dussossoy, D. Carriere, P. Carayon, M. Bouaboula, D. Shire, G. Le Fur, P. Casellas (1995)

Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations.

Eur. J. Biochem. 232: 54-61.

Gerard, C.M., C. Mollereau, G. Vassart, M. Parmentier (1991)

Molecular cloning of a human cannabinoid receptor which is also expressed in testis.

Biochem. J. 279 (Pt 1): 129-34.

Guo, J., S.R. Ikeda (2004)

Endocannabinoids modulate N-type calcium channels and G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels via CB1 cannabinoid receptors heterologously expressed in mammalian neurons.

Mol. Pharmacol. 65: 665-74.

Guzman, M., I. Galve-Roperh, C. Sanchez (2001)

Ceramide: a new second messenger of cannabinoid action.

Trends Pharmacol. Sci. 22: 19-22.

Guzman, M., C. Sanchez, I. Galve-Roperh (2002)

Cannabinoids and cell fate.

Pharmacol. Ther. 95: 175-84.

Hanus, L., S. Abu-Lafi, E. Fride, A. Breuer, Z. Vogel, D.E. Shalev, I. Kustanovich, R. Mechoulam (2001)

2-Arachidonyl glyceryl ether, an endogenous agonist of the cannabinoid CB₁ receptor.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98: 3662-3665.

Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, K. Weber (2001)

Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs.

J. Cell Sci. 114: 4557-4565.

Herkenham, M., A.B. Lynn, M.R. Johnson, L.S. Melvin, B.R. de Costa, K.C. Rice (1991)

Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study.

J. Neurosci. 11: 563-83.

Howlett, A.C. (1985)

Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes.

Mol. Pharmacol. 27: 429-36.

Hurst, D.P., D.L. Lynch, J. Barnett-Norris, S.M. Hyatt, H.H. Seltzman, M. Zhong, Z.H. Song, J. Nie, D. Lewis, P.H. Reggio (2002)

N-(piperidin-1-yl)-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-1H-pyrazole-3-carboxamide (SR 141716A) interaction with LYS 3.28(193) is crucial for its inverse agonism at the cannabinoid CB₁-receptor.

Mol. Pharmacol. 62: 1274-1287.

Kalant, H. (2001)

Medicinal use of cannabis: history and current status.

Pain Res. Manag. 6: 80-91.

Kathmann, M., B. Weber, E. Schlicker (2001)

Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of acetylcholine release in the brain of NMRI, CD-1 and C57BL/6J mice.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363: 50-56.

Kilpatrick, G.J., J.J. Brian, J. Tyers, M.B. Tyers (1989)

Binding of the 5-HT₃ ligand, [³H]GR65630, to rat area postrema, vagus nerve and the brains of several species.

Eur. J. Pharmacol. 159: 157-164.

Lüllmann, H., K. Mohr (2004)

Pharmakologie und Toxikologie. Arzneimittelwirkungen verstehen - Medikamente gezielt einsetzen.

Thieme Verlag (Stuttgart), 14. Auflage.

Mackie, K., B. Hille (1992)

Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89: 3825-29.

Manzanares, J., J. Corchero, J. Romero, J.J. Fernandez-Ruiz, J.A. Ramos, J.A. Fuentes (1999)

Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids.

Trends Pharmacol. Sci. 20: 287-294.

Marsicano, G., C.T. Wotjak, S.C. Azad, T. Bisogno, G. Rammes, M.G. Cascio, H. Hermann, J. Tang, C. Hofmann, W. Zieglgansberger, V. Di Marzo, B. Lutz (2002)

The endogenous cannabinoid system controls extinction of aversive memories.

Nature 418: 530-34.

Marsicano, G., S. Goodenough, K. Monory, H. Hermann, M. Eder, A. Cannich, S.C. Azad, M.G. Cascio, S.O. Gutierrez, M. van der Stelt, M.L. Lopez-Rodriguez, E. Casanova, G. Schutz, W. Zieglgansberger, V. Di Marzo, C. Behl, B. Lutz (2003)

CB₁ cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity.

Science 302: 84-88.

Matsuda, L.A., S.J. Lolait, M.J. Brownstein, A.C. Young, T.I. Bonner (1990)

Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA.

Nature 346: 561-64.

Mechoulam, R., Y. Gaoni (1965)

A total synthesis of DL-delta-1-tetrahydrocannabinol, the active constituent of hashish.

J. Am. Chem. Soc. 87: 3273-75.

Motulsky, H., A. Christopoulos (2003)

Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression.

GraphPad Prism[®] Manual Version 4.0.

Munro, S., K.L. Thomas, M. Abu-Shaar (1993)

Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids.
Nature 365: 61-65.

Nakazi, M., U. Bauer, T. Nickel, M. Kathmann, E. Schlicker (2000)

Inhibition of serotonin release in the mouse brain via presynaptic cannabinoid CB₁ receptors.
Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 361: 19-24.

Pertwee, R.G., L.A. Stevenson, D.B. Elrick, R. Mechoulam, A.D. Corbett (1992)

Inhibitory effects of certain enantiomeric cannabinoids in the mouse vas deferens and the myenteric plexus preparation of guinea-pig small intestine.
Br. J. Pharmacol. 105: 980-84.

Pertwee, R.G., S.R. Fernando, J.E. Nash, A.A. Coutts (1996)

Further evidence for the presence of cannabinoid CB₁ receptors in guinea-pig small intestine.
Br. J. Pharmacol. 118: 2199-205.

Pertwee, R.G. (1997)

Pharmacology of cannabinoid CB₁ and CB₂ receptors.
Pharmacol. Ther. 74: 129-80.

Petrocellis, L.D., M.G. Cascio, V.D. Marzo (2004)

The endocannabinoid system: a general view and latest additions.
Br. J. Pharmacol. 141: 765-74.

Porter, A.C., J.M. Sauer, M.D. Knierman, G.W. Becker, M.J. Berna, J. Bao, G.G. Nomikos, P. Carter, F.P. Bymaster, A.B. Leese, C.C. Felder (2002)

Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB₁ receptor.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 301: 1020-1024.

Pugh, G., M.E. Abood, S.P. Welch (1996)

Antisense oligodeoxynucleotides to the kappa-1 receptor block the antinociceptive effects of delta 9-THC in the spinal cord.

Brain Res. 689: 157-8.

Racz, I., A. Bilkei-Gorzo, Z.E. Toth, K. Michel, M. Palkovits, A. Zimmer (2003)

A critical role for the cannabinoid CB1 receptors in alcohol dependence and stress-stimulated ethanol drinking.

J. Neurosci. 23: 2453-58.

Rinaldi-Carmona, M., F. Barth, M. Heaulme, D. Shire, B. Calandra, C. Congy, S. Martinez, J. Maruani, G. Neliat, D. Caput (1994)

SR 141716A, a potent and selective antagonist of the brain cannabinoid receptor.

FEBS Lett. 350: 240-44.

Robson, P. (2001)

Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids.

Br. J. Psychiatry 178: 107-15.

Rosenthal H.E. (1967)

Graphical method for the determination and presentation of binding parameters in a complex system.

Anal. Biochem. 20: 525-532.

Sanchez, C., I. Galve-Roperh, D. Rueda, M. Guzman (1998)

Involvement of sphingomyelin hydrolysis and the mitogen-activated protein kinase cascade in the Delta9-tetrahydrocannabinol-induced stimulation of glucose metabolism in primary astrocytes.

Mol. Pharmacol. 54: 834-43.

Scatchard, G. (1949)

The attraction of proteins for small molecules and ions.

Ann. N.Y. Acad. Sci. 51: 660-666.

Schlicker, E., J. Timm, M. Göthert (1996)

Cannabinoid receptor-mediated inhibition of dopamine release in the retina.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 354: 791-95.

Schlicker, E., J. Timm, J. Zentner, M. Göthert (1997)

Cannabinoid CB₁ receptor-mediated inhibition of noradrenaline release in the human and guinea-pig hippocampus.

Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 356: 583-89.

Schlicker, E., A. Redmer, A. Werner, M. Kathmann (2003)

Lack of CB₁ receptors increases noradrenaline release in vas deferens without affecting atrial noradrenaline release or cortical acetylcholine release.

Br. J. Pharmacol. 140: 323-28.

Shen, M., T.M. Piser, V.S. Seybold, S.A. Thayer (1996)

Cannabinoid receptor agonists inhibit glutamatergic synaptic transmission in rat hippocampal cultures.

J. Neurosci. 16: 4322-4334.

Sim-Selley, L.J., L.K. Brunk, D.E. Selley (2001)

Inhibitory effects of SR 141716A on G-protein activation in rat brain.

Eur. J. Pharmacol. 414: 135-43.

Szabo, B., L. Dorner, C. Pfreundtner, W. Norenberg, K. Starke (1998)

Inhibition of GABAergic inhibitory postsynaptic currents by cannabinoids in rat corpus striatum.

Neuroscience 85: 395-403.

Twitchell, W., S. Brown, K. Mackie (1997)

Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons.

J. Neurophysiol. 78: 43-50.

van der Stelt M., V. Di Marzo (2003)

The endocannabinoid system in the basal ganglia and in the mesolimbic reward system: implications for neurological and psychiatric disorders.

Eur. J. Pharmacol. 480: 133-50.

Vaysse, P.J., E.L. Gardner, R.S. Zukin (1987)

Modulation of rat brain opioid receptors by cannabinoids.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 534-39.

Wang, L., J. Liu, J. Harvey-White, A. Zimmer, G. Kunos (2003)

Endocannabinoid signaling via cannabinoid receptor 1 is involved in ethanol preference and its age-dependent decline in mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100: 1393-98.

Wilson, R. I., R. A. Nicoll (2001)

Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses.

Nature 410: 588-92.

Zimmer, A., A.M. Zimmer, A.G. Hohmann, M. Herkenham, T.I. Bonner (1999)

Increased mortality, hypoactivity, and hypoalgesia in cannabinoid CB₁ receptor knockout mice.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 5780-85.

Zygmunt, P.M., J. Petersson, D.A. Andersson, H. Chuang, M. Sorgard, V. Di Marzo, D. Julius, E.D. Hogestatt (1999)

Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide.

Nature 400: 452-57.

8 Veröffentlichungen

Paper

Flau, K., A. Redmer, S. Liedtke, M. Kathmann, E. Schlicker (2002)

Inhibition of striatal and retinal dopamine release via nociceptin/orphanin FQ receptors.

Br. J. Pharmacol. 137: 1355-61.

Liedtke, S., K. Flau, M. Kathmann, E. Schlicker, H. Stark, G. Meier, W. Schunack (2003)

Replacement of imidazole by a piperidine moiety differentially affects the potency of histamine H₃-receptor antagonists.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 367: 43-50.

Malinowska, B., K. Kiec-Kononowicz, K. Flau, G. Godlewski, H. Kozłowska, M. Kathmann, E. Schlicker (2003)

Atypical cardiostimulant β -adrenoceptor in the rat heart: stereoselective antagonism by bupranolol but lack of effect by some bupranolol analogues.

Br. J. Pharmacol. 139: 1548-54.

Poster / Vorträge

Flau, K., S. Liedtke, M. Kathmann, E. Schlicker, H. Stark, G. Meier, W. Schunack (2002)

Does imidazole replacement by a piperidine moiety lead to effective H₃-receptor antagonists?

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 335 [Suppl. 1]: P7.

Flau, K., A. Redmer, S. Liedtke, M. Kathmann, E. Schlicker (2003)

Potencies and binding affinities of five nociceptin/orphanin FQ receptor antagonists in the mouse brain cortex.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 367 [Suppl.]: R38.

Flau, K., B. Malinowska, K. Kiec-Kononowicz, G. Godlewski, H. Kozłowska, M. Kathmann, E. Schlicker (2003)

The antagonistic property of bupranolol at the atypical β -adrenoceptor is stereoselective but is not retained by seven analogues.

Pol. J. Pharmacol. 55: 486-487.

Liedtke, S., K. Flau, M. Kathmann, E. Schlicker, H. Stark, W. Schunack (2002)

Does imidazoline replacement by a piperidino moiety affect histamine H₃-receptor antagonist potency?

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 365 [Suppl.]: R28.

Redmer, A., K. Flau, S. Liedtke, M. Kathmann, E. Schlicker (2002)

OP₄ receptor-mediated inhibition of noradrenaline and dopamine release in mouse and guinea-pig tissues.

Arch. Pharm. Pharm. Med. Chem. 335 [Suppl. 1]: P30.

Schlicker, E., S. Liedtke, K. Flau, M. Kathmann (2002)

Further evidence that the cannabinoid receptor inhibiting noradrenaline release in the guinea-pig brain belongs to the CB₁ subtype and is subject to an endogenous tone.

Pharmacologist 44 [Suppl.]: A 112.

Schultheiß, T., K. Flau, A. Redmer, M. Kathmann, P.H. Reggio, H.H. Seltzman, E. Schlicker (2004)

The facilitatory effect of SR 141716 on transmitter release is due to its inverse agonist activity at cannabinoid CB₁-receptors.

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 369 [Suppl. 1]: R84.

9 Lebenslauf

Geburtsdatum 16.04.1975

Geburtsort Köln

Schullaufbahn

1981 bis 1985 Ulrich-Grundschule in Kerpen-Sindorf
1985 bis 1991 Leibniz-Gymnasium in Kerpen-Horrem
1991 bis 1994 Gutenberg-Gymnasium in Bergheim (Erft)
1994 Abitur

Grundwehrdienst

1994 bis 1995 5. Stabs- und Fernmelderegiment 310 in Koblenz
Heeresmusikkorps 7 in Düsseldorf

Studium

Okt. 1995 bis April 2000 Studium der Pharmazie an der Rheinischen
Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
20. März 1998 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
07. April 2000 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Mai 2000 bis Nov. 2000 Praktikum in der Sülzburg-Apotheke in Köln
Nov. 2000 bis Mai 2001 Praktikum in der Apotheke Zur alten Post in Bonn
08. Mai 2001 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
07. Juni 2001 Approbation als Apotheker

Promotion

Juni 2001 bis Juli 2004 Anfertigung der Dissertationsarbeit bei Herrn
Professor E. Schlicker am Institut für Pharmako-
logie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-
Wilhelms-Universität Bonn