

Western-Blot-Untersuchungen der μ -Opiatrezeptorkonzentration im
Gehirn Drogentoter
– ein Humanmodell chronischer Opiatexposition

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

vorgelegt von: Michael Fitzenreiter
aus: Bad Homburg v.d.H.

Erscheinungsjahr: 2007

Angefertigt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Herr Professor Dr. B. Madea
2. Gutachter: Herr Professor Dr. H. Vetter

Tag der Mündlichen Prüfung: 11.04.2007

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn
http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online elektronisch publiziert

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der Universität Bonn
Direktor: Herr Professor Dr. B. Madea

Für Janine

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Epidemiologie und Bedeutung der Opiatabhängigkeit	7
1.2. Sucht, Toleranz und Entzug	10
1.3. Todesursachen	10
1.4. Obduktionsergebnisse bei Drogentoten	12
1.5. Opiate und Opioide	13
1.6. Opiatrezeptoren	15
1.7. Der μ -Opiatrezeptor	17
1.8. Regulation der μ -Opiatrezeptordichte unter chronischer Morphinexposition	18
1.9. Das dopaminerge mesolimbische Belohnungssystem	20
1.10. Ziele dieser Arbeit	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Untersuchungsgut	23
2.2. Herstellung der Positivkontrolle	24
2.2.1. Züchtung der SH-SY5Y Neuroblastomzelllinie	24
2.2.2. Lyse der SH-SY5Y Zellkultur	25
2.3. Herstellung der Gewebelysate	25
2.3.1. Gewinnung der Gehirnpräparate	25
2.3.2. Lyse der Gehirnproben	25
2.4. Proteinbestimmung nach Bradford	26
2.5. Gelelektrophorese nach Laemmli	26
2.6. Transfer	26
2.7. Immunreaktion	27
2.8. Rechnergestützte Densitometrie	28
2.9. Geräte	28
2.10. Chemikalien und Medien	29
2.11. Lösungen	29
2.12. Verbrauchsmaterialien	33
2.13. Antikörper	33
2.13.1. Primärer Antikörper	33

2.13.2. Sekundärer Antikörper	33
3. Ergebnisse	34
4. Diskussion	39
4.1. Spezifität der Methoden	39
4.1.1. Materialgewinnung und Lagerung	39
4.1.2. Spezifität des primären Antikörpers	40
4.1.3. Spezifität des sekundären Antikörpers und der Chemiluminiszenz	40
4.1.4. Spezifität der rechnerunterstützten Densiometrie	40
4.2. Verteilung der μ -Opiatrezeptoren in den Gehirnregionen	41
4.3. Unterschiede zwischen den Drogentoten und dem Kontrollkollektiv	43
4.3.1. Auswahl des Untersuchungskollektivs	45
4.3.2. Besonderheiten der pharmakologischen Eigenschaften der Opiate	46
4.3.3. Semiquantitative Proteinbestimmung aus totalen Zelllysaten	46
4.3.4. Anatomische Lokalisation der untersuchten Regionen	47
5. Zusammenfassung	49
Anhang	
I Literaturverzeichnis	51
II Danksagung	69
III Lebenslauf	70

1. Einleitung

1.1. Epidemiologie und Bedeutung der Opiatabhängigkeit

Der illegale Drogenmarkt in Deutschland wird von Heroin, Amphetamin, Kokain und Ecstasy beherrscht.

In einer Repräsentativerhebung des Europäischen Informationsnetzwerks zu Drogen und Sucht aus dem Jahr 2000 zeigte sich für Deutschland folgendes Bild: 0,5% der 18- bis 39-Jährigen im Westen und 0,7% im Osten haben schon mindestens einmal in ihrem Leben Heroin konsumiert.

Im Jahr 2002 starben in Deutschland insgesamt 1.513 Menschen infolge ihres Rauschgiftkonsums. Damit ist die Zahl der Drogentoten auf dem niedrigsten Stand seit 1997 (siehe Abb. 1).

Europaweit hat sie jedoch auch in den letzten Jahren tendenziell zugenommen und bewegt sich zwischen 7.000 bis 9.000 akut drogenbedingten Todesfällen.

Das Bundeskriminalamt definiert in Übereinstimmung mit der WHO Rauschgifttodesfälle nicht nur als durch Überdosierungen bedingte Todesfälle. Die Definition schließt vielmehr auch Todesfälle infolge langzeitigen Missbrauchs, Selbsttötungen aus Verzweiflung über die Lebensumstände oder unter Einwirkung von Entzugserscheinungen sowie infolge von Unfällen unter Drogeneinfluss stehender Personen ein. Die Mehrzahl der Todesfälle steht in direktem oder indirektem Zusammenhang mit dem Konsum von Heroin (Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung, 2003).

In den meisten EU-Ländern sind 80-90% der Opfer einer Überdosis Männer. In Deutschland beträgt der Anteil der Männer 84,3%. Dies ist auf den hohen Anteil von Männern bei den Opiatabhängigen zurückzuführen. In den EU-Ländern beträgt das Durchschnittsalter der Drogentoten zwischen 30,2 und 40 Jahren, wobei in den meisten Ländern das Alter der durch Drogeneinwirkung zu Tode gekommenen Personen steigt. In Deutschland lag das Durchschnittsalter im Jahr 1999 bei 31,5 Jahren. (Jahresbericht 2003, Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht, 2003).

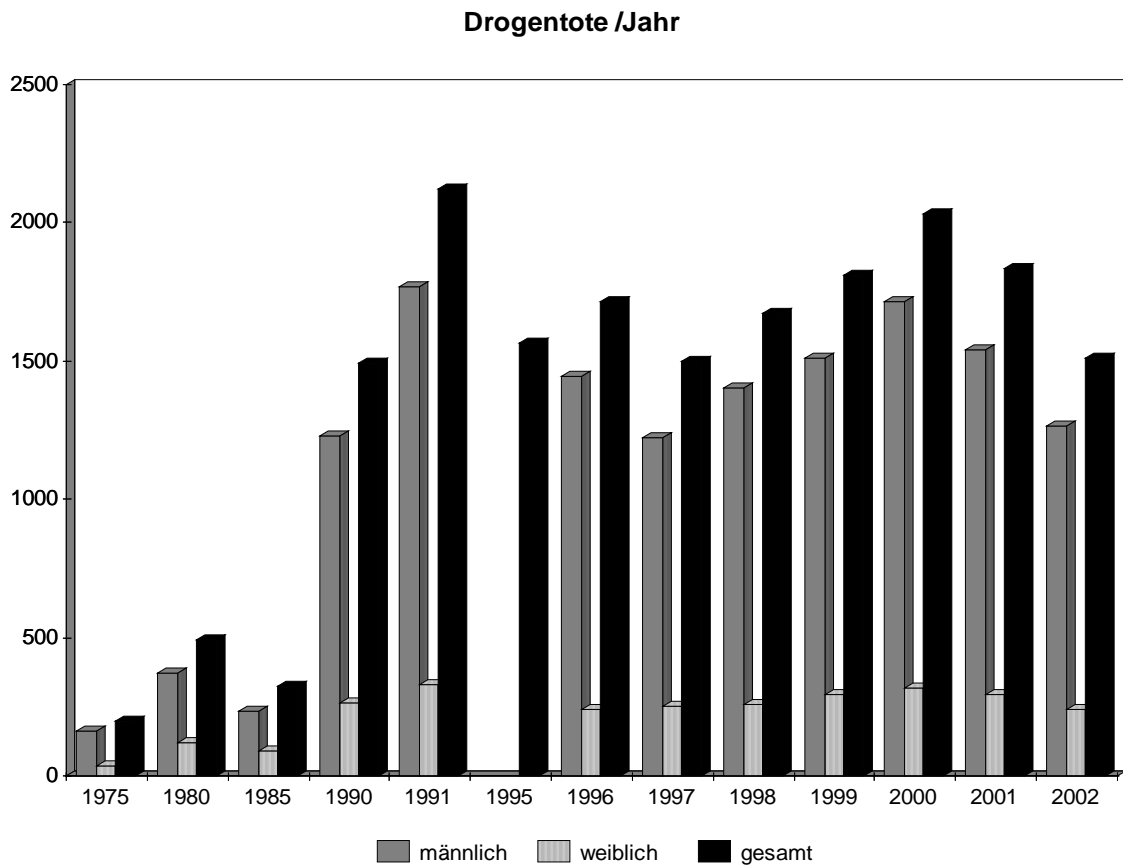


Abb. 1 Drogentote in der Bundesrepublik Deutschland 1975 -2002 (ab 1990 einschließlich ehemaliger DDR) (nach Drogen- und Suchtbericht der Bundesregierung, 2003)

In Deutschland stellt sich die Situation wie folgt dar: Unter den erstmalig polizeilich aufgefallenen Konsumenten harter Drogen nehmen Konsumenten von Heroin mit 28% einen der vorderen Plätze ein. Heroinerstauffällige stellten bis 2001 die größte Zahl erstauffälliger Konsumenten harter Drogen dar (polizeilich erfasste Erstkonsumenten von Heroin 2002: 6.378; 2001: 7.868; 2000: 7.914). Die Gruppe der Amphetaminerstkonsumenten rückte 2002 mit einem Anteil von 29% erstmals auf den ersten Platz vor.

Weitere Probleme der Opiatsucht sind die drogenbedingte Kriminalität und Infektionen. Drogenbedingte Kriminalität umfasst strafbare Handlungen im Sinne der Drogengesetzgebung, unter dem Einfluss illegaler Drogen begangene Delikte, Straftaten, die Konsumenten zur Finanzierung ihrer Drogensucht begehen (vor allem Beschaffungskriminalität und Drogenhandel) und systembedingte Straftaten, die im Rahmen funktionierender illegaler Märkte begangen werden (Kampf um Territorien, Beamtenbestechung usw.). 2002 wurden bundesweit insgesamt

250.969 Rauschgiftdelikte registriert, dabei handelt es sich in 68% der Fälle um Konsumdelikte. Bei diesen Konsumdelikten spielen Heroin und Cannabis eine überragende Rolle. Zusätzlich wurden 2.807 Fälle der direkten Beschaffungskriminalität registriert, über die Hälfte hiervon waren Rezeptfälschungen (58%).

Zur Zeit werden mehrere Studien angefertigt, die den Zusammenhang zwischen Drogensucht und Kriminalität weiter untersuchen (Drogensituation 2002, REITOX).

Bei drogenbedingten Infektionen dominieren Hepatitis B und C sowie Infektionen mit dem HI-Virus. Nach Angaben des Aidszentrums im Robert Koch Institut kamen aus der Gruppe der Personen mit intravenösem Drogenkonsum 15% der in 2002 neu an AIDS Erkrankten. Bei allen bisher gemeldeten AIDS-Fällen liegt der Anteil der Konsumenten intravenöser Drogen bei 15,4%.

Lokale Studien zeigen bei Opiatabhängigen und bei Drogentoten eine sehr hohe Prävalenz von Hepatitis B und C. Die ermittelten Quoten für die Infektion mit dem Hepatitis B Virus liegen zwischen 33% und 64% und für den Hepatitis C Virus zwischen 60% und 90% (Backmund et al., 2001; Brack, 2002; Heinemann et al., 2001).

Zusätzlich werden bei Drogentoten häufig frühere Suizidversuche und Politoxikomanie, insbesondere mit zusätzlichem Alkoholmissbrauch beobachtet (Brettel et al., 1992; Harding-Pink, 1990; Janssen et al., 1989; Kringsholm, 1988; Kringsholm et al., 1994; Püschel et al., 1993; Wessel, 1986).

Die Kosten, die durch die Opiatabhängigkeit entstehen, sind schwer zu differenzieren. In Deutschland wurden 2002 insgesamt 343,2 Millionen Euro öffentliche Mitteln zur Bekämpfung und Behandlung der Drogensucht ausgegeben. Dabei entfielen zum Beispiel auf die 951 ambulanten Beratungseinrichtungen 57,9 Millionen Euro, auf die stationäre Rehabilitation 99,7 Millionen Euro und auf die Behandlung in Suchtabteilungen der Krankenhäuser 97,0 Millionen Euro. Nicht eingeschlossen sind die Ausgaben für Strafverfolgung und Strafvollzug.

Die Kosten für die Substitutionsbehandlung mit Methadon bzw. mit Dihydrocodein werden auf mindestens 30,0 Millionen Euro geschätzt (Jahresbericht 2003, Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht, 2003).

Die angeführten Daten zeigen die Bedeutung der Drogensucht in Deutschland und Europa. Diese große Bedeutung sowie die umfangreiche Untersuchungstätigkeit im Zusammenhang mit

Drogentodesfällen und Straftaten unter Drogeneinfluss der Opiatsucht in Deutschland begründen das besondere Interesse der Rechtsmedizin an diesem Thema.

1.2. Sucht, Toleranz und Entzug

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat Sucht 1957 folgendermaßen definiert: Sucht ist „ein Zustand periodischer oder chronischer Vergiftung, hervorgerufen durch den wiederholten Gebrauch einer natürlichen oder synthetischen Droge und gekennzeichnet durch 4 Kriterien:

- Ein unbezwingbares Verlangen zur Einnahme und Beschaffung des Mittels,
- eine Tendenz zur Dosissteigerung (Toleranzerhöhung),
- die psychische und meist auch physische Abhängigkeit von der Wirkung der Droge,
- die Schädlichkeit für den einzelnen und/oder die Gesellschaft.“

Abhängigkeit wird unterteilt in psychische und physische Abhängigkeit. Die psychische Abhängigkeit beinhaltet ein anfangs meist noch beherrschbares Verlangen, das später nicht mehr zu kontrollieren ist. Die Abhängigkeit unterliegt dabei nicht einem „Alles- oder Nichts-Gesetz“; die Intensität der Abhängigkeit beruht vielmehr auf mehreren Faktoren, zu denen zum Beispiel die Art der Droge und des Konsums, Häufigkeit der Einnahme und Substanzmenge aber auch fortgesetzter Konsum trotz negativer sozialer oder körperlicher Konsequenzen gehören.

Die physische Abhängigkeit ist gekennzeichnet durch das Auftreten von Entzugserscheinungen bei Nachlassen der Drogenwirkung. Bei Opiaten treten diese ca. 8 bis 12 Stunden nach der letzten Applikation oder nach Minuten bei Antagonisierung auf und sind gekennzeichnet durch Dysphorie, Frösteln, Mydriasis, Rhinorrhoe, Hypersalivation, Übelkeit, Diarrhoe, Bauch- und Gliederschmerzen.

Durch die, im Vergleich zu Morphin, starke Wirkung von Heroin kommt es schnell zur Entstehung einer Heroinabhängigkeit und zur Toleranzentwicklung. Eine Toleranzentwicklung ist eingetreten, wenn zur Erzielung eines gleichbleibenden Effektes die Dosierung gesteigert werden muss (Altman et al., 1996). Umgekehrt wird bei Opiaten auch beobachtet, dass der maximal erzielbare Effekt nach wiederholter Applikation größer wird. Das bedeutet, dass die bei Opiatabhängigen beobachtete Tendenz zur Dosissteigerung durch mehrere Ursachen bedingt ist.

1.3. Todesursachen

Die Statistik der Drogentoten zeigte 1999 1.507 Todesfälle infolge von Überdosierungen. Damit war die Überdosierung mit 83,2% der Fälle die häufigste Ursache eines Drogentodes. Die

tödliche Überdosierung war meistens die Folge von Heroinkonsum oder Mischintoxikationen infolge polytoxikomanischen Betäubungsmittelmissbrauchs (Battista et al., 1993; Bentley et al., 1996; Brettel et al., 1992; Janssen et al., 1989; Kaatsch et al., 1994; Kringsholm et al., 1994; Kringsholm, 1988; Lockemann et al., 1997; Penning et al., 1993; Püschel et al., 1993a; Steentoft et al., 1996a; Wessel, 1986).

In 60-80% der Fälle findet die Überdosierung unbeabsichtigt statt. Risikofaktoren für eine unbeabsichtigte Überdosierung bei Opiatkonsumenten sind gleichzeitiger Konsum anderer neurodepressiv wirkender Drogen (z. B. Alkohol oder Benzodiazepine), Verlust der Toleranz nach einer Periode der Abstinenz (z. B. nach Haftentlassung oder Abschluss eines Therapieprogramms), eine langjährige Opiatabhängigkeit, fortgeschrittenes Alter, insbesondere bei gleichzeitiger Erkrankung der Leber oder der Atemwege, und unvermutete Veränderungen der Reinheit der Substanz (Bentley et al., 1996; Janssen et al., 1989; Kaa, 1992; Kringsholm et al., 1994; Steentoft et al. 1996a; Wessel, 1986).

Bei einer Heroinüberdosierung wirkt meist die Atemdepression tödlich. Dabei können regelmäßig hohe Morphinkonzentrationen im Blut toxikologisch nachgewiesen werden. Bei einer weit geringeren Anzahl der Drogentodesfälle werden jedoch deutlich niedrigere Morphinspiegel gemessen. In diesen Fällen werden anaphylaktische Reaktionen oder myokardiale Schädigungen im Sinne einer myofibrillären Degeneration vermutet. Insgesamt schwanken jedoch die bei Drogentoten bestimmten Morphinkonzentrationen auch innerhalb dieser beiden Gruppen beträchtlich (Rajs et al., 1979).

Oftmals gibt schon die Auffindesituation einen Hinweis auf den Tod durch Drogenkonsum. Häufig werden Spritzen, geschwärzte Löffel, Ascorbinsäure oder Heroinreste in unmittelbarer Nähe der Leiche gefunden (Janssen et al., 1989; Kaa, 1992; Kaatsch et al., 1994; Kringsholm, 1988; Kringsholm et al., 1994; Li et al., 1996; Steentoft et al., 1996b).

Der Ort des Todes ist in der überwiegenden Zahl der Fälle ein privater Raum, z.B. die Wohnung, eine Pension, ein Hotel oder ein (Asylanten-)Heim. Selten werden Drogentote an öffentlich zugänglichen Orten gefunden (z.B. öffentliches WC, Bahnhofsbereich, Krankenhäuser, Parks). In diesen Fällen ist an eine Leichenverbringung im Sinne eines „Leichendumpings“, d.h. die Beseitigung einer Drogenleiche durch Ablage oder in Ausnahmefällen durch Zerstückelung zu denken (Madea et al., 1994).

1.4. Obduktionsergebnisse bei Drogentoten

Typische Befunde bei der äusseren Leichenschau von Opfern tödlicher Betäubungsmittelintoxikationen sind Injektionsstellen unterschiedlichen Alters, Spritzenabszesse, intensive Totenflecke, schaumige Oedemflüssigkeit in der Mundhöhle sowie zyanotische Hautverfärbungen von Hals, Gesicht und oberer Thoraxapertur.

Die Obduktion zeigt meist Lungen- und Hirnoedeme, Hyperämie der inneren Organe, flüssiges Leichenblut, Splenomegalie sowie eine portale Lymphknotenhyperplasie. Letztere steht im Zusammenhang mit dem Metabolismus und der Exkretion der konsumierten Drogen, mit Immunmechanismen bei chemischen Verunreinigungen, Bakteriämie oder Virämie bei unsteriler Injektion in die Vene (Cassidy et al., 1995; Kaa et al., 1993; Li et al., 1996).

Besonderes Interesse bei der Obduktion gilt Lunge, Herz und Leber.

Da der Tod nach Drogenkonsum meist pathophysiologisch durch die Atemdepression bedingt ist, findet man in der Lunge häufig die histologischen Korrelate von Hypoxie und Apnoe (Janssen et al., 1989, Kringsholm et al., 1987a; Lockemann et al., 1993a). Da Drogeninjektionen häufig verunreinigt sind, sind Fremdkörperreaktionen ebenfalls typisch. (Janssen et al., 1989; Keul et al., 1993; Kringsholm et al., 1987a,b; Püschel et al., 1987a).

Die feingewebliche Untersuchung des Lungengewebes lässt zudem eine ungefähre Abschätzung des Zeitintervalls zwischen Drogenaufnahme und Eintritt des Todes zu. Die Schwere des Lungenödems korreliert positiv, die Ausprägung des Emphysems sowie die Schwere der Lungenblutung korreliert negativ mit der durchschnittlichen Überlebenszeit nach Injektion der Droge. Eitrige Bronchopneumonien werden bei Spättodesfällen, d.h. nach Überlebenszeiten von mehreren Tagen, beobachtet. Das pathophysiologische Erklärungsmodell für diese Beobachtungen entspricht dem zeitlichen Ablauf einer Schocklunge. Die beschriebenen Schädigungen werden durch die heroininduzierte Hypoxie und mit direkten toxischen Effekten erklärt, aber auch durch Hypersensitivitätsreaktionen oder durch eine Histaminfreisetzung mit Erhöhung der Kapillarpermeabilität (Dettmeyer et al., 2000; Grellner et al 1995, 1996; Lockemann und Püschel, 1993a).

Unsterile, bzw. verunreinigte Injektionen sind ebenfalls Ursache der am Herzen Drogentoter regelmäßig nachweisbaren Endokarditiden, Myokarditiden, degenerativen Veränderungen und unterschiedlich ausgeprägter myofibrillärer Degeneration. Zusätzliche Gründe für diese Veränderungen sind wiederum toxische Effekte und hypoxische Episoden, jedoch auch

Fehlernährung und allergische Reaktionen (Dickens et al., 1995; Gerlach, 1980; Janssen et al., 1989; Keul et al., 1993; Kringsholm et al. 1987a; Li et al., 1996).

Typische Befunde die an der Leber erhoben werden können sind Parenchymverfettung und Hepatitiden. Die Parenchymverfettung wird durch den Metabolismus der Droge verursacht sowie durch hypoxische und toxische Wirkungen. Die Ätiologie der Hepatitiden ist sehr heterogen, wobei neben Fremdkörperreaktionen virale Ursachen dominieren (Backmund et al., 2001; Brack, 2002; Heinemann et al., 2001; Kringsholm et al., 1982; Paties et al., 1987).

Neben diesen Organen zeigen aber auch die Nieren Drogentoter häufig typische Veränderungen in Form einer mono- und lymphozytenreichen, endokapillären Frühform einer membranproliferativen Glomerulonephritis. Die Ursache dieser Beobachtung wird in Zusammenhang mit infektiösen Hepatitiden oder mit Immunreaktionen auf injizierte Drogen und Begleitsubstanzen gebracht (Bakir et al., 1996; Dettmeyer et al., 1998; Johnson et al., 1993).

1.5. Opiate und Opioide

Opium ist der getrocknete Saft, der aus der unreifen Samenkapsel der Schlafmohnpflanze (*Papaver somniferum*) gewonnen wird. Opium enthält verschiedene Alkaloide, z. B. Morphin als Hauptwirkstoff, und Codein, Papaverin und Narcotin. 1804 isolierte der deutsche Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner den Wirkstoff aus Opium, der für einen Rausch am wichtigsten ist. Er nannte ihn "Morphium", das mit Morphin identisch ist und nach dem griechischen Gott des Schlafes "Morpheus" bezeichnet ist. Ab 1826 wurde die Substanz als Medikament gehandelt (siehe Abb. 2).

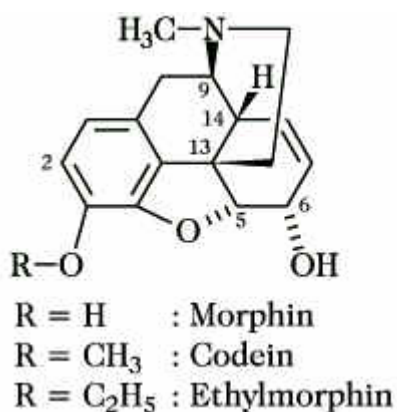


Abb. 2 Strukturformel des Morphins

Auf der Suche nach Stoffen, die genauso gut wirken, jedoch weniger abhängig machen, synthetisierte man Diacetylmorphin, besser bekannt als Heroin (siehe Abb. 3). Der Name geht auf

das griechische Wort Held zurück. Der Begriff "Heroin" wurde am 16.05.1898 beim Kaiserlichen Patentamt in Berlin als Wortmarke eingereicht. Ab dem Jahr 1898 begann die kommerzielle Produktion von Heroin in großem Umfang durch die Firma Bayer. Heroin wurde als oral einzunehmendes Hustenmittel angeboten. Das Medikament wurde damals außerdem dazu eingesetzt, die Entzugssymptome des Morphiums zu unterdrücken. Auf Grund des dann erkannten Suchtpotenzials wurde im Jahr 1931 von der Firma Bayer die Produktion eingestellt.

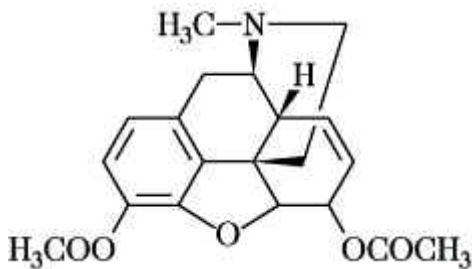


Abb. 3 Strukturformel des Heroins

Unter Opiaten versteht man alle Substanzen, die direkt aus Opium gewonnen werden. Das sind u.a. das Morphin und das Kodein. Unter Opioiden versteht man synthetische oder halbsynthetische Pharmaka, sowie körpereigene Substanzen (Endorphine) mit einer morphinartigen Wirkung.

Das am häufigsten missbräuchlich genutzte Opioid, Heroin, wird durch eine chemische Reaktion von Morphin mit Essigsäure-Anhydrid hergestellt, und wird auf Grund der chemischen Struktur auch als Diacetylmorphin bezeichnet. Durch die Einführung der beiden Acetylgruppen verbessert sich die Fettlöslichkeit. Heroin ist also wesentlich lipophiler als Morphin. Nach einer intravenösen Injektion wird das lipophile Heroin schnell ins Gehirn aufgenommen und dort über Monoacetylmorphin zu Morphin hydrolysiert. Die typische Wirkung von Heroin, also der „Kick“, entsteht größtenteils durch das schnelle Anfluten von Morphin im Gehirn. Eine vergleichbar stark konzentrierte intravenöse Injektion von Morphin hätte nicht diesen Effekt, da Morphin langsamer die Blut-Hirn-Schranke überwindet.

Die missbräuchliche Anwendung des Heroins erfolgt am häufigsten intravenös, um eine besonders schnelle Anflutung im Hirn zu erreichen. Praktiziert wird aber auch die subkutane Injektion oder die Inhalation von Heroinrauch. Zur Injektion wird die Substanz dazu meist auf einem Löffel mit Zitronensaft oder Vitamin C-Pulver aufgeköcht, um sie zu lösen. Dann wird diese Lösung über Watte oder einen Zigarettenfilter zur Reinigung mit einer Spritze aufgezogen und in die Vene gespritzt.

Bei der Zufuhr von Heroin werden zentrale und periphere Wirkungen ausgelöst, da Opiat-Rezeptoren sich sowohl im zentralen Nervensystem als auch in peripheren Geweben befinden.

Zu den zentralen Wirkungen zählen Euphorie, Rausch- und Glücksgefühle sowie Sedierung. Zusätzlich tritt eine starke Analgesie auf. Des Weiteren kommt es zur Atemdepression, antitussiver Wirkung, Anxiolyse und Miosis. Zudem treten eine arterielle Hypotonieneigung und eine bradycarde Wirkung auf. Ferner kann Heroin durch verschiedene Wirkungsmechanismen Übelkeit auslösen, aber auch antiemetisch wirken.

Bei den peripheren Wirkungen handelt es sich um eine verzögerte Magenentleerung, einen gestörten Gallenfluss, Obstipation, Harnverhalten und eine Histaminfreisetzung. Durch die Freisetzung von Histamin werden allergische Reaktionen, wie beispielsweise Hautjucken, Verengung der Bronchien und Blutdruckabfall ausgelöst. Ferner hemmt Morphin bei schwangeren Frauen die Wehentätigkeit.

Medizinische Anwendung finden Opiate bzw. Opioide als stark wirksame Analgetika und Injektionsnarkotika sowie als Antitussiva.

1.6. Opiatrezeptoren

Aufgenommene Opiate entfalten ihre zentralnervöse Wirkung über Opiatrezeptoren. Zuerst entdeckt wurden Opiatrezeptoren 1973 (Pert und Snyder, 1973; Simon et al. 1973; Terenius, 1973) durch Rezeptor-Bindungsexperimente.

1976 wurden am chronisch spinalen Hund verschiedene Opiatrezeptoren gefunden (Gilbert und Martin, 1976; Martin et al., 1976). Durch Bindung von verschiedenen Opiaten und deren Derivaten postulierten Martin und seine Mitarbeiter drei Rezeptortypen: μ für Morphin, κ für Ketocyclazocin und σ für Nallylnormetazocin (SKL-10047). Zusätzlich wurde 1977 ein weiterer Rezeptortyp entdeckt, welcher eine hohe Affinität zu Enkephalin aufweist (Lord et al. 1977).

In dieser Zeit wurden auch endogene Liganden für die Opiatrezeptoren entdeckt: Enkephalin als potenter Opioidagonist (Hughes et al., 1975), β -Endorphin, ebenfalls mit agonistischer Wirkung (Li und Chung, 1976), sowie Dynorphin als κ -Opioidagonist (Goldstein et al., 1981). Die Klonierung und der Nachweis der cDNS Nukleotidsequenz des δ - (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992), und nachfolgend des κ - (Meng et al., 1993) und des μ -Opioidrezeptors (Chen et al., 1993; Wang et al., 1993) haben die Aminosäuresequenzen der Opiatrezeptoren eindeutig identifiziert. Die einzelnen Rezeptorproteine bestehen aus einer Aminosäuresequenz von ca. 370-400 Aminosäuren und weisen untereinander eine große Homologie (60-70%) auf. Regionen mit

vermehrter Variabilität sind besonders das N-terminale Ende, welches für die Bindung von Agonisten und Antagonisten von Bedeutung ist (Raynor et al., 1994a), sowie die dritte intrazelluläre Schleife und das C-terminale Ende, welche wesentlich an der Kopplung intrazellulärer second Messenger-Moleküle beteiligt sind (siehe Abb. 4) (Gudermann et al., 1996).

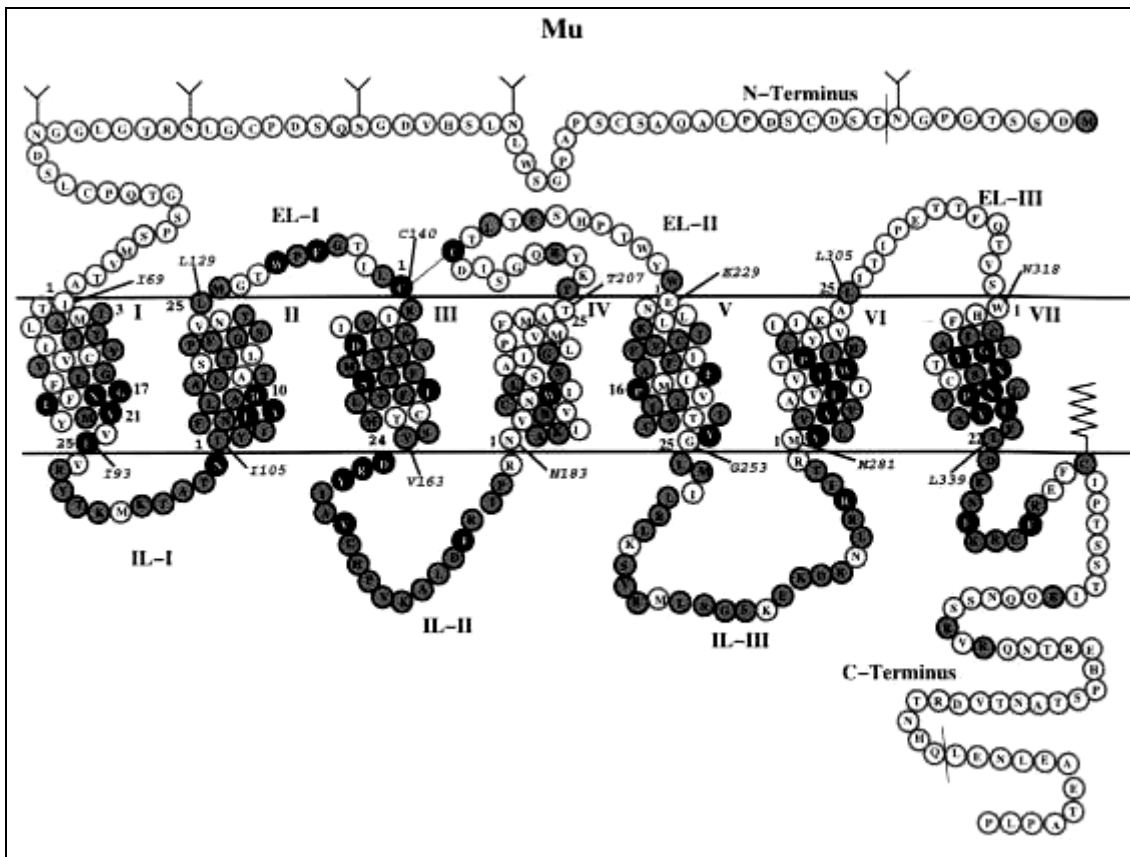


Abb. 4 Aminosäuresequenz und transmembranöse Struktur des klonierten μ -Opiatrezeptors

Alle drei Opiatrezeptoren gehören zu der Familie der G-Protein (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) gekoppelten Rezeptoren, die als Charakteristika ein extrazelluläres N-terminales Ende, ein intrazelluläres C-terminales Ende und sieben hydrophobe, transmembranäre Domänen haben (Gudermann et al., 1996).

Opioid-Liganden können als Agonisten, Antagonisten oder partielle Agonisten wirken. Agonisten aktivieren den Opioidrezeptor. Antagonisten verdrängen den Agonisten vom Opioidrezeptor, aktivieren den Rezeptor jedoch nicht, so dass die Wirkung des Agonisten dadurch wieder aufgehoben wird. Aufgrund der unterschiedlichen Struktur und Funktion dieser Liganden binden

sie auf unterschiedliche Weise am Rezeptor; so z.B. an einem extrazellulären Loop des membrangebundenen Proteins oder direkt in einer Bindungstasche, welche von den sieben Helices gebildet wird. Es folgen Konformationsänderungen im Rezeptor, die wahrscheinlich durch Phosphorylierungen am C-Terminus oder durch Öffnung einer Salzbrücke ausgelöst werden (Oliveira et al., 1994). Dadurch wird intrazellulär ein G-Protein aktiviert, welches aus drei Untereinheiten (α , β , γ) besteht. Dies hat zur Folge, daß Guanosindiphosphat (GDP) abgespalten wird und anschließend Guanosintriphosphat (GTP) bindet, wobei sich die α -Untereinheit mit dem GTP von der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins abspaltet. Die α -Untereinheit bindet nun an ein Effektorprotein, z. B. Adenylatcyclase oder Phospholipase C, welches über die Bildung von Botenstoffen, wie cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), die Funktionen verschiedener zellulärer Effektoren reguliert. Als Folge kommt es zu einer Inhibition der Adenylat-Zyklase und damit zu einer Senkung der intrazellulären cAMP Konzentration (Blume et al., 1979; Sharma et al., 1977), einer Reduktion des Ca^{2+} - Einstroms (Gross et al., 1990) und einer Vermehrung des K^{+} -Ausstroms (North et al., 1987). Nach der Hydrolyse von GTP zu GDP lagern sich die Untereinheiten des G-Proteins wieder zusammen.

1.7. Der μ -Opiatrezeptor

Die Bedeutung des μ -Opiatrezeptors (MOR) als Vermittler sowohl erwünschter als auch der unerwünschten Wirkungen ist in vielen Experimenten bestätigt worden. Versuche mit für den μ -Opiatrezeptor spezifischen Liganden zeigten, dass sie die typischen Morphinwirkungen Rausch, Euphorie und Analgesie auslösen. Ebenso zeigten Versuche mit μ -Opiatrezeptor-Knockout-Mäusen, dass die Wirkungen von Opiaten eng an das Vorhandensein dieses Rezeptortyps gebunden sind. Bei μ -Opiatrezeptor Knockout-Mäusen wurde nach subkutaner Injektion hoher Dosen von Morphin keine signifikante Analgesie mehr nachgewiesen (Matthes et al., 1996; Sora et al., 1997; Tian et al., 1997). Auch fehlte die starke Analgesie bei intrathekalen oder intracerebroventrikulären Injektionen, die man bei gleicher Dosis bei Wildtyp-Mäusen vorfindet.

Aber auch unerwünschte Wirkungen sind bei Knockout-Mäusen nicht mehr oder nur noch in geringerem Maße auslösbar. Eine der Haupttodesursachen bei Opiatüberdosierungen, die respiratorische Depression, ist bei Nichtvorhandensein des μ -Opiatrezeptors auch mit hohen Morphindosen nicht zu erreichen (Matthes et al., 1998), erst bei extrem hohen Dosen (1.600 mg/kg KG, subkutan) trat eine letale Atemdepression auf (Loh et al. 1998). Ebenso fehlen weitere Wirkungen des Morphins - Verstopfung (Roy et al., 1998), Immunsuppression in Form

von Lymphorganatrophie (Gavériaux-Ruff et al., 1998), Euphorie (Matthes et al., 1996) und Modifikation von Bewegungsmustern (Tian et al., 1997) – bei μ -Opiatrezeptor-Knockout-Mäusen. Insbesondere zeigten Matthes und Mitarbeiter, dass bei diesen Mäusen sämtliche somatischen und vegetativen Entzugserscheinungen nach chronischer Opiatzufuhr nicht nachweisbar waren.

Zusammenfassend ist also die herausragende Bedeutung des μ -Opiatrezeptors für die Opiatwirkungen in umfassenden Experimenten gezeigt worden.

Der menschliche μ -Opiatrezeptor ist aus 409 Aminosäuren aufgebaut und in der Aminosäuresequenz zu 95% mit dem μ -Opiatrezeptor der Ratte identisch (Wang et al., 1993). Sowohl der μ -Opiatrezeptor des Menschen (Raynor et al., 1995; Wang et al., 1994) als auch der Rezeptor der Ratte (Chen et al., 1993; Fukuda et al., 1993; Thompson et al., 1993; Wang et al., 1993; Zastawny et al., 1994) sind kloniert.

Das Gen für den menschlichen μ -Opiatrezeptor wurde auf Chromosom 6, q 24-25 lokalisiert (Uhl et al., 1994; Wang et al., 1993). Im Northern Blot zeigen sich neben einem prominenten Transkript von 13 kb weitere weniger deutliche Banden von 11, 4,3 und 2,8 kb Länge.

1.8. Regulation der μ -Opiatrezeptordichte unter chronischer Morphinexposition

Bisherige Untersuchungen zur Regulation der μ -Opiatrezeptordichte wurden mit Hilfe der Rezeptorautoradiographie, Ligandenbindungs- und in situ Hybridisierungstudien, im Wesentlichen als tierexperimentelle Untersuchungen sowie Experimente an Zellkulturen durchgeführt. Dabei wurden differente Ergebnisse gefunden: Sowohl von „up-Regulation“ oder „down-Regulation“ im Sinne eines Anstiegs oder einer Abnahme der Rezeptordichte wurde berichtet als auch von einer „no-change“ Situation der Opiatrezeptordichte nach chronischer Morphinexposition.

Folgende Tabelle zeigt exemplarisch Studien und ihre Ergebnisse, welche zu diesem Thema durchgeführt wurden:

Autor	Opiat-Agonist	Zell-/ Tier-Modelle	Ergebnis
Maloteaux et al. 1989	Morphin in vitro	Zellkultur embyonales Rattenvorderhirn	μ -OR \leftrightarrow
Lenoir et al 1983	Morphin in vitro	Zellkultur embyonales Rattenvorder- und hinterhirn	μ -OR \leftrightarrow
Chakrabati et al. 1995	Morphin/ DAMGO	Neuro2A (murine Neuroblastomzelllinie)	μ -OR \downarrow
Tempel et al. 1988	Morphin	Neugeborene Ratten	μ -OR \downarrow
Werling et al. 1989	Morphin	Corticale Membran (Meerschweinchen)	μ -OR \downarrow
Zadina et al. 1993	Morphin in vitro	SH-SY5Y (menschliche Neuroblastomzelllinie)	μ -OR \downarrow
Yabaluri und Medzihradsky 1997	Morphin	C6 Gliazellen (Transfektion mit μ -OR der Ratte)	μ -OR \downarrow
Zaki et al. 1999	Morphin/ Fentanyl	HEK 293 MOR (transfizierte humane embryonale Nierenzellen)	μ -OR \downarrow
Brady et al. 1989	Morphin	Ratte	μ -OR \uparrow
Fabian et al. 2002	Morphin	Ratte	μ -OR \uparrow
Tao et al. 1987	Morphin	Ratte	μ -OR \uparrow
Yoburn et al. 1993	Fentanyl Morphin	Maus	μ -OR \uparrow
Zadina et al. 1989	Morphin	Ratte	μ -OR \uparrow

Tab. 1 Regulation des μ -Opiatrezeptors in bisherigen Studien

(μ -OR \leftrightarrow : No Change; μ -OR \downarrow : Down-Regulation; μ -OR \uparrow : Up-Regulation)

Erwähnenswert erscheint, dass wiederholt eine quantitativ unterschiedlich ausgeprägte Regulation nach Exposition mit verschiedenen Opiat-Agonisten beobachtet wurde (Zaki et al., 1999; Blake et al., 1996; Shen et al., 2000).

Wie aus den unterschiedlichen Ergebnissen der Studien ersichtlich ist, existiert noch kein einheitliches Erklärungsmodell für Adaptionen der Rezeptordichte als Grundlage für Toleranz- und Abhängigkeitsentwicklung durch chronische Opiatzufuhr.

Ursachen dieser Diversität könnten methodische Unterschiede zwischen Ligandenbindungs-, quantitativen rezeptorradiographischen- und Hybridisierungsstudien sein, aber auch Unterschiede in Art und Präparation des Untersuchungsmaterials oder der Spezifität der Liganden.

1.9. Das dopaminerge mesolimbische Belohnungssystem

Psychotrope Substanzen, welche als Drogen konsumiert werden, wirken über eine Erhöhung der Konzentration an Dopamin auf das mesolimbische dopaminerge Belohnungssystem.

Das dopaminerge Belohnungssystem hat drei Hauptfunktionen: Modulation der Antwort auf Schmerz- und Stressreize, Belohnung und Verstärkung sowie Erhaltung der Homeostase, z.B. der Regulation der Körpertemperatur oder der Nahrungs- und Wasseraufnahme.

Der anatomische Signalweg des dopaminergen Belohnungssystems besteht aus einem Schaltkreis im Mittelhirn, Vorderhirn und extrapyramidalen Anteilen um den Nucleus accumbens als Mittelpunkt. Die Hauptregionen sind neben Nucleus accumbens das ventrale Tegmentum, das Corpus amygdaloideus, der Hypothalamus, der Hippocampus und der Frontalcortex. (de Olmos et al., 1985; Phelix et al., 1992; de Olmos and Heimer, 1999)

Drogen wie Morphin, aber auch Nikotin, Cocain und Ethanol aber auch Videospiele erhöhen die extrazelluläre Dopaminkonzentration im Nucleus accumbens (Imperato and Di Chiara, 1986; Koeppe et al., 1998; Pontieri et al., 1996; Tanda et al., 1997 ; Wise und Bozarth, 1985). Die Ausschüttung von Dopamin wird als positiver Stimulus, d.h. als Belohnung empfunden. Der molekulare Wirkmechanismus unterliegt hierbei einer Substanzspezifität (Altmann et al., 1996). Kokain beispielsweise wirkt demnach durch die Blockade des Dopamintransporters, d.h. Hemmung der Wiederaufnahme („re-uptake“) aus dem synaptischen Spalt, wodurch die dopaminerge Transmission besonders im Nucleus accumbens gesteigert wird.

Opiate hingegen bewirken über den μ -Opiatrezeptor eine Erhöhung der Dopaminfreisetzung im mesolimbischen System durch Hemmung von inhibitorischen GABA-ergen Neuronen hauptsächlich im ventralen Tegmentum (Xi und Stein, 1998). Läsionen der Kerngebiete des mesolimbischen dopaminergen Systems, insbesondere des Nucleus accumbens oder des ventralen Tegmentums reduzieren die Verstärkerwirkungen der Opiate (Hutcheson et al., 2001; Kelsey et al., 1989; Olmstead et al., 1998).

1.9. Ziele dieser Arbeit

Bisherige Untersuchungen haben gezeigt, dass die für die Suchtentstehung relevanten Wirkungen des Morphiums, bzw. des Heroins, über den μ -Opiatrezeptor vermittelt werden.

Frühere Experimente zur Regulation von Opiatrezeptoren wurden im Wesentlichen an Zellkulturen oder im Tierversuch an einzelnen Gehirnregionen durchgeführt. Dabei wurden die μ -Opiatrezeptoren meist mit Rezeptorautoradiographie oder immunhistochemischen Methoden dargestellt.

Unter chronischer Opiatagonistexposition sind bisher sowohl eine Adaption der Rezeptorzahl im Sinne einer Vermehrung als auch einer Verminderung beobachtet worden. Auch von einer „no change“ Situation wurde berichtet.

Bei dieser Arbeit soll die Bestimmung der Konzentration von μ -Opiatrezeptoren in Bezug auf die Proteinmasse durch Auftrennung von totalen Zelllysaten, anschließender Markierung der Rezeptoren mit einem monoklonalen Antikörper gegen den μ -Opiatrezeptor und rechnergestützter Auswertung der Bandenschwärzung semiquantitativ erfolgen. Dabei wurden mit dieser Methode neun verschiedene Gehirnregionen des Menschen untersucht um einen Vergleich zwischen diesen Regionen zu ermöglichen. Besondere Beachtung erhielten dabei Gehirnregionen, welche Bestandteil des dopaminergen mesolimbischen Belohnungssystems sind. Aus ethischen Gründen können solche Untersuchungen nur an postmortal gewonnenem Gewebe durchgeführt werden.

Folgende Fragen sollen in dieser Arbeit zu klären versucht werden:

- a. Wie unterscheiden sich die Konzentrationen von μ -Opiatrezeptor-Protein in den verschiedenen Hirnregionen, insbesondere in Gehirnregionen, die das dopaminerge Belohnungssystem bilden?
- b. Gibt es Unterschiede in der Konzentration von μ -Opiatrezeptoren zwischen Kontrollkollektiv und chronischen Opiatexponierten?
- c. In welchen Gehirnregionen sind diese Unterschiede feststellbar?

Mit dieser Untersuchung soll die Grundlage der Suchtentstehung und Aufrechterhaltung näher untersucht werden. Die Kenntnis der neurobiologischen Vorgänge, die die Entstehung der Sucht

auslösen, kann eventuell neue Ansätze in der Behandlung oder auch der Prophylaxe von Abhängigkeitserkrankungen erbringen.

2. Material und Methoden

2.1. Untersuchungsgut

Das Untersuchungsgut stammt aus Obduktionen des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn aus den Jahren 1999 bis 2001. Untersucht wurden ein Kollektiv von 13 Drogentoten und eine Gruppe von 9 Kontrollen.

Das Kollektiv der Drogentoten verstarb an Opiatmonointoxikationen oder an der Kombination von Opiaten mit anderen Rauschdrogen, wobei die Nichtopiate nicht konkurrierend todesursächlich waren (siehe Tab. 1).

Fall Nr.	THC Metabolite	Morphin frei	Morphin gesamt	Codein	Diazepam	BAK
1	6,3 ng/ml	107,7 ng/ml	253,0 ng/ml	13,8 ng/ml	0,23 mg/ml	0,00
2	-	177,0 ng/ml	205,0 ng/ml	26,0 ng/ml	-	0,21
3	5,3 ng/ml	57,2 ng/ml	77,2 ng/ml	8,4 ng/ml	-	1,18
4	20,7 ng/ml	171,0 ng/ml	514,0 ng/ml	30,0 ng/ml		0,00
5	-	52,0 ng/ml	-	10,6 ng/ml		0,01
6	-	114,7 ng/ml	131,0 ng/ml	30,1 ng/ml		0,00
7	-	220,0 ng/ml	-	38,0 ng/ml	1,64 mg/ml	0,02
8	-	335,0 ng/ml	-	-	-	2,40
9	6,8 ng/ml	144,0 ng/ml	170,0 ng/ml	25,0 ng/ml	0,209 mg/ml	1,40

Tab. 2 Konzentration verschiedener Rauschdrogen im Blut der Drogentoten

Bei den weiteren vier Fällen des Kollektivs der Drogentoten wurde keine toxikologische Untersuchung durchgeführt. Bei diesen Verstorbenen wurde aber durch polizeiliche Ermittlungen ein intravenöser Drogenkonsum festgestellt, der in jedem der Fälle schon über ein Jahr bestand. Außerdem war die jeweilige Auffindesituation typisch für intravenösen Opiatkonsum (frische Einstichstellen, Heroinpäckchen in der unmittelbaren Umgebung, Fixerutensilien im Auffinderraum). Die Ergebnisse der Obduktion sprachen in allen 13 Fällen für einen Tod infolge einer Heroinmono- oder Heroinmischintoxikation.

Die Todesursachen der Kontrollgruppe waren:

3 x Verbluten

2 x Erhängen

2 x Herzinfarkt

1 x Rauchgasintoxikation

1 x Lungenembolie

Bei keinem Mitglied der Kontrollgruppe war Drogenkonsum in der Vorgeschichte bekannt. Nach dem Tod angefertigte toxikologische Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf Opiatkonsum.

	Alter [Jahre]	Geschlecht	Post mortem [h]
Drogenkonsumenten	18 – 44, MW: 29,7	9 männlich, 4 weiblich	12 – 96, MW: 48
Kontrollgruppe	28 – 59, MW: 39,0	5 männlich, 4 weiblich	20 – 60, MW: 37

Tab. 3 Alter, Geschlecht und Zeit bis zur Gewebeentnahme

2.2 Herstellung der Positivkontrolle

2.2.1. Züchtung der SH-SY5Y Neuroblastomzelllinie

Die SH-SY5Y Zellen wurden im tiefgefrorenen Zustand vom Institut für Anästhesiologie der Universität Bonn übernommen.

Die bei -80 °Celsius gelagerten Neuroblastomzellen der Zellkultur wurden in einem Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 ° Celsius aufgetaut. Dann wurden die Zellen in ein Zellkulturröhrchen überführt und mit RPMI++ Medium auf 20 ml aufgefüllt. Nach einer Zentrifugation über 10 min bei 500 U/min wurde das Medium bis zum Sediment abgesaugt. Nach der Resuspension mit wenigen Millilitern frischen Mediums wurde die Suspension in bereits mit 37 °Celsius warmem RPMI++ Medium gefüllten 10 cm Gewebeschaln überführt.

Die Gewebeschaln wurden im Brutschrank bei 37 °Celsius und 5% CO₂ Gehalt der Luft inkubiert und das Medium etwa alle drei Tage ersetzt. Das Wachstum wurde mikroskopisch überprüft. Bei vollständigem Bewuchs der Platten wurden die Zellen vorsichtig mit einem Gummischaber gelöst und in Kulturschaln mit frischem Medium überführt. Insgesamt wurden die Zellen zweimal passagiert um eine ausreichende Menge der Positivkontrolle zu erhalten.

2.2.2. Lyse der SH-SY5Y Zellkultur

Das Medium auf den bewachsenen Zellkulturschälchen wurde vorsichtig abgesaugt und die Schalen mit zimmerwarmem PBS gespült. Die folgenden Schritte wurden strikt auf Eis durchgeführt. Im ersten Schritt wurde 0,6 ml RIPA Puffer mit frisch zugesetztem Proteinaseninhibitor-Cocktail und Na_3VO_4 pro 10cm Schale zugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers gelöst und mit einer 21G Spritze in ein Zentrifugationsröhrchen überführt. Es folgte eine Wiederholung dieses Schrittes mit 0,3 ml RIPA Puffer. Die kombinierten Lysate wurden mehrfach durch eine 21G Nadel gezogen um die DNS aufzutrennen. Die Lysate wurden 45 min auf Eis inkubiert und anschließend für 10 min bei 10000 G zentrifugiert. Der Überstand stellte das totale Zelllysat (TCL) dar. Das TCL wurde gepoolt um eine gleichmäßige Proteinkonzentration in allen Positivkontrollen zu erhalten, dann auf Eppendorf Cups aufgeteilt und bei -80°Celsius gelagert.

2.3. Herstellung der Gewebelysate

2.3.1. Gewinnung der Gehirnpräparate

Die untersuchten Proben wurden direkt im Anschluß an die Obduktion aus den Gehirnregionen Thalamus, Nucleus candatus, Hypothalamus, ventrales Tegmentum, Frontalcortex, Hippocampus, Putamen, Nucleus accumbens und Corpus amygdaloideum entnommen und sofort in flüssigem Stickstoff bei -80°Celsius eingefroren, um eine Denaturierung der Proteine zu verhindern.

2.3.2. Lyse der Gehirnproben

Sämtliche folgenden Schritte bis zur Befüllung der Western Blot Kammern wurde auf Eis, d.h. bei 4°Celsius durchgeführt.

Nach Entnahme aus der -80°Celsius Kühlung wurden jeweils etwa 50 mg der einzelnen Regionen mit den Skalpell abgetrennt und sofort in mit 1,5 ml eisgekühlten RIPA-Lyse-Puffer gefüllten Falcon-Tubes gegeben, welcher vorher mit Proteinaseinhibitor und Na_3VO_4 versetzt wurde. Die Falcon-Tubes wurden vor und nach der Probenzugabe mit der Feinwaage gewogen, um das Probengewicht zu bestimmen.

Dann wurden die Proben jeweils dreimal für 5 sec mit dem Homogenisator zerkleinert. Dazwischen wurden 10 sec lange Kühlintervalle eingehalten, um eine Erwärmung der Proben durch Reibung zu verhindern. Anschließend wurden die Proben für 45 Minuten auf Eis inkubiert.

Um das totale Zelllysate zu erhalten wurden die Proben bei 12 500 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert um Zelltrümmer zu entfernen.

2.4. Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Ziel war es eine Menge äquivalent zu 10 µg Protein aus den Lysaten zu entnehmen und diese Probe anschließend in der Gelelektrophorese zu trennen. Zur Quantifizierung wurde die photometrische Methode von Bradford verwandt. Sie beruht auf einer colorimetrischen Reaktion des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue, die zu einer Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein führt. Daraus resultiert eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den Wellenlängenbereich von 595 nm und kann auch dort über Extinktionsmessung detektiert werden. Die Linearität des Extinktionskoeffizienten wurde von Spector 1978 nachgewiesen. Eine Eichgrade wurde mit Hilfe einer BSA-Konzentrationsreihe (1-20 µg) erstellt.

2.5. Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Die Proteinproben (die Totalen Zellysate) wurden mit zweifach destilliertem Wasser auf gleiche Volumina aufgefüllt und anschließend 1:1 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt. Die anschließende Denaturierung der Proteine erfolgte durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °Celsius.

Bei jedem Versuch wurde ein Slot mit einem gefärbten Molekulargewichtsstandard gefüllt.

Während der Gelelektrophorese bei 130 V wurden die Proben erst im Sammelgel (5% Acrylamid) fokussiert, um dann nachfolgend im Trenngel nach Molekulargewicht aufgetrennt zu werden. Der Acrylamidgehalt der Trenngele richtete sich nach dem Molekulargewicht der µ-Opiatrezeptoren; die optimale Auftrennung wurde mit einem 10% Acrylamidanteil erreicht. Die Geldicke betrug 1 mm. Die Elektrophorese im Laufpuffer wurde durchgeführt bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

2.6. Transfer

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels elektrophoretischer Elution im Naß-Verfahren (Towbin et al., 1979) auf eine Nitrocellulosemembran transferiert, die vor dem Transfer mindestens 10 min in Transferpuffer präinkubiert wurde. Bei der Übertragung der Proteine wurden, von Kathode nach Anode gesehen, in das Blotmodul geschichtet: Schwämme, What-

man-Papier, Gel, Nitrocellulosemembran, Whatmanpapier und Schwämme. Anschließend wurde das Modul in Transferpuffer gestellt, und es wurde bei 100 mA pro Elektrophorese-kammer geblottet. Der Transfer dauerte etwa 18 Stunden.

Der Erfolg der Proteinübertragung wurde durch die sichtbare Übertragung des gefärbten Molekulargewichtstandards überprüft. Die 40 kDa Bande wurde zur späteren Orientierung auf dem Röntgenfilm mit einem Kohlestift markiert.

2.7. Immunreaktion

Nitrocellulosemembranen besitzen eine extrem hohe Bindungskraft für Proteine. Daher muss verhindert werden, dass eine unspezifische Adsorption des primären Antikörpers an die Membran stattfindet. Zu diesem Zweck muss die Membran mit nicht antigenem Protein oder anderen oberflächenaktiven Agenzien abgesättigt werden (Towbin und Gordon, 1984). In diesem Protokoll kamen in der Blockierlösung das milde Detergenz Tween 20 (0,1%) sowie bovines Serumalbumin (4%) und fettfreie Trockenmilch (4%) zur Anwendung. Es wurde für 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler geblockt.

Nach dem Absättigen konnte die erste Immunreaktion durchgeführt werden. Dies geschah durch einstündige Inkubation der Nitrocellulosemembran bei Raumtemperatur auf dem Schüttler mit dem Erstantikörper. Er war in einer Konzentration von 1:2.000 in Antikörperlösung verdünnt. Anschließend wurde 1x10 Minuten und 4x5 Minuten mit jeweils ca. 30 ml Waschlösung gespült, um ungebundenen Antikörper zu entfernen.

Der in der ersten Antigen-Antikörper-Reaktion entstandene Immunkomplex wurde mit Hilfe eines Enzymkonjugats sichtbar gemacht. Da die Antikörper nicht direkt markiert zur Verfügung standen, erfolgte die Detektion über Meerrettichperoxidase-markierte Zweitantikörper (Hsu und Soban, 1982; Nakane, 1968) die gegen den im Immunkomplex gebundenen Erstantikörper gerichtet waren. Die Konzentration der Sekundärantikörper in der Antikörperlösung betrug 1:5000. Dabei wurde die Membran in dieser Antikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert und anschließend erneut 1x10 min und 4x5 min in der Waschlösung gewaschen. Die Visualisierung erfolgte mittels ECL-Kit. Dieses Kit basiert auf der Fähigkeit von cyclischen Diacylhydraziden wie Luminol zu chemoluminiszieren (Chemolumineszenz bedeutet Lumineszenz aufgrund einer chemischen Reaktion). Eines der am besten verstandenen und hier zur Anwendung kommenden Systeme stellt die HRP/Hydrogen Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol unter alkalischen Bedingungen dar. Direkt nach

der Oxidation befindet sich das Luminol in einem angeregten Zustand und kehrt über Lichtemission in seinen Grundzustand zurück. Die verstärkte Chemi-luminiszenz (Whitehead et al., 1979) wird durch chemische Verstärker wie Phenole erreicht, was sowohl zu verlängerter wie auch zu etwa 1000fach verstärkter Lichtemission führt. Die Strahlung findet zwischen der 5 und 20. Minute ihr Maximum und verfällt anschließend mit einer Halbwertszeit von 60 Minuten.

Das freiwerdende Licht der ECL-Reaktion führt zur Schwärzung eines Röntgenfilms.

2.8. Rechnerunterstützte Densitometrie

Es wurde 1970 von Laemmli gezeigt, dass die Schwärzung des Röntgenfilms linear zu der Stärke des Lichts verläuft, welches durch die ECL-Reaktion emittiert wurde. Daher lassen sich die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden auch mittels Densitometrie quantifizieren. Die geschwärzten Röntgenfilme wurden rechnergestützt eingescannt und densitometrisch vermessen. Zur Messung der Schwärzung wurde das Rechnerprogramm NIH-Image verwendet, welches von dem National Institute of Health der USA zur Auswertung von Western Blots entwickelt wurde.

Schließlich wurde der ermittelte Wert für die standardisierte Positivkontrolle gleich eins gesetzt und die ermittelten Werte der Proben entsprechend umgerechnet, um eine Vergleichbarkeit der Versuche untereinander zu gewährleisten.

2.9. Geräte

Brut-/Trockenschrank	memmert, Depex (Houten, Niederlande)
Dampfsterilisator	Varioklav Typ500, H+P Labortechnik GmbH (München)
Elektrophoresekammer	Mini-Protean-II, Bio-Rad GmbH (München)
Heiz-Magnetprüher	Monotherm, Variomag (Daytona Beach, USA)
Heizblock	QBTB, Grant (London, UK)
Netzgeräte	PowerPac 300, Bio-Rad GmbH (München)
pH-Elektrode	Typ pH525, WTW (Weilheim)
Präzisionspritzen	Microliter syringes, Hamilton (Reno, USA)
Röntgenfilmentwickler	Curix capacity Typ8350, Agfa-Gevaert (Köln)
Schüttelwasserbad	Typ GFL, Labor Eich (Bonn)
Spektrophotometer	UV-160 A, Shimadzu (Tokio, Japan)
Sterilbank	ZKB 72, Bio-Flow Technik (Meckenheim)
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG (Zürich, Schweiz)

Waagen	Analytic AC 2105, Sartorius-Werke GmbH (Göttingen) BP 21005, Sartorius-Werke GmbH (Göttingen)
Wärmebad	M31, Köttermann Labortechnik (Uetze/Hänigsen)
Zentrifuge	Centrifuge 5415 R, Eppendorf AG (Hamburg) Microfuge E, Beckmann Instruments (Palo Alto, USA)

2.10. Chemikalien und Medien

30% Acrylamid/Bis Lösung (29:1)	Bio-Rad GmbH (München)
APS	Bio-Rad GmbH (München)
Chemilumineszenz Reagent	Perkin Elmer Life Sciences (Wellesley, USA)
Fötiales Kälberserum, steroidfrei	Biochrom KG (Berlin)
Penicillin/ Streptomycin x100	Gibco-BRL (Eggenstein)
Precision Protein Standards	Bio-Rad GmbH (München)
RPMI 1640 Flüssigmedium	Biochrom KG (Berlin)
SDS 20% (w/v)	Bio-Rad GmbH (München)
TEMED	Bio-Rad GmbH (München)
Triton X	Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)

Alle hier nicht gesondert erwähnten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Sigma Chemie GmgH (Deisenhofen)

Merck (Darmstadt)

2.11. Lösungen

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
KH ₂ PO ₄	1,5 mM
Na ₂ HPO ₄	8,1 mM
Aqua dest ad	100%

RIPA Lysepuffer	pH 7,5
NaF	50 mM
EDTA	2,5 mM
Triton X-100	1%
Tris pH 7,5	20 mM
Glycerol	10%
Na-desoxycholat	1%
SDS	0,1%
Na ₄ P ₂ O ₇	10 mM

Vor Gebrauch Zugabe von Proteaseinhibitorcocktail (100µl/ 10ml) und Natriumorthovanadat (50µM)

Proteaseinhibitorcocktail

Aprotinin	1µg/ ml
Leupeptin	1µg/ ml
PMSF	1mM
Lagerung bei -80° Celsius	

Antikörperlösung

BSA	1%
Tween-20	0,05%
PBS	ad 100%

Blockierlösung

BSA	4 %
Non fat dry milk	4 %
Tween-20	0,1 %

PBS	ad	100%
-----	----	------

Waschlösung

BSA		0,1 %
Tween-20		0,05 %
PBS	ad	100%

Stripplösung

Tris HCl		65 mM
SDS		2 %
Mercaptoethanol		100 mM
PBS	ad	100%

Reduzierender Probenpuffer (6x)

Tris/HCl (0,5M; pH 6,8)		280 mM
Glycerol		30%
SDS		1%
DTT		500 mM
Bromphenol Blau		0,0012%
Aqua dest (deionisiert)	ad	100%

SDS-PAGE Gele

Sammelgel 5%

Aqua bidest	5,7 ml
0,5 M Tris pH 6,8	2,5 ml
SDS 10%	100µl
Acrylamid/ Bis (30%)	1,7 ml

Es werden schnell hinzu gegeben:

APS (10%)	50µl
Starten der Polymerisation durch:	
TEMED	10 µl

Trenngel (10%)	
Aqua bidest	8,3 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml
10% SDS	200 µl
Acrylamid/ Bis (30%)	6,7 ml

Es werden schnell hinzu gegeben:	
APS (10%)	100µl
Starten der Polymerisation durch:	
TEMED	10 µl

Laufpuffer für die Gelelektrophorese nach Laemmli

Tris	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%
pH 8,3	

Transferpuffer für den Immunoblot auf Nitrocellulosemembran

Tris	25 mM
Glycin	200 mM
Methanol	20%
pH 8,3	

RPMI++ Medium

RPMI 1640 Fertigflüssigmedium

Fötale Kälberserum	10%
--------------------	-----

Penicillin/ Streptomycin x100 1%
Lagerung bei 4 °Celsius

2.12. Verbrauchsmaterialien

Chromatographiepapier	Whatman Int. Ltd., (Maidstone, USA)
Gummischaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Kulturschalen	Falcon (Heidelberg)
Nitrocellulosemembran	Optitran BA-583, Schleicher & Schuell GmbH (Dassel)
Röntgenfilme	100NIF, Fuji Photo Film Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
Wachsfilm	Parafilm „M“, American National Can (Chicago, USA)

2.13. Antikörper

2.13.1. Primärer Antikörper

Der monoklonale Antikörper gegen den μ -Opiatrezeptor (DiaSorin, USA, Cat. No. 24216) wurde nach Herstellerangaben in Kaninchen erzeugt und richtet sich gegen eine synthetische Peptidsequenz, welcher mit den Aminosäuren 384-398 des klonierten μ_1 -Opiatrezeptor der Ratte korrespondiert. Dieses Peptid wurde dann mit Glutaraldehyd an Rinder-Thyreoglobulin gebunden. Der Antikörper bewies bereits eine starke Immunfluoreszenz am Rückenmark und am Nucleus caudatus sowie dem Putamen der Ratte. Die Spezifität wurde gesichert (Arvidsson et al., 1995).

2.13.2 Sekundärer Antikörper

Meerrettichperoxidase gekoppeltes Anti-Rabbit Ig Vector Labs. (Burlingame, USA)

Der sekundäre Antikörper wurde mit der Antikörperlösung im Verhältnis 1:5.000 verdünnt und vor jedem Gebrauch neu angesetzt.

3. Ergebnisse

Die Markierung mit monoklonalen MOR-Antikörper und einem Chemiluminiszenz-Detektionssystem nach Auftrennung der Zelllysate mittels Western Blots konnte in jeder untersuchten Gehirnregion sowohl bei dem Drogenkollektiv als auch im Kontrollkollektiv eine stabile Bande im Bereich der 50 kDa Markierung nachweisen. Bei der als Negativkontrolle verwendeten Proteinmischung zeigte sich keine Bande an dieser Position.

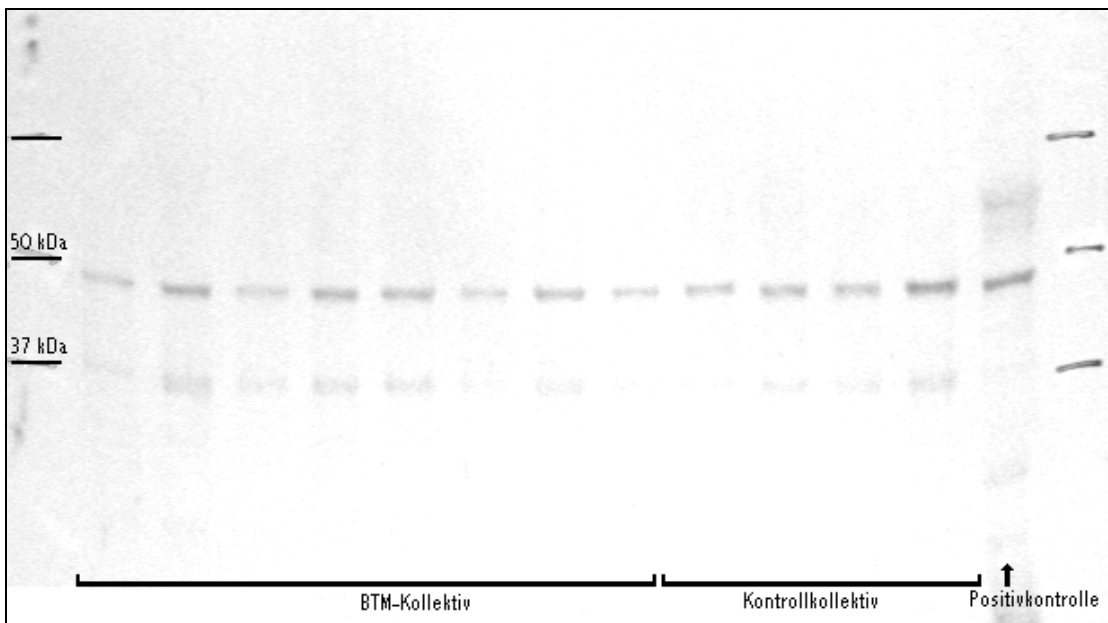


Abb. 5 Western Blot von Zelllysaten des Nucleus caudatus von 8 Drogentoten und 4 Kontrollen sowie der Positivkontrolle (mit MOR-Antikörpern markierte Banden)

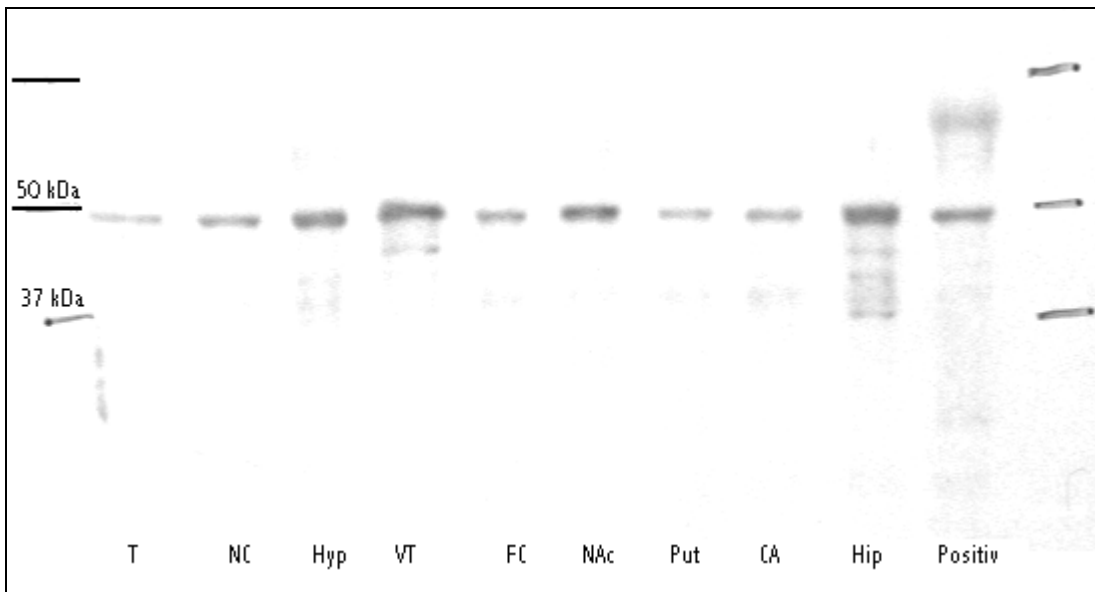


Abb. 6 Western-Blot der Gehirnregionen Thalamus (T), Nucleus caudatus (NC), Hypothalamus (Hyp), ventrales Tegmentum, (VT), Frontalcortex (FC), Nucleus accumbens (NAc), Putamen (Put), Corpus amygdaloideum (CA) und Hippocampus (Hip) sowie der Positivkontrolle (mit MOR-Antikörper markierte Banden) aus dem BTM-Kollektiv („Drogentoter“).

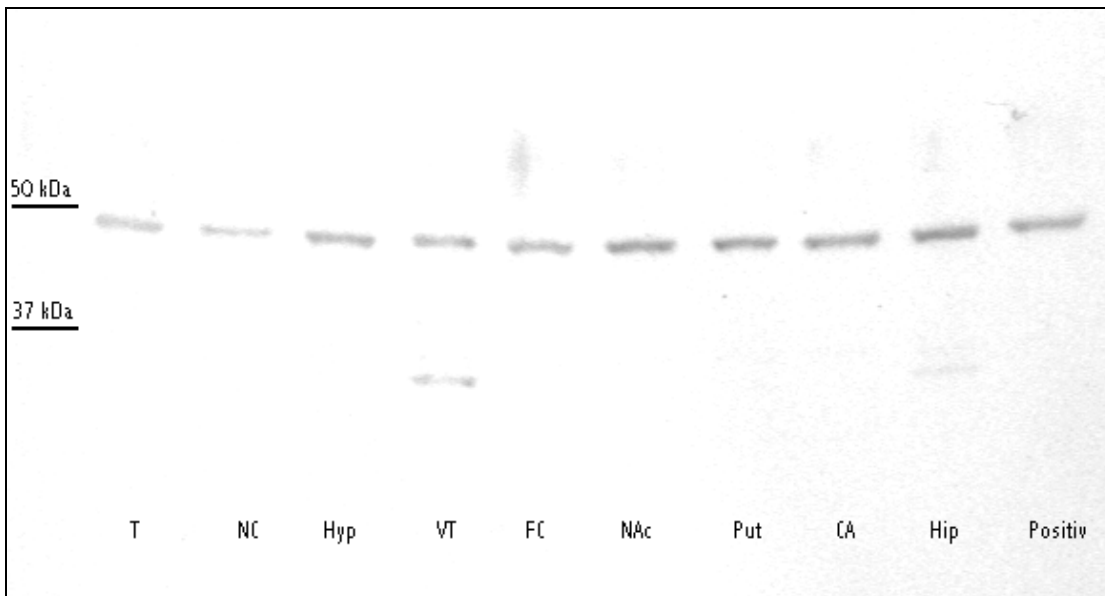


Abb. 7 Western-Blot der Gehirnregionen Thalamus (T), Nucleus caudatus (NC), Hypothalamus (Hyp), ventrales Tegmentum, (VT), Frontalcortex (FC), Nucleus accumbens (NAc), Putamen (Put), Corpus amygdaloideum (CA) und Hippocampus (Hip) sowie der Positivkontrolle (mit MOR-Antikörper markierte Banden) aus dem Kontroll-Kollektiv.

	T	N.C.	Hyp	VT	FC	NAc	Put	CA	Hip
K 1	0,45	0,67	n.a.	0,82	0,35	0,61	n.a.	0,53	n.a.
K 2	0,04	0,85	n.a.	1,16	0,65	0,74	0,78	0,89	0,89
K 3	0,69	0,63	0,45	0,79	0,45	0,65	0,6	0,68	0,84
K 4	0,48	0,86	0,69	1,12	0,85	0,78	0,93	0,81	0,8
K 5	0,27	0,41	0,49	0,53	0,29	0,43	0,73	0,69	0,99
K 6	0,94	0,6	1,33	1,12	0,87	1,07	0,96	0,92	1,16
K 7	0,16	0,93	0,21	0,7	0,23	0,72	0,69	0,47	1,91
K 8	0,15	0,7	0,91	1,05	0,25	0,87	0,74	0,91	0,53
K 9	0,68	0,74	0,81	0,37	0,21	0,6	0,71	0,74	0,9

Tab.4 Relative optische Dichtewerte (Positivkontrolle = 1) der jeweiligen Gehirnregionen im Kontrollkollektiv (Thalamus [T], Nucleus caudatus [NC], Hypothalamus [Hyp], ventrales Tegmentum [VT], Frontalcortex [FC], Nucleus accumbens [NAc], Putamen [Put], Corpus amygdaloideum [CA] und Hippocampus [Hip], n.a. Region nicht untersucht)

	T	NC	Hyp	VT	FC	NAc	Put	CA	Hip
BTM 1	0,42	0,93	0,5	0,85	1	1,27	1,18	0,93	0,82
BTM 2	0,33	0,76	0,86	0,91	0,59	0,79	0,7	0,55	0,82
BTM 3	0,6	0,25	0,97	0,89	0,64	0,89	0,83	0,29	0,46
BTM 4	0,55	0,54	0,86	0,29	0,45	0,75	0,67	0,74	1,01
BTM 5	0,37	0,94	0,94	1,01	0,79	0,38	0,63	0,84	n.a.
BTM 6	0,61	0,49	0,79	0,19	0,35	0,78	0,97	n.a.	n.a.
BTM 7	0,44	0,81	0,76	0,5	0,33	0,51	0,85	0,82	0,84
BTM 8	0,5	0,59	1,13	1,7	0,46	1,32	0,47	0,79	1,79
BTM 9	0,8	0,42	0,89	1,02	0,52	0,23	0,73	0,61	0,78
BTM 10	0,45	0,5	0,87	0,66	0,51	0,75	0,65	0,49	0,54
BTM 11	0,4	0,61	0,57	0,74	0,24	0,78	0,47	0,21	0,79
BTM 12	n.a.	0,76	0,59	0,7	0,36	0,74	0,15	0,8	0,27
BTM 13	0,18	0,88	0,92	0,28	0,58	0,71	0,81	0,87	0,85

Tab. 5 Relative optische Dichtewerte (Positivkontrolle = 1) der jeweiligen Gehirnregionen im BTM-Kollektiv („Drogentote“) (Thalamus [T], Nucleus caudatus [NC], Hypothalamus [Hyp], ventrales Tegmentum [VT], Frontalcortex [FC], Nucleus accumbens [NAc], Putamen [Put], Corpus amygdaloideum [CA] und Hippocampus [Hip] n.a. Region nicht untersucht)

	BTM-Kollektiv MW± SD (Spannweite)	Kontrollkollektiv MW± SD (Spannweite)
Thalamus	0,47 ± 0,15 (0,33-0,80)	0,43 ± 0,31 (0,04-0,94)
Nucleus caudatus	0,67 ± 0,20 (0,25-0,94)	0,71 ± 0,14 (0,41-0,93)
Hypothalamus	0,81 ± 0,17 (0,57-0,97)	0,70 ± 0,34 (0,21-1,33)
Ventrales Tegmentum	0,66 ± 0,38 (0,19-1,70)	0,85 ± 0,27 (0,37-1,16)
Frontalcortex	0,59 ± 0,20 (0,24-1,00)	0,46 ± 0,25 (0,21-0,87)
Nucleus accumbens	0,77 ± 0,29 (0,23-1,27)	0,72 ± 0,17 (0,43-1,07)
Putamen	0,83 ± 0,24 (0,15-1,18)	0,77 ± 0,11 (0,60-0,96)
Corpus amygdaloideum	0,70 ± 0,22 (0,21-0,93)	0,74 ± 0,15 (0,47-0,91)
Hippocampus	0,79 ± 0,37 (0,27-1,79)	1,00 ± 0,38 (0,53-1,91)

Tab. 6 Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Spannweite der relativen optischen Dichtewerte (Positivkontrolle = 1) im Vergleich zwischen BTM-Kollektiv und Kontrollkollektiv

Nach Auswertung durch den Wilcoxon-Test ($p \leq 0,05$ wurde als signifikant vorausgesetzt) zeigten sich keine signifikanten Änderungen in der optischen Dichte und damit in der Proteinmenge des MOR-Rezeptors im Vergleich zwischen BTM-Kollektiv und Kontrollkollektiv.

Die mit Hilfe einer semiquantitativen densitometrischen Software (Image, National Institutes of Health) bestimmten optischen Dichtewerte lagen zwischen 4% (0,04) und 191% (1,91) des für die Positivkontrolle bestimmten Dichtewertes. Es ist also eine relativ hohe Streuung der Messwerte zu bemerken.

Interessanterweise zeigen sich vergleichsweise hohe optische Dichtewerte (OD) im Hippocampus, Putamen und ventralem Tegmentum, wohingegen im Thalamus und Frontalcortex relativ geringe optische Dichtewerte (OD) und damit MOR-Proteinexpression gefunden werden.

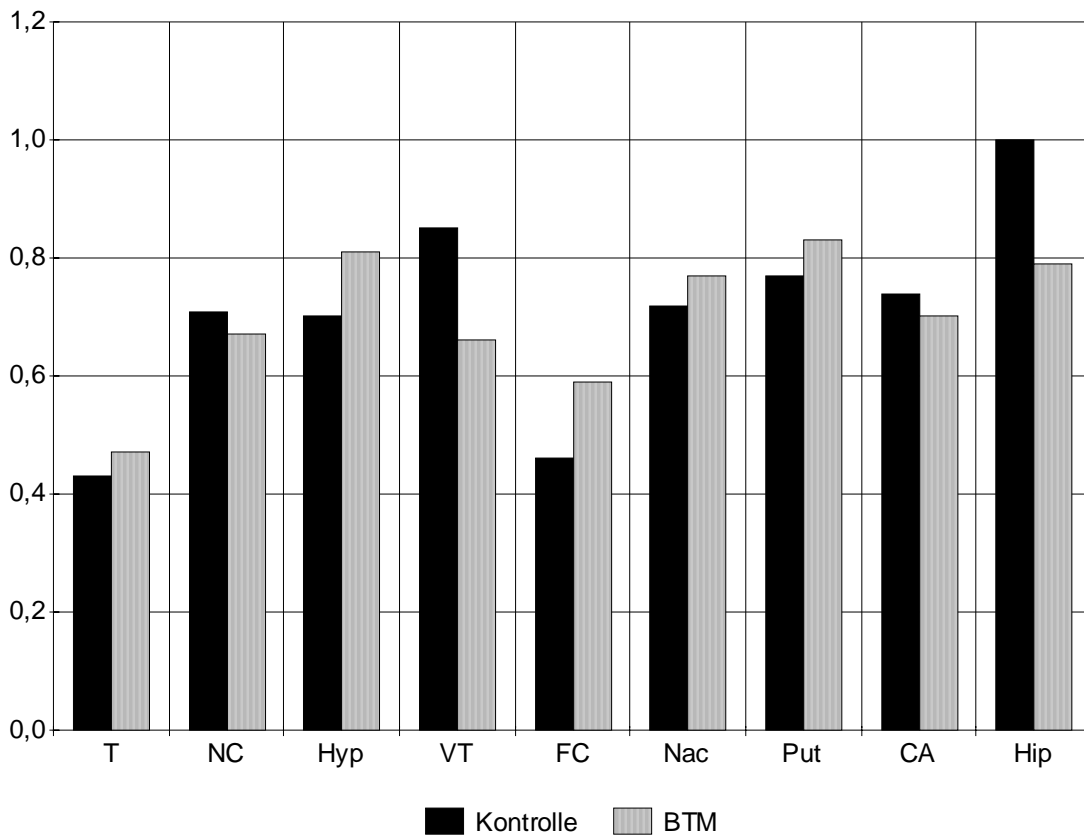


Abb. 8 Graphische Darstellung der relativen optischen Dichtewerte (Positivkontrolle = 1) im Vergleich zwischen BTM-Kollektiv und Kontrollkollektiv

Besonders ausgeprägte Differenzen zwischen BTM-Kollektiv und Kontrollkollektiv im Sinne einer Verminderung zeigen sich im Hippocampus (BTM OD 0,79 : Kontrolle OD 1,00) sowie im ventralen Tegmentum (BTM OD 0,66 : Kontrolle OD 0,85). Weiterhin fiel eine geringgradigere Verminderung der Proteinexpression im Nucleus caudatus und im Corpus amygdaloideum auf.

Im Frontalkortex (BTM OD 0,59 : Kontrolle OD 0,46) und im Hypothalamus (BTM OD 0,81 : Kontrolle OD 0,70) wurde jedoch tendenziell eine verstärkte Expression des MOR-Proteins gefunden, im geringeren Ausmaß auch im Thalamus, Nucleus accumbens und dem Putamen.

Obwohl diese Ergebnisse auf regulative Veränderungen in der Expression des MOR-Proteins durch chronische Opiatexposition hindeuten, konnte keine statistische Signifikanz zwischen dem Kollektiv der chronisch Opiatexponierten und dem Kontrollkollektiv nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1. Spezifität der Methoden

4.1.1. Materialgewinnung und Lagerung

Das Untersuchungsgut dieser Arbeit bestand aus Präparaten aus jeweils 9 Gehirnregionen von 13 Drogentoten und 9 Kontrollpersonen, welche keine Opiate konsumierten.

Die toxikologischen Untersuchungen der Drogentoten wiesen bei allen untersuchten Personen des BTM-Kollektivs erhöhte Opiat-Spiegel im Blut nach. Auch die Auffindesituation sowie die körperliche Untersuchung ergaben in allen 13 Fällen eindeutige Hinweise auf einen stattgehabten intravenösen Opiatmissbrauch, zudem ergaben sich in allen Fällen anhand der polizeilichen Akte Hinweise für einen langjährigen intravenösen Opiatmissbrauch.

Zum Einfluß der post-mortem Zeit bis zum Einfrieren der Proben liegen Untersuchungen vor.

Gonzales-Maeso et al. zeigten 2002, dass die mittels Western-Blot analysierte Immunreaktivität gegenüber G-Proteinen im menschlichen Gehirn nicht mit der postmortem Zeit korreliert. Darüberhinaus wurde der Einfluß der Lagerung in diesem Experiment abgeschätzt. Hier zeigte sich, dass sich im Zeitraum von 1-85 Monaten keine signifikante Änderung der Immunreaktivität gegenüber G α -Proteinen bei einer Lagerung von -70 °Celsius ergab. Es fand sich lediglich eine Abnahme der Bindungsfähigkeit von [³⁵S]GTP γ S von 3% pro Jahr der Lagerung.

Die postmortale Stabilität des μ -Opiat-Rezeptors wurde auch tierexperimentell am Modell der Ratte nachgewiesen. Kuhar et al. zeigten 1973 eine postmortale Abnahme des Bindungsverhaltens gegenüber Opiaten bei erhaltenem Verteilungsmuster der Rezeptoren. Zusätzliche fielen Unterschiede zwischen verschiedenen Rattenstämmen bezüglich der postmortalen Abnahme des Bindungsverhaltens auf. Bei Lagerungstemperaturen von 4 °Celsius schien sich ein gewisser stabilisierender Einfluß auf das Bindungsverhalten zu ergeben.

Insgesamt scheinen also sowohl die postmortem Zeit bis zum Einfrieren wie auch die Lagerung der Proben einen eher untergeordneten Effekt auf die Immunreaktivität von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wie dem μ -Opiat-Rezeptor zu haben. Trotzdem wurde in dieser Untersuchung auf vergleichbare postmortem Zeit und Lagerungszeitraum der Proben zwischen dem Kollektiv der Drogentoten und dem Kontrollkollektiv geachtet um möglicherweise unterschiedliche Denaturierung von Rezeptorproteinen möglichst auszuschließen.

4.1.2. Spezifität des primären Antikörpers

Die Spezifität des monoklonalen Antikörpers gegen den μ -Opiat-Rezeptor wurde durch Arvidson et al. 1995 ausführlich referiert. Der Antikörper richtet sich gegen die Aminosäuresequenz aa384-398 des geklonten μ -OR1 der Ratte. Es zeigte sich eine deutliche indirekte Immunfluoreszenzfärbung durch den Antikörper, welche durch eine Präadsorbition durch die Aminosäuresequenz aa384-398 des μ -OR1 vollständig geblockt werden konnte.

Die entsprechende Sequenz des menschlichen μ -OR weist eine 100%ige Homologie mit der Aminosäuresequenz des Ratten- μ -OR auf (NCBI, accession number L20684 und NM_000914).

Die vorgelegte Untersuchung lässt auf eine entsprechende Bindung auch an den menschlichen μ -OR schließen, der ebenfalls die Zielsequenz des Antikörpers enthält, da alle Gehirnproben einschließlich der Positiv-Kontrolle eine stabile Bande an der aufgrund der Molekülgröße erwarteten Position im Western-Blot zeigten, während die Negativkontrolle keine Bande an dieser Stelle aufwies.

4.1.3. Spezifität des sekundären Antikörpers und der Chemiluminiszenz

Als sekundärer Antikörper diente ein mit Meerrettichperoxidase gekoppeltes Anti-Rabbit Immunglobulin, wobei die Meerrettichperoxidase zur Kathalyse der durch Luminol bedingten Chemiluminiszenz benutzt wird.

Um eine falsch positive Markierung der Nitrozellulose-Membran auszuschließen, wurden Kontrollen unter Auslassung des primären Antikörpers durchgeführt, welche sämtlich negativ waren. Ebenso negativ zeigten sich die Kontrollen, die unter Auslassung sowohl des primären als auch des sekundären Antikörpers, d.h. nur unter Verwendung der Chemiluminiszenzreagenzien, durchgeführt wurden.

Eine falsch positive Markierung der Membran durch die Antikörpers oder das Chemiluminiszenz-Detektionssystem kann also ausgeschlossen werden.

4.1.4. Spezifität der rechnerunterstützten Densitometrie

Die durchgeführte semiquantitative Densitometrie wurde mittels des vom National Institute of Health der USA speziell für die Auswertung von Western-Blot-Analysen entwickelten Programms „NIH-Image“ durchgeführt. Um den Fehler durch die manuelle Markierung der Banden des Western Blots zu minimieren wurde jeder Membran-Scan dreimal markiert und

analysiert, wobei sich eine nur geringe Varianz der Messwerte ergab. Aus den gemessenen Schwärzungen wurde jeweils der Mittelwert gebildet.

Insgesamt war also die semiquantitative Auswertung gut reproduzierbar.

4.2. Verteilung der μ -Opiatrezeptoren in den Gehirnregionen

In dieser Arbeit fanden sich unterschiedliche Konzentrationen von μ -Opiatrezeptoren in den untersuchten Gehirnregionen. Sowohl in der Kontrollgruppe als auch im Kollektiv der Drogentoten waren die μ -OR-Konzentrationen am niedrigsten im Thalamus und im Frontalkortex. Höhere Werte fanden sich im Hippocampus des Kontrollkollektivs.

Studien, welche die μ -Opiatrezeptor-Proteinkonzentration in den in der vorliegenden Studie untersuchten Regionen des menschlichen Gehirns untersuchen, liegen nicht vor. Bisherige Experimente untersuchten entweder nur die Proteinkonzentration in einzelnen Regionen oder nutzten Methoden wie Bindungsstudien oder den Nachweis von μ -OR-mRNA im menschlichen Gehirn.

So zeigten Pfeiffer et al. 1982 in einer Ligandenbindungsstudie eine unterschiedliche Bindung von spezifischen μ -OR-Liganden in den unterschiedlichen menschlichen Gehirnregionen. Bei einer nur kleinen Fallzahl (pro Region n=2 bis 3) fand sich eine hohe Bindung im Thalamus, niedrige Bindung im Hippocampus sowie mittlere Bindung im Frontalcortex, Putamen, Nucleus caudatus, Hypothalamus und Corpus amygdaloideum.

Eine weitere Ligandenbindungsstudie (Pilpil et al., 1986) ergab eine hohe Bindung im posterioren Anteil des Corpus amygdaloideum, im Putamen, Nucleus caudatus, Hypothalamus sowie eine disseminierte Bindung im Frontalkortex. Die Befunde dieser Studie zeigen also eine gute Übereinstimmung mit den Befunden der vorgelegten Untersuchung.

Es folgten Studien, welche die mRNA-Expression in den verschiedenen Gehirnregionen untersuchten.

Minami und Satoh fanden 1995 eine unterschiedliche Verteilung der μ -OR m-RNA im Rattenhirn. Eine starke Expression konnte im Putamen und Nucleus caudatus nachgewiesen werden. Mittlere bis starke Expression zeigte sich im Corpus amygdaloideum und im Thalamus sowie eine disseminierte Expression im Hippocampus. Im Frontalcortex wurde nur wenig μ -OR m-RNA nachgewiesen.

Peckys und Landwehrmeyer führten analoge Untersuchungen 1999 an postmortal gewonnenem menschlichen Hirngewebe durch und fanden eine hohe Expression im Thalamus, mittlere Expression im Hypothalamus, Putamen, ventralen Tegmentum, Nucleus accumbens, Nucleus caudatus und eine niedrige bis mittlere Expression im Frontalcortex und Hippocampus. Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Untersuchung war die uneinheitliche Verteilung der mRNA innerhalb der Regionen, wobei ein besonders ausgeprägt fleckförmiges Muster im Frontalcortex und Hippocampus gefunden wurde. Zudem zeigten sich im Putamen und Nucleus caudatus Unterschiede der Expression zwischen anteriorem und posteriorem Anteil.

Mansour et al. verbanden 1994 den Nachweis der μ -OR m-RNA mit einer Ligandenbindungsstudie im Rattenhirn und zeigten deutliche Unterschiede in der mRNA-Synthese und der μ -OR-Ligandenbindung im Frontalkortex und dem Hippocampus der Ratte.

Dies legt nahe, dass der μ -Opiatrezeptor Transportmechanismen unterliegt, das heißt, dass der Ort der Expression nicht identisch mit dem Ort des Membraneinbaus sein muß.

Insgesamt ergeben sich also eher widersprüchliche Befunde zwischen den bisherigen Untersuchungen und den vorliegenden Befunden. Insbesondere die niedrige μ -OR-Rezeptor Konzentration im Thalamus sowie die hohe Konzentration im Hippocampus überrascht.

Mögliche Ursachen der unterschiedlichen Befunde können zunächst in der Methode liegen.

In dieser Untersuchung wurde der Anteil des μ -Opiatrezeptorproteins am Gesamtprotein der Probe in Relation zur Positivkontrolle nachgewiesen. Das Material bestand dabei aus totalen Zelllysaten. Dabei wird also das gesamte μ -Opiatrezeptorprotein der Zelle nachgewiesen, unabhängig von der räumlichen Verteilung in oder an der Zelle. Im Gegensatz dazu weisen Ligandenbindungsstudien die Rezeptordichte an der Zelle nach, das heißt die für eine Ligandenbindung zur Verfügung stehenden Rezeptoren der Zellmembran. G-Protein gekoppelte Rezeptoren werden nach Agonistenbindung internalisiert (Bohm et al., 1997) und stehen damit für Ligandenbindungsstudien nicht mehr zur Verfügung. Die μ -Opiatrezeptorproteinbestimmung aus totalen Zelllysaten weist naturgemäß aber auch internalisierte Rezeptoren nach.

Eine weitere Ursache der Diskrepanzen könnte zudem die eingeschränkte Vergleichbarkeit unterschiedlicher Spezies sein. Beim Vergleich der regionalen Verteilung von Opiatrezeptoren mittels Ligandenbindungsstudie mit ^3H -Dihydromorphin zwischen menschlichem und Rhesusaffenhirn (Kuhar et al. 1973) wurden unterschiedliche Verteilungen insbesondere im Thalamus und im Nucleus caudatus gefunden, weniger ausgeprägt aber auch im Frontalkortex

und im Corpus amygdaloideum. In Anbetracht der Tatsache, dass viele Studien zur Verteilung der μ -Opiatrezeptoren an unterschiedlichen Tierspezies durchgeführt wurden, erscheint eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen nicht uneingeschränkt möglich.

Zusammenfassend liegt mit dieser Arbeit erstmals eine Untersuchung der μ -Opiatrezeptorproteinkonzentration aus totalen Zelllysaten aus neun Regionen des menschlichen Hirns vor. Die diskrepanten Befunde insbesondere im Thalamus und im Hippocampus können ein Hinweis auf Regulationsvorgänge in diesen Regionen sein, welche auf die unterschiedliche zelluläre Distribution der μ -Opiatrezeptoren in diesen zentralen Bereichen des mesolimbischen Belohnungssystems hindeuten.

4.3. Unterschiede zwischen den Drogentoten und dem Kontrollkollektiv

In dieser Untersuchung zeigten sich tendenzielle Änderungen der μ -Opiatrezeptormenge sowohl im Sinne einer up-regulation, einer down-regulation oder auch einer no-change Situation. Hinweise auf eine vermehrte Expression des μ -Opiatrezeptors durch chronischen Opiatkonsum ergaben sich im Hypothalamus und dem Frontalcortex. Verminderte Expression zeigte sich im ventralen Tegmentum und im Hippocampus. Die Regionen Thalamus, Nucleus caudatus, Nucleus accumbens, Putamen und Corpus amygdaloideum wiesen nur marginale Unterschiede in der Expression des μ -Opiatrezeptorproteins auf. Insgesamt wurde jedoch für keine der untersuchten Regionen eine statistische Signifikanz (gewählt wurde $p \leq 0,05$) erreicht.

In der Literatur findet sich nur eine Untersuchung, in welcher eine ähnliche Methode zum Nachweis des μ -Opiatrezeptorproteins angewendet wurde (Garcia-Sevilla et al., 1997). Es wurden totale Zelllysate aus dem Frontalkortex von Drogentoten, welche langjährig Drogen konsumiert hatten im Vergleich zu einem drogenfreien Kontrollkollektiv semiquantitativ auf den Gehalt an μ -Opiatrezeptorprotein untersucht. Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein polyklonaler μ OR-Antikörper verwendet. Ein signifikanter Unterschied in der μ -Opiatrezeptorproteinkonzentration des Frontalkortex konnte nicht gezeigt werden.

Aus der Arbeitsgruppe des Instituts für Rechtsmedizin der Universität Bonn liegen mehrere Arbeiten vor, welche mit einer immunhistochemischen Markierung und anschließenden Auswertung mittels Lichtmikroskopie oder camera lucida die für den μ -Opiatrezeptor positiven Zellen von Drogentoten mit denen eines drogenfreien Kontrollkollektiv verglichen. Untersucht

wurden der Frontalkortex (Schmidt et al., 2001, 2003) und der Hippocampus (Schmidt et al., 2005).

Die Auswertung der Experimente zum Frontalkortex zeigte keine signifikante Änderung der μ -Opiatrezeptordichte in den Areae 24 und 25 (nach Brodmann, 1909), aber eine signifikant erhöhte Dichte in Area 11. Im Hippocampus konnte keine signifikante Änderung der Dichte gezeigt werden, wobei sich eine tendenzielle Verminderung der μ -Opiatrezeptor-Dichte fand.

Die Ergebnisse dieser Studie decken sich also insgesamt mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit (Tendenzielle Zunahme der μ -Opiatrezeptoren im Frontalkortex und Abnahme im Hippocampus), wobei in den bisherigen Arbeiten eine Signifikanz lediglich in einem Bereich der Großhirnrinde (Area 11) erreicht werden konnte.

Zudem existieren Ligandenbindungsstudien, welche die Agonisten- und Antagonistenbindung im menschlichen Gehirn im Vergleich zwischen chronisch Opiatexponierten und einem drogenfreien Kontrollkollektiv untersuchen (Gabilondo et al., 1994). Untersucht wurden unter anderem Frontalcortex, Thalamus und Nucleus caudatum, wobei sich kein signifikanter Unterschied in der Bindungsfähigkeit von μ -Opiatrezeptorliganden zwischen dem Kollektiv der Opiatexponierten und dem Kontrollkollektiv ergab.

Zusätzlich wurden aber auch zahlreiche Ligandenbindungsstudien am Tiermodell sowohl mit μ -Opiatrezeptoragonisten (Brunello et al., 1984, Dingledine et al., 1983, Nishino et al., 1990) als auch -antagonisten (Geary und Wooten, 1985; Oishi et al. 1983) durchgeführt, welche keine signifikante numerische Änderung der Bindungsstellen zeigten.

Dagegen stehen tierexperimentelle Arbeiten, welche eine „down-regulation“ der Bindungsstellen nach Morphinexposition zeigen (Rogers et al., 1986; Werling et al., 1989) aber auch eine „up-Regulation“ (Rothman et al. 1989, Yoburn et al., 1993).

Es stellt sich die Frage, aus welchen Gründen sich in der vorliegenden Arbeit keine signifikante Änderung des μ -Opiatrezeptorproteins finden konnte. Als mögliche Ursachen kommen folgende in Betracht:

- Auswahl des Untersuchungskollektivs
- Besonderheiten der pharmakologischen Eigenschaften der Opiate
- Eigenschaften der semiquantitativen Proteinbestimmung aus totalen Zelllysaten
- Anatomische Lokalisation der untersuchten Regionen

4.3.1. Auswahl des Untersuchungskollektivs

Die postulierte chronische Opiatexposition für die Gruppe der Drogentoten konnte sich in den vorliegenden Fällen neben den Befunden der gerichtsmedizinischen Untersuchung mit toxikologischen Untersuchungen vor allem auf die polizeilichen Ermittlungen stützen.

Alle Drogentoten waren polizeilich bekannt; anhand der Akten ergab sich für alle Personen eine Mindestdauer des intravenösen Opiatmissbrauchs von einem Jahr, wobei die Dauer des Opiatkonsums eine große Spannweite aufwies und naturgemäß nur anhand von indirekten Parametern (z.B. Delikte gegen das Betäubungsmittelgesetz) geschätzt werden konnte. Eine genaue Aussage über den Zeitraum des Konsums, die Art und Menge der konsumierten Drogen war somit nicht möglich.

Ein Einfluss von zusätzlich zu Opiaten konsumierten Drogen kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden. Unterwald et al. wiesen 1992 zum Beispiel mit einer Ligandenbindungsstudie nach, dass die Applikation von Kokain zu einer „up-regulation“ der μ -Opiatrezeptoren im Rattenhirn führt.

Weiterhin liegen Hinweise vor, dass die Umstände des Todes die Dichte der μ -Opiatrezeptoren verändern können. In Untersuchungen an Opfern von Selbstmord zeigte sich eine „up-regulation“ der μ -Opiatrezeptoren im Bereich des Frontalkortex und des Nucleus caudatus, wobei im Thalamus keine signifikante Änderung der Ligandenbindungsfähigkeit gezeigt werden konnte (Gabilondo et al. 1995; Gross-Isseroff et al. 1990).

Um den Einfluss von Nicht-Opiaten auf die μ -Opiatrezeptorkonzentration möglichst zu minimieren wurden in dieser Untersuchung nur Todesfälle ohne todesursächlich konkurrierende Konzentrationen von Alkohol oder Benzodiazepinen in dem Kollektiv der Drogentoten eingeschlossen.

In Zukunft könnte zur genaueren Abschätzung des Drogenkonsums die Haaranalytik hinzugezogen werden. Damit kann in Abhängigkeit von der Haarlänge der Drogenkonsum über einen Zeitraum von bis zu mehreren Monaten abgeschätzt werden (Sachs und Kintz, 1998).

Eine weitere Möglichkeit zur genaueren Abschätzung der aufgenommenen Opiatmenge wäre die Erweiterung des Untersuchungskollektivs um Verstorbene, welche eine Substitutionsbehandlung mit Opiaten (z.B. Methadon oder in Zulassungsstudien Diacetylmorphin) erhalten haben.

4.3.2. Besonderheiten der pharmakologischen Eigenschaften der Opiate

Wie erwähnt ist davon auszugehen, dass das Kollektiv der Drogentoten einen polyvalenten Substanzabusus betrieben hat. Auch der Gebrauch von verschiedenen Opiaten erscheint möglich. Untersuchungen zeigen, dass Opiate mit unterschiedlicher Affinität zum μ -Opiatrezeptor in unterschiedlichem Maße die Regulation beeinflussen. Am Modell der C₆ Glia-MOR Zellen konnte nachgewiesen werden, dass Substanzen mit einer starken Affinität zum μ -Opiatrezeptor wie Etorphine eine ausgeprägtere „down-regulation“ im Sinne einer verminderten Bindungsfähigkeit nach chronischer Exposition induzieren als schwächer affine Agonisten wie Morphin (Yabaluri und Medzihradsky, 1997). Dies wird auch auf die stärkere Internalisierung von Rezeptoren durch stärkere Agonisten zurückgeführt wie in einer [³⁵S]GTP γ S-Bindungsstudie mit Morphin, Etorphin, Fentanyl und Buprenorphin an 293-SF-MOR Zellen gezeigt werden konnte (Zaki et al., 2000).

Auch der Zeitraum der Applikation ist bedeutsam. Bei der Ratte löste eine fünftägige Dauergabe von Morphin eine intrazelluläre Vermehrung der μ -Opiatrezeptoren im Gehirn aus; erst nach zehntägiger Morphinapplikation kam es zu einer „up-regulation“ des μ -Opiatrezeptors (Fabian et al., 2002). Die im Tierexperiment angewandten Applikationsregime sind insgesamt sehr uneinheitlich und nur sehr eingeschränkt auf den Menschen zu übertragen. So wird zumeist eine kontinuierliche Opiatapplikation mittels Implantation subcutaner Depots (Brady et al., 1989; Danks et al., 1988) oder kontinuierliche Infusionen erreicht (Werling et al., 1989). Auch die verabreichte Dosis variiert zwischen den Untersuchungen deutlich. Solche kontinuierlichen Opiatgaben sind naturgemäß nicht auf den missbräuchlichen Opiatgebrauch beim Menschen übertragbar. Hier werden Phasen des akuten Rauschs von Episoden des Entzuges gefolgt. Auch erstreckt sich der Zeitraum der „chronischen“ Opiatgabe im Tierexperiment maximal auf einige Wochen, während dem Tod an einer Überdosis in der Regel ein jahrelanger Opiatmissbrauch vorangeht.

Die Erkenntnisse aus Tierexperimenten sind also nur eingeschränkt auf den Menschen zu übertragen, und auch die Vergleichbarkeit der Kollektive der Drogentoten ist nur unter Vorbehalt möglich.

4.3.3. Semiquantitative Proteinbestimmung aus totalen Zelllysaten

Eine bereits erwähnte Besonderheit der vorliegenden Arbeit ist, dass die Quantifizierung der μ -Opiatrezeptoren aus totalen Zelllysaten erfolgte. Regulationsvorgänge, welche durch eine

Internalisation des Rezeptorproteins von der Zellmembran in das Zellinnere erfolgen und mittels Ligandenbindungsstudien erfasst werden können, werden sich mit dieser Methode nicht nachvollziehen lassen.

Auch eine „Desensibilisierung“ des Rezeptors durch chronischen Opiatkonsum kann nicht nachgewiesen werden, sofern die Aminosäuresequenz des primären Antikörpers und das Molekulargewicht des μ -Opiatrezeptors durch den Vorgang nicht verändert werden. Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Reduktion der [35 S]GTP γ S Bindung im Thalamus und im Corpus amygdaloideum durch den μ -Opiatrezeptor Agonist DAMGO nach einer 40tägigen Morphinexposition bei Ratten kommt, während eine Rezeptorautoradiographie mit [3 H] DAMGO keine Änderung der Rezeptordichte ergab (Maher et al., 2005). Daraus kann geschlossen werden, dass die Sensibilität der Rezeptoren verringert wurde, ohne dass eine „down-regulation“ der zur Verfügung stehenden Rezeptoren eingetreten war.

Insgesamt bietet die verwendete Methode eine Möglichkeit Regulationsvorgänge zu erfassen, die sich auf die Gesamtheit des μ -Opiatrezeptorproteins der Zelle beziehen, unabhängig von der Subkompartimentierung innerhalb der Zelle. Dies ist insbesondere daher interessant, weil gezeigt werden konnte, dass einer der Effekte einmaliger oder kurzfristiger Opiatexposition die Rezeptorinternalisation ist, so dass experimentelle Methoden, die nur die Rezeptorexpression an der Zellmembran nachweisen, nicht sicher zwischen kurzzeitigen Regulationsvorgängen und längerfristigen Adaptionsvorgängen unterscheiden können (Koch et al. 2001).

4.3.4. Anatomische Lokalisation der untersuchten Regionen

Bei der vorliegenden Arbeit wurden vor allem Gehirnregionen untersucht, die in Bezug zum dopaminergen mesolimbischen Belohnungssystem stehen, um adaptive Vorgänge in diesem für die Opiatwirkung wichtigen System zu erfassen (Tempel et al. 1984).

Es wird postuliert, dass regionale Unterschiede in diesem System mit unterschiedlicher tonischer Opioidaktivität zusammenhängen bzw. unterschiedlichen Regelkreisen oder Feedback-Mechanismen (Morris et al., 1988).

Dabei muss in Betracht gezogen werden, dass sich Opiate nicht gleichmäßig im Gehirn verteilen. Bei Nachweis einer großen interindividuellen Varianz zeigen sich besonders hohe Morphinkonzentrationen nach intravenöser Applikation im Thalamus und im Hirnstamm (Pare et al., 1984).

Erwähnenswert ist zudem, dass verschiedene Studien eine unterschiedliche μ -Opiatdistribution innerhalb der einzelnen Regionen insbesondere im Frontalcortex, Putamen, Nucleus caudatus und Hippocampus zeigen (Mansour et al., 1994; Peckys und Landwehrmeyer, 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurden im Gegensatz dazu totale Zelllysate aus einer Gesamtregion gewonnen, so dass Unterschiede innerhalb einer Region nicht abgebildet werden konnten.

Es erscheint sinnvoll, die hier vorliegenden Ergebnisse mit weiteren Experimenten zur μ -Opiatrezeptorexpression in den Gehirnregionen des dopaminergen mesolimbischen Belohnungssystems zu ergänzen um die Regulationsvorgänge einschließlich Rezeptortransport besser zu verstehen. Dabei sollte auch eine Subdifferenzierung innerhalb der einzelnen Regionen angestrebt werden.

5. Zusammenfassung

Missbräuchlich verwendete Opiate wie Heroin besitzen auf Grund ihres hohen Suchtpotentials mit entsprechender Toleranzentwicklung einen hohen Stellenwert in sozialer und medizinischer Hinsicht.

Ihre Wirkung wird über verschiedene Opiatrezeptoren vermittelt (μ -OR, δ -OR, κ -OR). Die Hauptwirkung und insbesondere die zum Suchtpotential beitragende euphorisierende, antinozizeptive und sedierende Wirkung wird über den μ -Opiatrezeptor vermittelt.

Bisherige Untersuchungen zur Adaption der μ -Opiatrezeptordichte unter chronischer Opiatexposition erfolgten hauptsächlich tierexperimentell, an Zellkulturen oder an einzelnen menschlichen Gehirnregionen und zeigten sowohl eine Vermehrung als auch eine Verminderung oder keine signifikante Regulation der μ -Opiatrezeptordichte als Folge chronischer Opiatexposition. Untersuchungen zur Regulation des μ -Opiatrezeptors beim Menschen könnten wichtige Hinweise zum Verständnis der Opiatsucht liefern.

In dieser Untersuchung dienten an einer Opiatüberdosierung verstorbene Drogentote mit bekanntem langjährigem intravenösem Opiatmissbrauch als Modell für chronische Opiatexposition am Menschen im Vergleich zu einem altersentsprechenden Kontrollkollektiv, bei dem ein Drogenmissbrauch ausgeschlossen werden konnte. Es wurde die μ -Opiatrezeptor-Protein Konzentration in neun Gehirnregionen untersucht (Thalamus, Nucleus caudatus, Hypothalamus, ventrales Tegmentum, Frontalcortex, Nucleus accumbens, Putamen, Corpus amygdaloideum und Hippocampus), welche im Bezug zum mesolimbischen dopaminergen Belohnungssystem stehen. Die Proben wurden nach Lyse mittels Western-Blot aufgetrennt und nach Markierung mittels monoklonalem μ -Opiatrezeptor-Antikörper sowie Anwendung einer Chemilumineszenz-Färbung rechnergestützt semiquantitativ ausgewertet.

Es zeigte sich eine verhältnismäßig hohe Proteinexpression von μ -Opiatrezeptoren im Hippocampus und im ventralen Tegmentum bei relativ geringer Expression im Frontalcortex und Thalamus. Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Konzentration von μ -Opiatrezeptorprotein zwischen dem Kollektiv der Drogentoten und dem Kontrollkollektiv

nachgewiesen, wobei tendenzielle aber nicht signifikante Abweichungen zwischen den Kollektiven auf regional unterschiedliche regulative Veränderungen hindeuten könnten.

Sinnvolle weitergehende Untersuchungen könnten in der immunhistochemischen Darstellung des μ -Opiatrezeptors oder dem systematischen Nachweis der μ -Opiatrezeptor m-RNA Expression in den unterschiedlichen Regionen des menschlichen Gehirns im Vergleich zwischen chronisch Opiatexponierten und einem Kontrollkollektiv bestehen, um die Vorgänge, die zur Toleranz- und Suchtentwicklung bei chronischer Opiatexposition beitragen, besser zu verstehen.

Anhang I Literatur

- Altmann J, Everitt BJ, Glautier S, Markou A, Nutt D, Oretti R, Phillips GD, Robbins TW.
The biological, social and clinical bases of drug addiction: commentary and debate.
Psychopharmacology 1996; 125:285-345
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee J, Nakano A, Dado R, Loh H, Law P, Wessendorf
M, Elde. Distribution and Targeting of a μ - Opioid Rezeptor (MOR1) in Brain and
Spinal Cord. J Neurosci 1995; 15:3328-3341.
- Backmund M, Meyer K, von Zielonka M. Prävalenzdaten zu Hepatitis B und C bei
Drogenabhängigen in München. Suchtmedizin 2001; 3:21-24.
- Bakir AA, Dunea G. Drugs of abuse and renal disease. Clin Nephrol 1996; 5:122-126.
- Battista HI, Rössler H, Haller R, Kohler H, Riemer Y, Henn R, Hinterbuber H. A survey of
drug deaths in Western Austria. Forensic Sci Int 1993; 62:141-146.
- Bentley AJ, Busuttill A. Deaths among drug abusers in South-East Scotland.
Med Sci Law 1996; 36:231-236.
- Blake AD, Bot G, Reisine T. Structure-function analysis of the cloned opiate receptors: peptide
and small molecule interactions. Chem Biol. 1996; 3:967-972
- Blume AJ, Lichtshtein D, Boone G. Coupling of opiate receptors to adenylate cyclase:
requirement for Na⁺ and GTP. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979; 76:5626-5630
- Bohm SK, Grady EF, Bunnett NW. Regulatory mechanisms that modulate signalling by
G-protein-coupled receptors. Biochem J 1997; 322:1-18.

- Bolger GT, Skolnick P, Rice KG, Weissman BA. Differential regulation of μ -opiate receptors in heroin- and morphine-dependent rats. *FEBS Lett* 1988; 234:22-26.
- Brack J. Die Hepatiden B und C bei drogenabhängigen Patienten: Eine epidemiologische Studie. *Suchttherapie Supplement* 2002; 3:3-10
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
- Brady LS, Herkenham M, Long JB, Rothman RB. Chronic morphine increases μ -opiate receptor binding in rat brain: a quantitative autoradiographic study. *Brain Res* 1989; 477:382-386.
- Brettel H-F, Dobbertin T. Multifaktorielle Untersuchungen von 154 Rauschmitteltodesfällen. *Beitr Gerichtl Med* 1992; 50:127-130
- Brodmann K. Vergleichende Lokalisationslehre der Großhirnrinde. Leipzig: Johann Ambrosius Barth, 1909.
- Bundeskriminalamt. 2003a. Rauschgiftjahresbericht 2002. <http://www.bka.de/lageberichte/rg.html>. Zugriffsdatum 12.03.2007
- Bundeskriminalamt. 2003b. Polizeiliche Kriminalstatistik 2002. <http://www.bka.de/pks/pks2002/index2.html>. Zugriffsdatum 12.03.2007
- Brunello N, Volterra A, Di Giulio AM, Cuomo V, Racagni G. Modulation of opioid system in C57 mice after repeated treatment with morphine and naloxone: biochemical and behavioral correlates. *Life Sci* 1984; 34:1669-1678.
- Cassidy MT, Curtis M, Muir G, Oliver JS. Drug abuse deaths in Glasgow in 1992 – a retrospective study. *Med Sci Law* 1995; 35:207-212.

Chakrabarty S, Law P-Y, Loh HH. Neuroblastoma Neuro2A cells stably expressing a cloned μ -opioid receptor: a specific cellular model to study acute and chronic effects of morphine. *Mol Brain Res* 1995; 30:269-278.

Chen Y, Mestek A, Lin J, Harley JA, Yu L. Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44:8-12

Danks JA, Tortella FC, Long JB, Bykov V, Jacobson AE, Rice KC, Holaday JW, Rothman RB. Chronic administration of morphine and naltrexone up-regulates [³H](D-ALA₂,D-Leu⁵)enkephalin binding sites by different mechanisms. *Neuropharmacology* 1988; 27:965-974.

de Olmos JS, Alheid GF, Beltramino CA. *The Rat Nervous System*. Academic Press, Sydney; (1985) 223-334

de Olmos JS, Heimer L. The concepts of the ventral striatopallidal system and extended amygdala. *Ann NY Acad Sci* 1999; 877:1-32

Dettmeyer R, Schmidt P, Musshoff F, Dreisvogg C, Madea B. Pulmonary edema in fatal heroin overdose: immunohistological investigations with IgE, collagen IV and laminin - no increase of defects of alveolar-capillary membranes. *Forensic Sci Int* 2000; 110:87-96.

Dettmeyer R, Wessling B, Madea B. Heroin associated nephropathie – a post mortem study. *Forensic Sci Int* 1998; 95:109-116.

Deutsche Referenzstelle für die Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (DBDD). *Drogensituation* 2002. 2003

Dickens P, Ho J, Wong KY. Sudden death from ruptured septic myocardial infarct in an intravenous drug addict. *Forensic Sci Int* 1995; 75:67-72.

- Dingledine R, Valentino RJ, Bostock E, King ME, Chang K-J. Downregulation of δ but not μ opioid receptors in the hippocampal slice associated with the loss of physiological response. *Life Sci* 1983; 33:333-336.
- Europäische Beobachtungsstelle für Drogen und Drogensucht (EBDD). Jahresbericht 2003 – Stand der Drogenproblematik in der Europäischen Union und in Norwegen. 2003
- Evans CJ, Keith DE jr., Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. Cloning of a δ opioid receptor by functional expression. *Science* 1992; 258:1952-1955.
- Fabian G, Bozo B, Szikszay M, Horvath G, Coscia CJ, Szucs M. Chronic morphine-induced changes in mu-opioid receptors and G proteins of different subcellular loci in rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* 2002; 302:774-780.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H. Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor δ - and μ -subtypes. *FEBS Lett* 1993; 327:311-314
- Gabilondo AM, Meana JJ, Barturen F, Sastre M, Garcia-Sevilla JA.. μ -opioid receptor and α_2 -adrenoreceptor agonist binding sites in the post-mortem brain of heroin addicts. *Psychopharmacology* 1994; 115:135-140
- Gabilondo AM, Meana JJ, Garcia-Sevilla JA. Increased density of mu-opioid receptors in the postmortem brain of suicide victims. *Brain Res* 1995; 682:245-250
- Garcia-Sevilla JA, Ventalyol P, Busquets X, Le Harpe R, Walzer C, Guimon J. Regulation of immunolabelled μ -opioid receptors and protein kinase C- α and ζ isoforms in the frontal cortex of human opiate addicts. *Neuroscience Lett* 1997; 226:29-32
- Gaveriaux-Ruff C, Matthes HW, Peluso J, Kieffer BL. Abolition of morphine-immunosuppression in mice lacking the mu-opioid receptor gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:6326-6330

- Geary WA, Wooten GF. Regional saturation studies of [³H] naloxone binding in the naive, dependent and withdrawal states. *Brain Res* 1985;360:214-223
- Gerlach D. Postmortem investigations of fatal cases of narcotic addiction. *Forensic Sci Int* 1980; 15:31-39.
- Gilbert PE, Martin WR. The effect of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazoline-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 198:66-82.
- Goldstein A, Fischli W, Lowney L, Hunkapiller M, Hood L. Porcupine pituitary dynorphin: complete amino acid sequence of the biologically active heptadecapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; 78:7219-7223
- Gonzalez-Maeso J, Torre I, Rodriguez-Puertas R, Garcia-Sevilla JA, Guimon J, Meana JJ. Effects of Age, Postmortem Delay and Storage Time on Receptor-mediated Activation of G-proteins in Human Brain. *Neuropsych* 2002; 26:468-478
- Grellner W, Madea B, Sticht G. Zur Beziehung zwischen Lungenhistostruktur und Überlebensintervall bei letalem Opiatkonsum. *Rechtsmedizin* 1995; 5:130-137.
- Grellner W, Madea B, Sticht G. Pulmonary histopathology and survival period in morphine-involved deaths. *J Forensic Sci* 1996; 41:433-437.
- Gross RA, Moises HC, Uhler MD, Macdonald RL. Dynorphin A and cAMP-dependent protein kinase independently regulate neuronal calcium currents. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:7025-7029
- Gross-Isseroff R, Dillon KA, Israeli M, Biegon A. Regionally selective increases in mu opioid receptors density in the brains of suicide victims. *Brain Res* 1990; 530:312-316

- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1996; 36:429-459
- Harding-Pink D. Mortality following release from prison. *Med Sci Law* 1990; 30:12-16
- Heinemann A, Gross U. Infektionsprophylaxen im offenen Strafvollzug durch Vergabe steriler Einmalspritzen über Automaten. *Sucht* 2001; 47:57-65
- Hsu SM, Soban E. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1982; 30:1079-1082
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 1975; 258:577-579
- Hutcheson DM, Parkinson JA, Robbins TW, Everitt BJ. The effects of nucleus accumbens core and shell lesions on intravenous heroin self-administration and the acquisition of drug-seeking behaviour under a second-order schedule of heroin reinforcement. *Psychopharmacology (Berl)* 2001; 153:464-472
- Imperato A, Di Chiara G. Preferential stimulation of dopamine release in the nucleus accumbens of freely moving rats by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239:219-228
- Janssen W, Trübner K, Püschel K. Death caused by drug addiction: a review of the experiences in Hamburg and the situation in the Federal Republic of Germany in comparison with the literature. *Forensic Sci Int* 1989; 43:223-237
- Johnson RJ, Gretchen H, Yamabe H, Hart J, Bacchi CE, Hartwell B, Couser WG, Lorey L, Wener MH, Alpers CE. Membranoproliferative Glomerulonephritis associated with hepatitis C virus infection. *New Engl J Med* 1993; 328:465-470.

- Kaa E. Drug abuse in Western Denmark during the eighties. II Fatal poisonings among drug abusers. *Forensic Sci Int* 1992; 55:75-82
- Kaa E, Teige B. Drug-related deaths during the 1980s. A comparative study of drug addict deaths examines at the institutes of forensic medicine in Aarhus, Denmark and Oslo, Norway. *Int J Leg Med* 1993; 106:5-9.
- Kaatsch H-J, Nietsch W, Martz W. Drogentod in Schleswig-Holstein von 1987-1991. *Rechtsmedizin* 1994; 4:56-60.
- Kieffer BI, Beford K, Gavériaux-Ruff C, Hirth CG. The δ -opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:12048-12052
- Kelsey JE, Carlezon WA Jr, Falls WA. Lesions of the nucleus accumbens in rats reduce opiate reward but do not alter context-specific opiate tolerance. *Behav Neurosci* 1989; 103:1327-1334
- Keul H-G, Schäfer A, Lörcher U, Schneider M, Lutz F-U, Reuhl J. Preliminary results of an interdisciplinary survey of drug victims. *Forensic Sci Int* 1993; 62:147-149.
- Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schroder H, Kahl E, Holtt V. C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 2001; 276:31408-31414
- Koepp MJ, Gunn RN, Lawrence AD, Cunningham VJ, Dagher A, Jones T, Brooks DJ, Bench CJ, Grasby PM. Evidence for striatal dopamine release during a video game. *Nature* 1998; 393:266-268
- Kringsholm B, Christoffersen P. Liver pathology in fatal drug addiction. *Forensic Sci Int* 1982; 20:141-151

Kringsholm B, Christoffersen P. Lung and heart pathology in fatal drug addiction.

A consecutive autopsy study. *Forensic Sci Int* 1987a; 34:39-51.

Kringsholm B, Christoffersen P. The nature and the occurrence of birefringent material in different organs in fatal drug addiction. *Forensic Sci Int* 1987b; 34:53-62

Kringsholm B. Deaths among drug addicts in Denmark in 1968-1986.

Forensic Sci Int 1988; 38:139-149

Kringsholm B, Kaa E, Steentoft A, Worm K, Simonsen KW. Deaths among drug addicts in Denmark in 1987-1991. *Forensic Sci Int* 1994; 67:185-195

Kuhar MJ, Pert CB, Snyder SH. Regional distribution of opiate binding in monkey and human brain. *Nature* 1973; 245:447-450

Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685

Lenoir D, Barg J, Simantov R. Down-regulation of opiate receptors in serum-free cultures of aggregating fetal brain cells. *Life Sci* 1983; 33:337-340

Li CH, Chung D. Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Nature* 1976; 267:495-499

Li L, Smialek JE. Observations on drug abuse deaths in the state of Maryland.

J Forensic Sci 1996; 41:106-109

Lockemann U, Püschel K. Siderophages in the lung of drug addicts.

Forensic Sci Int 1993a; 59:169-175

- Lockemann U, Wischhusen F, Püschel K. Entwicklung der HIV-1-Prävalenz bei Drogentodesfällen in Deutschland und Europa – Analyse des vergangenen Jahrzehnts (1985-1994). *Rechtsmedizin* 1997; 7:117-120.
- Loh HH, Liu H-C, Cavalli A, Yang W, Chen Y-F, Wei L-N. μ -Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Mol. Brain Res.* 1998, 54:321-326
- Lord JAH, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977; 267:495-499
- Madea B, Käferstein H, Sticht G. Drogentodesfälle mit Leichenbeseitigung. *Arch Mriminol* 1994; 193:1-9
- Maher CE, Martin TJ, Childers SR. Mechanisms of mu opioid receptor/G-protein desensitization in brain by chronic heroin administration. *Life Sci* 2005; 77:1140-1154
- Maloteaux JM, Octave JN, Laterre EC, Laduron PM. Down-regulation of 3H-Iofentanil binding to opiate receptors in differernt cultured neuronal cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharman* 1989; 339:192-199
- Mansour A, Fox CA, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. Mu-opioid receptor mRNA expression in the rat NS: comparison to mu-receptor binding. *Brain Res* 1994; 643:245-265
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE. The effect of morphin- and nalorphin-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976; 197:517-532

- Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch J-L, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubié M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL. Activity of the d-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the k-receptor is maintained in mice lacking the μ -receptor. *J Neurosci* 1998, 18:7285-7295
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* 1996; 383:819-823
- Meng F, Xie GX, Thompson RC, Mansour A, Goldstein A, Watson SJ, Akil H. Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:9954-9958
- Minami M, Satoh M. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neuroscience Res* 1995;23:121-145
- Morris BJ, Millan MJ, Herz A. Antagonist-induced opioid receptor up-regulation. Regionally specific modulation of μ , δ and κ binding sites in rat brain revealed by quantitative autoradiography. *J Pharmacol Exp Ther* 1988;247:729-736
- Nakane PK. Simultaneous localization of multiple tissue antigens using the peroxidase-labeled antibody method: a study on pituitary glands of the rat. *J Histochem Cytochem* 1968; 16:557-560
- Nishino K, Su YF, Wong CS, Watkins WD, Chang K-J. Dissociation of μ opioid tolerance from receptor down-regulation in rat spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;253:67-72.
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ. Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987; 84:5487-5491

- Oishi R, Ozaki M, Takemori AE. In vivo binding of naloxone to opioid receptors in morphine-dependent mice. *Neuropharmacol* 1983;22:1015-1019
- Oliveira L, Paiva AC, Sander C, Vriend G. A common step for signal transduction in G protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1994;15:170-172
- Olmstead MC, Munn EM, Franklin KB, Wise RA. Effects of pedunclopontine tegmental nucleus lesions on responding for intravenous heroin under different schedules of reinforcement. *J Neurosci* 1998; 18:5035-5044
- Pare EM, Monforte JR, Thibert RJ. Morphine concentration in brain tissue from heroin-associated deaths. *J Analytical Toxicology* 1984; 8:213-216
- Paties C, Peveri V, Falzi G. Liver histopathology in autopsied drug-addicts. *Forensic Sci Int* 1987; 35:11-26
- Peckys D, Landwehrmeyer GB. Expression of mu, kappa, and delta opioid receptor messenger RNA in the human CNS: a ³³P in situ hybridization study. *Neuroscience* 1999; 88:1093-1135
- Penning R, Fromm E, Betz P, Kauert G, Drasch G, Meyer v L. Drug death autopsies at the Munich Institute of Forensic Medicine. *Forensic Sci Int* 1993b; 62:135-139
- Pert CB, Kuhar MJ, Snyder SH. Opiate receptor: Autoradiographic localization in rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976b; 73:3729-3733
- Pert CB, Snyder SH. Opiat receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973; 179:1011-1014
- Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor binding-enhancement by opiate administration in vivo. *Biochem Pharmacol* 1976a; 25:847-853.

- Pfeiffer A, Pasi A, Mehraein P, Herz A. Opiate receptor binding sites in human Brain. *Brain Res* 1982; 248:87-96
- Phelix CF, Liposits Z, Paull WK. Monoamine innervation of bed nucleus of stria terminalis: an electron microscopic investigation. *Brain Res Bull* 1992; 28:949-965
- Pilapil C, Welner S, Magnan J, Zamir N, Quirion R. Mu opioid receptor binding sites in human brain. *NIDA Res Monogr* 1986; 75:319-322
- Pontieri FE, Tanda G, Orzi F, Di Chiara G. Effects of nicotine on the nucleus accumbens and similarity to those of addictive drugs. *Nature* 1996; 382:255-257
- Püschel K, Benz D, Betz P, Birkholz M, Brettel H-F, Eidam J, Gerling I, Geserick G, Graw M, Hilgermann R, Hummelsheim G, Jakob B, Kernbach-Wighton, Klöppel A, Köhler-Schmidt H, Kringsholm B, Lasczkowski G, Lockemann U, Madea B, Mattern R, Nietsch W, Penning R, Pietrzak T, Pollak S, Quadflieg G, Rajs J, Reinhardt G, Risser D, Schäfer A, Schneider V, Schulz-Schaeffer W, Springer E, Trübner K, Vock R, Volanthen B, Wischhusen F. HIV-1 Prävalenz bei Drogentoten in der Bundesrepublik Deutschland sowie im internationalen Vergleich (Stand 31.12.1991). *Rechtsmedizin* 1993a; 3:40-43
- Puttfarcken PS, Werling LL, Cox BM. Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylyl cyclase in 7315c cell membranes: A useful model for the study of tolerance at μ opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1988; 33:520-527
- Puttfarcken PS, Cox BM. Morphine-induces desensitization and down-regulation at μ -receptors in 7315c pituitary tumor cells. *Life Sci* 1989; 45:1937-1942
- Rajs J, Falconer B. Cardiac lesions in intravenous drug addicts. *Forensic Sci Int* 1979; 13:193-209

- Raynor K, Kong H, Chen Y, Yasuda K, Yu L, Bell GI, Reisine T. Pharmacological characterisation of the clones κ -, δ - and μ -opioid receptors. *Mol Pharmacol* 1994a; 45:330-334
- Raynor K, Kong H, Mestek A, Bye LS, Tian M, Liu J, Yu L, Reisine T. Characterization of the cloned human mu opioid receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272:423-428
- Robert Koch Institut. 2003. Epidemiologisches Bulletin - Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und public health - Sonderausgabe A.
http://www.rki.de/cln_048/nn_196440/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2003/Sonderausgaben/A__03.html?__nnn=true. Zugriffsdatum 12.03.2007
- Rogers NF, El-Fakahany EE. Morphine-induced opioid receptor down-regulation detected in intact adult rat brain cells. *Eur J Pharmacol* 1986; 124:221-230
- Rothman RB, McLean S, Bykov V, Lessor RA, Jacobson AE, Rice KC, Holaday JW. Chronic morphine upregulates a μ -opiate binding site labeled by [3H] cycloFOXY: a novel opiate antagonist suitable for positron emission tomography. *Eur J Pharmacol* 1987; 142:73-81
- Rothman RB, Bykov V, Long JB, Brady LS, Jacobson AE, Rice KC, Holaday JW. Chronic administration of morphine and naltrexone up-regulate μ -opioid binding sites labeled by [3H] [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]enkephalin: further evidence for two μ -binding sites. *Eur J Pharmacol* 1989; 160:71-82
- Roy S, Liu H-C, Loh HH. μ -Opioid receptor-knockout mice: the role of μ -opioid receptor in gastrointestinal transit. *Mol Brain Res* 1998; 56:281-283
- Roy S, Barke RA, Loh HH. μ -Opioid receptor-knockout mice: role of mu-opioid receptor in morphine mediated immune functions. *Brain Res Mol Brain Res*. 1998; 61:190-194

- Sachs H, Kintz P. Testing for drugs in hair. Critical review of chromatographic procedures since 1992. *Journal of Chromatography B* 1998; 713:147-161
- Schmidt PH, Oscilowski Z, Schmolke C, Padosch SA, Mußhoff F, Madea B. Zur Zelldichte μ -Opiatrezeptor-exprimierender hippocampaler Neuronen Drogentoter. *Rechtsmedizin* 2005; 15:18-23
- Schmidt PH, Schmolke C, Musshoff F, Menzen M, Prohaska C, Madea B. Area-specific increased density of mu-opioid receptor immunoreactive neurons in the cerebral cortex of drug-related fatalities. *Forensic Sci Int* 2003; 133:204-211
- Schmidt PH, Schmolke C, Mußhoff F, Prohaska C, Menzen M, Madea B. Numerical density of μ opioidreceptor expressing neurons in the frontal cortex of drug related fatalities. *Forensic Sci Int* 2001; 115:219-229
- Simon E, Hiller J, Edelman I. Stereospecific binding of potent narcotic analgesic [3 H]etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1973; 70:1947-1949
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M. Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:3365-3369
- Shen J, Benedict Gomes A, Gallagher A, Stafford K, Yoburn BC. Role of cAMP-dependent protein kinase (PKA) in opioid agonist-induced mu-opioid receptor downregulation and tolerance in mice. *Synapse* 2000; 38:322-327
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR. Opiate receptor knockout mice define μ receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1544-1549
- Sora I, Funada M, Uhl GR. The mu-opioid receptor is necessary for [D-Pen $_2$,D-Pen $_5$] enkephalin-induced analgesia. *Eur J Pharmacol* 1997; 324:1-2

Spector T. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation.

Anal Biochem 1978; 86:142-146

Suzuki S, Miyagi T, Chuang TK, Chuang LF, Doi RH, Chuang RY. Morphine upregulates mu opioid receptors of human and monkey lymphocytes.

Biochem Biophys Res Commun 2000; 279:621-628

Steenoft A, Teige B, Holmgren P, Vuori E, Kristinsson J, Kaa E, Wethe G, Ceder G, Pikkarainen J, Simonsen KW. Drug addict deaths in the Nordic countries: a study based on medicolegally examined cases in the five Nordic countries in 1991.

Forensic Sci Int 1996a; 77:109-118

Steenoft A, Worm K, Pedersen CB, Sprehn M, Mogensen T, Sorensen MB, Nielsen E. Drugs in blood samples from unconscious drug addicts after the intake of an overdose.

Int J Leg Med 1996b; 108:248-251

Tanda G, Pontieri FE, Frau R, Di Chiara G. Contribution of blockade of the noradrenaline carrier to the increase of extracellular dopamine in the rat prefrontal cortex by amphetamine and cocaine. *Eur J Neurosci* 1997; 9:2077-2085

Tao P-L, Law P-Y, Loh HH. Decrease in δ and μ opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; 240:809-816

Terenius L. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol* 1973; 33: 377-384

Tempel A, Gardner EL, Zukin RS. Visualization of opiate receptor up-regulation by light microscopy autoradiography. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:3893-3897

Tempel A, Gardner EL, Zukin RS. Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. *J Pharmacol Exp Ther* 1985; 232:439-444

Tempel A, Crain SM, Peterson ER, Simon EJ, Zukin RS. Antagonist-induced opiate receptor upregulation in cultures of fetal mouse spinal cord-ganglion explants. *Brain Res* 1986; 25:287-291

Tempel A, Habas J, Paredes W, Barr GA. Morphine-induced downregulation of mu-opioid receptors in neonatal rat brain. *Brain Res* 1988; 469:129-133

Thompson RC, Mansour A, Akil H, Watson SJ. Cloning and pharmacological characterisation of a rat μ -opioid receptor. *Neuron* 1993; 11:903-913

Tian M, Broxmeyer HE, Fan Y, Lai Z, Zhang S, Aronica S, Cooper S, Bigsby RM, Steinmetz R, Engle SJ, Mestek A, Pollock JD, Lehman MN, Jansen HT, Ying M, Stambrook PJ, Tischfield JA, Yu L. Altered hematopoiesis, behavior, and sexual function in mu opioid receptor-deficient mice. *J Exp Med* 1997; 185:1517-1522

Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding--current status and outlook. *J Immunol Methods* 1984; 72:313-340

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 76:4350-4354

Uhl GR, Childers S, Pasternak G. An opiate-receptor gene family reunion. *Trends Neurosci* 1994; 17:89-93

Unterwald EM, Horne-King J, Kreek MJ. Chronic cocaine alters brain mu opioid receptors. *Brain Res* 1992; 584:314-318

Wang JB, Imai Y, Epplere CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR. μ -opiat receptor: cDNA cloning and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:10230-10234

- Wang JB, Johnson PS, Persico AM, Hawkins AL, Griffin CA, Uhl GR. Human μ -opiate receptor: cDNA and genomic clones, pharmacologic characterization and chromosomal assignment. *FEBS Lett* 1994; 338:217-222
- Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJ, Thorpe GH. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* 1979; 25:1531-1546
- Wise RA, Bozarth MA.. Brain mechanisms of drug reward and euphoria. *Psychiatr Med* 1985; 3:445-460
- Werling LL, McMahon PN, Cox BM. Selective changes in μ -opioid receptor properties induced by chronic morphine exposure. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:6393-6397
- Wessel J. Zu den Umständen des Todes bei Drogentodesfällen. *Z Rechtsmed* 1986; 96:215-228
- Yoburn BC, Billings B, Duttaroy A.. Opioid receptor regulation in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265:314-320
- Xi ZX, Stein EA. Nucleus accumbens dopamine release modulation by mesolimbic GABAA receptors-an in vivo electrochemical study. *Brain Res.* 1998; 798:156-165
- Yabaluri N, Medzihradsky F. Down-regulation of μ -opioid receptor by full but not partial agonists is dependent of G protein coupling. *Mol Pharmacol* 1997; 52:896-902
- Yu VC, Richards ML, Sadée W. A human neuroblastoma cell line expresses mu and delta opioid receptor sites. *J Biol Chem* 1986; 261:1065-1070
- Zadina JE, Chang SL, Ge LJ, Kastin AJ. Mu opiate receptor down-regulation by morphine and up-regulation by naloxone in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265:254-262

Zadina JE, Kastin AJ, Ge LJ, Gulden H, Bungart KJ. Chronic, but not acute, administration of morphine alters antiopiate (Tyr-MIF-1) binding sites in rat brain.

Life Sci 1989; 44:555-561

Zaki PA, Keith DE, Brine GA, Carroll I, Evans CJ. Ligand-induced changes in surface μ -opioid receptor number: Relationship to G protein Activation?

JPET 2000; 292:1127-1134

Zastawny RL, George SR, Nguyen T, Cheng R, Tsatsos J, Briones-Urbina R, O'Dowd BF. Cloning, characterization, and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain.

J Neurochem 1994; 62:2099-2105

Anhang II Danksagung

Mein besonderer Dank gilt

Herrn Prof. Dr. P. Schmidt

Für seine jederzeit gewährte Hilfe, Unterstützung und Geduld

Herrn Prof. Dr. B. Madea

Für die Themenstellung und die Möglichkeit, die Laborräume im Rechtsmedizinischen Institut zu nutzen

Herrn Prof. Dr. H. Vetter

Für die Möglichkeit, die Westernblot-Analysen in den Laborräumen der Medizinischen Universitäts-Poliklinik durchzuführen

Frau Dr. J. Becker

Für die Hilfe gerade in der schwierigen Anfangsphase

Dem MTA-Team der Medizinischen Universitäts-Poliklinik und insbesondere Frau I. Baier

Für die Hilfe in praktischen Fragen