

Opioidrezeptortypen; Bindungsstudien und selektive Toleranz

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Dr. rer. med.

an der Medizinischen Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von:

Patrizia Rubini Illes (Dottore in Scienze biologiche / Univ. Milano)

Geburtsdatum/Geburtsort:

28. März 1956 in Milano, Italien

Angefertigt am:

Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie,
Medizinische Fakultät, Universität Leipzig

Betreuer:

Prof. Dr. Michael Schaefer

Beschluss über die Verleihung des Doktorgrades vom: 24.05.2016


Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	2
Wissenschaftlicher Anteil der Promovendin an der Publikation.....	3
Bibliographische Beschreibung.....	4
I. Einleitung.....	5
Grundlegende Erklärungen.....	5
Multiple Opioidrezeptoren.....	5
II. Wissenschaftlicher Hintergrund.....	8
Eigene Publikationen.....	8
Fragestellungen der Dissertation.....	8
III. Zusammenfassung der Arbeit.....	9
IV. Originalmitteilungen.....	13
V. Derzeitiger Stand der Opioidforschung.....	31
Opioidrezeptortypen.....	31
Transduktionsmechanismen der Opioidrezeptoren; Toleranz und Abhängigkeit.....	32
Zentrale und periphere Opioidanalgesie.....	38
Schlussfolgerungen.....	39
VI. Literaturverzeichnis.....	40
Eigenständigkeitserklärung.....	44
Lebenslauf und Publikationsverzeichnis.....	45
Danksagung.....	49

Erklärung über den wissenschaftlichen Anteil der Promovendin zur Publikation

Die drei Publikationen, die meiner Doktorarbeit als Grundlage dienen, sind während meiner anderthalbjährigen Stipendienzeit am Max-Planck-Institut für Psychiatrie in München entstanden. In einer Publikation (Rubini et al., Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol, 319:142-146, 1982) bin ich Erstautorin; die Bindungsstudien an Homogenisaten des Rattenhirns, Meerschweinchen-Ileums („guinea-pig ileum“, GPI) und Mäuse-Vas deferens (MVD) habe ich selbst durchgeführt. An den beiden weiteren Publikationen (Schulz et al., J Pharmacol Exp Ther, 219: 547-550, 1981; Wüster et al., Life Sci, 29: 1219-1227, 1981) habe ich maßgeblich mitgewirkt, indem ich die Messungen am MVD bewerkstelligt habe. Die restlichen Experimente wurden von der TA Frau Christine Hager durchgeführt. Das Schreiben der drei Arbeiten durch die Herren Prof. Rüdiger Schulz und Dr. Michael Wüster habe ich kritisch begleitet und unterstützt.

Leipzig, 24. September 2015



Patrizia Rubini Illes (Dottore in scienze biologiche / Univ. Mailand)

Bibliographische Beschreibung

Patrizia Rubini Illes

Opioidrezeptortypen; Bindungsstudien und selektive Toleranz

Universität Leipzig, kumulative Dissertation

49 S, 43 Lit., 0 Tab., 3 Abb.

Referat

Das Meerschweinchen-Ileum („guinea-pig ileum“; GPI) und Mäuse-Vas deferens (MVD) werden seit mehreren Jahrzehnten als Test-Systeme für die Quantifizierung der Wirksamkeit von Opioid-Agonisten verwendet. Gleichzeitig sind sie geeignet, die Rezeptortyp-Selektivität von Morphin-ähnlichen Analgetika, ihren synthetischen Abkömmlingen und verschiedenen endogenen Opioidpeptiden zu bestimmen. Es war bereits zu Beginn der 80-er Jahre des letzten Jahrhunderts bekannt, dass es drei Opioidrezeptor-Typen gibt, die durch Morphin-ähnliche Analgetika (μ), Enkephaline (δ) und Benzomorphone/Dynorphine (κ) selektiv/präferentiell aktiviert werden können. In derselben Zeit widmete ich mich der Erforschung einiger damals hochaktueller Fragen, indem ich mich dieser Testsysteme bediente.

Es wurde selektive Toleranz am GPI und MVD gegenüber der akuten Applikation von Opioid-Agonisten erzeugt, indem derselbe Agonist dem Meerschweinchen oder der Maus über mehrere Tage hindurch subkutan verabreicht wurde. Nach Entwicklung der Toleranz, nahm die ursprüngliche Hemmwirkung der Agonisten, auf die durch elektrische Nervenstimulation ausgelösten Kontraktionen des GPI bzw. MVD, ab. Die vollständige Kreuz-Toleranz zwischen Morphin und D-Ala², D-Leu⁵-Enkephalin (DADL) schloss das Vorhandensein eines δ -Rezeptors aus, während die fehlende Kreuz-Toleranz zwischen Normorphin/DADL einerseits und Ethylketocyclazocin andererseits das Vorhandensein eines κ -Rezeptors belegte.

In einer zweiten Publikation untersuchten wir am MVD mithilfe der selektiven Toleranzentwicklung, welcher Rezeptortypen durch Pro-Enkephalin- und Pro-Dynorphin-Abkömmlinge stimuliert werden. Aus dem Vorläufermolekül Pro-Enkephalin entstehen im Organismus δ -präferentielle Enkephaline und aus dem Pro-Dynorphin κ -präferentielle Dynorphine. Wir fanden, dass eine minimale Länge des Polypeptids für die κ -Aktivität des Dynorphins unerlässlich ist; nach weiterer Kürzung überwiegte die δ -Aktivität.

Letztendlich versuchte ich zu klären, weshalb am GPI sowohl Toleranz als auch Abhängigkeit erzeugt werden kann, während am MVD nur Toleranz resultiert. Demzufolge führte die in vivo-Vorbehandlung mit einem Opioid-Agonisten sowohl am GI als auch am MVD zu einer Empfindlichkeitsabnahme gegenüber demselben Agonisten, aber die Applikation des Opioid-Antagonisten Naloxon löste nur am GPI eine Entzugs-ähnliche Kontraktion aus. Die Bindungskapazitäten von μ - (GPI) und δ -Bindungsstellen (MVD) an DADL-unbehandelten und behandelten Homogenisaten aus Rattenhirn und MVD waren identisch; somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Toleranz eine Abnahme der genannten Opioid-Bindungsstellen zugrunde liegt. Weitere Untersuchungen an Homogenisaten des Gehirns, des GI und des MVD zeigten eine GTP-abhängige Bindung der Agonisten Dihydromorphin, DADL und Ethylketocyclazocin an den ersten beiden, nicht jedoch am letzteren Gewebetyp. Dies stützte unsere Annahme, dass am MVD (Präsynapse) die Toleranzentwicklung über andere Second-Messenger-Wege verwirklicht wird als an Gehirn und GI (Postsynapse).

Einleitung

Grundlegende Erläuterungen

Meine Dissertation berichtet über Experimente, die vor mehr als 30 Jahren durchgeführt und kurz danach publiziert wurden. Deshalb habe ich mich entschieden folgendermaßen vorzugehen: (1) Ich fasse einige grundlegende Kenntnisse zusammen, die bereits zum Zeitpunkt der Experimente bekannt waren; (2) Danach beziehe ich mich auf drei Publikationen, die aus meiner Arbeit entstanden sind; (3) Letztlich berichte ich über weitere, wesentliche Entwicklungen im Forschungsgebiet, die durch unsere damaligen Ergebnisse mitgestaltet wurden.

Ich hatte das Glück nach dem Abschluss meines Biologiestudiums 1980-81 anderthalb Jahre am Max-Planck-Institut für Psychiatrie (Direktor: Prof. Albert Herz) innerhalb der Gruppe Prof. Rüdiger Schulz – Dr. Michael Wüster arbeiten zu dürfen. Das Institut gehörte damals zu den weltweit führenden Forschungsstätten der Opioidforschung und hatte regen ideellen und personellen Austausch mit weiteren Institutionen u.a. in Großbritannien und den Vereinigten Staaten. Für uns, angehende Wissenschaftler und Wissenschaftlerinnen war dies eine höchst anregende und fruchtbare Zeit.

Multiple Opioidrezeptoren

Opium, ein Extrakt der Schlafmohnkapsel ist seit mehreren tausend Jahren bekannt; es wurde seitdem als schmerzstillendes und beruhigendes/schlafförderndes Medikament sowie missbräuchlich als euphorisierendes Suchtmittel verwendet (Höllt, 2013). Es besteht aus einer Mischung von mehr als 20 Alkaloiden, von denen eines, 1806, vom Paderborner Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner, nach dem griechischen Gott der Träume (Morpheus), als Morphin benannt wurde. Morphin besitzt eine Reihe peripherer und zentraler Wirkungen, die ohne Ausnahme neuronal vermittelt werden. Die für die Therapie wichtigste Wirkung ist die analgetische; bis heute gibt es kein Mittel, das bei den meisten Schmerzzuständen vergleichbar stark und verlässlich wirken würde. Allerdings schränken die zahlreichen unerwünschten Effekte von Morphin (Sedierung, Toleranz/Abhängigkeit, Atemdepression, Obstipation) seine Anwendbarkeit bei akuten und chronischen Schmerzen ein. Es ist ein altes Streben der Pharmakologen, ein Medikament herzustellen, das eine dem

Morphin vergleichbare analgetische Wirkstärke besitzt, aber ohne dessen Nebenwirkungsspektrum.

Zwei Entdeckungen erweckten große Hoffnungen, dieses Ziel verwirklichen zu können. Erstens, die Identifizierung endogener tierischer Opioidpeptide und zweitens, die Charakterisierung multipler Opioidrezeptoren. Es wurde angenommen, dass endogene tierische Substanzen nebenwirkungsarmer seien als das pflanzliche Morphin und, dass die analgetische Wirkung des Morphins an einem anderen Rezeptor entstehen würde, als seine restlichen Effekte.

Liebeskind und Mitarbeiter (Akil et al., 1976) beobachteten, dass die elektrische Stimulation bestimmter Hirnregionen z.B. im periaquäduktalem Grau, eine starke Analgesie auslöste, die durch den Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon, aufgehoben werden konnte. Dieser Befund stützte die Annahme, dass endogene Opioidpeptide im Gehirn vorkommen und auf elektrische Reize hin freigesetzt werden. Kurz danach gelang der Nachweis, dass Gehirnextrakte die inhibitorische Wirkung von Morphin auf durch Nervenstimulation ausgelöste Muskelkontraktionen des Meerschweinchen-Ileums (GPI) und des Mäuse-Vas deferens (MVD) nachahmen können (Hughes et al., 1975). Naloxon antagonisierte auch diesen Effekt. Dadurch gelang die Aufreinigung zweier Pentapeptide, die als Met- und Leu-Enkephalin benannt wurden. Die Entdeckung des β -Endorphins (Li et al., 1976) und der Dynorphine (Goldstein et al., 1979) folgten anschließend.

Die bekannten Opioidpeptide werden aus drei Vorläufermolekülen durch proteolytische Spaltung gebildet: β -Endorphin entsteht aus dem Pro-Opiomelanocortin (POMC), das auch ein gemeinsamer Prekursor des β -Lipotropins und des ACTH ist, Met- und Leu-Enkephalin entstehen aus Pro-Enkephalin, und Dynorphin aus Pro-Dynorphin.

Die Annahme, dass Opioidrezeptoren homogen sind, wurde zuerst von Martin et al. (1976) anhand Experimente am spinalisierten Hund in Frage gestellt. Die von ihm beschriebenen drei Rezeptoren (μ , κ , σ) wurden durch die δ - (Lord et al., 1977) und ϵ -Rezeptoren ergänzt (Schulz et al., 1981a). Die jeweils typischen Agonisten für die μ -, κ - und δ -Rezeptoren sind Morphin, der synthetische Agonist Ethylketocyclazocin und das Opioidpeptid Leu-Enkephalin (Illies 1989; s. unten). Am σ -Rezeptor entstehen psychotomimetische Effekte bestimmter Opioidstrukturen, wie z.B. des N-Allylnormetazocins, die aber durch Naloxon nicht antagonisierbar sind und deshalb mittlerweile nicht als Opioidrezeptor-vermittelte Effekte betrachtet werden (Zukin und

Zukin, 1984). Ob es einen eigenständigen ϵ -Rezeptor gibt, ist fragwürdig; während Morphin, Leu-Enkephalin und Dynorphin die durch Nervenreizung induzierten Kontraktionen des Ratten-Vas deferens unbeeinflusst lassen, wirkt β -Endorphin hemmend. Bindungsstudien und funktionelle Messungen konnten aber das Vorhandensein dieses Rezeptors im Gehirn oder verschiedenen peripheren Organen nicht belegen. Es wurde hingegen gezeigt, dass β -Endorphin im etwa gleichem Umfang μ - und δ -Rezeptoren stimuliert.

Die Selektivität eines Opioids für seinen Rezeptor kann durch Bindungsstudien oder Bioassays nachgewiesen werden (Kosterlitz et al., 1981). Entscheidend ist die Dissoziationskonstante (K_i) einer nicht radioaktiven Substanz, die einen Radioliganden von seinen Bindungsstellen verdrängt. Die verwendeten Radioliganden waren z.B. tritiiertes Dihydromorphin (μ), D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin (DADLE; δ) und Ethylketocyclazocin (κ). Mithilfe dieser Liganden konnten die K_i -Werte zahlreicher Agonisten bestimmt werden und somit auch ihre Rezeptorselektivität. Da jedoch keines dieser Liganden absolut selektiv für die erwähnten Rezeptoren war, wurden die restlichen Rezeptoren im Gehirnhomogenisat durch überschüssige Konzentrationen von kaltem [D-Ala², MePhe⁴, Gly-ol⁵]enkephalin (DAGO; μ) und DADLE (δ) eliminiert (Magnan et al., 1982; Corbett et al., 1984).

Weiterhin wurden die intramuralen Nerven isolierter Glattmuskelpräparate elektrisch gereizt, um mechanische Antworten hervorzurufen (Lord et al., 1977). Die Amplituden dieser Kontraktionen konnten durch Opioide gehemmt werden, indem die Transmitterfreisetzung aus den Endigungen postganglionär sympathischer und parasympatischer Nerven unterdrückt wurde. Gängige Bioassaypräparate sind das GPI (nur μ und δ) sowie das MVD (μ , δ und κ). Aus dem Vergleich der Agonisten-Konzentrationen, die eine 50%-ige Hemmung der Kontraktionen hervorrufen (IC_{50}), kann auf die Wirkpotenz der jeweiligen Opioide gefolgert werden. Während Bindungsstudien zwischen Agonisten und Antagonisten nicht differenzieren, kann die Dissoziationskonstante der Antagonisten (K_B) aus der Gleichung $pA_2 = -\log K_B$ berechnet werden. Der pA_2 -Wert ergibt sich aus dem Schild-Plot (Arunlakshana and Schild, 1958); dafür muss eine Konzentrations-Wirkungskurve des Agonisten in Ab- und Anwesenheit eines Antagonisten aufgenommen werden, um die jeweiligen IC_{50} -Werte vergleichen zu können.

Bindungsstudien und Bioassays erlaubten die Bestimmung der Rezeptor-Selektivität einer Reihe von Opioid-Agonisten und -Antagonisten (Illes, 1989). Morphin sowie die meisten synthetischen und halbsynthetischen Opioid-Analgetika (Fentanyl, Methadon) sind μ -selektiv, so wie einige Enkephalin-Strukturanaloga (z.B. DAGO). Met⁵- und vor allem Leu⁵-Enkephalin sind δ -präferentiell, obwohl sie auch μ -Rezeptoren mitaktivieren können. Eine höhere Selektivität zu δ -Rezeptoren besitzen DADLE und [D-Pen², D-Pen⁵]enkephalin. Synthetische Benzomorphan-Strukturen wie Ethylketocyclazocin und Beremazocin sind κ -präferentiell; Dynorphin-(1-13) und Dynorphin-(1-17) aktiviert ebenfalls vorzugsweise κ -Rezeptoren.

Naloxon ist ein genereller Opioid-Antagonist, obwohl es zum μ -Rezeptor eine etwa 10-fach höhere Affinität besitzt als zu den δ - und κ -Rezeptoren (Yoshimura et al., 1982). Selektive μ -, δ - und κ -Antagonisten wurden hergestellt und werden zur Rezeptor-Charakterisierung verwendet.

I. Wissenschaftlicher Hintergrund und Fragestellungen

Eigene Publikationen

Meine Dissertation entstand auf der Grundlage dreier Publikationen, die sich mit der Charakterisierung von Opioidrezeptoren im GPI und MVD beschäftigen.

Schulz R, Wüster M, Rubini P und Herz A (1981b) Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: Their differentiation by means of selective tolerance development. *J Pharm Exp Ther* 219: 547-550.

Wüster M, Rubini P, Schulz R (1981) The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. 29: 1219-1227.

Rubini P, Schulz R, Wüster M, Herz A (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319: 142-146.

Fragestellungen der Dissertation

Es wurden insgesamt 3 Fragenkomplexe eruiert, die zu dieser Zeit noch nicht geklärt waren:

1. Enthält das GPI-Längsmuskel / myenterischer Plexus-Präparat getrennte μ - und δ -Rezeptoren oder wirken δ -präferentielle Opioidpeptide über ihre μ -Restaktivität in diesem Gewebe?
2. Über welche Rezeptoren wirken neuere Opioidpeptide, die über den proteolytischen Abbau von Proenkephalin (Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin, Met-Enkephalin-Arg-Phe) oder Pro-Dynorphin (Dynorphin-(1-13), α -Neo-Endorphin) entstehen und im Organismus vorkommen?
3. Wodurch ist die starke Toleranz und Gewebeabhängigkeit im GPI bedingt und wie kann die geringe Toleranz und fehlende Gewebeabhängigkeit im MVD erklärt werden?

IV. Zusammenfassung der Arbeit

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades Dr. rer. med.

Titel: Opioidrezeptortypen; Bindungsstudien und selektive Toleranz

Eingereicht von: Patrizia Rubini Illes (Dr. rer. nat. Univ. Milano)

Angefertigt an der Abteilung Neuropharmakologie, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Betreut von: Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Monat und Jahr der Einreichung: 23.9.2015

Schulz R, Wüster M, **Rubini P** und Herz A (1981) **Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: their differentiation by means of selective tolerance development.** J Pharm Exp Ther 219: 547-550.

Eine langdauernde Vorinkubation des GPI bzw. des MVD mit Morphin-haltiger Nährlösung (unter in vitro-Bedingungen wird anstelle von Morphin häufig Normorphin verwendet) führte zur Entwicklung von Toleranz und im Falle des GPI zu einer zusätzlichen Abhängigkeits-ähnlichen Reaktion. Die Toleranz manifestierte sich als verminderte Ansprechbarkeit gegenüber dem in Anwesenheit des Morphins akut applizierten Normorphin, während die Gewebeabhängigkeit sich als starke Naloxon-induzierte Kontraktion bemerkbar machte. Diese Kontraktion beruhte auf einer massiven Ausschüttung von Acetylcholin aus den postganglionär parasymphatischen Nervenendigungen. Als Erklärung wurde hinzugezogen, dass Naloxon das Morphin von seinen Rezeptoren verdrängt und eine entzugsähnliche Reaktion auslöst.

Da nicht nur eine in vitro-Vorinkubation mit Morphin in den beiden Präparaten zur Empfindlichkeitsabnahme gegenüber Morphin/Normorphin führte sondern auch die mehrtägige, subkutane Implantation eines Morphin-Pellets oder einer Opioid-Lösung enthaltenden osmotischen Minipumpe, haben wir über den letzteren Weg selektive Toleranz gegenüber μ - (Morphin, Fentanyl), δ - (DADLE) und κ -Agonisten (Ethylketocyclazocin, MR 2034, MRZ) hervorgerufen. Nach in vivo-Behandlung mit den genannten Substanzen wurde das GPI präpariert, in einer Nährlösung, die den jeweiligen Agonisten in der ungefähr 80-fachen Toleranz-induzierenden Konzentration enthielt, aufgehängt und mit Feldelektroden elektrisch stimuliert. Die Reizparameter wurden so gewählt (supramaximale Spannung, 0.5 ms Reizbreite, 0.1 Hz Frequenz), dass ausschließlich das neuronale Gewebe stimuliert wurde, nicht aber der Glattmuskel.

In vorhergehenden Experimenten konnte die Rezeptorausstattung des GPI nicht eindeutig identifiziert werden. Mit der Erzeugung der selektiven Toleranz an μ -Rezeptoren wurde die akute Wirkung von sowohl μ - als auch δ -Rezeptor-Agonisten wesentlich vermindert. Demgegenüber, übten κ -Rezeptor-Agonisten ihre Wirkung in unveränderter Intensität aus. Die vollständige Kreuz-Toleranz zwischen Morphin und DADLE schloss das Vorhandensein eines δ -Rezeptors aus, während die fehlende Kreuz-Toleranz zwischen Normorphin/DADLE einerseits und Ethylketocyclazocin andererseits das Vorhandensein eines κ -Rezeptors belegte.

Es bedarf einer Erklärung, weshalb die in vivo-Behandlung mit Fentanyl nur geringe Toleranz gegenüber Normorphin auslöste und *vice versa* (wenig Kreuz-Toleranz), obwohl sich eine hochgradige Toleranz gegenüber derselben Substanz entwickelte. Es wurde geschlussfolgert, dass es verschiedene Subtypen von μ -Rezeptoren gibt, eines mit Empfindlichkeit gegenüber Morphin/Normorphin und ein anderes gegenüber Fentanyl.

Wüster M, Rubini P, Schulz R (1981) **The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors.** *Liefer Sci* 29: 1219-1227.

In dieser Publikation wurden als Testsysteme sowohl das GPI als auch der MVD verwendet. Die neuronal-induzierten Kontraktionen wurden im MVD durch identische Reizparameter ausgelöst, wie für das GPI beschreiben, um eine direkte, glattemuskuläre Kontraktion zu vermeiden. Die experimentelle Vorgehensweise war

ähnlich wie in der vorhergehenden Publikation beschrieben, indem den Tieren Morphin-Pellets oder Opioid-Lösung enthaltende osmotische Minipumpen subkutan implantiert wurden. Dadurch konnte selektive μ - oder κ -Rezeptor-Toleranz (GPI) bzw. μ -, δ - oder κ -Rezeptor-Toleranz (MVD) hervorgerufen werden. Ziel der Untersuchungen war mit der Methode der selektiven-Toleranz die Rezeptor-Präferenzen von Dynorphin-(1-9), Dynorphin-(1-13), α -Neo-Endorphin und Met-Enkephalin-Arg-Phe zu bestimmen. Während Dynorphin-(1-13) κ -präferentiell war, führte die C-terminale Kürzung dieses Moleküls bei Dynorphin-(1-9) zu einer Abnahme der κ - und Zunahme der δ -Aktivität. Das Pro-Dynorphin-Abbauprodukt α -Neo-Endorphin behielt seine κ -Präferenz; das C-terminal längere Pro-Enkephalin-Abbauprodukt Met-Enkephalin-Arg-Phe behielt seine δ -Präferenz. Bindungsstudien an Gehirnhomogenisaten der Ratte bestätigten die vorhergehenden Ergebnisse.

Ein interessanter Befund war, dass die in vivo-Behandlung mit den κ -Rezeptor-Agonisten Ethylketocyclazocin, MR 2034 und MRZ 2549 eine hochgradige Toleranz gegenüber denselben Substanzen, eine geringe Toleranz gegenüber Dyn-(1-13) und keine Toleranz gegenüber den restlichen Agonisten bewirkte. Wir folgerten, dass am MVD unterschiedliche Subpopulationen von κ -Rezeptoren vorhanden sind.

Rubini P, Schulz R, Wüster M, Herz A (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 319: 142-146.

Wie bereits geschildert, entwickelt sich im Gegensatz zum GPI am MVD zwar hochgradige Opioid-Toleranz nach in vivo-Vorbehandlung mit Opioiden, aber keine in vitro-Entzugskontraktion nach Naloxongabe. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass im isolierten GPI sowohl die cholinergen Zellkörper als auch ihre Nervenendigungen erhalten bleiben, während im MVD die Verbindungen der postganglionär sympathischen Nervenendigungen zu ihren Zellkörpern im Zuge der Präparation durchtrennt werden. Wir nehmen aber an, dass die Zellsomata, als Stätten der Proteinsynthese, für die Abhängigkeitsentwicklung unerlässlich sind.

In einer ersten Versuchsserie haben wir nachgewiesen, dass die Bindungskapazitäten von μ - (GPI) und δ -Bindungsstellen (MVD) an DADLE-unbehandelten und -behandelten Homogenisaten aus Rattenhirn und MVD identisch

waren. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Toleranz eine Abnahme der genannten Opioid-Bindungsstellen zugrunde liegen würde.

In der zweiten Versuchsreihe wurde der Frage nachgegangen, ob die Toleranzentwicklung im Gehirn, GPI und MVD durch dieselben oder durch unterschiedliche Mechanismen bedingt ist. Es war bereits damals bekannt, dass ein wichtiger Second-Messenger der Opioid-Rezeptoren cAMP ist, das durch das Enzym Adenylatcyclase aus ATP gebildet wird. Nach wiederholter Applikation von suchterzeugenden Opioid-Agonisten (z.B. Morphin oder Heroin) nimmt die Aktivität von Adenylatcyclase zu. Bei Opioid-Abhängigkeit, kann dann das plötzliche Absetzen des Suchtstoffs oder die Gabe von Naloxon zur erhöhten Produktion von cAMP führen.

Da die Bindung von Opioid-Agonisten, nicht aber die von -Antagonisten, GTP benötigt, und abbaustabile GTP-Strukturanaloga wie z.B. Guanylyl imidodiphosphat (GMP-PNP) diese Bindung verhindern können, untersuchten wir die Beeinflussbarkeit der ^3H -Dihydromorphin-, ^3H -DADLE- und ^3H -Ethylketocyclazocin-Besetzung ihrer Bindungsstellen in Homogenisaten des Rattenhirns, GPI und MVD. Wir fanden, dass GMP-PNP die Bindung der jeweiligen Radioliganden in Hirn und GPI hemmen konnte, aber im MVD unbeeinflusst ließ. Diese letztere Versuchsserie stützte die Hypothese, dass das GPI ein adäquates Modell der Toleranzentwicklung im Nervensystem darstellt, nicht aber das MVD, wo die Toleranz von der Abhängigkeit getrennt sich entwickelt und offenbar andere Second-Messenger-Wege nutzt.

Es sei angemerkt, dass Bindungsstellen sich von funktionellen Rezeptoren unterscheiden und deshalb die Ergebnisse mit entsprechender Behutsamkeit interpretiert werden sollten.

Functional Opiate Receptors in the Guinea-Pig Ileum: Their Differentiation by Means of Selective Tolerance Development¹

RÜDIGER SCHULZ, MICHAEL WÜSTER, PATRICIA RUBINI and ALBERT HERZ

Department of Neuropharmacology, Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Kraepelinstrasse 2, D-8000 München 40, Federal Republic of Germany

Accepted for publication August 11, 1981

ABSTRACT

Schulz, Rüdiger, Michael Wüster, Patricia Rubini and Albert Herz: Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: Their differentiation by means of selective tolerance development. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 219: 547-550, 1981.

A differentiation of multiple opiate receptors in the electrically stimulated longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the guinea-pig ileum is described employing the technique of tolerance development of selective opiate receptors. Appar-

ently, *mu*- and *kappa*-opiate receptors are clearly differentiated in this tissue, since highly tolerant *mu*-receptors (80-fold) co-exist with *kappa*-receptors of almost normal sensitivity and *vice versa*. Attempts to demonstrate *delta*-receptors failed, as there was complete cross-tolerance between *mu*- and *delta*-agonists. It is proposed that *delta*-agonists bring about their action *via mu*-receptors in this preparation. Although *mu*- and *kappa*-receptors have been demonstrated, neither of them appear to represent a uniform population.

Opiate receptors have been reported to be heterogeneous in nature (Martin *et al.*, 1976; Lord *et al.*, 1977; Chang and Cuatrecasas, 1979; Snyder and Goodman, 1980; Hughes, 1981). The techniques employed for their differentiation mainly relate to the characterization of receptor binding properties or to the rank order of potencies of certain opioids in specific bioassay systems such as the mouse vas deferens (MVD) or the GPI. Recently, we reported that the technique of selective tolerance development of opiate receptors represents a reliable tool to further investigate into the concept of multiple opiate receptors (Schulz *et al.*, 1980a, b, 1981; Wüster *et al.*, 1980a, 1981).

These studies not only verified binding data about *mu*- and *delta*-opiate receptors in the MVD (Leslie and Kosterlitz, 1979), but, in addition, revealed the presence of closely related receptors for *kappa*-agonists and dynorphin₁₋₁₃ (Wüster *et al.*, 1980b). Moreover, the results obtained led us to propose subtypes (isoreceptors) of *mu*- and *kappa*-receptors in this tissue (Schulz and Wüster, 1981).

It was the aim of the present experiments to differentiate opiate receptors in the GPI. The longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the GPI has been proposed to contain mainly *mu*-receptors (Lord *et al.*, 1977). However, recent studies

revealed the presence of not only *mu*-binding sites but also of *delta*-sites of almost identical number in the myenteric plexus (Leslie *et al.*, 1980). Furthermore, the presence of separate *kappa*-receptors has been demonstrated in the GPI (Lord *et al.*, 1977). However, Ward *et al.* (1980) reported complete crosstolerance between *kappa*-receptor agonists and *mu*-receptor agonists suggesting a lack of multiplicity. These conflicting reports prompted us to apply the technique of selective tolerance development of opiate receptors to differentiate these receptors in the GPI. This technique may be of advantage over previously used methods as it yields information concerning function of specific opiate receptors, whereas at the same time other opiate receptors are functionally eliminated (Wüster *et al.*, 1980a).

Methods

Male guinea pigs (350-400 g) were decapitated and the longitudinal muscle of the ileum, with adherent myenteric plexus, was prepared as described by Kosterlitz *et al.* (1970). Care was taken to use strips of 1.5 cm length only. A strip was mounted in a 5-ml tissue bath in Krebs-Ringer-bicarbonate solution (Schulz and Goldstein, 1972). Electrical field stimulation was applied for maximal twitch tension (60 V, 0.5 msec, 0.1 Hz). The preparations were equilibrated for 120 min by changing the bathing fluid at 10-min intervals. The drug effects on electrically evoked twitch tension were expressed as a percentage of the twitches just before addition of the drug to the bath. The concentration required to cause a 50% inhibition of twitch tension (IC₅₀) was calculated from two test concentrations of an opioid producing about

Received for publication March 12, 1981.

¹This work was supported by the Deutsche Forschungsgemeinschaft. Part of this work has been presented to the 22nd Spring Meeting of the German Pharmacological Society (Rubini, 1981).

ABBREVIATIONS: MVD, mouse vas deferens; GPI, guinea-pig ileum; FEN, fentanyl; NORM, normorphine; FK, FK 33-824 [D-Ala², MePhe⁴, Met(O)ol⁵-enkephalin]; DADL, D-Ala², D-Leu⁵-enkephalin; DSThr, Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr; EK, ethylketocyclazocine; MR 2034, 5,9-dimethyl-2'-hydroxy-2-tetrahydro-flurfuryl-6,7-benzomorphan; MRZ, (5,9-dimethyl,2'-5,9-dimethyl-2'-hydroxy-2-(methoxy-propyl)-6,7-benzomorphan.

30 and 70% inhibition, respectively, at the same preparation. Some strips were highly tolerant so that 70% inhibition of twitch tension was not established. Those preparations were excluded for IC_{50} computation.

The ileum of guinea pigs were rendered tolerant by chronic administration (6 days) of opioids dissolved in water employing osmotic minipumps (model 2001, Alza Corp., Palo Alto, CA; delivery rate $1 \mu\text{l/hr}$ for 7 days). The pumps were implanted s.c. under light ether anesthesia. An exception was made for the poorly water-soluble ethylketocyclazocine and for morphine, which were given as pellet (prepared as described by Gibson and Tingstad, 1970) and implanted s.c. A single ethylketocyclazocine pellet (100 mg) contained 20 mg of free-drug base. The guinea pigs received a single pellet each day for 4 consecutive days. The morphine pellets (each 150 mg) contained 75 mg of free base and 4 pellets were given 3 days before decapitation.

In order to prevent loss of tolerance of the strips after they were removed from the chronically treated guinea pig, the tissues were exposed *in vitro* to a defined concentration of the opioid applied *in vivo* (Schulz and Herz, 1976). It has been reported that a criterion to maintain tolerance *in vitro* at a certain level depends on the concentration of the opioid bathing the preparation (Schulz and Herz, 1976; Schulz *et al.*, 1980b). Therefore, the opioid concentrations selected corresponded to that needed to maintain an about 80-fold tolerance.

The drugs under investigation were tested in the presence of the maintenance opioid. The IC_{50} values (half maximal inhibition) served for the quantitative assessment of the development of tolerance and cross-tolerance. Absence of tolerance development to a certain opioid was defined by the quotient (Q) = 1, that is, the IC_{50} values of this drug in a preparation chronically exposed to an opioid was identical to that determined in a naive preparation. Accordingly, Q increases as the degree of tolerance increases.

For the calculation of isometric twitch tension, the preparations (mean wet weight, 31 mg) were removed from the bath, blotted and weighed. Tension was expressed in milligrams per milligram of tissue wet weight.

Statistical analysis: each quotient (Q) represents the mean \pm S.E.M. of at least three independent experiments. One experiment reflects the Q calculated from the mean IC_{50} value of each of six preparations from a naive and from a chronically treated guinea pig.

The following substances were used: FEN (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium); NORM (Bios Products, Brussels, Belgium); FK 33-824 (Sandoz, Basle, Switzerland); DADL, DSThr (Bachem, Bubendorf, Switzerland); EK (Sterling-Winthrop Research Institute, New York); MR 2034, MRZ (Dr. H. Merz, Boehringer, Mannheim, FRG) and morphine HCl (Merck, Darmstadt, FRG).

Results

The opioid concentration required to maintain tolerance *in vitro* of preparations from guinea pigs chronically treated with a narcotic drug strongly impairs or eliminates the response to electrical stimulation of naive tissues. However, as tolerance develops the twitch tension recovers.

For the present investigation, only preparations of chronically treated animals displaying an electrically evoked twitch tension in the presence of the maintenance opioid in the range to that of naive preparations (32 ± 8.2 mg/mg of wet tissue, $n = 25$) were employed. The concentrations of the opioids to maintain tolerance were selected to correspond to that required for an about 80-fold tolerance toward the drug chronically applied.

Figure 1 shows the degree of tolerance and cross-tolerance to the supposed *mu*-, *delta*- and *kappa*-receptor agonists in preparations taken from guinea pigs chronically exposed to *mu*- or *delta*-agonists. The *mu*-agonists selected were FEN, NORM and FK (Lord *et al.*, 1977; Leslie and Kosterlitz, 1979; Chang *et al.*, 1980; Wüster *et al.*, 1980a). The *delta*-agonists were DADL (Kosterlitz, 1978; Wüster *et al.*, 1980a) and DSThr (Gacel *et*

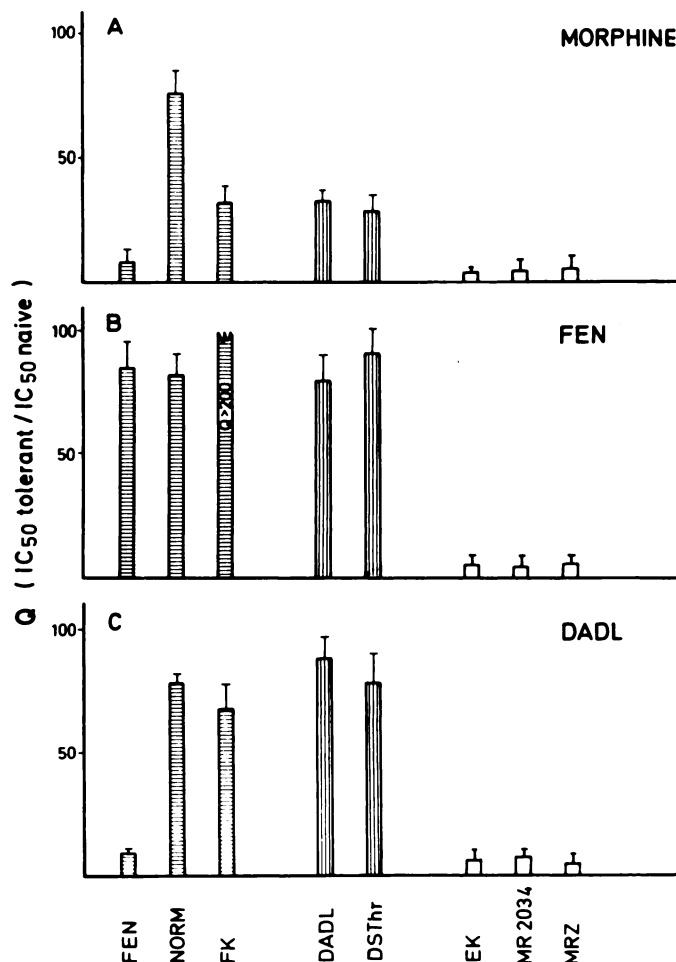


Fig. 1. Tolerance caused by morphine (panel A), FEN (panel B) and DADL (panel C), respectively, in the electrically stimulated longitudinal muscle-myenteric plexus preparation of the GPI. Columns reflect the degree of tolerance and cross-tolerance assayed for the compounds indicated at the abscissa ($Q = 1$ signifies lack of tolerance or cross-tolerance). Each column represents the mean quotient \pm S.E.M. of at least three independent experiments. Each experiment rests on data from six strips of a single guinea pig.

al., 1980), the *kappa*-agonists were EK (Hutchinson *et al.*, 1975; Martin *et al.*, 1976), MR 2034 (Merz *et al.*, 1975) and MRZ (Merz and Stockhaus, 1979).

Panel A (fig. 1) demonstrates that strips of guinea pigs chronically exposed to morphine (4 pellets, preparations set up *in vitro* at 400 nM NORM) display a high degree ($Q = 75$) of tolerance to NORM, but different Q -values were obtained for the other drugs tested. The two *mu*-agonists FEN and FK display Q -values of 8 and 32, respectively. DADL and DSThr, the *delta*-agonists, exhibited Q -values of 33 and 29, respectively. Interestingly, the cross-tolerance observed for the supposed *kappa*-agonists EK, MR 2034 and MRZ was of minor degree (4-6-fold).

The second *mu*-agonist chronically applied was FEN (panel B) ($10 \mu\text{g/hr}$, strips set up at 10 nM FEN). Under these experimental conditions, the degree of tolerance was of similar degree for FEN, NORM, DADL and DSThr, as indicated by Q -values of about 75. Interestingly, FK displayed at such preparations a Q greater than 200. Again, almost absence of cross-tolerance was observed for the *kappa*-agonists. FK, the other *mu*-agonist under investigation, was infused at a dose of $10 \mu\text{g/}$

hr and the strips were set up at 20 nM FK. The tolerance and cross-tolerance profile revealed a similar Q-value of about 80 for FK, NORM, DADL and DSThr. A similar low degree of cross-tolerance as reported for strips of animals infused with morphine or FEN was observed for FEN and the *kappa*-agonists EK, MR 2034 and MRZ (data not shown).

Panel C of figure 1 depicts data obtained with preparations from guinea pigs chronically exposed to the *delta*-agonist DADL (50 μ g/hr set up at 200 nM DADL). Tolerance (Q = 88) was seen for DADL, but similar data were obtained for DSThr, NORM and FK. A minor degree of cross-tolerance was obtained for FEN (Q = 9) and almost no cross-tolerance does exist in these preparations for the *kappa*-agonists. Chronic infusion of DSThr (50 μ g/hr, strips set up *in vitro* at 500 nM DSThr) yielded quite similar results to that of DADL-tolerant preparations (data not shown).

Figure 2 depicts tolerance and cross-tolerance data observed in preparations from guinea pigs chronically treated with different *kappa*-agonists. Panel A (fig. 2) demonstrates data of strips taken from EK-treated guinea pigs (4 pellets, set up at 10 nM EK). Whereas EK showed an 80-fold tolerance in these preparations, cross-tolerance was dramatically increased to MR 2034 (Q > 200). MRZ was still rather active in these strips

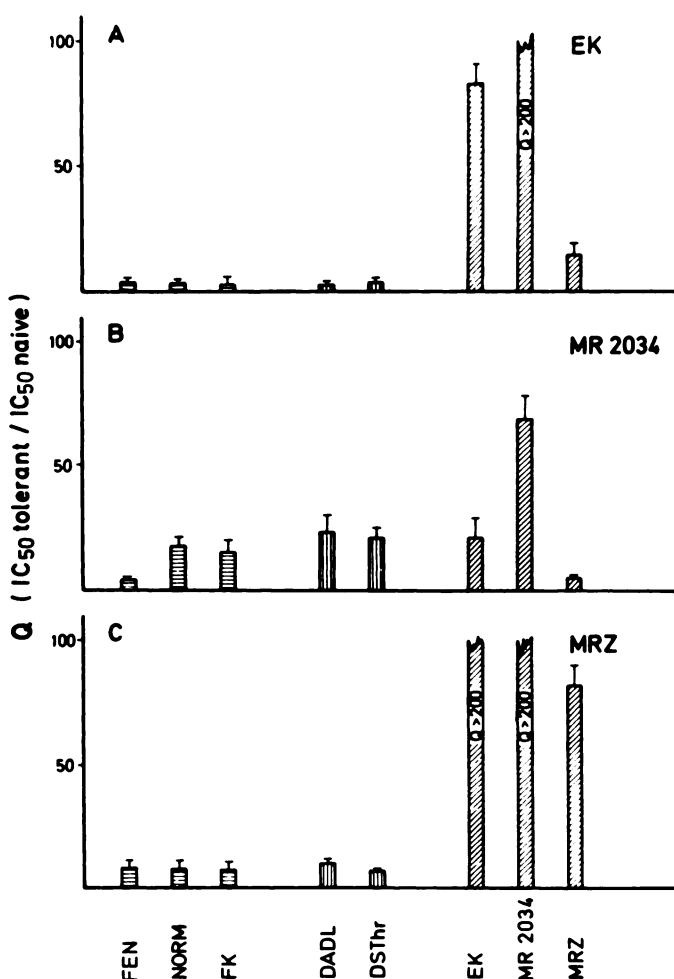


Fig. 2. Tolerance and cross-tolerance to the *kappa*-opiate receptor agonists EK, MR 2034 and MRZ, respectively. Columns indicate the degree of tolerance and cross-tolerance determined for the opioids indicated at the abscissa (Q = 1 indicates lack of tolerance or cross-tolerance). For further details see figure 1.

displaying a Q of 15. On the other hand, almost no cross-tolerance does exist for either the *mu*- or the *delta*-agonists tested.

Preparations of guinea pigs chronically treated with MR 2034 (5 μ g/hr, set up at 3 nM MR 2034) are 70-fold tolerant toward MR 2034 (fig. 2, panel B). Interestingly, EK exhibits a cross-tolerance Q of only 21 and for MRZ Q equals 5. With the exception of FEN (Q = 5), these preparations display cross-tolerance for the *mu*- and *delta*-agonists with Q-values of 20. Tests with MRZ (fig. 2, panel C; 10 μ g/hr, set up at 5 nM MRZ) showed an 80-fold tolerance to this supposed *kappa*-agonist, but revealed cross-tolerance values for EK and for MR 2034 of greater than 200. With respect to the *mu*- and *delta*-agonists tested, the Q-values were in the range of 8.

Discussion

The degree of tolerance development for specific opiates, when applied to the GPI, does not differentiate between *mu*- and *delta*-receptor agonists, however, a clear differentiation between *mu*- and *kappa*-agonists was observed. In the present study, a high degree of tolerance and cross-tolerance to *mu*- or *delta*-agonists are associated with almost no cross-tolerance to *kappa*-agonists, and this roughly holds true *vice versa* for preparations tolerant to *kappa*-agonists. Although these results seem to demonstrate the existence of the classical *mu*- and *kappa*-opiate receptors in the GPI, a detailed analysis of the data may give further insight into the issue of multiple opiate receptors.

Tests with the putative *mu*-agonists NORM, FEN and FK (Chang *et al.*, 1980; Gillan *et al.*, 1980; Wüster *et al.*, 1980a) revealed striking differences as judged by cross-tolerance data. Tolerance to NORM (80-fold) was associated with only a 30-fold cross-tolerance to FK and an almost unchanged response to FEN (Q = 8). In addition, tolerance to FK is accompanied by a similar degree of cross-tolerance to NORM, but almost completely lacks cross-tolerance to FEN. On the other hand, tolerance to FEN produces the same degree of cross-tolerance to NORM, whereas even the cross-tolerance to FK increased. One explanation of these results would suggest that FEN has access to a class of receptors not normally activated by NORM or FK. Thus, a classification of these compounds to serve as common *mu*-receptor agonists is highly questionable.

The findings obtained with the putative *delta*-agonists DADL and DSThr seem to be less difficult to interpret. They exhibit comparable cross-tolerance at all conditions tested. However, preparations tolerant to FEN or to FK displayed identical cross-tolerance to these *delta*-agonists. NORM-tolerant preparations show a less pronounced cross-tolerance to DADL and DSThr. These findings may be surprising in light of a report by Leslie *et al.* (1980) that the GPI contains separate *delta*- and *mu*-binding sites of equal amount; however, they agree with the report of Lord *et al.* (1977) claiming, predominantly the presence of *mu*-receptors in this preparation. An answer to this issue may be given by Leslie *et al.* (1980) who argued that out of *mu*- and *delta*-receptors only the *mu*-receptors possess a function as they control the activity of the longitudinal muscle. If so, tolerance attributed to *delta*-receptor would not be detected in the electrically stimulated longitudinal muscle-myenteric plexus preparation. Therefore, the high degree of cross-tolerance observed between FEN, FK, DADL and DSThr would support the notion that these drugs act *via* a common receptor, possibly a *mu*-receptor type. An action

through *delta*-receptors is less likely due to the relatively low potency of DADL and DSThr in this preparation (Gacel *et al.*, 1980).

The findings obtained with the putative *kappa*-agonist strengthens the notion of separate *kappa*-receptors in the GPI, a suggestion already advanced by Hutchinson *et al.* (1975). These data, however, do not agree with a report of complete cross-tolerance between EK and morphine (Ward *et al.*, 1980). On the other hand, the heterogeneous cross-tolerance profile of the different *kappa*-agonist tested resembled in principle that found for the putative *mu*-agonists. There was at no time complete cross-tolerance between EK, MR 2034 and MRZ, challenging the notion of a uniform *kappa*-receptor type in the GPI. The data rather suggest distinct differences within the *kappa*-receptor population. The results may even favor separate MRZ-receptors, although MRZ activates receptors for EK and MR 2034.

Thus, the present studies strongly suggest the presence of *mu*- and *kappa*-opiate receptors in the GPI. However, neither the *mu*- nor the *kappa*-receptors appear to represent a uniform population. Apparently, the GPI contains receptors for FEN which are different from those for NORM. This parallels analogous experiments conducted with *mu*-agonists (*e.g.*, sufentanyl) in the MVD (Schulz and Wüster, 1981).

Finally, the present data as well as the findings published elsewhere (Schulz and Wüster, 1981; Wüster *et al.*, 1981) reveal considerable differences with respect to the selectivity of opioids, *e.g.* *mu*-agonists. Whereas in the MVD highly tolerant *delta*-receptors (1000-fold) and *mu*-receptors of normal sensitivity exist (Schulz *et al.*, 1980a), the maximal degree of selective tolerance for *mu*-receptors in the brain was only 15-fold as compared to *delta*-receptors (Schulz *et al.*, 1981). Apparently, the data for the GPI range between the MVD and the brain.

However, these findings raise the question of heterogeneity of *mu*-receptors between the different tissues tested.

Acknowledgments

We wish to thank Ms. C. Hager for technical assistance and Dr. G. T. Shearman for stylistic correction of the text. We also wish to thank Dr. H. Merz for providing the κ -agonists MRZ and MR 2034.

References

- CHANG, K. J. AND CUATRECASAS, P.: Multiple opiate receptors. *J. Biol. Chem.* **254**: 2610-2618, 1979.
- CHANG, K. J., HAZUM, E. AND CUATRECASAS, P.: Multiple opiate receptors. *Trends Neurosci.* **3**: 160-161, 1980.
- GACEL, G., FOURNIE-ZALUSKI, M.-C. AND ROQUES, P.: Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr, a highly preferential ligand for δ -opiate receptors. *FEBS Lett.* **118**: 245-247, 1980.
- GIBSON, R. D. AND TINGSTAD, J. E.: Formulation of a morphine implantation pellet suitable for tolerance-physical dependence studies in mice. *J. Pharm. Sci.* **59**: 426-427, 1970.
- GILLAN, M. G. C., KOSTERLITZ, H. W. AND PATERSON, S. J.: Comparison of the binding characteristics of tritiated opiates and opioid peptides. *Br. J. Pharmacol.* **70**: 481-490, 1980.
- HUGHES, J.: Peripheral opiate receptor mechanisms. *Trends Pharmacol. Sci.* **2**: 21-24, 1981.
- HUTCHINSON, M., KOSTERLITZ, H. W., LESLIE, F. M. AND WATERFIELD, A. A.: Assessment in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphan which have strong antinociceptive activity but do not substitute for morphine in the dependent monkey. *Br. J. Pharmacol.* **55**: 541-546, 1975.
- KOSTERLITZ, H. W.: Multiple opiate receptors. Abstract of 7th International Congress of Pharmacology, Paris, 1978.
- KOSTERLITZ, H. W., LYDON, R. J. AND WATT, A. J.: The effects of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory alpha- and beta-adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* **39**: 398-413, 1970.
- LESLIE, F. M., CHAVKIN, C. AND COX, B. M.: Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: Evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **214**: 395-402, 1980.
- LESLIE, F. M. AND KOSTERLITZ, H. W.: Comparison of binding of [³H]-methionine-enkephalin, [³H]-naltrexone and [³H]-dihydromorphine in the mouse vas deferens and the myenteric plexus and brain of the guinea pig. *Eur. J. Pharmacol.* **56**: 379-383, 1979.
- LORD, J. A. H., WATERFIELD, A. A., HUGHES, J. AND KOSTERLITZ, H. W.: Endogenous opioid peptides: Multiple agonists and receptors. *Nature (Lond.)* **267**: 495-499, 1977.
- MARTIN, W. R., EADES, C. G., THOMPSON, J. A., HUPPLER, R. E. AND GILBERT, P. E.: The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **197**: 517-532, 1976.
- MERZ, H. AND STOCKHAUS, K.: N-[(Tetrahydrofurfuryl)alkyl] and N-(alkoxyalkyl)derivatives of (-)-normetazocine, compounds with differentiated opioid action profiles. *J. Med. Chem.* **22**: 1475-1483, 1979.
- MERZ, H., STOCKHAUS, K. AND WICK, H.: Stereoisomeric 5,9-dimethyl-2'-hydroxy-2-tetrahydrofurfuryl-6,7-benzomorphan, strong analgesics with non-morphine-like action profile. *J. Med. Chem.* **18**: 996-1000, 1975.
- RUBINI, P.: Tolerance and cross-tolerance to multiple opiate agonists in the guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **316**: (suppl.) R62, 1981.
- SCHULZ, R. AND GOLDSTEIN, A.: Inactivity of narcotic glucuronides as analgesics and on guinea-pig ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **183**: 404-410, 1972.
- SCHULZ, R. AND HERZ, A.: Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea pig. *Life Sci.* **19**: 1117-1128, 1976.
- SCHULZ, R. AND WÜSTER, M.: Are there subtypes (isoreceptors) of multiple opiate receptors in the mouse vas deferens? *Eur. J. Pharmacol.*, in press, 1981.
- SCHULZ, R., WÜSTER, M. AND HERZ, A.: Differentiation of opiate receptors in the brain by the selective development of tolerance. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **14**: 75-79, 1981.
- SCHULZ, R., WÜSTER, M., KRENSS, H. AND HERZ, A.: Selective development of tolerance without dependence in multiple opiate receptors of mouse vas deferens. *Nature (Lond.)* **285**: 242-243, 1980a.
- SCHULZ, R., WÜSTER, M., KRENSS, H. AND HERZ, A.: Lack of cross-tolerance on multiple opiate receptors in the mouse vas deferens. *Mol. Pharmacol.* **18**: 395-401, 1980b.
- SNYDER, S. H. AND GOODMAN, R.: Multiple neurotransmitter receptors. *J. Neurochem.* **35**: 5-15, 1980.
- WARD, S. J., COLIN, F. C., METCALF, G. AND REES, J. M. H.: Tolerance, cross-tolerance and dependence to μ and κ agonists in vivo and in vitro. In *Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists*, ed. by E. L. Way, pp. 103-106, Pergamon Press, New York, 1980.
- WÜSTER, M., SCHULZ, R. AND HERZ, A.: The direction of opioid agonists towards μ -, δ - and ϵ -receptors in the vas deferens of the mouse and the rat. *Life Sci.* **27**: 163-170, 1980a.
- WÜSTER, M., SCHULZ, R. AND HERZ, A.: Highly specific opiate receptors for dynorphin-(1-13) in the mouse vas deferens. *Eur. J. Pharmacol.* **62**: 235-236, 1980b.
- WÜSTER, M., SCHULZ, R. AND HERZ, A.: Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. *Biochem. Pharmacol.* **30**: 1883-1887, 1981.

Send reprint requests to: R. Schulz, Department of Neuropharmacology, Max-Planck-Institut für Psychiatrie Kraepelinstrasse 2, D-8000 München 40, Federal Republic of Germany.

THE PREFERENCE OF PUTATIVE PRO-ENKEPHALINS
FOR DIFFERENT TYPES OF OPIATE RECEPTORS

Michael Wüster, Patrizia Rubini and Rüdiger Schulz

Department of Neuropharmacology
Max-Planck-Institut für Psychiatrie
Kraepelinstrasse 2, D-8000 München 40
Federal Republic of Germany

(Received in final form July 10, 1981)

Summary

Certain endogenous opioid peptides, which structurally resemble potential enkephalin precursors (pro-enkephalins), were tested for their interaction with μ -, δ - and κ -type of opiate receptors. These studies employed the technique of the development of tolerance towards selective opioid agonists on the isolated guinea-pig ileum and mouse vas deferens preparations. Additionally, binding studies in rat brain homogenate were performed to determine the affinity of these compounds towards different receptor sites in the CNS. These investigations revealed that dynorphin₁₋₁₃ and α -neo-endorphin₁₋₈ may preferentially interact with the κ -type of opiate receptors, dynorphin₁₋₉ exhibits both δ - and κ -agonistic activity and met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ is a ligand with selectivity for δ -receptors.

The discovery of enkephalins was followed by an intensive search for their precursor molecules. Following the detection of α -neo-endorphin (1), dynorphin₁₋₁₃ (DYN₁₋₁₃) (2) or met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ (3), a considerable number of further opioid peptides have recently been described to be present in brain, pituitary, and adrenal medulla, which also contain the amino acid sequence of either met- or leu-enkephalin (4-7). Interestingly, the individual peptides displayed considerable differences in potency on either the guinea-pig isolated ileum (GPI), which has been suggested to be a μ -opiate receptor preparation (8), or on the mouse vas deferens (MVD), a proposed δ -receptor preparation (8).

The assumption of a particular physiological role for each of these peptides led to speculation regarding the receptor selectivity of these pro-enkephalins. It has already been suggested that met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ exhibits δ -opiate receptor preference (9) and that DYN₁₋₁₃ possesses μ -receptor activity (10). However, this contention has been questioned by data claiming a κ -receptor preference both for met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ (11) as well as for DYN₁₋₁₃ (12). Despite these conflicting data, it has previously been shown that the C-terminal sequence of opioid peptides is the critical determinant of receptor preference (13,14). Thus, an investigation into the opiate receptor selectivity of

presently available pro-enkephalins appears desirable.

In order to address this issue, we employed the technique, the development of tolerance of selective opiate receptors (15-17). The principle of this approach rests on the notion that opioids exhibiting complete cross-tolerance must bring about their action via identical receptors. On the other hand, opioids exhibiting no cross-tolerance should manifest their action at different receptors. Employing this approach, it has been demonstrated that at least μ -, δ - and κ -opiate receptors are involved in the control of twitch tension of the electrically stimulated MVD (17), and μ - and κ -receptors control the GPI (33). In addition, these studies have hinted at the possible existence of subtypes for certain opiate receptors (17). The second method employed for the estimation of the receptor preferences of pro-enkephalins is the commonly used radioreceptor assay employing brain homogenates.

Methods

The preparation and set-up of the GPI and MVD followed essentially the methods described elsewhere (18-20). Preparations were equilibrated for 60 min by changing the bathing fluid at 5 min intervals. Drug concentration required for half-maximal inhibition of electrically induced twitch tension (IC_{50} -values) were determined from at least two test doses of an opioid, one giving more and one less than 50% at the same preparation.

The preparations were rendered tolerant by the chronic treatment of guinea pigs and mice with specific agonists. For maintenance of tolerance of the tissue in vitro, the preparations were incubated in the organ bath with the opioid applied in vivo. The drug concentration selected corresponded to that required to maintain a certain degree of tolerance (100-200 fold) in vitro. The opioids were administered for 6 days by means of osmotic minipumps (Alza Mod. 2001, delivery rate 1 μ l/h) implanted subcutaneously under light ether anaesthesia. Exceptions were made for ethylketocyclazocine (EK) and for morphine, which had to be applied by the pellet implantation technique (19), since the maximal rate of drug delivery by the minipumps would not be sufficient to obtain a high degree of tolerance. Mice and guinea pigs received a single EK pellet (25 mg free base) daily for 6 consecutive days, whereas the morphine pellets, which were given to guinea pigs, contained 75 mg of free base, and 4 pellets were implanted 3 days before killing.

The chronic treatment of guinea pigs and the set-up conditions of the corresponding strips were as follows: morphine (4 pellets) strips set-up at 400 nM normorphine (NORM); fentanyl (FEN, delivery rate 10 μ g/h), strips set-up at 10 nM FEN; D-Ala², D-Leu⁵-enkephalin, (DADL, 50 μ g/h), strips set-up at 200 nM DADL; ethylketocyclazocine (EK, 6 pellets), strips set-up 10 nM EK; MR 2034 (5 μ g/h), strips set-up at 3 nM MR 2034; MRZ 2549 (10 μ g/h), strips set-up at 5 nM MRZ 2549. The treatment of mice and the set-up conditions of the vasa deferentia were as follows: sufentanyl (SUF) (2 μ g/h), preparations set-up at 2 nM SUF; DADL (5 μ g/h), preparations set-up in the presence of 5 nM DADL, SUF (2 μ g/h) simultaneously with DADL (5 μ g/h), preparations set-up in the presence of 2 nM SUF and 5 nM DADL; EK (6 pellets) preparations set-

Table 1

The effect of K^+ -ions on the potency of opioids on the electrically stimulated mouse vas deferens.

Compound	IC ₅₀ -values (nM) ^a		
	5.7 mM K ⁺	15.2 mM K ⁺	15.2 K ⁺ /5.7K ⁺ ^Q
D-Ala ² , D-Leu ⁵ -enkephalin	0.4 ± 0.05	0.9 ± 0.08	2.3
dynorphin ₁₋₉	23.6 ± 3.1	47.2 ± 5.0	2.0
met-enkephalin-Arg ⁶ -Phe ⁷	15.4 ± 1.8	58.4 ± 6.1	3.8
dynorphin ₁₋₁₃	3.6 ± 0.8	19.4 ± 1.9	5.4
α-neo-endorphin ₁₋₈	107 ± 12	550 ± 62.0	5.1
MR 2034	5.3 ± 0.9	31.8 ± 2.9	6.0

^a Each value reflects the mean ± SEM of at least 6 determinations.

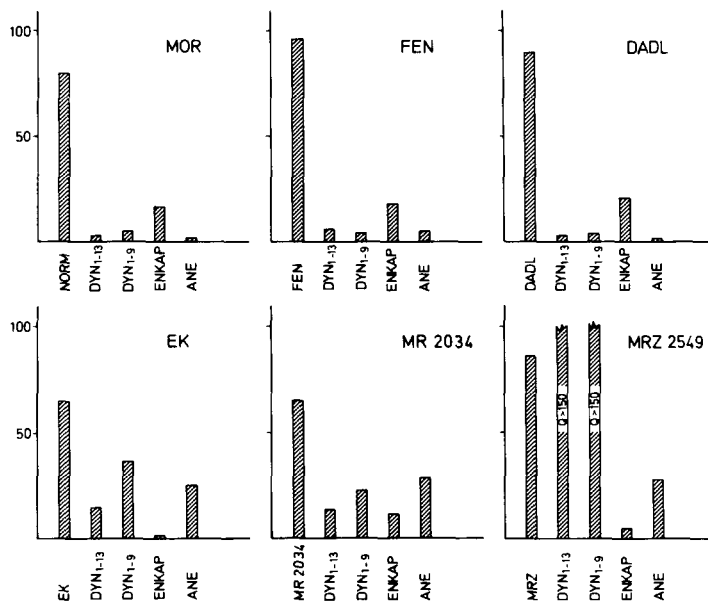


FIG. 1

Tolerance and cross-tolerance of opioids on the GPI. The degree of tolerance, measured by calculating the quotient (Q) of the IC₅₀ values of tolerant and naive preparations, is plotted on the ordinate. Q = 1 indicates lack of tolerance. The drug chronically infused is indicated in each panel. Abscissa: opioids tested for tolerance and cross-tolerance. The abbreviations are: DYN (dynorphin); ENKAP (met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷); ANE (α-neo-endorphin). Each column represents the quotient of mean IC₅₀-values, each value consists of at least 6 determinations. The standard error of the mean values did not exceed 16%.

up at 150 nM; MR 2034 30 µg/h, set-up at 60 nM MR 2034; MRZ 2549 (15 µg/h), set-up at 10 nM MRZ 2549.

IC₅₀-values of opioids were estimated in the presence of the maintenance drug. For the estimation of cross-tolerance, the quotient of IC₅₀-values obtained on the tolerant vs. naive preparations was calculated. Accordingly, a quotient (Q) of 1 would indicate absence of cross-tolerance, with Q increasing with a raising degree of cross-tolerance. The differential effects of potassium on the potency of opioids in the MVD were tested according to the method described by Wüster and Schulz (21).

Binding studies in rat brain homogenates were performed employing the rapid filtration technique through Whatman glasfibre filters (GF/B) according to Pert and Snyder (22). The separate estimation of µ-, δ- and κ-receptor affinities of the opioids followed essentially a method recently described by Chang et al., (23). ³H-sufentanyl (³H-SUF, 0.25 nM final concentration) was used to measure binding to µ-receptors, ³H-D-Ala², D-Leu⁵-enkephalin (1 nM) for δ- and ³H-diprenorphine (³H-DIPR, 0.5 nM) for κ-receptors. These latter experiments involve the addition of morphiceptin (β-casomorphin₁₋₄ amide, 10⁻⁵M) and DADL (10⁻⁷M) added in order to saturate the µ- and δ-sites which are simultaneously labelled by ³H-DIPR, as has been detailed elsewhere (23). The samples were incubated at 0°C for 90 min., employing Tris HCL buffer.

Drugs used: Dynorphin₁₋₁₃, met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷, D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin, morphiceptin (Bachem, Basel, Switzerland), Dynorphin₁₋₉, α-neo-endorphin₁₋₈ (Peninsula Lab., San Carlos, USA), ethylketocyclazocine (Sterling-Winthrop Res. Institute, Rensselaer, USA), MR 2034 (5,9 dimethyl-2-hydroxy-2-tetrahydrofurfuryl-6, 7-benzomorphan), MRZ 2549 (5,9-dimethyl, 2'-l-hydroxy-2-(2-methoxypropyl)-6, 7-benzomorphan) (supplied by Dr. H. Merz, Boehringer, Ingelheim, FRG), fentanyl, sufentanyl (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium), morphine (Merck AG., Darmstadt, FRG), normorphine (Bios Products, Brussels, Belgium), ³H-D-Ala²-D-Leu⁵-enkephalin (73 Ci/mmoles), ³H-diprenorphine (10.6 Ci/mmoles) (Amersham Buchler, Braunschweig, FRG), ³H-sufentanyl (19 Ci/mmoles) (Janssen Pharmaceutica, Beerse, Belgium).

Results

The opioid peptides investigated displayed a particular inhibitory activity on the GPI (IC₅₀-values + SEM (nM): DYN₁₋₁₃: 2.2 + 0.3; DYN₁₋₉: 68 + 8.1; met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷: 548 + 77; α-neo-endorphin 132 + 12.1) and the MVD (see Table 1, 5.7 mM K⁺). These potencies, however, were differently impaired on preparations rendered tolerant towards specific agonists. Figure 1 demonstrates tolerance and cross-tolerance to pro-enkephalins on preparations of guinea pigs made tolerant to µ-, δ- or κ-agonists. The µ-agonists were FEN and morphine (8,24,25), the δ-agonist was DADL (26), and the κ-agonists were EK (27,28), MR 2034 (29), and MRZ 2549 (30)

As shown in the upper panel, preparations with a high degree of tolerance towards NORM, FEN or DADL displayed negligible degrees of cross-tolerance towards DYN₁₋₁₃, DYN₁₋₉ and α-neo-endorphin (ANE). A considerable amount of cross-tolerance (Q = 20) was observed for met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ (ENKAP).

In the lower panel of Figure 1, the tolerance and cross-tolerance of strips tolerant for the κ -agonist EK, MR 2034 and MRZ 2549, respectively, are displayed. EK-tolerant preparations ($Q = 65$) exhibited a certain degree of cross-tolerance for DYN_{1-13} ($Q = 15$), which was even increased for DYN_{1-9} and α -neo-endorphin. The response of met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ was, however, similar to that of naive preparations. MRZ 2549 tolerant tissues displayed even higher degrees of cross-tolerance ($Q > 150$) towards DYN_{1-13} and DYN_{1-9} than MRZ 2549 itself. Again, moderate cross-tolerance was observed for α -neo-endorphin, while met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ almost lacked cross-tolerance.

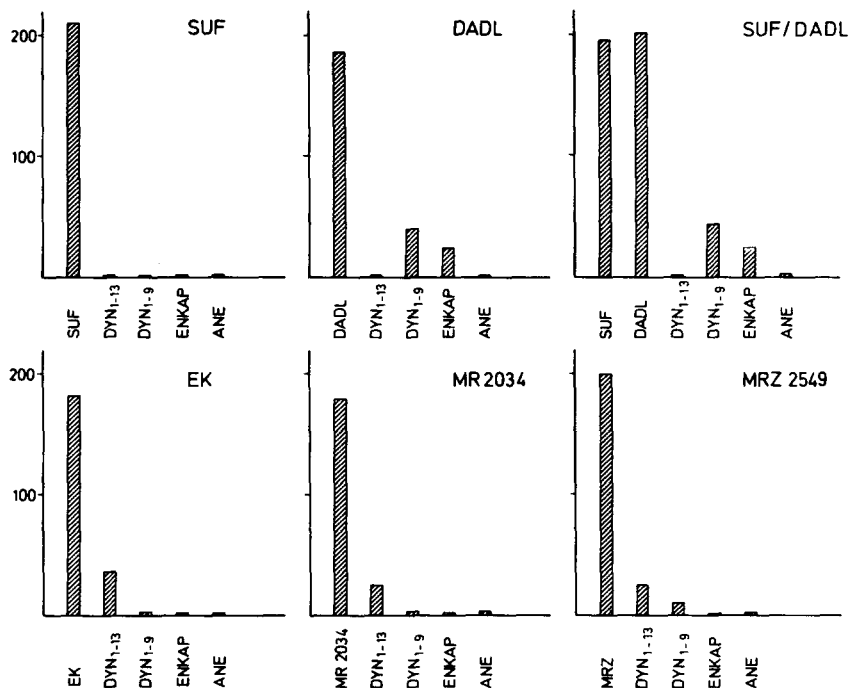


FIG. 2

Tolerance and cross-tolerance on the MVD. (For further explanation, see Figure 1).

Figure 2 demonstrates tolerance and cross-tolerance on the MVD. The upper panel demonstrates that tolerance to SUF is not associated with cross-tolerance to any pro-enkephalin. Tolerance to DADL is accompanied by cross-tolerance to DYN_{1-9} ($Q = 40$) and met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ ($Q = 22$), while DYN_{1-13} and α -neo-endorphin are not impaired in their potency. Preparations simultaneously infused with SUF and DADL still displayed the same degree of cross-tolerance for DYN_{1-9} and met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷.

The lower panel of Figure 2 depicts data obtained on MVD chronically treated with the different κ -agonist. The observations are very similar whatever κ -agonist was employed: DYN_{1-13} displayed some degree of cross-tolerance whereas the potency of the other peptides tested was very similar to that in naive preparations.

The effect of K^+ -ions on the potency of opioids is given in Table 1. A comparison of the IC_{50} -values at 5.7 mM K^+ (normal Krebs-Ringer solution) and increased K^+ concentration (15.2 mM) reveals a moderate loss for the δ -agonist DADL, and severe impairment for DYN_{1-13} , α -neo-endorphin and MR 2034. The loss in potencies of the other compounds tested was comparable to DADL.

Data from radioreceptorassay are given in Table 2, displaying separately the receptor affinities (K_d -values) of the opioids for μ -, δ - and κ -receptor sites. Among the compounds tested, DYN_{1-13} showed the highest affinity for κ -sites, whereas no binding could be found for these sites for met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ up to 10^{-6} M. Both DYN_{1-9} and α -neo-endorphin had moderate affinities for κ -sites, while DYN_{1-9} displayed higher affinities to μ - and δ -sites.

Table 2

ligand	K_i - values (nM) ^a		
	³ H-SUF	³ H-DADL	³ H-DIPR ^b
DYN_{1-13}	85	49	12.5
DYN_{1-9}	55	3.7	57
met-enkephalin-Arg ⁶ -Phe ⁷	9.5	4.2	> 1000
α -neo-endorphin	92	> 300	80

^a Apparent K_i -values were calculated from IC_{50} -values of displacement curves. Data are mean from 3 experiments performed in triplicate with SEM being less than 30%.

^b The binding assay of ³H-diprenorphine was performed in the presence of morphiceptin (10^{-5} M) and DADL (10^{-7}) as described elsewhere (23).

Discussion

The present studies emphasize the interaction of a number of putative pro-enkephalins (34) with multiple opiate receptors, in particular with those in the GPI and the MVD. The use of the technique of development of tolerance to selective opiate receptors has revealed some similarities for the GPI and the MVD with respect to tolerance and cross-tolerance data; however, some inconsistencies are apparent. Results from the GPI reveal a considerable degree of cross-tolerance between κ -receptor agonists and DYN_{1-13} , DYN_{1-9} and α -neo-endorphin. Interestingly, DYN_{1-13} and DYN_{1-9} display greater cross-tolerance on MRZ-tolerant preparations than on EK- or MR 2034-tolerant tissues. In contrast, met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ only displays cross-tolerance to μ - or δ -agonists.

This finding is at variance to results derived from MVD where DYN_{1-13} displayed an about equal cross-tolerance in each of the preparations rendered tolerant to any of the κ -agonists. α -Neo-endorphin apparently does not at all cross-react under the experimental conditions employed here. The reason underlying these apparently discrepant data on the GPI and MVD may be explained by the existence of different sub-populations of opiate receptors (iso-receptors) for κ -agonists in these tissues, a notion which has

Table 3

compound	amino acid sequence	receptor preference		
		MVD	GPI	rat brain
DYN ₁₋₁₃	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys	κ	κ	κ
DYN ₁₋₉	Tyr-Gly-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Arg-Ile-Arg	δ	κ	δ
α-neo-endorphin ₁₋₈	Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-Arg-Lys-Arg	??	κ	κ
met-enkephalin-Arg ⁶ -Phe ⁷	Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-Arg-Phe	δ	μ	δ

recently been advanced (17). Accordingly, the chronic treatment with the κ-agonists employed here did not affect the opiate receptors in the MVD with which α-neo-endorphin interacts. This is in contrast to the GPI and thus may suggest the κ-receptors in both tissues are not identical.

Selective development of tolerance in MVD to either the μ-agonist SUF or the δ-agonist DADL reveals for met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ pronounced δ-receptor preference as indicated in the MVD. The remarkably stronger cross-reactivity in preparations simultaneously treated with high doses of SUF and DADL according to (31) abolishes the total opiate activity of met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ (data not shown) and indicates that this compound may interact alternatively with either μ- and δ-receptors, a characteristic which has already been proposed for β-endorphin (31).

A proposal for the interactions between the opioid peptides under investigation and specific opiate receptors in the tissues employed is outlined in Table 3. Apparently, DYN₁₋₁₃ displays κ-receptor activity in both preparations. DYN₁₋₉, however, exhibits δ-activity in the MVD, but interacts with κ-receptors in the GPI. α-Neo-endorphin does interact with receptors in the MVD which are not covered by any of the tolerance-inducing opioids employed whereas it binds to the κ-receptors in the GPI as indicated by cross-tolerance to κ-agonists in this tissue. Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ exhibits cross-tolerance with either μ- or δ-agonists in both preparations, there are no indications for a κ-agonistic activity of this peptide as has been claimed by Audigier et al. (11). This notion is supported by measuring the K⁺-shifts of the opioids on MVD (21). High K⁺-quotients which might be indicative of κ-receptor preference are shown by DYN₁₋₁₃ as well as α-neo-endorphin, but neither by DYN₁₋₉ nor met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷.

These results from peripheral tissue preparations are comparable with data obtained from binding studies in rat brain homogenate. Separate testing for μ-, δ- and κ-receptor affinities reveals a preferential displacement of DYN₁₋₁₃ and α-neo-endorphin on κ-sites whereas DYN₁₋₉ and met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ displays maximal binding to δ-receptors.

Summarizing these data, it appears that among the compounds

tested, DYN₁₋₁₃ represents in different tissues an opioid peptide with certain selectivity for the κ -type of opiate receptors; a characteristic which is to a lesser extent true for α -neo-endorphin. Shortening the DYN-sequence to DYN₁₋₉ results in a substantial increase in δ -receptor activity, although some κ -activity is still displayed as is evident in preparations such as the GPI which does not contain functional δ -receptors (33). Met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ on the other hand, failed to show any affinity towards κ -receptor sites in peripheral tissues and in brain homogenate; instead appeared as agonist with δ -receptor preference if such receptors are available.

The present data might help to understand the differing results obtained when estimating the receptor selectivity of opioids. Employing the phenomenon of different naloxone potencies in antagonizing μ - and κ -agonistic effects on the GPI (K_e -values), Audigier et al. (11) have suggested met-enkephalin-Arg⁶-Phe⁷ to be an endogenous κ -agonist. On the other hand, comparing potencies on GPI and MVD, this compound has formerly been characterized as δ -agonist (9), which is in line with the present data. Similarly, an interpretation of GPI/MVD quotients according to Kosterlitz et al. (32), and data from radioreceptorassay, have led Chang et al. (10) to postulate μ -selectivity for DYN₁₋₁₃.

Thus, conclusions drawn from K_e -values of naloxone or from GPI/MVD quotients may provide misleading informations concerning the direction of opioids towards particular types of opiate receptors. As is demonstrated in the present investigation, however, agonists may exhibit apparent differences in their receptor selectivity when tested in various bioassays, due to the differing heterogeneity of receptor populations in these tissues. For example, if no specific receptor is present for a certain opioid, the compound manifests its action on receptor available, as has been shown for the δ -agonist DADL in the GPI (33).

Note added in proof: The present study employed α -neo-endorphin₁₋₈ as communicated in ref. 1. The correct amino acid sequence of α -neo-endorphin₁₋₁₀ was reported recently (Kangawa et al., Biochem. biophys. Res. Commun. 99, 871-878, 1981).

Acknowledgements

This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft. We wish to thank Ms. C. Hager for expert technical assistance and Mr. M.J. Millan for stylistic correction of the text.

References

1. K. KANGAWA, H. MATSUO, and M. ISARASHI, Biochem. biophys. Res. Commun. 86, 153-160 (1979).
2. A. GOLDSTEIN, S. TACHIBANA, L.I. LOWNY, M. HUNKAPILLER and L. HOOD, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76, 6666-6670 (1979).
3. R.V. LEWIS, A.S. STERN, J. ROSSIER, S. STEIN, and S. UDEN-FRIEND, Biochem. biophys. Res. Commun. 89, 822-829 (1979).
4. W.-Y. HUANG, R.C.C. CHANG, A.J. KASTIN, D. COY and A.V. SCHALLY, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 76, 6177-6180 (1979).
5. S. KIMURA, R.V. LEWIS, A.S. STERN, J. ROSSIER, S. STEIN and S. UDENFRIEND, Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 77, 1681-1685 (1980).

6. N. MINAMINO, K. KANGAWA, A. FUKUDA, H. MATSUO and M. IAGARASHI, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 95, 1475-1481 (1980).
7. K. MIZUNO, N. MINAMINO, K. KANGAWA and H. MATSUO, *Biochem. biophys. Res. Commun.* 95, 1482-1488 (1980).
8. J.A.H. LORD, A.A. WATERFIELD, J. HUGHES and H.W. KOSTERLITZ, *Nature (Lond.)* 267, 495-499 (1977).
9. J. ROSSIER, Y. AUDIGIER, N. LING, J. CROS and S. UDENFRIEND, *Nature (Lond.)* 288, 88-90 (1980).
10. K.-J. CHANG, E. HAZUM and P. CUATRECASAS, *Trends in Neurosciences* 3, 160-162 (1980).
11. Y. AUDIGIER, H. MAZARGUIL, J. ROSSIER and J. CROS, *Europ. J. Pharmacol.* 68, 237-238 (1980).
12. M. WÜSTER, R. SCHULZ and A. HERZ, *Neurosci. Lett.* 20, 79-83 (1980).
13. D.G. SMYTH, Endogenous and Exogenous Opiate Agonists and Antagonists, ed. E.L. Way, pp. 1-4, Pergamon Press, New York (1980).
14. R. SCHULZ, M. WÜSTER and A. HERZ, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 216, 604-606 (1981).
15. R. SCHULZ, M. WÜSTER, H. KRENSS and A. HERZ, *Nature (Lond.)* 285, 242-243 (1980).
16. R. SCHULZ, M. WÜSTER, H. KRENSS and A. HERZ, *Mol. Pharm.* 18, 395-401 (1980).
17. M. WÜSTER, R. SCHULZ and A. HERZ, *Biochem. Pharmacol.*, in press (1981).
18. H.W. KOSTERLITZ, R.J. LYDON and A.J. WATT, *Brit. J. Pharmacol.* 39, 398-413 (1970).
19. R. SCHULZ and A. GOLDSTEIN, *Nature (Lond.)* 214, 168-170 (1973).
20. J. HUGHES, H.W. KOSTERLITZ and F.M. LESLIE, *Brit. J. Pharmacol.* 53, 371-381 (1975).
21. M. WÜSTER and R. SCHULZ, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 315, 181-184 (1980).
22. C.B. PERT and S.H. SNYDER, *Science (Wash.)* 179, 1011-1014 (1973).
23. K.-J. CHANG, E. HAZUM and P. CUATRECASAS, *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* in press.
24. H.W. KOSTERLITZ and F.M. LESLIE, *Brit. J. Pharmacol.* 64, 607-614 (1978).
25. K.-J. CHANG and P. CUATRECASAS, *J. Biol. Chem.* 254, 2610-2618 (1979).
26. H.W. KOSTERLITZ, 7th intern. Congress of Pharmacology, Paris 2 (1978).
27. W.R. MARTIN, C.G. EADES, J.A. THOMPSON, R.E. HUPPLER and P.E. GILBERT, *J. Pharmacol. exp. Ther.* 197, 517-532 (1976).
28. M. HUTCHINSON, H.W. KOSTERLITZ, F.M. LESLIE, A.A. WATERFIELD and L. TERENIUS, *Brit. J. Pharmacol.* 55, 541-546 (1975).
29. H. MERZ, K. STOCKHAUS and H. WICK, *J. Med. Chem.* 18, 996-1000 (1975).
30. H. MERZ and K. STOCKHAUS, *J. Med. Chem.* 22, 1475-1483 (1979).
31. M. WÜSTER, R. SCHULZ and A. HERZ, *Life Sci.* 27, 163-170 (1980).
32. H.W. KOSTERLITZ, J.A.H. LORD, S.J. PATERSON and A.A. WATERFIELD, *Brit. J. Pharmacol.* 68, 333-342 (1980).
33. R. SCHULZ, M. WÜSTER, P. RUBINI and A. HERZ, *J. Pharmacol. exp. Ther.* in press (1981).
34. J. ROSSIER, *Trends in Neuroscience* 4, 94-97 (1981).

Opiate Receptor Binding Studies in the Mouse *Vas Deferens* Exhibiting Tolerance Without Dependence

Patrizia Rubini, Rüdiger Schulz, Michael Wüster, and Albert Herz

Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Department of Neuropharmacology, Kraepelinstrasse 2, D-8000 München 40, Federal Republic of Germany

Summary. The apparent lack of dependence in highly opiate-tolerant isolated mouse *vas deferens* may conflict with unitary theories postulating a common biochemical mechanism for both phenomena. Therefore, attention focused on binding sites of the opiate receptors which in this tissue are located presynaptically. Binding studies conducted with homogenate of highly tolerant *vasa deferentia* revealed no significant different results as compared to naive tissues. Further studies examined the effect of guanine nucleotide on opiate receptor interaction. Apparently, μ -, δ - and κ -opiate receptors in the mouse *vas deferens* proved resistant to the regulatory action of guanine nucleotide in naive and tolerant tissues. From these experiments, it is concluded that the binding characteristics of opiate receptors in the mouse *vas deferens* do not change with chronic activation. In addition, the lack of an effect of guanine nucleotide on opiate binding leads to the suggestion that binding sites are not coupled to adenylate cyclase in this tissue. Taken together, these findings draw the attention to the coupling mechanism of opiate receptors in the mouse *vas deferens* which may play a key role in the adaptational mechanisms following chronic opiate exposure.

Key words: Mouse *vas deferens* – Opiate tolerance/dependence – Multiple opiate receptor – Guanine nucleotide

Introduction

Isolated *vasa deferentia* of mice chronically exposed to a specific type of opioid may exhibit an extremely high degree of tolerance (Schulz et al. 1980a, b; Wüster et al. 1981a, b), as is indicated by a decreased ability of an opioid to reduce the evoked release of excitatory neurotransmitter at the neuro-muscular junction. Furthermore, selective tolerance has been demonstrated, i.e., there may be tolerance with respect to one type of agent, e.g., a μ -receptor agonist, without there being signs of tolerance to another type of agent, e.g. a δ - or κ -receptor agonist, depending on which type of agent was used to establish the initial tolerance (Schulz et al. 1980a; Wüster et al. 1981a, b). Interestingly, such highly tolerant mouse *vas deferens* (MVD) preparations failed to display any sign of dependence, as judged by their inability to release abnormally high amounts of excitatory neurotransmitter upon challenge with the narcotic antagonist

naloxone (Gillan et al. 1979; Schulz et al. 1980b, c). In addition, even the data reported by North and Vitek (1980) can hardly be interpreted as a sign of withdrawal.

This apparent dissociation of tolerance and dependence contrasts with data obtained from experiments on whole animals, the isolated guinea-pig ileum (GPI) or cultured neuroblastoma glioma hybrid cells, documenting the expression of both tolerance and dependence during the state of opiate tolerance (Herz 1978; Schulz 1978; Hamprecht 1978). Thus, the finding obtained with the MVD is difficult to reconcile with the notion that tolerance and dependence reflect a common mechanism developing beyond the binding site level at neurons sensitive to opioids (Collier 1980).

The question arises, therefore, why does the MVD behave differently from other tissues. The most striking neuro-anatomical difference between the isolated MVD and other systems investigated is the fact that the MVD contains nerve terminals only, that is, the corresponding somata have been removed (Koch 1970; Henderson et al. 1972; North and Vitek 1980). Therefore, adaptational processes due to chronic opiate exposure are confined to presynaptic sites.

These unique findings obtained with the MVD are in conflict with current theories concerning the adaptive mechanisms underlying chronic opiate receptor activation. Although most of the reports which have presented data from the central nervous system (CNS) or the GPI, deny that changes in the number or affinity of opiate binding sites are the basic mechanisms responsible for opiate tolerance (Cox and Padhya 1977; Höllt and Wüster 1978), an adaptation at the level of the opiate binding site should not be ruled out (Axelrod 1956; Collier 1968; Davis et al. 1979; Chang et al. 1981a). At present, opiate tolerance/dependence is believed to reflect an expression of adaptational processes at the post-recognition stage of the receptor, most likely involving adenylate cyclase (Sharma et al. 1975; Hamprecht 1978) as well as calcium (Chapman and Way 1980). Interestingly, data have been communicated suggesting that not all opiate binding sites may be coupled to the adenylate cyclase system (Karras and North 1979). Accordingly, only those binding sites coupled to adenylate cyclase are generally assumed to be regulated by certain guanine nucleotides (Levitzki and Helmreich 1979; Blume 1978). It would be worthwhile, therefore, to investigate whether in the MVD, the responses of receptors to the action of guanine nucleotides are different from those of other tissues.

For these reasons the present paper investigates the characteristics of opiate binding sites in the tolerant MVD as compared to those in the GPI and the CNS. In addition, there is an investigation of the regulatory function of guanine

Send offprint requests to R. Schulz at the above address

nucleotides on opiate binding by several types of opiate agonists in naive and tolerant preparations.

Methods

Tissue Homogenates

Mouse Vas Deferens. Vasa deferentia of NMRI mice (25–30 g) were prepared (Hughes et al. 1975) in ice-cold 0.05 M Tris-buffer, pH 7.4 (about 40 mice for 1 experiment). The tissue was minced and then homogenized (20 mg wet tissue/ml Tris-buffer) by means of an Ultra-Turrax homogenizer (model 8 N) for 3 min (maximum speed, 0°C). The homogenate was centrifuged at $5,000 \times g$ for 10 min. The resultant pellet was washed 4 times with 100 ml buffer by re-suspension and re-centrifugation (4°C). Thereafter, the pellet was taken up in Tris-buffer to give a final homogenate concentration of 1 g tissue/100 ml.

Longitudinal muscle-myenteric plexus of the guinea-pig: Male guinea-pigs (400 g) were decapitated and the small intestine (minus duodenum) was removed. Longitudinal muscle myenteric plexus strips were prepared as described by Kosterlitz et al. (1970). The strips were minced and homogenized in sucrose (0.32 M) dissolved in 0.05 M Tris-buffer (pH 7.4, 0°C; 50 mg wet tissue/ml buffer), employing an Ultra-Turrax (model 10 N) at half-maximal speed for 90 s. The homogenate was centrifuged at $1,000 \times g$ (10 min). The supernatant was decanted and centrifuged at $7,000 \times g$ (20 min, 4°C). The pellet (P_2) was washed 4 times at 4°C, each time with 100 ml Tris-buffer (pH 7.4). The pellet was resuspended with an Ultra-Turrax at low speed and the suspension centrifuged at $7,000 \times g$ (20 min). The final P_2 -pellet was taken up in Tris-buffer (0.05 M, pH 7.4), to obtain a final tissue homogenate of 1 g/100 ml.

Brain Homogenate. Male Sprague-Dawley rats (150 g) were decapitated and the brains (minus cerebellum) were homogenized at 0°C using an Ultra-Turrax (N 10, maximal speed, 10 s, 1 g tissue in 10 ml sucrose/Tris-buffer). For further preparation see procedure of longitudinal muscle-myenteric plexus preparation.

Radioreceptor Assays

Mouse Vas Deferens and Longitudinal Muscle-Myenteric Plexus of the Guinea-Pig Ileum. The freshly prepared homogenates were incubated with ligands, with triplicate samples for each concentration (final volume 2 ml). Total incubation time was 90 min at 0°C. 5 ml Tris-buffer (0°C) was added to each sample immediately before separation of free and bound ligands by means of filtration under reduced pressure (Whatman glass filters GFC, diameter 2.5 cm). The filters were washed once with 5 ml Tris-buffer (0°C). The filters were counted for radioactivity, and specific binding was defined as total binding minus binding in the presence of 10 μ M of cold ligand.

Brain. The incubations with the radioactive and cold ligands were conducted at 0°C for 90 min. Triplicate samples of each concentration consisted of 2 ml of a final tissue suspension of 1 g/100 ml Tris-buffer (0.05 M, pH 7.4) of the freshly prepared homogenate. These samples were filtered through glassfibre discs (Whatman GFC) and rinsed twice with each 5 ml Tris-buffer (0°C). For further details see MVD/GPI procedure.

Induction of Opiate Tolerance

Osmotic minipumps were employed for chronic administration of the opioid [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin (DADL). The devices were implanted subcutaneously, under light ether anaesthesia. Mice received the model 2001 (delivery rate 1 μ l/h, Alza Corporation, Palo Alto, CA, USA, and guinea-pigs the model 2ML1 (10 μ l/h, Alza Corporation). Mice were infused with 5 μ g DADL/h, and guinea-pigs with 500 μ g/h. After 7 days, the animals were decapitated and the respective tissues were prepared.

Tritiated Ligands. ³H-[D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin (30–50 Ci/mmol) and ³H-dihydromorphine (76 Ci/mmol) were obtained from the Radiochemical Centre, Amersham, Great Britain. ³H-Ethylketocyclazocine (15 Ci/mmol) was purchased from New England Nuclear, Dreieich, FRG.

Drugs Employed were. [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin (Bachem, Switzerland); normorphine (Boehringer, Ingelheim, FRG); ethylketazocine-methanesulfonate (Sterling-Winthrop Res. Institute, Rensselaer, NY, USA); guanylyl-imidodiphosphate (GMP-PNP) (Boehringer, Mannheim, FRG); sucrose, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane (Merck, Darmstadt, FRG).

Results

Binding studies in MVD-homogenate require several precautions. One critical point relates to the incubation temperature, which has to be kept at 0°C (Leslie and Kosterlitz 1979). Our studies on MVD confirm this report as well as the long incubation time required (90 min) to establish equilibrium. Thus, to make the binding studies comparable between the MVD, the GPI and the brain, identical incubation conditions were employed for these three tissues (0°C, 90 min). These conditions ensure equilibrium for the ligands studied.

Binding Studies in Opiate Tolerant GPI and MVD

Vasa deferentia of mice were rendered tolerant by infusion of DADL (5 μ g/h, 7 days). These preparations which initially exhibit a several hundred-fold tolerance to DADL, have been shown to display still about 100-fold tolerance after an extensive washing procedure (Schulz et al. 1980b). The myenteric plexus of guinea-pigs was made tolerant by infusion of 500 μ g DADL/h. These isolated strips show, despite a 3 h washing procedure, an about 50-fold tolerance to DADL (Schulz et al. 1981). The ability of the tissue homogenates to specifically bind ³H-DADL is shown in Fig. 1. There was no significant difference in the binding of tolerant and naive tissues of GPI or MVD over a wide range of ³H-DADL concentrations. The specific binding of ³H-DADL was dose-dependent, 20–40% in the MVD and 25–50% in the GPI.

Guanine nucleotide (GMP-PNP) effects on opiate and receptor interactions:

The following studies report the effect of GMP-PNP on binding of different opiate receptor agonists in homogenate of naive MVD, GPI and brain, respectively. The incubation concentration of three different ³H-opioids, being prototypes for μ -, κ - and δ -receptors, were adjusted to give a total binding of radioactive tracer of about 1,000 cpm per sample. The concentrations were (a) for the μ -agonist ³H-di-

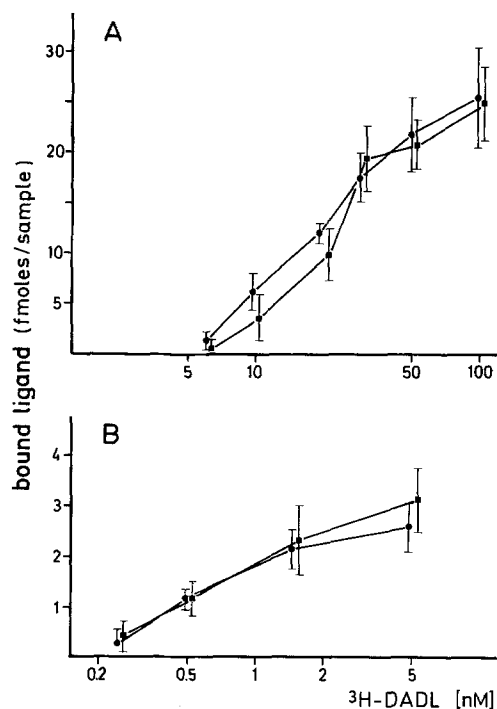


Fig. 1. Specific binding of ³H-[D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin in homogenates of guinea-pig ileum (A) and mouse vas deferens (B). Binding studies were conducted in tissues taken from naive animals (●) and from those made tolerant to [D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin (■). Each point represents the mean ± S.E.M. of at least two separate experiments. *Ab-scissa*: concentration of tritiated ligand (nM). *Ordinate*: amount of ligand bound (fmole) per sample

hydromorphone (DHM): MVD, 50 nM; GPI, 5 nM; brain, 1 nM; (b) for the κ -agonist ethylketazocine (EK); MVD, 10 nM; GPI, 2 nM; brain, 6 nM; and (c) for the δ -agonist [D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin (DADL): MVD, 0.5 nM; GPI, 30 nM; brain, 2 nM. The concentrations of the corresponding non-labelled competing ligand were 10 μ M throughout.

The effects of increasing concentrations of GMP-PNP on binding of DHM, DADL and EK for the three tissues are summarized in Fig. 2.

In brain and GPI the guanine nucleotide reduces opiate receptor binding for DHM, DADL and EK. While the effect for DHM is pronounced (60% at 10 μ M GMP-PNP), a moderate action was observed for DADL and EK in these preparations (about 35% at 100 μ M, $P < 0.05$). Interestingly, the MVD proved resistant to the guanine nucleotide action for any of the opioids. Even the highest concentration of GMP-PNP (100 μ M) did not affect the binding of DHM, the most sensitive compound to GMP-PNP in brain and GPI.

The effect of the guanine nucleotide on opiate binding was also studied in homogenate of tissues (MVD and GPI) made tolerant in vivo to DADL. The experimental conditions employed to cause tolerance were identical to those described for the effect on opiate receptors in these tissues (see Fig. 1). These studies revealed, however, that the MVD and GPI made tolerant to DADL display the same binding characteristics with respect to the GMP-PNP/DADL interaction as described for naive preparations (see Fig. 2). The guanine nucleotide concentration covered the range from 0.1–100 μ M.

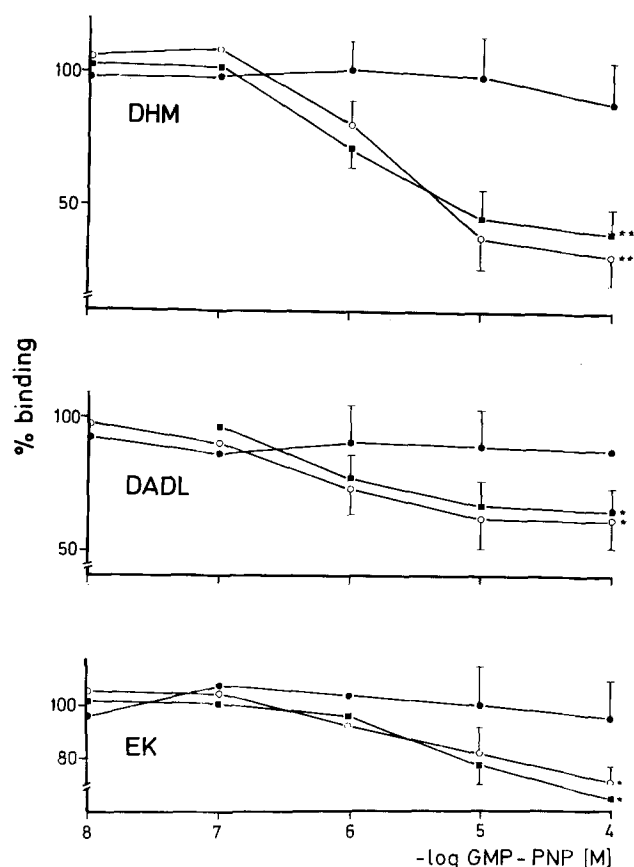


Fig. 2. Binding of ³H-dihydromorphone (DHM), ³H-[D-Ala²,D-Leu⁵]enkephalin (DADL) or ³H-ethylketazocine (EK) in the presence of increasing concentrations of GMP-PNP in homogenates of MVD (●), GPI (○) and rat brain (■). Data are expressed as percent binding of the binding obtained in the absence of the guanine nucleotide. Each point represents the average of at least two independent experiments. S.E.M. is given for data calculated from at least three independent experiments. *Ordinate*: % of binding, *abscissa*: concentration of GMP-PNP (-log M). * $P < 0.05$, ** $P < 0.02$ (two tailed Student's *t*-test)

Discussion

The apparent lack of dependence in highly opiate-tolerant mouse vas deferens (MVD) led to experiments testing the binding characteristics for opioids in these tissues. In an extension of these studies, the activity of the guanine nucleotide GMP-PNP was investigated to examine its modulatory effect on the interaction of an opioid with its receptor.

The binding studies conducted on tissues (GPI, MVD) made highly tolerant to DADL in vivo did not reveal an altered ability to bind ³H-DADL. The findings with the tolerant MVD parallel findings from brain and GPI of opiate-tolerant animals, showing no change in the number of affinity of opiate binding sites during the state of tolerance (Cox and Padhya 1977; Höllt and Wüster 1978). Thus, the data presented here with the MVD, together with most of those published earlier (Höllt and Wüster 1978) do not suggest that chronic exposure to an opiate leads to changes at the level of opiate binding site.

The second point which has been investigated relates to the effect of GMP-PNP on opiate receptor binding in brain

and GPI as compared to binding in the MVD. The binding of prototype agonists for μ -, δ - and κ -receptors, DHM, DADL and the benzomorphan derivative EK, respectively, proved sensitive to the effect of the guanine nucleotide in homogenate of brain and GPI, although to a different degree. These data are confirmatory to findings by others (Blume 1978; Childers and Snyder 1980; Zukin and Gintzler 1980; Chang et al. 1981b). In contrast to results obtained on the GPI and rat brain, in the MVD all three opioids are resistant to the modulatory action of GMP-PNP. Since a regulation of hormone and neurotransmitter receptors by guanine nucleotide has been proposed to reflect a coupling of the binding site of receptors to adenylate cyclase (Levitzki and Helmreich 1979), we suggest that the opiate receptors present in the MVD are not coupled to this enzyme. Thus, the apparent dissociation of tolerance and dependence in the MVD, which contrasts with data obtained from other tissues, e.g. the GPI (Schulz and Herz 1976), may relate to the lack of a modulatory effect of guanine nucleotide on the opiate receptors in the MVD. It is of interest, however, that experiments conducted in MVD and GPI to test whether induction of tolerance alters the results obtained with naive tissues, revealed no such effect of guanine nucleotide.

In view of the data discussed so far the attention may now be turned to the coupling mechanism, that is the link between binding site and effector of the receptor. In analogy to observations reported on adrenergic receptors, it has been suggested that desensitization (tolerance) is due to an uncoupling of the binding site from its subsequent effector (Su et al. 1979). Moreover, a reversal of this effect is rapidly achieved on removal of the appropriate agonist (Hanski and Levitzki 1978; Harden et al. 1979). Thus, if one assumes a similar mechanism for opiate receptors in the MVD, one could explain development of tolerance without dependence. Such mechanism would not require changes at the level of the binding site, which is in line with findings reported in this paper.

It is the aim of the present investigation to search for mechanisms which may be responsible for the apparent lack of dependence in highly tolerant MVD in contrast to the findings in GPI and rat brain. The results of the binding studies do not indicate that persistent activation of opiate receptors in the MVD is counteracted by a reduction in the number or the affinity of opiate binding sites. However, one has to keep in mind that binding studies with tissues from opiate-tolerant animals have to be carried out in the absence of the tolerance-inducing ligand, that is, after withdrawal of the opioid. Consequently, the binding studies may inform about the receptor situation during the state of withdrawal and therefore give less information of the state of opiate tolerance. From studies of adrenergic receptors, it is well known that dramatic changes of the receptor, with respect to binding sites or to coupling mechanisms, may occur after removal of the tolerance-inducing drug. In fact, a considerable loss of opiate tolerance occurs rapidly in the MVD after unmasking of the opiate receptors (Schulz et al. 1980b). These reflections caused recent studies with intact vasa deferentia of high opiate tolerance. These preliminary and continuing investigations (Schulz et al. 1980a) indicate a loss of opiate receptors during the state of tolerance. They would be in line with data by Chang et al. (1981a), claiming a reduced number of opiate receptors in cultured neuroblastoma cells that have been made tolerant. On the other hand, there is no indication for an adaptation of adenylate

cyclase or another enzyme system which would control the release in the MVD of an excitatory transmitter, e.g. nor-adrenaline. If such a system would adapt to chronic activation of the opiate receptor, dependence should be detected by a specific withdrawal sign subsequent to disinhibition of the enzyme in analogy to the findings with neuroblastoma cells (Sharma et al. 1975). Thus, in view of the drawbacks of binding studies for the investigation of opiate tolerance and dependence, an alteration of the coupling mechanism of opiate receptors may be possible during the state of tolerance.

Acknowledgement. We thank Dr. L. Reid for stylistic correction of the paper. This work was supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft.

References

- Axelrod J (1956) Possible mechanisms of tolerance to narcotic drugs. *Science* 124:263–264
- Blume A (1978) Interactions of ligands with the opiate receptors of brain membranes: Regulation by ions and nucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:1713–1717
- Chapman DB, Way EL (1980) Metal ion interactions with opiates. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 20:553–579
- Chang KJ, Eckel RW, Blanchard SG (1981a) Opioid peptides induce reduction in cultured neuroblastoma cells. *Nature* 296:446–448
- Chang KJ, Hazum E, Killian A, Cuatrecasas P (1981b) Interactions of ligands with morphine and enkephalin receptors are differentially affected by guanine nucleotide. *Mol Pharmacol* 20:1–7
- Childers S, Snyder SH (1980) Differential regulation by guanine nucleotides of opiate agonist and antagonist receptor interactions. *J Neurochem* 34:583–593
- Collier HOJ (1968) Supersensitivity and dependence. *Nature* 220:228–231
- Collier HOJ (1980) Cellular site of opiate dependence. *Nature* 283:625–629
- Cox BM, Padhya R (1977) Opiate binding and effect in ileum preparations from normal and morphine pretreated guinea-pigs. *Br J Pharmacol* 61:271–278
- Davis ME, Akera T, Brody TM (1979) Reduction of opiate binding to brainstem slices associated with development of tolerance to morphine in rats. *J Pharm Exp Ther* 211:112–119
- Gillan MGC, Kosterlitz HW, Robson LE, Waterfield AA (1979) The inhibitory effects of presynaptic α -adrenoceptor agonists on contractions of guinea-pig ileum and mouse vas deferens in the morphine-dependent and withdrawn states produced in vitro. *Br J Pharmacol* 66:601–608
- Hamprecht B (1978) Opioids and cyclic nucleotides. In: Herz A (ed) *Developments in opiate research*. Marcel Dekker, New York, pp 357–406
- Hanski E, Levitzki A (1978) The absence of desensitization in the beta adrenergic receptors of turkey reticulocytes and erythrocytes and its possible origin. *Life Sci* 22:53–60
- Harden TK, Su YF, Perkins JP (1979) Catecholamine-induced desensitization involves an uncoupling of β -adrenergic receptors and adenylate cyclase. *J Cycl Nucl Res* 5:99–106
- Henderson G, Hughes J, Kosterlitz HW (1972) A new example of a morphine sensitive neuroeffector junction: Adrenergic transmission in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 46:764–766
- Herz A (1978) Sites of opiate action in the central nervous system. In: Herz A (ed) *Developments in opiate research*. Marcel Dekker, New York, pp 153–191
- Höllt V, Wüster M (1978) The opiate receptors. In: Herz A (ed) *Developments in opiate research*. Marcel Dekker, New York, pp 1–65
- Hughes J, Kosterlitz HW, Leslie FM (1975) Effect on morphine on adrenergic transmission in the mouse vas deferens. Assessment of agonist and antagonist potencies of narcotic analgesics. *Br J Pharmacol* 53:371–381

- Karras PJ, North RA (1979) Inhibition of neuronal firing by opiates: Evidence against the involvement of cyclic nucleotides. *Br J Pharmacol* 65:647–652
- Koch F (1970) Das autonome Nervensystem. In: *Lehrbuch der Veterinär-anatomie*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, pp 350–357
- Kosterlitz HW, Lydon RJ, Watt AJ (1970) The effect of adrenaline, noradrenaline and isoprenaline on inhibitory α - and β -adrenoceptors in the longitudinal muscle of the guinea-pig ileum. *Br J Pharmacol* 33:398–413
- Leslie FM, Kosterlitz HW (1979) Comparison of binding of ^3H -Naltrexone and ^3H -Dihydromorphine in the mouse vas deferens and the myenteric plexus and brain of the guinea-pig. *Eur J Pharmacol* 56:379–383
- Levitzki A, Helmreich JM (1979) Hormone-receptor-adenylate cyclase interactions. *FEBS Lett* 101:213–219
- North RA, Vitek LV (1980) The effect of chronic morphine treatment on excitatory junction potentials in the mouse vas deferens. *Br J Pharmacol* 68:399–405
- Schulz R (1978) The use of isolated organs to study the mechanism of action of narcotic analgesics. In: Herz A (ed) *Developments in opiate research*. Marcel Dekker, New York, pp 241–277
- Schulz R, Herz A (1976) Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Life Sci* 19:1117–1128
- Schulz R, Wüster M, Krenss H, Herz A (1980a) Selective development of tolerance without dependence in multiple opiate receptors of mouse vas deferens. *Nature* 285:242–243
- Schulz R, Wüster M, Krenss H, Herz A (1980b) Lack of cross-tolerance on multiple opiate receptors in the mouse vas deferens. *Mol Pharmacol* 18:395–401
- Schulz R, Faase E, Illes P, Wüster M (1980c) Development of opiate tolerance/dependence in the guinea-pig myenteric plexus and the mouse vas deferens. In: Way EL (ed) *Endogenous and exogenous opiate agonists and antagonists*. Pergamon Press, New York, pp 136–138
- Schulz R, Wüster M, Rubini P, Herz A (1981) Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum – their differentiation by means of selective tolerance development. *J Pharmacol Exp Ther* 219:547–550
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci* 72:3092–3096
- Su Y-F, Harden K, Perkins JP (1979) Isoproterenol-induced desensitization of adenylate cyclase in human astrocytoma cells. *J Biol Chem* 254:38–41
- Wüster M, Schulz R, Herz A (1981a) Multiple opiate receptors in peripheral tissue preparations. *Biochem Pharmacol* 14:1883–1887
- Wüster M, Rubini P, Schulz R (1981b) The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. *Life Sci* 29:1219–1227
- Zukin RS, Gintzler A (1980) Guanyl nucleotide interactions with opiate receptors in guinea-pig brain and ileum. *Brain Res* 186:486–491

Received October 28/Accepted February 10, 1982

IV. Derzeitiger Stand der Opioid-Forschung

In diesem Kapitel fasse ich die wichtigsten Erkenntnisse der letzten Jahre zusammen, die das Thema meiner Dissertation betreffen und in die auch meine Ergebnisse eingeflossen sind.

Opioidrezeptortypen

Die klassische Bezeichnung der Opioidrezeptoren als μ , δ , und κ wird im Wesentlichen entsprechend der aktuellen Terminologie des maßgeblichen IUPHAR Unterausschusses beibehalten (Cox et al., 2015). Es wird empfohlen, die Abkürzungen „OP“ für Opiode und „r“ für Rezeptoren zu benutzen. Dementsprechend heißt der μ -Rezeptor „ μ OPr“ oder „MOPr“, und der δ -Rezeptor δ OPr oder DOPR. Ich werde jedoch in meinen Betrachtungen der Einfachheit halber die ursprüngliche, vereinfachte Terminologie weiter nutzen.

Die Strukturaufklärung der Opioidrezeptoren durch Klonierung ergab eine etwa 60%-ige Homologie zwischen μ -, δ - und κ -Rezeptoren (Reisine et al., 1993). Alle drei Subtypen gehörten zur Gruppe der typischen 7 Transmembransegmente-enthaltenden G Protein-gekoppelten Rezeptoren („G protein-coupled receptors“; GPCR). Die ursprüngliche Annahme, dass σ -Rezeptoren kein Subtyp des Opioidrezeptors sind, bestätigte sich, da das Protein eine grundsätzlich unterschiedliche Struktur mit nur einem Transmembransegment aufwies (Seth et al., 1998). Interessanterweise gesellte sich noch ein weiterer Subtyp zu den Opioidrezeptoren, der auf das Peptid Nociceptin/Orphanin FQ (N/OFQ) reagierte (Lambert, 2008). Nociceptin erhielt seinen Namen anhand der Tatsache, dass es nach spinaler Applikation Schmerz (nozizeptiver Effekt), nach supraspinaler Applikation jedoch Analgesie auslöste. Die Bezeichnung Orphanin FQ weist darauf hin, dass sein Rezeptor deorphanisiert werden musste und dabei die N- und C-terminalen Aminosäuren dem Namen hinzugefügt wurden (F, Phenylalanin; Q, Glutamin). N/OFQ entsteht im Organismus aus einem größeren Precursor-Molekül durch Proteolyse (Meis et al., 2003).

Die hochgradige Ähnlichkeit der Opioidrezeptoren μ , δ , κ mit dem N/OFQ (NOP)-Rezeptor wurde durch Kristallisation dieser Proteine nachgewiesen (Cox et al., 2015). Im Gegensatz zum σ -Rezeptor ist die Primär-, Sekundär- und Tertiärstruktur der nunmehr 4 Opioidrezeptortypen weitgehend ähnlich. Darüber hinaus wurde

gezeigt, dass diese Rezeptoren zu der Superfamilie der GPCR gehören und identische intrazelluläre Transduktionsmechanismen verwenden.

Frühe Untersuchungen an μ -, δ - und κ -Rezeptoren wiesen darauf hin, dass es weitere Subtypen, wie μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 und κ_1 , κ_2 gibt. Unsere eigenen funktionellen Befunde am GPI und MVD konnten ebenfalls in diesem Sinne gedeutet werden (Wüster et al., 1981; Schulz et al., 1981). Knockout Experimente belegen jedoch, dass es nicht mehr als drei getrennte Gene für μ -, δ - und κ -Rezeptoren an Maus (*Oprm1*, *Oprd2*, *Oprk1*) und Mensch (*OPRM1*, *OPRD1*, *OPRK1*) gibt. Die Inaktivierung dieser Gene bei μ -, δ - und κ -Rezeptor-defizienten Mäusen erlaubten festzustellen, welcher Rezeptor an der analgetischen Wirkung einzelner Opioide beteiligt war (Gaveriaux-Ruff, 2013). Morphin aktivierte ausschließlich μ -Rezeptoren, da seine Wirkung in *Oprm1* K.O.-Mäusen nicht mehr ausgelöst werden konnte. Demgegenüber wurde der analgetische Effekt von Pentazocin, abhängig von der Schmerzmodalität durch μ - (Hitze, mechanische Schädigung, Formalin-Reizung) oder κ -Rezeptoren (viszeraler Schmerz) vermittelt (Ide et al., 2011). Im Falle von Bremazocin wurden sogar alle drei Opioidrezeptor-Typen besetzt, obwohl die Bedeutung des κ -Rezeptors überwog.

Auf der Grundlage der mithilfe von Knockout-Mäusen gewonnenen Erkenntnisse wurde gefolgert, dass die vermeintlichen Subtypen von Opioidrezeptoren vorwiegend auf dem unterschiedlichen Maß der Aktivierung mehrerer Opioidrezeptortypen beruht. Trotz der grundsätzlichen Richtigkeit dieser Feststellung, gibt es jedoch mehrere Splice-Varianten von μ -Rezeptoren (nicht aber von δ - und κ -Rezeptoren) und zahlreiche Einzelnukleotid-Polymorphismen („single nucleotide polymorphism“; SNP) desselben Rezeptors. Nur ein einziger dieser Polymorphismen kommt in der kodierenden Region des Gens vor (rs 1799971; A118G) und führt zum Entfallen einer potentiellen Glykosylierungsstelle (Gelernter et al., 1999).

Transduktionsmechanismen der Opioidrezeptoren, Toleranz und Abhängigkeit

Das erste Glied der Transduktionskette von Opioidrezeptoren ist die Aktivierung der Rezeptor-gekoppelten $G_{i/o}$ -Proteine (Proft and Weiss, 2015). Wie alle heteromeren G-Proteine besteht auch $G_{i/o}$ aus einer GTP-bindenden α -Untereinheit, sowie den β - und γ -Untereinheiten, die in fest assoziierter Form als $G\beta\gamma$ -Dimer vorkommen. Unter Ruhebedingungen bindet $G\alpha$ GDP und koppelt an den Opioidrezeptor. Nach Besetzen des Rezeptors durch seinen Agonisten kommt es zu

einer Konformationsänderung, die zum Austausch von GDP durch GTP führt und danach zur Dissoziation des GTP-bindenden $G\alpha$ und des stabilen $G\beta\gamma$ -Dimers vom Rezeptor. Anschließend wird GTP infolge der endogenen GTPase Aktivität von $G\alpha$ in GDP abgebaut und mit $G\beta\gamma$ neu assoziiert; damit wird der Signalmechanismus abgeschlossen, und der Rezeptor-G-Protein-Komplex kann neu aktiviert werden.

$G\alpha_{i/o}$ ist ein Pertussis toxin hemmbares G-Protein, das die Funktion des Enzyms Adenylcyclase inhibiert und dadurch die intrazelluläre Konzentration des Second-Messenger-Moleküls cAMP reduziert. Dies führt zu einer verminderten Ruheaktivität von Proteinkinase A (cAMP-abhängige Proteinkinase) (Williams et al., 2001). Die Hemmung der Adenylcyclase hat zwei Konsequenzen: (1) Es wird ein spannungsabhängiger kationischer Schrittmacher-Strom (I_h) moduliert, der bei hyperpolarisierten Werten das Membranpotential in Richtung Depolarisation verschiebt; (2) Das Adenylcyclase/PKA-System ist für die präsynaptische Hemmwirkung (Reduktion der Transmitterfreisetzung) verantwortlich (Abb. 1).

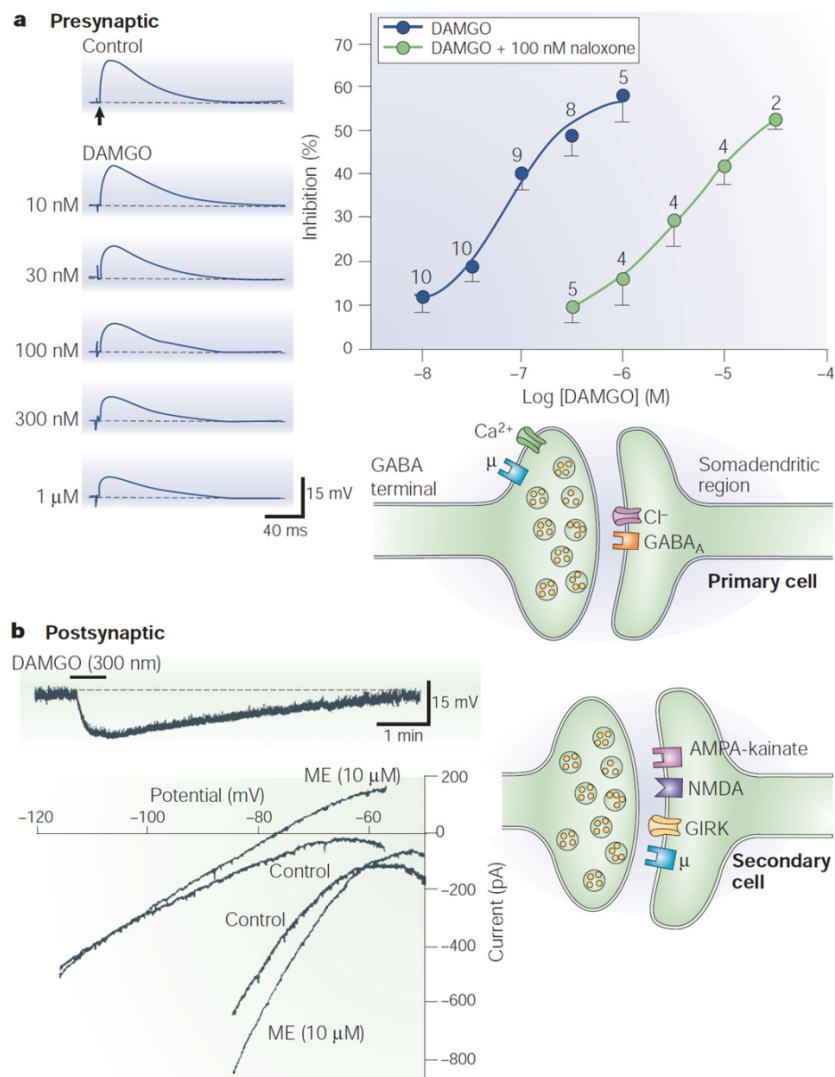


Abb. 1 Synaptische Effekte von μ -Opioidrezeptor-Agonisten in der rostralen ventrolateralen Medulla (RVM; hier entstehen kardiovaskuläre Wirkungen von Opioiden). (a) μ -Rezeptor-Agonisten vermindern die Freisetzung von GABA über einen präsynaptischen Wirkmechanismus (s. die Konzentrations-abhängige Reduktion der auswärtsgerichteten GABAergen postsynaptischen Ströme). Die verminderte GABAerge Hemmung führt zur Enthemmung der primären „on“-Zellen im RVM. (b) Im Gegensatz dazu hemmen μ -Rezeptor-Agonisten die „sekundären“ off-Zellen im RVM, indem sie eine einwärtsgerichtete K^+ -Leitfähigkeit induzieren (s. den durch DAMGO ausgelösten Auswärtsstrom und die Umkehr dieses Stromes bei etwa dem Gleichgewichtspotential von K^+). Der Wirkmechanismus ist postsynaptisch. DAMGO, [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵]enkephalin; GIRK, G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter K^+ -Kanal; ME, [Met⁵]enkephalin; NMDA, N-Methyl-D-Aspartat. Die „on“-Zellen erhöhen den sympathischen Output, während die „off“-Zellen ihn vermindern. Entnommen aus der Publikation von Fields (2004).

$G\beta\gamma$ induziert eine einwärtsgerichtete K^+ -Leitfähigkeit, und blockiert spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle (Boland und Bean, 1993). Diese Effekte beruhen auf einer unmittelbaren Bindung der $\beta\gamma$ -Untereinheiten an die Ionenkanäle. Die Aktivierungs- und Inaktivierungs-Kinetik der Ca^{2+} -Ströme wird verlangsamt; stark depolarisierende Präpulse („prepulse facilitation“) verhindern die Hemmwirkung von Opioiden. Es wurde gefolgert, dass diese Effekte auf der langsamen, spannungs-abhängigen Dissoziation von $G\beta\gamma$ vom Kanal beruhen.

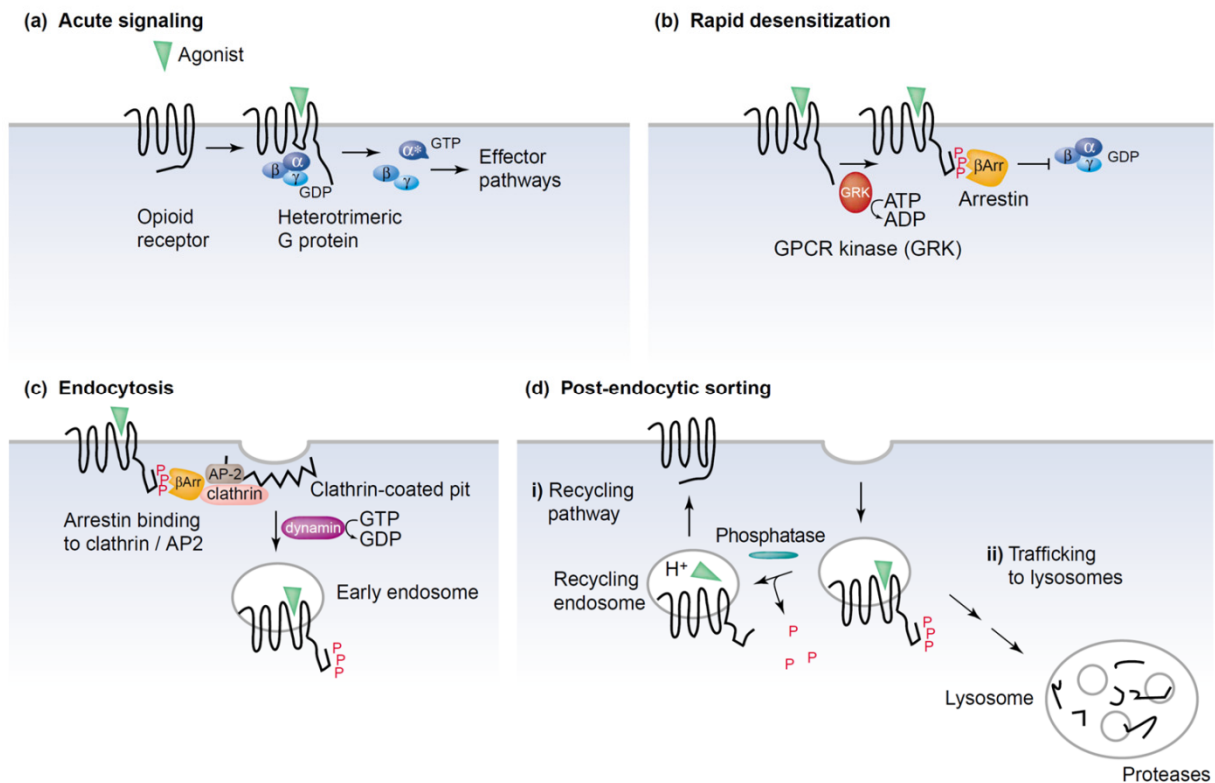


Abb. 2 Durch die Agonisten-induzierte Aktivierung von Opioidrezeptoren angestoßenen Ereignisse. (a) Akute Applikation. Rezeptor-vermittelte Aktivierung von heteromeren G-Proteinen. Dem Rezeptor kann ein Ionenkanal, die Adenylatcyclase oder eine Proteinkinase

nachgeschaltet werden. (b) Schnelle Desensibilisierung. Phosphorylierung und Bindung an β -Arrestin verhindert die Aktivierung des G-Proteins. (c) Endocytose. β -Arrestin fördert die Aufnahme der Rezeptoren in Clathrin-Vesikel und verpackt sie Dynamin-abhängig in Endosome. (d) Post-endocytotisches Sortieren. (i) Wiedereinbau in die Plasmamembran. (ii) Aufnahme in Lysosomen und Proteolyse. Entnommen aus der Publikation von Zastrow et al., (2003).

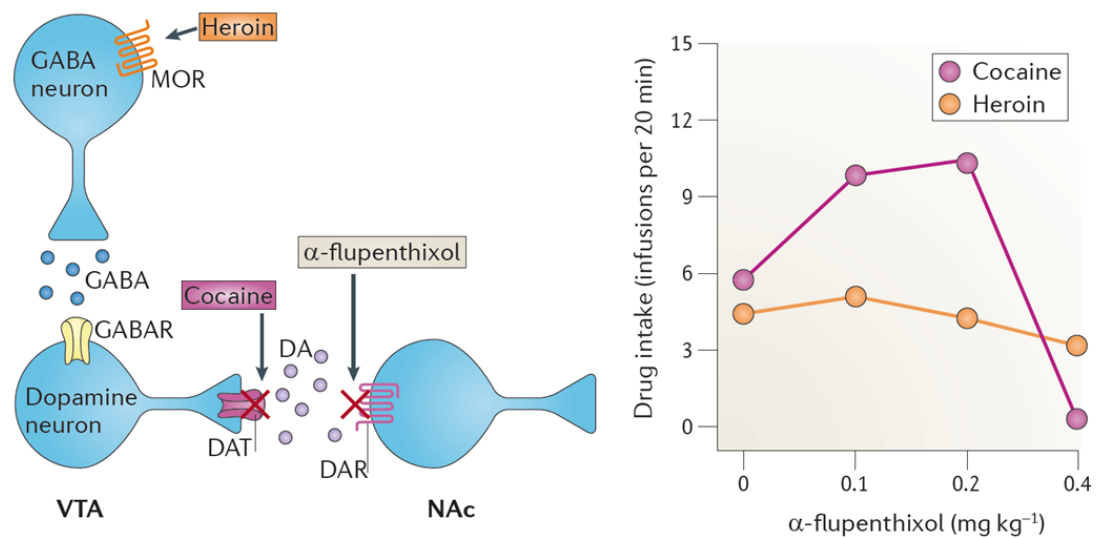
Toleranz bedeutet eine schnelle Wirksamkeitsabnahme der Opoide, die vor allem bei Morphin ein begleitendes Symptom der Abhängigkeitsentwicklung ist. Bereits innerhalb von Stunden nach Morphingabe kommt es zur Rezeptor-Desensibilisierung, die danach in Toleranz übergeht (von Zastrow et al., 2003; Nagi and Pineyro, 2011). Die Toleranz beruht auf der verminderten Rezeptorexpression auf der Oberfläche der neuronalen Plasmamembran (Abb. 2). Während der Desensibilisierung entkoppelt sich der Rezeptor von seinem G-Protein infolge Phosphorylierung durch G-Proteingekoppelte Rezeptor-Kinasen. Danach wird der Opioidrezeptor an β -Arrestine gebunden, endocytotisch in Clathrin-Vesikel aufgenommen und Dynamin-abhängig in Endosome verpackt. Der Rezeptor kann danach unverändert in die Membran wiedereingebaut („recycling“) oder in Lysosomen proteolytisch zersetzt werden. Die Rolle der Arrestine in der Morphin-Toleranz wurde durch β -Arrestin-2 K.O. Mäuse nachgewiesen, die stark verminderte Desensibilisierung/Toleranz gegenüber Morphin zeigten (Bohn et al., 2000).

Die Forschung an Opioidrezeptoren und ihren Agonisten hat seit langen Jahren das erklärte Ziel Medikamente zu identifizieren, die geringe Toleranz und Abhängigkeit erzeugen. Die κ -Rezeptoragonisten mit μ -agonistischer/-antagonistischer Restwirkung haben die in sie gesetzten Hoffnungen nicht erfüllt (Kreek et al., 2012). Es wurde angenommen, dass z.B. Pentazocin über μ -Rezeptoren stark schmerzstillend wirkt, aber über κ -Rezeptoren aversive/-dysphorische Effekte ausübt, und deshalb keine Toleranz erzeugen wird. Diese Hoffnung hat sich jedoch nicht bewahrheitet. Pentazocin fällt unter die Bestimmungen des Betäubungsmittelgesetzes und wird seit 2006 in Deutschland therapeutisch nicht mehr verwendet.

Neuerdings stehen im Mittelpunkt der Überlegungen δ -Rezeptor-Agonisten. Diese Peptidstrukturen lösen eine schwache spinale Analgesie aus, im Gegensatz zu μ -Rezeptor-Agonisten, die sowohl spinale als auch supraspinale Angriffspunkte besitzen (Zhang et al., 2006). Darüber hinaus befinden sich μ -Rezeptoren vorwiegend an der Zelloberfläche, während δ -Rezeptoren zytoplasmatisch lokalisiert

sind. Sie werden in „large dense-core vesicles“ (LDCV) mit Neuropeptiden gemeinsam gespeichert. Nach nozizeptiver Stimulation oder Agonisten-Applikation wird ihr Einbau in die Plasmamembran gefördert. Es wird weiterhin angenommen, dass δ - und μ -Rezeptoren Heterodimere bilden können; somit wird der μ -Rezeptor-vermittelte Effekt vermindert. Die klinische Anwendung von δ -Rezeptor-Agonisten könnte jedoch dadurch eingeschränkt werden, dass sie prokonvulsiv sind; dieser Effekt wird durch NO vermittelt, ist kurzlebig und unterliegt einer schnellen Toleranz (Gendron et al., 2014).

a Heroin taking versus cocaine taking after dopamine receptor blockade



b Heroin taking versus cocaine taking after lesion of NAc dopamine terminals

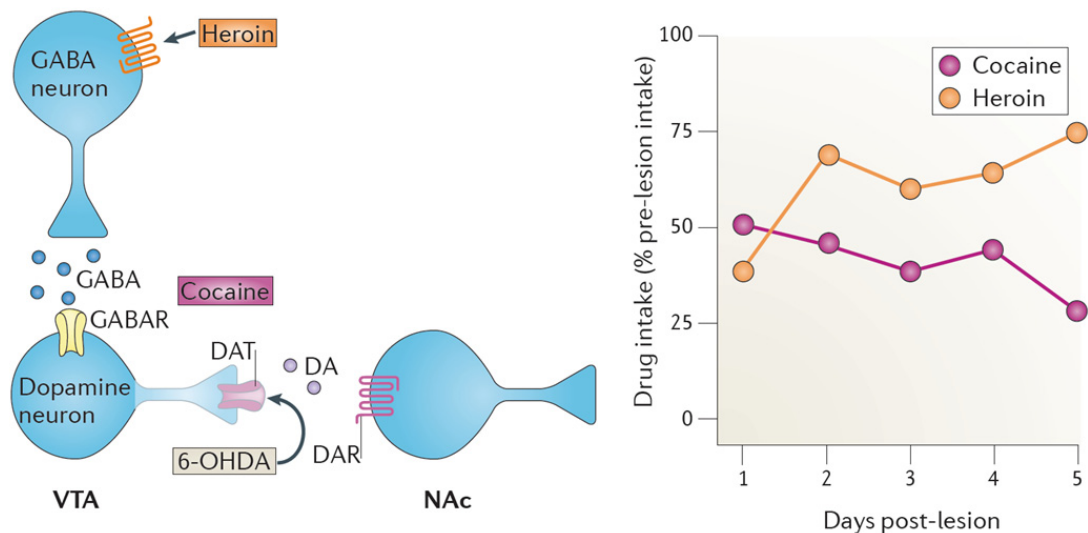


Abb. 3 Pharmakologische Blockade von Dopaminrezeptoren oder Schädigung des mesocortico-limbischen dopaminergen Systems vermindert das Cocain-, nicht aber das Heroin-ausgelöste Wohlbefinden („reward“). Dieser „reward“ wird der menschlichen Euphorie gleichgesetzt. (a) Auswirkung der Dopaminrezeptor-Blockade. Ratten wurden trainiert, eine Taste zu drücken, um danach intravenös Heroin oder Cocain zu erhalten. Niedrige Dosen

des D2-Dopaminrezeptor-Antagonisten α -Flupenthixol erhöhten die Cocain-, nicht aber die Heroin-Selbsapplikationsrate. Bei hohen Dosen von α -Flupenthixol verschwand dieser Unterschied, wahrscheinlich da die sedierende Eigenschaften des Pharmakons in den Vordergrund gerückt sind. (b) Auswirkung der dopaminergen Lesion. Die dopaminergen Zellkörper im Nucleus accumbens (NAc) wurden durch lokale 6-OH-Dopamin-injection abgetötet. Danach sank die Cocain-Selbstapplikationsrate; die Heroin-Selbsapplikationsrate stieg jedoch an. DA, Dopamin; DAR, Dopaminrezeptor; DAT, Dopamintransporter; GABA_A; GABA_A-Rezeptor; MOR, μ -Opioidrezeptor; VTA, ventrales tegmentale Areal. Opioide inkl. Heroin hemmten den inhibitorischen GABA_A-Rezeptor an dopaminergen Neuronen des VTA; das darauffolgende gesteigerte Feuern dieser Neurone erhöhte die Dopamin-Freisetzung im NAc. Cocain hemmte die Wiederaufnahme von Dopamin mittels Transporter und führte somit ebenfalls zum Anstieg der Dopaminkonzentration im NAc. Entnommen aus der Publikation von Badiani et al. (2011).

Die Abhängigkeit ist eine chronische, rezidivierende Funktionsstörung des Gehirns, die durch zwanghafte Drogen-Suche („craving“) und Drogen-Einnahme charakterisiert ist (Shippenberg et al., 2008). Alle abhängigkeits-erzeugenden Substanzen steigern die Aktivität der vom ventralen tegmentalen Areal (VTA) zum Nucleus accumbens (NAc) projizierenden dopaminergen Neurone. Die wiederholte Applikation von Opioiden oder Psychostimulanzien erzeugt Neuroadaptation sowohl im mesolimbischen System als auch in weiteren Gehirnsregionen, die Teile des cortico-striatopallidalen Regelkreises sind. Die Unterbrechung der chronischen Opioidgabe wird durch verminderte dopaminerge Neurotransmission im präfrontalen Cortex (PFC) und NAc begleitet. Diese adaptiven Änderungen führen u.a. zum aversiven Effekt des Entzugs und sind ein Grund der kontinuierlichen Drogeneinnahme. Ein Beispiel der zellulären Opioid-Toleranz und -Abhängigkeit kann aus der akuten Hemmung der Adenylatcyclase abgeleitet werden, die nach langdauernder Applikation bzw. Entzug in Stimulation der Enzymaktivität übergeht (Sharma et al., 1975). Die erhöhte Aktivität von Adenylcyclase trägt zur Entzugssymptomatik bei.

Die mesocortico- limbische Dopaminneurone werden als gemeinsames Substrat des Belohnungssystems bei Morphin/Heroin- und Cocain/Amphetamin-Sucht betrachtet. Neuerdings wurden jedoch zahlreiche Unterschiede bei den beiden Suchtformen beobachtet (Abb. 3; Badiani et al., 2011; Kreek et al., 2012). Diese Unterschiede bestehen in den folgenden Bereichen: (1) Sensitisierung gegenüber dem Suchtmittel; (2) aberrantes Lernen; (3) fronto-striatale Dysfunktion; und (4) lustorientiertes Verhalten. Ein Beispiel dafür ist, dass der Dopaminrezeptor-

Antagonist α -Flupenthixol die Selbstapplikation von Cocain im Tierexperiment fördert, die von Heroin aber unbeeinflusst lässt.

Zentrale und periphere Opioidanalgesie

Die zentral wirkenden μ -agonistischen Morphin-ähnlichen Opiode wirken bei starken akuten oder chronischen Schmerzen analgetisch. Sie haben jedoch eine Reihe unerwünschter zentraler Nebenwirkungen, wie Atemdepression, Brechreiz und Erbrechen, Sedierung, Euphorie, Toleranz und Abhängigkeit. κ -Agonisten lösen an zentralen Angriffspunkten Dysphorie aus. Neuerdings wurden peripher wirkende Opiode hergestellt, die von solchen Nebenwirkungen frei sind (Stein and Zöllner, 2009; Stein et al., 2003).

Alle drei Typen von Opioidrezeptoren sind an peripheren sensorischen Endigungen der Hinterwurzelganglienzellen vorhanden. Eine G Protein-vermittelte Hemmung der N-Typ, spannungsabhängigen Ca^{2+} -Ströme scheint der primäre Mechanismus der Opioid-Effekte zu sein. Zusätzlich können Opiode über die Inhibition der Adenylcyclase-Aktivität Tetrodotoxin (TTX)-resistente Na^{+} -selektive oder nicht-selektive kationische Ströme unterdrücken. TTX-resistente Na^{+} -Kanäle werden in kleinen DRG-Neuronen und in ihren C-Faserterminalen selektiv exprimiert.

Nach Gewebeschäden, die durch Entzündung, Neuropathie und Knochenverletzungen hervorgerufen werden, wird der axonale Transport von Opioidrezeptoren in die Nervenendigungen erhöht (Hassan et al., 1993). An diesen Rezeptoren wirken alle endogenen Pro-Opiomelanocortin-, Proenkephalin- und Prodynorphin-Genprodukte. Periphere Opiode werden aus Immunzellen (Monocyten, Makrophagen, Lymphocyten) in einer Ca^{2+} -abhängigen Weise sekretiert (Stein et al., 2003). Die Sekretionsrate kann durch Interleukin- 1β und Corticotropin-releasing Hormon (CRH) gefördert werden. Letztendlich interagieren Opioid- und Chemokin-Rezeptoren miteinander und ermöglichen z.B. die direkte Beeinflussung der Monocyten- und Lymphocyten-Funktionen durch μ -Rezeptoragonisten (Melik et al., 2015).

Als periphere Opiode können quartäre Verbindungen genutzt werden, die die Blut-Hirnschranke nicht passieren (z.B. Loperamid). Neue periphere κ -Rezeptor-Agonisten wurden bei chronischer Pankreatitis erfolgreich verwendet (Eisenach et al., 2003).

Schlussfolgerungen

Die Befunde die in unseren Publikationen vor einigen Jahrzehnten beschrieben wurden, konnten teilweise bestätigt, teilweise entkräftet werden.

1. Die anhand funktioneller Untersuchungen und Bindungsstudien supponierten μ -, δ - und κ -Rezeptoren konnten kloniert und kristallisiert werden. Die etwa 60%-ige Homologie zwischen den drei Rezeptortypen und ihre 3D-Struktur-Analogien belegten, dass sie mit einander eng verwandt sind. Sie gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Als neues Mitglied dieser Rezeptorfamilie wurde der Nociceptin/OrphaninFQ-Rezeptor identifiziert, der spinal Analgesie und supraspinal Schmerz auslöst.
2. Die mit selektiver Toleranzentwicklung nachgewiesenen Unterschiede innerhalb der μ - und κ -Rezeptortypen beruhen nicht an der Ausschaltung spezifischer Subtypen dieser Rezeptoren (z.B. μ_1 , μ_2 oder κ_1 , κ_2). Sie können vielmehr mit der unterschiedlich starken Besetzung der drei Opioidrezeptoren durch Agonisten bzw. mit der Bildung von Rezeptor-Dimeren erklärt werden.
3. Die fehlende in vitro-Abhängigkeitsentwicklung im MVD ist wohl damit zu erklären, dass die Transduktionsmechanismen der prä- und postsynaptischen Opioidrezeptoren sich in zahlreichen Aspekten unterscheiden. Diese Aspekte beziehen sich auf (a) den Ausmaß der Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein, (b) die Rolle der $G\alpha$ -, und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten an der Regulation von Transmitterfreisetzung und Ionenkanal-Leitfähigkeit, (c) die endocytotische Aufnahme, endosomale Verpackung und Wiedereinbau der Rezeptoren in die Zellmembran oder ihren Abbau in Lysosomen.

Literaturverzeichnis

- Akil H, Mayer DJ, Liebeskind JC (1976) Antagonism of stimulation-produced analgesia by naloxone, a narcotic antagonist. *Science* 191:961-962.
- Arunlakshana O, Schild HO (1997) Some quantitative uses of drug antagonists. *Br J Pharmacol* 120(4 Suppl):151-161
- Badiani A, Belin D, Epstein D, Calu D, Shaham Y (2011) Opiate versus psychostimulant addiction: the differences do matter. *Nat Rev Neurosci* 12:685-700.
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG (2000) Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence. *Nature* 408:720-723.
- Boland LM, Bean BP (1993) Modulation of N-type calcium channels in bullfrog sympathetic neurons by luteinizing hormone-releasing hormone: kinetics and voltage dependence. *J Neurosci* 13:516-533.
- Corbett AD, Gillan MG, Kosterlitz HW, McKnight AT, Paterson SJ, Robson LE (1984) Selectivities of opioid peptide analogues as agonists and antagonists at the delta-receptor. *Br J Pharmacol* 83:271-279.
- Cox BM, Christie MJ, Devi L, Toll L, Traynor JR (2015) Challenges for opioid receptor nomenclature: IUPHAR Review 9. *Br J Pharmacol* 172:317-323.
- Eisenach JC, Carpenter R, Curry R (2003) Analgesia from a peripherally active kappa-opioid receptor agonist in patients with chronic pancreatitis. *Pain* 101:89-95.
- Gaveriaux-Ruff C (2013) Opiate-induced analgesia: contributions from mu, delta and kappa opioid receptors mouse mutants. *Curr Pharm Des* 19:7373-7381.
- Gelernter J, Kranzler H, Cubells J (1999) Genetics of two mu opioid receptor gene (OPRM1) exon I polymorphisms: population studies, and allele frequencies in alcohol- and drug-dependent subjects. *Mol Psychiatry* 4:476-483.
- Gendron L, Mittal N, Beaudry H, Walwyn W (2015) Recent advances on the delta opioid receptor: from trafficking to function. *Br J Pharmacol* 172:403-419.
- Goldstein A, Tachibana S, Lowney LI, Hunkapiller M, Hood L (1979) Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:6666-6670.

- Hassan AH, Ableitner A, Stein C, Herz A (1993) Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience* 55:185-195.
- Höllt V (2013) Opioidanalgetika. In: *Allgemeine und spezifische Pharmakologie und Toxikologie*, Urban & Fischer, München. S. 218-231.
- Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR (1975) Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258:577-580.
- Ide S, Minami M, Uhl GR, Satoh M, Sora I, Ikeda K (2011) (-)-Pentazocine induces visceral chemical antinociception, but not thermal, mechanical, or somatic chemical antinociception, in mu-opioid receptor knockout mice. *Mol Pain* 7:23.
- Illes P (1989) Modulation of transmitter and hormone release by multiple neuronal opioid receptors. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 112:139-233.
- Kosterlitz HW, Paterson SJ, Robson LE (1981) Characterization of the kappa-subtype of the opiate receptor in the guinea-pig brain. *Br J Pharmacol* 73:939-949.
- Kreek MJ, Levrán O, Reed B, Schlussman SD, Zhou Y, Butelman ER (2012) Opiate addiction and cocaine addiction: underlying molecular neurobiology and genetics. *J Clin Invest* 122:3387-3393.
- Lambert DG (2008) The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov* 7:694-710.
- Li CH, Chung D, Doneen BA (1976) Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochem Biophys Res Commun* 72:1542-1547.
- Lord JA, Waterfield AA, Hughes J, Kosterlitz HW (1977) Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267:495-499.
- Magnan J, Paterson SJ, Tavani A, Kosterlitz HW (1982) The binding spectrum of narcotic analgesic drugs with different agonist and antagonist properties. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319:197-205.
- Martin WR, Eades CG, Thompson JA, Huppler RE, Gilbert PE (1976) The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 197:517-532.
- Meis S (2003) Nociceptin/orphanin FQ: actions within the brain. *Neuroscientist* 9:158-168.

- Melik PS, Rivat C, Rostene W, Reaux-Le GA (2015) Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? *Nat Rev Neurosci* 16:69-78.
- Nagi K, Pineyro G (2011) Regulation of opioid receptor signalling: implications for the development of analgesic tolerance. *Mol Brain* 4:25.
- Proft J, Weiss N (2015) G protein regulation of neuronal calcium channels: back to the future. *Mol Pharmacol* 87:890-906.
- Reisine T, Bell GI (1993) Molecular biology of opioid receptors. *Trends Neurosci* 16:506-510.
- Rubini P, Schulz R, Wuster M, Herz A (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319:142-146.
- Schulz R, Wuster M, Herz A (1981a) Pharmacological characterization of the epsilon-opiate receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 216:604-606.
- Schulz R, Wuster M, Rubini P, Herz A (1981b) Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: their differentiation by means of selective tolerance development. *J Pharmacol Exp Ther* 219:547-550.
- Seth P, Fei YJ, Li HW, Huang W, Leibach FH, Ganapathy V (1998) Cloning and functional characterization of a sigma receptor from rat brain. *J Neurochem* 70:922-931.
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1975) Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72:3092-3096.
- Shippenberg TS, LeFevour A, Chefer VI (2008) Targeting endogenous mu- and delta-opioid receptor systems for the treatment of drug addiction. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 7:442-453.
- Stein C, Schafer M, Machelska H (2003) Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 9:1003-1008.
- Stein C, Zollner C (2009) Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 495-518.
- von Zastrow M, Svingos A, Haberstock-Debic H, Evans C (2003) Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs. *Curr Opin Neurobiol* 13:348-353.
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev* 81:299-343.

- Wuster M, Rubini P, Schulz R (1981) The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. *Life Sci* 29:1219-1227.
- Yoshimura K, Huidobro-Toro JP, Way EL (1982) Potency of three opiate antagonists to reverse the inhibitory activity of dynorphin, enkephalins and opioid-like alkaloids on the guinea pig ileum. *Eur J Pharmacol* 84:17-24.
- Zhang X, Bao L, Guan JS (2006) Role of delivery and trafficking of delta-opioid peptide receptors in opioid analgesia and tolerance. *Trends Pharmacol Sci* 27:324-329.
- Zukin RS, Zukin SR (1981) Multiple opiate receptors: emerging concepts. *Life Sci* 29:2681-2690.

Erklärung über die eigenständige Abfassung der Arbeit

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren.

Leipzig, den 23. September 2015

A handwritten signature in blue ink, reading "Patrizia Rubini" followed by a stylized flourish.

Patrizia Rubini (Dottore in scienze Biologiche / Univ. Mailand)

Lebenslauf und Publikationsverzeichnis

Lebenslauf

Name: Patrizia Rubini Illes (Dr. rer. nat. Univ. Milano)
 Adresse: Mainzer Straße 5
 04109 Leipzig
 Geburtsdatum, -ort: 28.03.1956, Milano, Italien
 Familienstand: verheiratet
 Nationalität: deutsch

Schulbildung und Studium

1974 Abitur am Humanistischen Gymnasium des Ursulinen-Ordens in Mailand
 1974 - 1979 Studium der Biologie an der Universität Mailand, Italien
 1980 Promotion als Doktor der Naturwissenschaften mit dem Thema „Zentrale Wirkung von Loperamid auf die Darmpassage von Ratten“

Beruflicher Werdegang

1980 - 1981 Stipendiatin der Planck-Gesellschaft am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München
 1981 -1982 wissenschaftliche Angestellte am Institut für Neuropathologie der Universität Freiburg
 1993 - 1994 freiberufliche Mitarbeiterin in der Abteilung für Präklinische Forschung der Fa Gödecke, Freiburg
 1994 - 1995 Wiedereinstiegsstipendium des Landes Baden-Württemberg am Institut für Physiologie der Universität Freiburg
 1995 - 2002 Gründung und Betreiben einer Firma für pharmakologisch-toxikologische Beratung
 2000 - 2000 6 Monate Forschungstätigkeit am Department of Pharmacology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, U.S.A.
 seit 2002 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig.

Seit 2015 „Adjunct Faculty Member“ des Molecular Medicine and Drug Research Centre der University of Karachi, Pakistan

Lehrtätigkeit

seit 2002 Vorlesungen und Kurse im Fach „Allgemeine Pharmakologie und Toxikologie“ für Studenten der Humanmedizin, Universität Leipzig

seit 2008 Praktika für Studenten der Pharmazie, Universität Leipzig

2012-2014 jährliche Betreuung eines POL-Kurses

2012 Vorlesungen und Kurse an der 2nd IBRO School of Neuroscience, Teheran, Iran

Oktober 2010-13 Vorlesungen für Studenten der Humanmedizin an der Tongji University, Medical School, Shanghai, China

Publikationsverzeichnis

1. Schulz R, Wüster M, Rubini P, Herz A (1981) Functional opiate receptors in the guinea-pig ileum: their differentiation by means of selective tolerance development. *J Pharmacol Exp Ther* 219:547-550.
2. Wüster M, Rubini P, Schulz R (1981) The preference of putative pro-enkephalins for different types of opiate receptors. *Life Sci* 29:1219-1227.
3. Rubini P, Schulz R, Wüster M, Herz A (1982) Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 319:142-146.
4. Illes P, Rubini P (1984) Mechanisms of inhibition by opioids and α_2 -adrenergic agonists of noradrenaline release. In: *Regulation of Transmitter Function: Basic and Clinical Aspects*. Eds. E.S. Vizi and K. Magyar, Elsevier, Amsterdam, S. 163-173.
5. Fischer KG, Leipziger J, Rubini P, Nitschke R, Greger R (1996) Attenuation of stimulated Ca^{2+} influx in colonic epithelial (HT29) cells by cAMP. *Pflugers Arch* 432:735-740.
6. Borvendeg SJ, Al-Khrasani M, Rubini P, Fischer W, Allgaier C, Wirkner K, Himmel HH, Gillen C, Illes P (2003) Subsensitivity of P2X₃ but not vanilloid 1 receptors in dorsal root ganglia of rats caused by acute cyclophosphamide cystitis. *Eur J Pharmacol* 474:71-75.
7. Allgaier C, Reinhardt R, Schädlich H, Rubini P, Bauer A, Reichenbach A, Illes P (2004) Somatic and axonal effects of ATP via P2X₂ but not P2X₇ receptors in rat thoracolumbar sympathetic neurones *J Neurochem* 90:359-367.

8. Rubini P, Pinkwart C, Gerevich Z, Nörenberg W, Illes P (2006) Regulation of intracellular Ca^{2+} by P2Y_1 receptors may depend on the developmental stage of cultured rat striatal neurons. *J. Cell Physiol* 209:81-93.
9. Gerevich Z, Zadori Z, Müller C, Wirkner K, Rubini P, Illes P (2007) Metabotropic P2Y receptors inhibit P2X_3 receptor-channels via G protein activation. *Br J Pharmacol* 151:226-236.
10. Wirkner K, Stanchev D, Milius D, Hartmann L, Kato E, Mager PP, Rubini P, Nörenberg W, Illes P (2008) Regulation of the pH sensitivity of human P2X_3 receptors by N-linked glycosylation. *J Neurochem* 107:1216-1224.
11. Rubini P, Engelhardt J, Wirkner K, Illes P (2008) Modulation by D1 and D2 dopamine receptors of ATP-induced release of intracellular Ca^{2+} in cultured rat striatal neurons. *Neurochem Int* 52:113-118.
12. Stanchev D, Blosa M, Milius D, Gerevich Z, Rubini P, Schmalzing G, Eschrich K, Illes P, Wirkner K (2009) Cross-inhibition between native and recombinant P2X_3 and TRPV1 receptors. *Pain* 143:26-36.
13. Rubini P, Milosevic J, Engelhardt J, Al-Khrasani M, Schwarz SC, Schwarz J, Nörenberg W, Illes P (2009) Increase of intracellular Ca^{2+} by adenine and uracil nucleotides in human midbrain-derived neuronal precursor cells. *Cell Calcium* 45:485-498.
14. Köles L, Leichsenring A, Rubini P, Illes P (2011) P2 receptor signaling in neurons and neuroglia of the central nervous system. *Adv Pharmacol* 61:441-493.
15. Bodnar M, Wang H, Riedel T, Hintze S, Kato E, Fallah G, Gröger-Arndt H, Giniatullin R, Grohmann M, Hausmann R, Schmalzing G, Illes P, Rubini P (2011) Amino acid residues constituting the agonist binding site of the human P2X_3 receptor. *J Biol Chem* 286:2739-2749.
16. Hausmann R, Bodnar M, Woltersdorf R, Wang H, Fuchs M, Messemer N, Qin Y, Riedel T, Grohmann M, Nieber K, Schmalzing G, Rubini P*, Illes P (2012) Different subunit stoichiometry of functional $\text{P2X}_2/3$ and $\text{P2X}_2/6$ receptors. *J Biol Chem* 287:13930-13943.
17. Messemer N, Kunert C, Grohmann M, Sobottka H, Nieber K, Zimmermann H, Franke H, Nörenberg W, Straub I, Schaefer M, Riedel T, Illes P, Rubini P (2013) P2X_7 receptors at adult neural progenitor cells of the mouse subventricular zone. *Neuropharmacology* 73C:122-137.
18. Messemer N, Kunert C, Illes P, Rubini P (2013) Co-expression of functional P2X_4 and P2X_7 receptors at adult neural precursor cells of the mouse subventricular zone. *The Open Neuroscience Journal* 7:1-4.
19. Illes P, Messemer N, Rubini P (2013) P2Y receptors in neurogenesis. *WIREs Membr Transp Signal*, 2:43-48.

20. Rubini P, Pagel G, Soghra M, Riedel T, Illes P (2014) Cultured astrocytes but not neurons of the rat hippocampus possess purinergic P2X7 receptors. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 387:943-954.
21. Kowalski M, Hausmann R, Schmid J, Dopychai A, Stephan G, Tang Y, Schmalzing G, Illes P, Rubini P. (2015) Flexible subunit stoichiometry of functional human P2X2/3 heteromeric receptors. *Neuropharmacology* 99:115-130.

Danksagung

Meinem Betreuer am Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München, Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz bedanke ich mich für die Überlassung des Themas und für seine kontinuierliche Hilfestellung bei der Bewältigung inhaltlicher und methodischer Hindernisse. Herr Dr. Michael Wüster hat mich während der Durchführung der Experimente ebenfalls tatkräftig unterstützt; dafür bin ich ihm sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Albert Herz, dem Direktor der Abteilung danke ich dafür, dass er mein Interesse an der Erforschung opioidergischer Mechanismen erweckt und meine Arbeiten stets mit hilfreichen Ratschlägen begleitet hat.

Mein Dank geht an die damaligen Mitarbeiter und Gastwissenschaftler der Abteilung (Dr. Christian Gramsch, Prof. Dr. Volker Höllt, Mark Millan, Henry Osborne, Dr. Richard Przewlocky, Gary Shearman, Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger) für ihre Diskussionsbereitschaft in methodischen und theoretischen Fragestellungen und für ihre freundliche Kooperationsbereitschaft.

Schließlich, besonders bedanken möchte ich mich bei der TA unserer Arbeitsgruppe, Christine Hager, die mir eine unschätzbare Hilfe im Laboralltag war.

Bei Herrn Prof. Dr. Peter Illes und Herrn Prof. Dr. Michael Schaefer am Rudolf-Boehm-Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Leipzig bedanke ich mich auf das Herzlichste für ihre Unterstützung bei der Lösung aller administrativer Probleme und ihrer Förderung in den Bereichen Forschung und Lehre seit der Aufnahme meiner Tätigkeit in Leipzig.