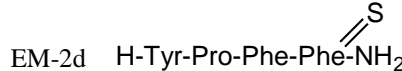
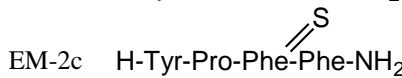
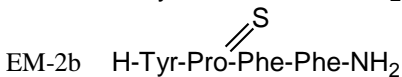
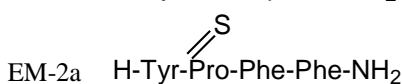
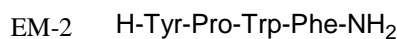
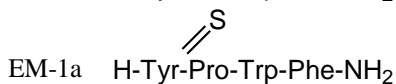


IV. Die biologische Aktivität thioxylierter opioider Peptide

Die Peptidbindung (-CONH-) stellt ein wichtiges Element in der Funktionsweise von biologisch aktiven Peptiden und Proteinen dar. Zur Untersuchung der Zusammenhänge zwischen primärer Struktur, Konformation und biologischer Funktion werden chemisch modifizierter Peptide benutzt. Hierbei ist von großer Bedeutung, daß keine zu drastische Veränderung der Konformation des nativen Peptids vorgenommen wird. Die Einführung einer Thioxo-peptidbindung in ein Peptidrückgrat stellt durch den isosteren Sauerstoff-Schwefel-Austausch eine vergleichsweise geringe Modifizierung der Peptidbindung dar. Diese Modifikation reicht aber oftmals aus, um eine veränderte proteolytische Stabilität und/oder veränderte Bindungsaffinitäten und -selektivitäten an Rezeptoren und damit Auswirkungen auf die Signaltransduktion, welche den biologischen Effekt verändert, zu bedingen.

Als Modellsystem zur Untersuchung der Auswirkungen einer thioxylierten Peptidbindung sowie des Einflusses der Position dieser auf die biologische Aktivität wurden das endogene, für den opioiden μ -Rezeptor selektive Endomorphin-1 (EM-1, Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂) und Endomorphin-2 (EM-2, Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) gewählt. Hierbei wurde die Stabilität der thioxylierten Derivate gegenüber der Dipeptidylpeptidase IV (DP IV), die Affinität an den μ -Rezeptor sowie die Signaltransduktion über cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) als *second messenger* an folgenden Derivaten untersucht: Tyr¹-thioxyliertes EM-1-Derivat (EM-1a) sowie Tyr¹- (EM-2a), Pro²- (EM-2b), Phe³- (EM-2c) und Phe⁴- thioxylierte (EM-2d) Derivaten des EM-2.



thioxylierten Derivate (EM-**2c**, **2d**) bereits nach 20 bis 45 min durch DP IV abgebaut. Die nativen Substrate wurden innerhalb von ca. 90 min hydrolysiert.

Für die DP IV stellen *N*-terminal freie Tripeptide [287] bzw. chromophore Dipeptidamide die minimale Substratstruktur dar. Zwar muß sich in der P₁-Position ein Prolinrest befinden, doch werden mit verringerter Effizienz auch Alanin und Hydroxyprolin akzeptiert [288]. Während Substrate mit P₁ = Prolin bezüglich der P₂-Position absolut L-spezifisch sind, wird bei P₁ = Alanin und D-Aminosäuren oder achiralen Aminosäuren in P₂-Position eine langsame Hydrolyse beobachtet. Eine Hydrolyse erfolgt nur an Substraten, deren Xaa-Pro-Bindung in der *trans*-Konformation vorliegt [289]. Bezüglich der Hydrolyse von thioxylierten Substraten ist bekannt, daß in P₂-Position thioxylierte Substrate eine ca. 600-fache Reduktion der katalytischen Effizienz durch eine Verschlechterung von k_{cat} und K_m um den Faktor 20 bis 30 aufweisen [61]. Jakob konnte erstmals die Hydrolyse eines nichtaktivierten P₁- thioxylierten Substrates zeigen [123].

Während innerhalb von 90 min ein quantitativer Abbau der nativen Endomorphine erfolgte, erhöhte die Thioxylierung sowohl der P₂- als auch der P₁-Position die Abbaustabilität gegenüber der Protease drastisch. Befand sich die Thioxozeptidbindung allerdings C-terminal zu der zu hydrolysierenden Pro-Xaa-Bindung, zeigten diese in P₁'- und P₂'-Position thioxylierten Derivate eine gegenüber den Oxozeptiden deutlich verringerte Abbaustabilität.

4.2. Biologische Aktivität

Sowohl Neuropeptide - einschließlich der endogenen Peptide (Opioide) - als auch exogene Alkaloide (Opiate) üben ihre physiologischen Effekte ursächlich durch Bindung an spezifische membrangebundene Rezeptoren aus. Dadurch können verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert werden, die schließlich zu Effekten, wie der Veränderung des Schmerzempfindens, der Ausschüttung von Neurotransmittern, der Hormonsekretion, der gastrointestinalen Motilität und der respirativen Aktivität, führen [290]. Bekannt sind drei Haupttypen von opioiden Rezeptoren im Hirn und Rückenmark: namentlich μ , δ und κ , wobei der μ -Rezeptor eine bedeutende Rolle in der opioiden Analgesie und der Entwicklung der opioiden Abhängigkeit spielt. Es ist bekannt, daß Endomorphine eine sehr hohe Affinität und Selektivität für die an G-Proteine-gekoppelten- μ -Rezeptoren aufweisen [243, 291, 292].

Um Aussagen über den Einfluß der thioxylierten Peptidbindung auf die opioide Affinität und Aktivität der Endomorphine zu erhalten, wurde die Bindung an den μ -Rezeptor und die Auswirkungen auf einen Teil der nachgeschalteten Signaltransduktion untersucht.

4.2.1. Ergebnisse der Untersuchungen zu Rezeptor-Bindungsaffinität

Da Endomorphine mit hoher Selektivität gegenüber dem δ - und κ -Rezeptor an den μ -Rezeptor binden, konnten zur Untersuchung der Opiatrezeptoraffinität der thioxylierten Endomorphine Rattenhirnmembrane als μ -repräsentatives Testsystem genutzt werden.

Um Aussagen über die Affinität der thioxylierten Endomorphins zu erhalten, wurden unter Verwendung des μ -rezeptorselektiven peptidischen Agonisten (D-Ala², N-Me-Phe⁴, glycinol⁵)-Enkephalin ([³H]DAMGO) als Radioligand, Bindungsstudien an Rattenhirnmembranhomogenaten durchgeführt. Die Ergebnisse der Bindungsstudien für die Endomorphine und das Tyr¹-thioxylierte Peptid sind in Abb. 45 und Tabelle 14 ersichtlich.

Peptid	IC ₅₀ (nM)
EM-1	3
EM-1a	2
EM-2	5.8
EM-2a	3.9
EM-2b	8
EM-2c	80
EM-2d	24

Tabelle 14. IC₅₀-Werte für die Bindung von EM-1 und EM-2, sowie EM-1a und EM-2a, b, c und d an μ -Rezeptoren einer Membranpräparation aus Rattenhirn. Die Bestimmung erfolgte durch Konkurrenzexperimente unter Verwendung des μ -selektiven Agonisten [³H]DAMGO.

Mit Einführung der Thioxyfunktion in die Tyr¹-Position war für die beiden Endomorphine eine leichte Erhöhung der Affinität zum μ -Rezeptor festzustellen. Eine quantitative Verdrängung des Radioliganden [³H]DAMGO erreichten die Peptide bei einer Konzentration von 10⁻⁶ M.

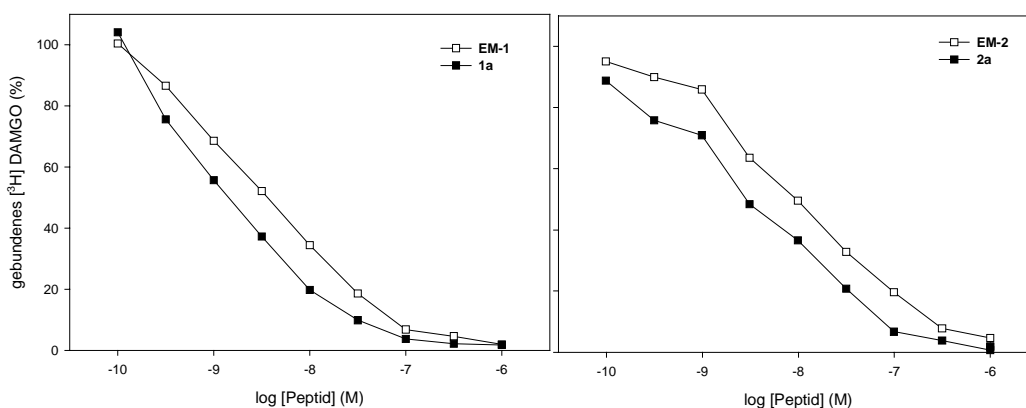


Abb. 45 Konzentrationsabhängige Verdrängung des [³H] DAMGO an Rattenhirnmembranen durch das EM-1 und EM-2 und deren Tyr¹-thioxylierten Derivate. Die abgebildeten Meßpunkte stellen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente dar.

Die Ermittlung des Einflusses der Thioxylierungsposition im Endomorphin erfolgte anhand des Vergleiches der Bindungsaffinitäten der Thioxyderivate EM-2a, b, c und d. Während bei Thioxylierung der Pro²-Bindung (EM-2b) nur eine geringe Abnahme der Bindungsaffinität feststellbar ist, nahm mit

Verlagerung der Thioxofunktion zum C-Terminus hin, die Bindungsaffinität merklich ab (**Abb. 46**) (Tabelle 14).

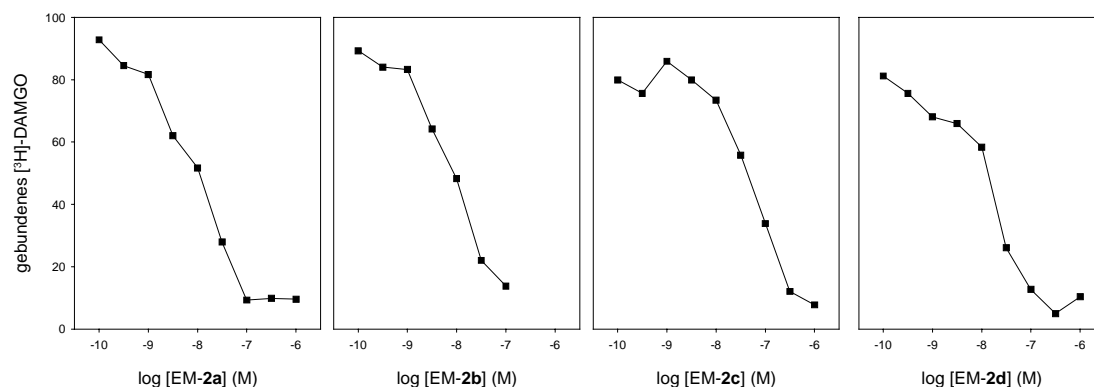


Abb. 46 Konzentrationsabhängige Verdrängung des [³H] DAMGO an Rattenhirnmembranen durch verschiedene thioxylierte EM-2-Derivate. Die abgebildeten Meßpunkte stellen die Mittelwerte dreier unabhängiger Experimente dar.

Während pharmakologische Untersuchungen die opioiden Rezeptoren in drei Klassen (δ -, κ - und μ -Rezeptoren) einteilten, führten Studien an endogenen Opioiden im Säugerhirn zur Identifizierung dreier Hauptklassen opioider Liganden: β -Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (887). β -Endorphine und Enkephaline zeigen sowohl für μ - als auch δ -Rezeptoren Affinität, Dynorphine binden selektiv am κ -Rezeptor. Die 1997 in Rinderhirn entdeckten Endomorphine [243] sind keine Bruchstücke eines bekannten „Vorgänger-Moleküls“ und repräsentieren aufgrund ihrer Aminosäuresequenz eine neue Familie endogener Opiode. Sie zeigen höchste Affinität und Selektivität für den μ -Rezeptor. So sind für das EM-1 eine Affinität von 0.36 μ M bei einer 4000- bis 150000-fachen Selektivität für den μ - gegenüber dem δ -Rezeptor beschrieben [243]. Mit einer Affinität von 0.69 μ M und einer Selektivität von >13000 für den μ -Rezeptor erweist sich das EM-2 als ähnlich μ -affiner Ligand.

Erstmalige Rezeptor-Bindungsstudien mit thioxylierten opioiden Peptiden wurden an Leu-Enkephalinen (Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu) durchgeführt. Clausen *et al.* konnte eine drastische Verminderung der Bindungsaffinität bei den Tyr¹-thioxylierten Derivaten zeigen. Hierbei fiel die Bindungsaffinität des Tyr¹-Thioxoenkephalins auf 2% gegenüber dem nativen Leu-Enkephalin [131]. Von Lajoie *et al.* zur Verdrängung von μ - und δ -spezifischen Radioliganden durchgeführte Bindungsstudien bestätigten für das analoge Thioxopeptid diesen drastischen Abfall der Bindungsaffinität. So verringerte sich die Affinität für den μ -spezifischen Ligand auf 45% und für den δ -spezifischen auf 31% der Affinität des nichtmodifizierten Leu-Enkephalins [54]. Durch Clausen [131] und Lajoie [54] wurden neben der Tyr¹-Position andere Peptidbindungen des Leu-Enkephalins durch einen O/S-Austausch modifiziert. Hierbei wurde festgestellt, daß bei Schwefeleinführung in Position 2 (Gly²) des Leu-Enkephalins eine Erhöhung der Bindungsaffinität auf das 5- bzw. 13-fache

erfolgt. Verschiebt sich die Position des Schwefel zum C-terminalen Ende, zeigen die Thioxoderivate verglichen zum nativen Enkephalin entweder geringere [54] oder leicht erhöhte Affinität [131].

Die Untersuchungen der thioxylierten Endomorphine zeigen ebenfalls einen deutlichen Einfluß der Position der Thioxozeptidbindung auf die Bindungsaffinität an den μ -Rezeptor. Für beide Tyr¹-thioxylierten Derivate (EM-1a, 2a) tritt, verglichen mit den nativen Endomorphinen, eine leicht verbesserte Affinität zum μ -Rezeptor auf. Die Thioxylierung der Pro²-Position (EM-2b) beeinträchtigt die Affinität ebenfalls nicht wesentlich. Sie fällt um das 1.5-fache gegenüber den Oxozeptiden. Die stärkste Beeinträchtigung der Bindungsaffinität ist bei Thioxylierung der Position 3 (Phe³) zu finden. Während das EM-2c eine Verminderung der Affinität um das 12-fache gegenüber dem EM-2 zeigt, sinkt die Bindungsaffinität des EM-2d um das 4-fache. Die Ergebnisse zeigen, daß die aus der Einführung eines Schwefelatoms in den C-terminalen Bereich der Endomorphine resultierenden Änderungen, die Affinität zum μ -Rezeptor deutlich stärker als eine Thioxylierung des N-terminalen Tyr-Pro-Motifs beeinträchtigen. Aus Untersuchungen zur Rezeptorerkennung konnte an β -Casomorphin, Dermorphin, Deltorphin I und Enkephalin gezeigt werden, daß die Reste Tyr¹ und Phe³ (bzw. im Enkephalin Phe⁴) pharmakophore Reste darstellen, wobei das N ^{α} - und die phenolische Gruppe des Tyr¹ sowie die aromatische Seitenkette des Phe für die opioide Aktivität dieser Peptide essentiell sind [293]. Im Falle der hier untersuchten Thioxoendomorphine wurden beide pharmakophore Reste modifiziert, wobei nur im Falle des Phe³ eine Affinitätsverminderung detektierbar war. Im Gegensatz hierzu wiesen die durch Clausen [131] und Lajoie [54] untersuchten thioxylierten Enkephaline bei Thioxylierung des Tyr¹ eine starke Verminderung bis zur Inaktivierung der Bindungsaffinität sowie bei Thioxylierung des Phe⁴ eine nur weniger drastische Änderungen der Affinität auf. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine allgemeingültige Vorhersage der durch Einführung einer Thioxozeptidbindung hervorgerufenen Änderungen der Bindungsaffinität nicht möglich ist.

4.2.2. Ergebnisse der Untersuchungen zur Inhibierung der cAMP-Bildung

Sowohl agonistische als auch antagonistische opioide Liganden weisen eine Bindungsaffinität zum Rezeptor auf. Zur Charakterisierung eines Liganden hinsichtlich seiner agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung ist es erforderlich, entweder die von der Bindung an den Rezeptor initiierte Signaltransduktion oder die wiederum hieraus resultierende biologische Antwort zu analysieren. Hierbei sollten nur Agonisten eine Weiterleitung des Signals, d.h. Signaltransduktion und somit letztendlich auch biologische Effekte zeigen. Der opioide μ -Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren mit sieben transmembranen α -Helices und inhibiert bei Bindung eines agonistischen Liganden an den Rezeptor die Adenylyl-Cyclase (AC), wobei der Spiegel des intrazellulären *second messengers* cAMP gesenkt wird [294].

Im Verlauf der Untersuchungen wurde die Aktivität der thioxylierten Endomorphine anhand der Reduzierung des intrazellulären cAMP-Gehaltes untersucht. Als zelluläres Modellsystem wurde die

Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y verwendet. Für diese ist ein hoher Anteil an μ -Rezeptoren beschrieben. Chakrabarti *et al.* ermittelte ein Expressionsverhältnis der μ - zu δ -Rezeptoren von 5 zu 1, bei einem Rezeptorgehalt von 140 fmol/mg Protein [295].

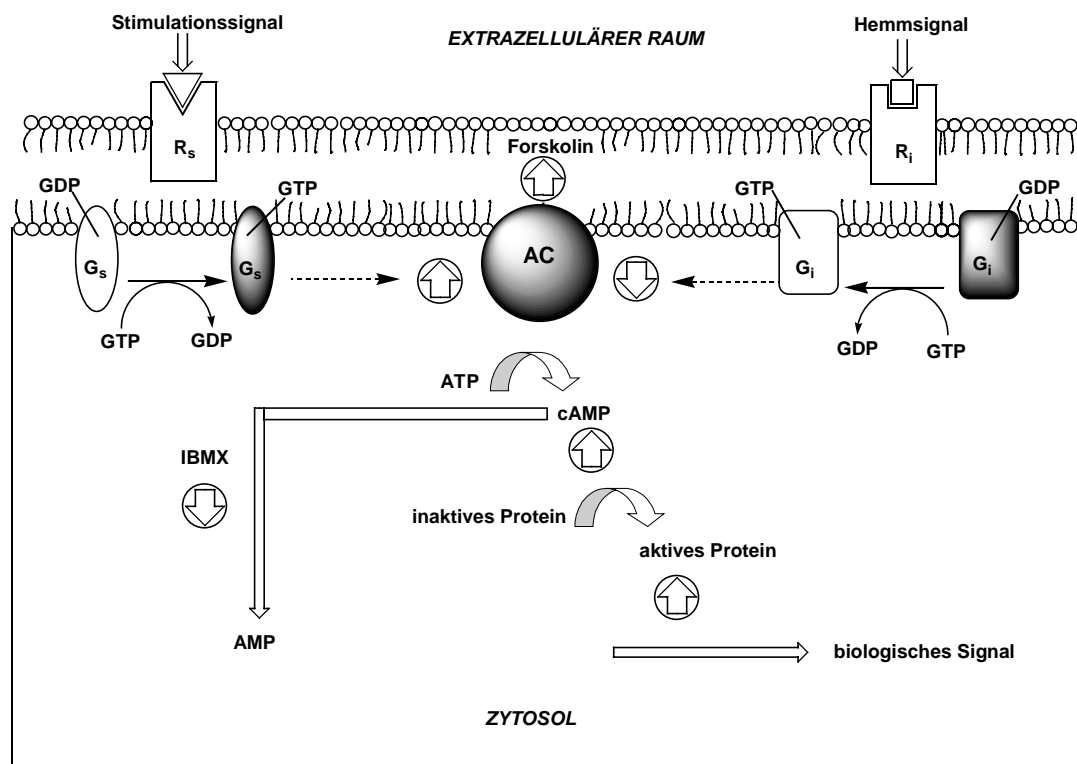


Abb. 47 Der Mechanismus der rezeptorvermittelten Aktivierung/Hemmung von Adenylylcyclase (AC). G-Proteine (Guaninnucleotid-bindenden Proteine) bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten (α , β und γ) und haben im Ruhezustand ein Molekül GDP gebunden. Die Bindung eines Liganden veranlaßt einen stimulatorischen Rezeptor R_s (links), das stimulierende G-Protein (G_s) zu binden. Die $G_{s\alpha}$ -Untereinheit des Trimers $G_{s\alpha}G_{\beta}G_{\gamma}$ tauscht gebundenes GDP gegen GTP aus. Der Komplex aus $G_{s\alpha}$ und GTP dissoziiert dann von $G_{\beta}G_{\gamma}$ und stimuliert die AC, ATP in cAMP umzuwandeln. Das gebildete cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche wiederum verschiedene Proteine phosphoryliert. Bindet der Ligand an einen inhibitorischen Rezeptor R_i (rechts), hemmt der Komplex aus $G_{i\alpha}$ und GTP die Bildung von cAMP durch AC.

Da es bei Bindung eines opioiden Liganden an den μ -Rezeptor zu einer Hemmung der AC durch das inhibitorische G-Protein G_i und somit zu einer Senkung des intrazellulären cAMP-Spiegels kommt, war es meßtechnisch notwendig, den konstitutiven cAMP-Gehalt zu erhöhen. Hierzu wurden unterschiedliche Konzentrationen eines Derivates des Diterpenoids Forskolin und das Prostaglandin E_1 (PGE_1) auf ihre stimulierende Wirkung hin untersucht. Die maximale Erhöhung des cAMP-Spiegels der Zellen konnte bei Stimulierung mit 100 μ M Forskolin erzielt werden. Da jedoch trotz Stimulierung keine ausreichend hohe Differenz der Inhibierungsamplitude erzielt werden konnte, wurden die Zellen einer Behandlung mit all-*trans*-Retinoinsäure unterzogen. Hierbei ist, einhergehend mit einer morphologische Differenzierung, eine Erhöhung des Gehaltes an μ -Rezeptor bestimmbar [296],[297]. Mit einer Konzentration von 10^{-5} M all-*trans*-Retinoinsäure konnte eine optimale morphologische Differenzierung der Zellen erreicht werden (Abb. 48).

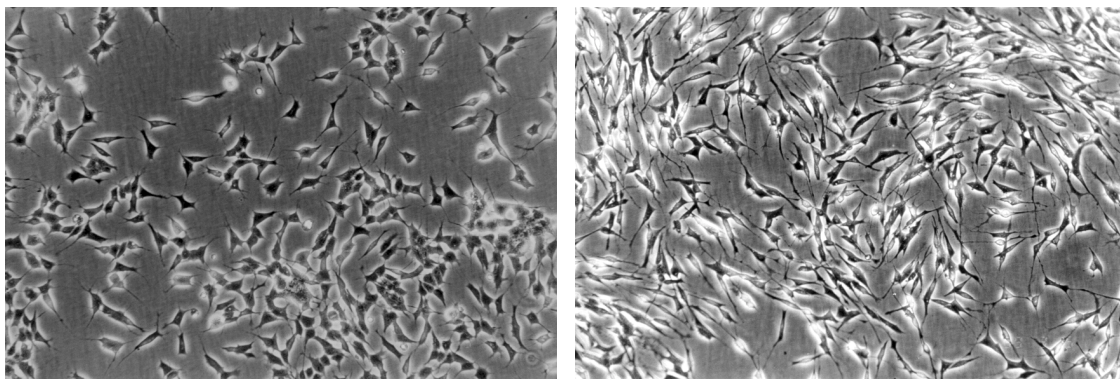


Abb. 48 Erhöhung der morphologischen Differenzierung der SH-SY5Y-Zellen. Die Zellen nach sechstägigem Wachstum ohne (**links**) und nach (**rechts**) Behandlung mit 10^{-5} M all-*trans*-Retinoinsäure.

Bei Vergleich der Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Inhibierung der cAMP-Bildung durch natives und Tyr¹-thioxyliertes Peptid wurden für das EM-1 und 2 ähnliche Inhibierungspotenzen gefunden (Abb. 49).

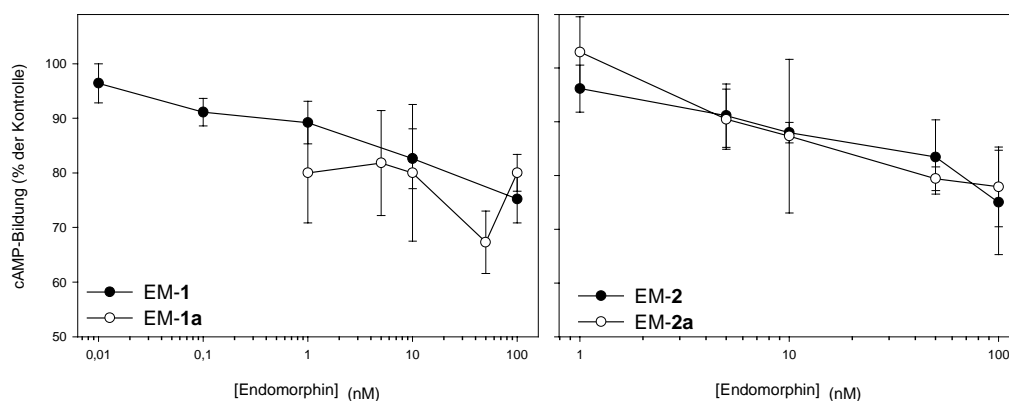


Abb. 49 Konzentrationsabhängige Inhibierung der cAMP-Bildung durch EM-1 und EM-2 und deren Tyr¹-thioxyliertes Derivate. Die Auftragungen stellen die gemittelten Werte aus fünf unabhängigen Experimenten dar.

Die Inhibierung der Bildung des intrazellulären cAMP betrug 10 bis ca. 30%. Maximale Inhibierung wurde für 100 nM Peptid mit 32% gefunden. Die Thioxo-peptide zeigten hierbei gleiche oder sogar gering verbesserte Inhibierungsfähigkeit verglichen mit den nativen Peptiden.

Für die drei weiteren thioxylierten EM-2-Derivate (EM-2b, c, und d) wurden Inhibierungsraten zwischen 8 und 22% gefunden (Abb. 50).

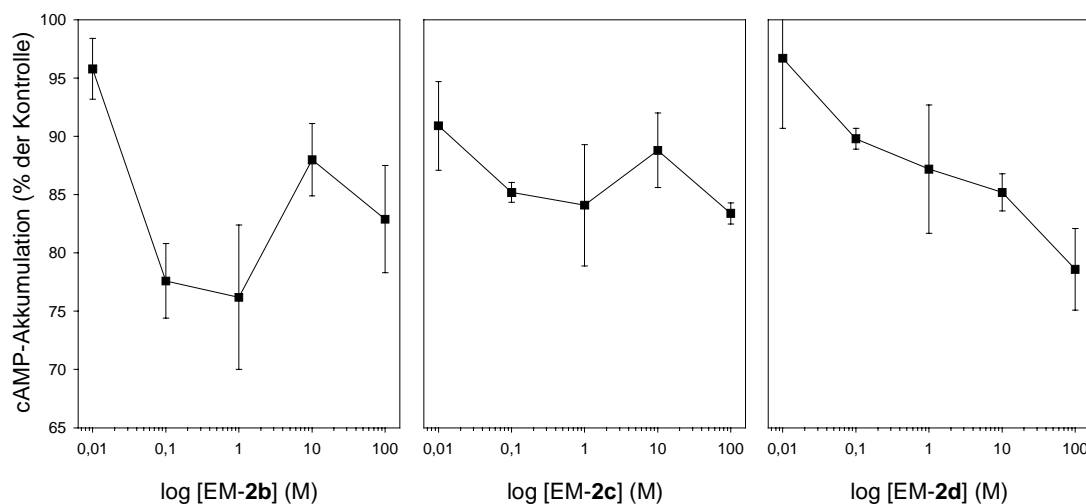


Abb. 50 Konzentrationsabhängige Inhibierung der cAMP-Produktion durch die thioxylierten EM-2-Derivate EM-2b, c und d. Die Auftragungen stellen die gemittelten Werte aus vier unabhängigen Experimenten dar.

Für alle thioxylierten Derivate der EM-1 und EM-2 konnte anhand der Inhibierung der Bildung des *second messengers* cAMP eine Signaltransduktion und somit biologische Aktivität nachgewiesen werden. Hierbei wurden Parallelen zu den an Rattenhirnhomogenaten durchgeführten Untersuchungen zur Bindungsaffinität deutlich. Während die Tyr¹-thioxylierten Peptide im Vergleich zum Oxozeptid sowohl eine geringfügige Erhöhung der Bindungsaffinität als auch eine verstärkte Inhibierung der cAMP-Bildung zeigten, nahm die Bindungsaffinität an den Rezeptor und die Inhibierungspotenz des cAMP mit Verschiebung der Thiozeptidbindung zum C-Terminus des Peptids hin ab. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß die thioxylierten Derivate als agonistische Liganden wirken.

4.2.3. Ergebnisse der Untersuchungen zur isomerspezifischen Inhibierung der cAMP-Bildung

Die thioxylierten Derivate beider nativen Endomorphine, EM-1a und 2a, erwiesen sich als hochaffine Liganden für den μ -Rezeptor, welche Signaltransduktion initiieren. Die durch die thioxylierte Tyr-Pro-Bindung verlangsamte Interkonversion beider Peptide ermöglichte eine präparative Trennung der *cis*- und *trans*-Isomere der Peptide. Zusammen mit der relativen, konformativen Stabilität der *cis*- und *trans*-Isomere waren somit Voraussetzungen geschaffen, die Isomerspezifität der Signaltransduktion des μ -Rezeptors zu charakterisieren.

Trotz der relativen Stabilität der Isomere mußten die Untersuchungen in einem bestimmten Zeit-Temperatur-Regime durchgeführt werden. In Anlehnung an die mittels ¹H-NMR bestimmte Summe der mikroskopischen Isomerisierungskonstanten und der Extrapolation über den Zeitraum der Experimente, wurden die isomerspezifischen Untersuchungen mit einem durchschnittlichen Gehalt von 90-95% an jeweiligem *cis*- bzw. *trans*-Isomer durchgeführt. Mittels ¹H-NMR wurde für das äquilibrierten EM-1a ein *cis*-Gehalt von 31% und für das EM-2a von 25 % bestimmt.

Sowohl EM-1a als auch EM-2a zeigten im Konzentrationsbereich von 1 und 10 nM Peptid isomerspezifische Inhibierungen. Die geringste Inhibierung der cAMP-Produktion wurde bei beiden Peptiden durch das *trans*-Isomer erreicht. Während die *cis*-Isomere die stärkste Inhibierungspotenz aufwiesen, lagen die Werte der äquilibrierten Peptide zwischen den der beiden Isomere.

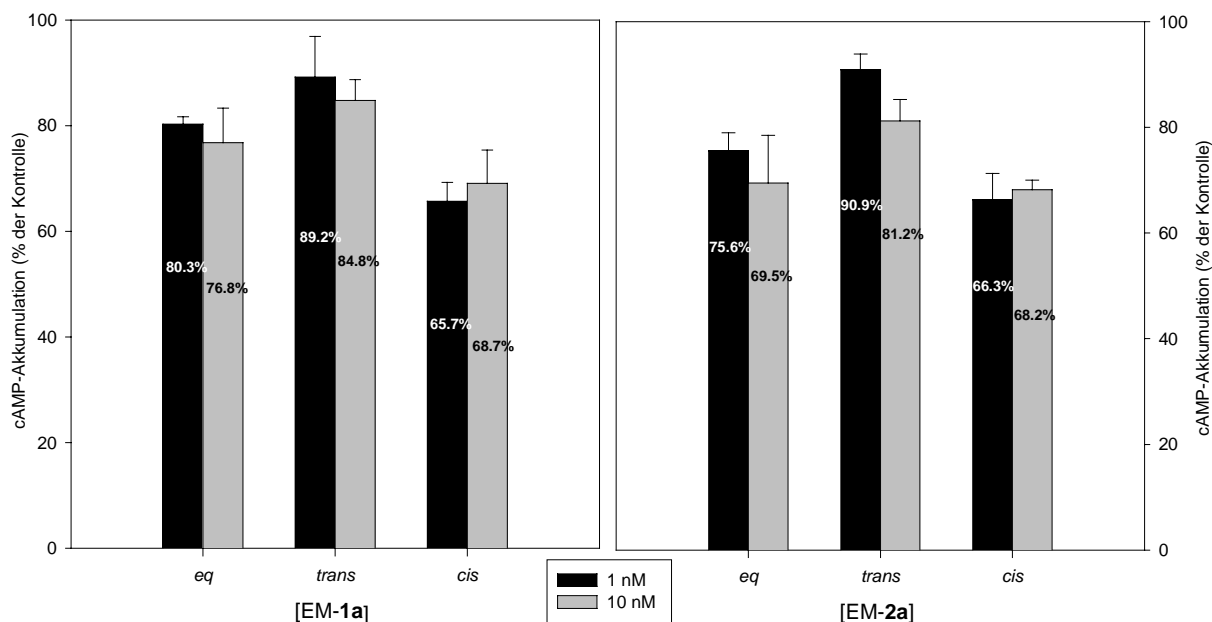


Abb. 51 Vergleich der isomerspezifischen Inhibierung des cAMP-Spiegels durch die *cis*- und *trans*-Isomere und die äquilibrierten Proben des EM-1a (links) und EM-2a (rechts) der Peptidkonzentrationen 1 (■) und 10 nM (□). Die Auftragung zeigt Ergebnisse eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Parallelversuchen.

Die dreidimensionale Struktur eines Liganden stellt eine wichtige Voraussetzung zur Bindung an den μ -, δ - oder auch an den κ -Rezeptor dar. Diese sogenannte „bioaktive Konformation“ weist für viele opioide Liganden des μ -Rezeptors eine bestimmte Anordnung von pharmakophoren Gruppen innerhalb der *N*-terminalen Signalsequenz auf. Topochemische Untersuchungen an μ -selektiven Casomorphinderivaten, wie Morpiceptin (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-NH₂) und β -Casomorphin-5 (H-Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-OH), identifizierten Tyr¹ und Phe³ als pharmakophore Reste [293, 298]. Da die Verknüpfung beider Aminosäuren über die Iminosäure Pro² erfolgt, muß die *cis/trans*-Isomerisierung der Tyr¹-Pro²-Bindung und hiermit die Konformation der *N*-terminalen Sequenz in der Rezeptorerkennung eine entscheidende Rolle spielen [293]. Bisher konnten Untersuchungen zur Isomerspezifität des μ -Rezeptors nur über eine chemische Modifizierung der *N*-terminalen Erkennungssequenz durch den Einbau nicht-natürlicher Aminosäuren bzw. Aminosäuremimetika erreicht werden. Die hierbei erfolgende Eliminierung der *cis/trans*-Isomerisierung resultierte in den Erhalt von Derivaten mit einer *cis*- bzw. *trans*-ähnlichen Anordnung der pharmakophoren Reste. Anhand von Rezeptor-Ligand-Untersuchungen mit derartig modifizierten Derivaten des β -Casomorphin-5 [299] und des Morpiceptins [293, 298, 300] wurde für die biologische Aktivität dieser μ -Rezeptor-Liganden die Erfordernis einer *cis*-Konformation der Tyr¹-Pro²-Bindung

vorhergesagt. Während für Endomorphine bislang keine Untersuchungen zu isomerspezifischen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen vorliegen, wurde anhand von NMR-Untersuchungen und Modellberechnungen von Podlogar *et al.* für das EM-1 die *trans*-Konformation als biologisch aktiv vorgeschlagen [301].

Der O/S-Austausch innerhalb der Tyr¹-Pro²-Bindung stellt - im Gegensatz zur Einführung von Aminosäuremimetika - unter Erhalt der nativen Peptidsequenz und Chiralität eine geringe Änderung der lokalen Geometrie dar, wobei die verlangsamte Isomerisierung der Thioxopeptidbindung den Erhalt der reinen *cis*- und *trans*-Konformere ermöglicht. Die zur Charakterisierung der Isomerspezifität der Signaltransduktion durchgeführten Untersuchungen zeigen deutliche Unterschiede in der Inhibierung der cAMP-Bildung durch die *cis*- und *trans*-Isomere. Während das *trans*-Isomer beider Endomorphinderivate nur eine geringe Hemmung der cAMP-Produktion bewirkt, zeigt das *cis*-Isomer die stärkste Inhibierung. Die äquilibrierten Proben beider Endomorphine liegen in ihrer Inhibierungsfähigkeit zwischen den beiden Konformeren. Die starke Inhibierung durch das *cis*-Isomer - verbunden mit der sehr geringen Inhibierung durch das *trans*-Isomer - zeigt, daß das *cis*-Isomer die Signaltransduktion initiiert und somit für die Endomorphine das bioaktive Konformer darstellt. Da bei höheren Peptidkonzentrationen (10 nM) durch die spontane *cis/trans*-Isomerisierung eine größere Menge *cis*-Isomer entsteht, ist gegenüber Peptidkonzentrationen von 1 nM eine verbesserte Hemmung der cAMP-Bildung durch das *trans*-Isomer festzustellen.