

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Angefertigt am Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Jena,
Friedrich Schiller Universität Jena
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Stefan Schulz

Einfluss der Agonist-selektiven Phosphorylierung
des μ -Opioid-Rezeptors
auf die Antinozizeption und das Suchtverhalten
nach Opioid-Applikation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Laura Pauline Glück
aus Regensburg

München 2014

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent/en: Priv.-Doz. Dr. Sabine André
Univ.-Prof. Dr. Walter Hermanns
Univ.-Prof. Dr. Bernhard Aigner
Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 08.02.2014

Für meine Familie

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Geschichte der Opiode	1
1.2	Wirkungen der Opiode	2
1.3	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren	7
1.3.1	Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	7
1.3.2	Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	10
1.3.3	Internalisierung und Resensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren	16
1.4	Opioid-Rezeptoren	17
1.4.1	μ -Opioid-Rezeptor	18
1.4.2	Regulation von Effektormolekülen durch den μ -Opioid-Rezeptor	19
1.5	Toleranz	21
1.6	Abhängigkeit	22
1.7	Mausmodelle	25
1.7.1	Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse	26
1.7.2	GRK-defiziente Mäuse	27
2	ZIELSETZUNG	29
3	MATERIAL	30
3.1	Chemikalien	30
3.2	Antikörper	30
3.3	Versuchstiere	31
4	METHODEN	31
4.1	Tierversuche	31
4.1.1	Ermittlung der Antinozizeption	32

4.1.2	Ermittlung der akuten Toleranz.....	33
4.1.3	Ermittlung der chronischen Toleranz und physischen Abhängigkeit.....	34
4.1.4	Ermittlung der Opioid-induzierten Belohnungseffekte und deren Extinktion.....	35
4.2	Biochemische Methoden	36
4.2.1	Anreicherung der Rezeptorproteine mittels Immunpräzipitation	36
4.2.2	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	37
4.2.3	Western-Blot-Analyse	38
4.2.4	Immundetektion.....	38
4.2.5	Quantifizierung der Rezeptorphosphorylierung	39
4.3	Datenauswertung und statistische Analyse.....	39
5	ERGEBNISSE	40
5.1	Agonist-selektive Phosphorylierung des μ-Opioid-Rezeptors <i>in vivo</i>.....	40
5.2	Antinozizeption GRK3- und GRK5-defizienter Mäuse im <i>hot plate</i>-Test	43
5.2.1	Basales Schmerzempfinden GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse.....	43
5.2.2	Akute antinozizeptive Reaktionen GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach Opioid-Applikation	44
5.2.3	Akute analgetische Toleranz GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach Opioid-Applikation.....	47
5.2.4	Antinozizeption und Entzugssymptomatik GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach chronischer Opioid-Applikation	51
5.3	Opioid-vermittelte Belohnungseffekte bei GRK5- und GRK3-defizienten Mäusen sowie MOR^{S375A/S375A}-Mäusen	56
5.3.1	<i>Conditioned place preference</i> und Extinktion der Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen nach Konditionierung mit Substanzen mit suchterzeugendem Charakter	56
5.3.2	<i>Conditioned place preference</i> und Extinktion der Präferenz bei GRK3-defizienten Mäusen nach Konditionierung mit Morphin und Fentanyl.....	59
5.3.3	<i>Conditioned place preference</i> und Extinktion der Präferenz bei MOR ^{S375A/S375A} -Mäusen nach Konditionierung mit Morphin.....	61

5.3.4	Unterbindung Morphin-induzierter Belohnungseffekte durch Inhibierung des ERK-Signallings	62
6	DISKUSSION.....	65
7	ZUSAMMENFASSUNG	78
8	SUMMARY	81
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	83
10	ANHANG.....	105
10.1	Abbildungsverzeichnis	105
10.2	Abkürzungsverzeichnis.....	108
10.3	Antikörper.....	110
11	DANKSAGUNG.....	111

1 Einleitung

1.1 Geschichte der Opioide

Opium dient seit Jahrtausenden der Behandlung von Schmerzen, wird aber auch aufgrund seiner psychotropen Wirkungen eingesetzt. Es entspricht dem getrockneten Milchsaft unreifer Samenkapseln des Schlafmohns, *Papaver somniferum*, wobei Morphin das Hauptalkaloid des Opiums darstellt. Der Gehalt an Morphin im Rohopium beträgt zwischen 9 und 18 %, weitere wirksame Bestandteile stellen Noscapin (2 – 12 %), Codein (0,2 – 6 %), Thebain (0,2 – 1 %), Papaverin (0,1 – 3 %) und Narcein (0,1 – 0,7 %) dar.

Bereits 4000 v. Chr. wurde in Keilschriften die Herstellung pharmazeutischer Produkte aus dieser Mohnart beschrieben. Archäologische Funde aus der Antike, welche angeritzte Mohnkapseln zeigen, zeugen davon, dass man sich selbst im alten Griechenland Opium sowohl zu medizinischen aber auch zu euphorisierenden Zwecken bei religiösen Ritualen zu Nutze gemacht hat. Ebenso schienen die Römer Gefallen an dem Gebrauch des Mohnsafts zu finden, sie mischten Opium mit Wein zu einem Getränk, das einen euphorisierenden Rausch herbeiführt. Selbst bekannte Vertreter der römischen Gesellschaft wie Nero und Mark Aurel nahmen regelmäßig Theriak, ein „Allheilmittel“, unter anderem versetzt mit Opium, ein. Der Leibarzt des Letzteren, Galen von Pergamon, erkannte aber auch die bedenklichen Folgen des Dauergebrauchs.

1806 erst isolierte der Apotheker Friedrich Sertürner einen aktiven Inhaltsstoff des Opiums, Morphin, und benannte es nach dem Gott der Träume, Morpheus. Daraufhin konnte reines Morphin in großen Mengen hergestellt werden und kam damals wie heute insbesondere bei Operationen und der Behandlung von postoperativen und schweren Schmerzen zum Einsatz. Auch als Substanz zur Prämedikation bei Anästhesien wurde es genutzt. Jedoch hat Morphin ein ebenso starkes Missbrauchspotential wie Opium und ist zudem auch nicht risikolos im Gebrauch. Infolgedessen wurde intensiv nach einem sicheren, effektiveren Opiat ohne suchterzeugende Wirkung geforscht. Nachdem es dem Chemiker Charles Romley Alder Wright 1873 gelungen war, aus Morphin und Essigsäure Diacetylmorphin zu synthetisieren, ließ die Aktiengesellschaft Farbenfabriken Friedrich Bayer im Elberfelder Stammwerk (heutige Bayer AG) dieses als Heroin bezeichnet patentieren. Ab dem Jahre 1898 wurde Heroin synthetisiert und massiv als orales Antitussivum und Analgetikum vermarktet, das potenter sein sollte als Morphin, jedoch ohne dessen suchterzeugenden Charakter.

Allerdings rührten sich schon 1904 erste Stimmen, die bezüglich Heroin ein noch größeres Abhängigkeitspotential sahen als bei Morphin. Aufgrund seiner hohen Lipophilie flutet

Heroin insbesondere bei intravenöser Applikation sehr schnell im Gehirn an, was ursächlich für den initialen „Kick“ ist. Es wird vollständig zu Morphin deacetyliert und entfaltet infolgedessen eine circa viermal stärkere Wirksamkeit als Morphin. Gerade wegen seiner Wirkungsverstärkung um ein Vielfaches nach intravenöser Gabe, stiegen viele Opioid-Abhängige auf das einfach erhältliche Heroin um. 1931 stellte Bayer den Vertrieb des Heroins ein, allerdings war es bis 1958 noch frei erhältlich und wurde erst im Jahre 1971 in Deutschland verboten.

Die gewaltige Bedeutung Opiums und Morphins sowie die damit verbundene Geschichte Heroins sind beispielhaft für die große Notwendigkeit, eine Substanz zu entdecken, die eine ähnlich starke Analgesie wie Morphin entfaltet, dabei aber keine euphorisierende oder suchterzeugende Wirkung besitzt. In der Hoffnung, dieser Forderung nachzukommen, wurden im Laufe der Zeit zahlreiche voll- oder teilsynthetische Opioide entwickelt, jedoch ist gegenwärtig kein Opioid verfügbar, das die oben genannten Kriterien erfüllt.

1.2 Wirkungen der Opioide

Opioide werden definiert als „alle natürlichen, halbsynthetischen und synthetischen Wirkstoffe, die ihre Wirkung durch Bindung an die Opioid-Rezeptoren entfalten und durch Naloxon spezifisch antagonisiert werden“ (Gartner & Watzke, 2006). Nach wie vor stellen Opioide die wichtigsten Arzneimittel zur Behandlung mittelschwerer bis schwerer Schmerzen dar. Sie hemmen im peripheren und zentralen Nervensystem die Schmerzentstehung, -weiterleitung und -verarbeitung, zudem verändern sie die Wahrnehmung von Schmerzen (Reisine & Bell, 1993).

Als erste endogene Opioid-Peptide wurden die Enkephaline Met- und Leu-Enkephalin entdeckt (Hughes et al., 1975), hierauf folgten die β -Endorphine und die Dynorphine (Goldstein et al., 1979; Li & Chung, 1976; Li et al., 1976). Sowohl Dynorphin A und B, welche agonistisch am κ -Opioid-Rezeptor wirken, wie auch Met- und Leu-Enkephalin, Agonisten am δ -Opioid-Rezeptor, werden posttranslational aus Prodynorphin, respektive Proenkephalin, gebildet. β -Endorphin bestehend aus 31 Aminosäuren wird aus dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin synthetisiert und bindet sowohl am μ - als auch am δ -Opioid-Rezeptor. Eine Selektivität für den μ -Opioid-Rezeptor besitzen dagegen die erst später entdeckten Opioid-Peptide Endomorphin 1 und Endomorphin 2 (Zadina et al., 1997), die allerdings keine strukturelle Ähnlichkeit mit β -Endorphin aufweisen.

Endogene Opioide werden maßgeblich im Hypothalamus und in der Hypophyse produziert und dienen vor allem der körpereigenen Unterdrückung von Schmerz- und Hungergefühlen.

Daneben sind sie auch von Bedeutung im Hinblick auf die Regulation der Atmung, des Wärmehaushaltes, im Zusammenhang mit Immunreaktionen und gastrointestinalen Funktionen (Peterson et al., 1993; Rowbotham, 2001; Sibinga & Goldstein, 1988).

Auch exogene Opioide entfalten ihre Wirkungen über das endogene, peptiderge Opioid-System. Aufgrund ihrer Vormachtstellung bezüglich der Behandlung schwerer Schmerzen sind diese Substanzen von beachtlicher klinischer Relevanz (Freye & Latasch, 2003; Raehal et al., 2011). Gegenwärtig unterscheidet man drei Opioid-Rezeptor-Typen; diese werden als μ -Opioid-Rezeptor (μ für Morphin), κ -Opioid-Rezeptor (κ für Ketocyclazocin) und δ -Opioid-Rezeptor (δ für Vas deferens) bezeichnet (Dhawan et al., 1996). Opioid-Analgetika weisen eine gemeinsame Präferenz für μ -Opioid-Rezeptoren auf, welche vorwiegend im Zentralen Nervensystem und Magen-Darm-Trakt lokalisiert sind (Heinl et al., 2011; Peng et al., 2012).

Die herausragende Bedeutung der μ -Opioid-Rezeptoren im Hinblick auf die - erwünschte - Vermittlung der Analgesie nach Morphin-Applikation, aber auch bezüglich unerwünschter Wirkungen wie Obstipation, Toleranzentwicklung und Atemdepression, konnte anhand von Experimenten mit μ -Opioid-Rezeptor-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Bei diesen Tieren rief eine Morphin-Applikation keine analgetische Wirkung hervor (Kieffer, 1999; Matthes et al., 1996; Sora et al., 1997), ebenso blieben die mit einer Morphin-Applikation einhergehenden unerwünschten Wirkungen aus (Matthes et al., 1996).

Basierend auf ihrer Bindungsaffinität am Rezeptor und ihrer biologischen Wirksamkeit werden Opioide in reine Agonisten (hohe intrinsische Aktivität), partielle Agonisten (geringe intrinsische Aktivität) und reine Antagonisten (keine intrinsische Aktivität) eingeteilt. Im Folgenden soll kurz auf die wichtigsten Charakteristika der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Agonisten und Antagonisten am μ -Opioid-Rezeptor eingegangen werden.

Morphin

Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei Morphin um eine natürlich vorkommende Verbindung, welche als pflanzlicher Sekundärstoff aus Opium, dessen Hauptalkaloid es darstellt, gewonnen werden kann. Noch heute wird Morphin aus Opium isoliert und aufgearbeitet, da eine Totalsynthese der Substanz aufgrund seiner komplexen chemischen Struktur sehr aufwendig ist. Morphin wirkt als partieller Agonist am μ -Opioid-Rezeptor, an welchem es den Großteil seiner Wirkung entfaltet (Kieffer, 1999; Matthes et al., 1996; Sora et al., 1997). Die Bindung Morphins am μ -Opioid-Rezeptor bedingt eine Aktivierung desselben, was in einer Inhibition der Signalübertragung in Gehirn und Rückenmark resultiert. Neben

der analgetischen Wirkung kann die Applikation von Morphin zudem auch zu Obstipation, Atemdepression, Histaminausschüttung und aufgrund der Stimulation von Chemorezeptoren des Brechzentrums zu Nausea und Emesis führen (Trescot et al., 2008).

Morphin wird relativ langsam aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert und unterliegt einem ausgeprägten First-pass-Effekt. Bei nicht retardierten Formulierungen beträgt die orale Bioverfügbarkeit lediglich etwa 25%. In der Leber wird das Alkaloid durch das Enzym UGT2B7 (UDP-Glucuronosyltransferase-2B7) jedoch in großem Umfang zu Morphin-6-glucuronid metabolisiert (Donnelly et al., 2002), welches die Blut-Hirn-Schranke ebenfalls überwindet und wie Morphin agonistisch am μ -Opioid-Rezeptor wirkt. Daneben entsteht als weiteres Stoffwechselprodukt der unwirksame Hauptmetabolit Morphin-3-glucuronid. Beide Glucuronide sind gut wasserlöslich und werden renal ausgeschieden (Lotsch & Geisslinger, 2001).

Bei Mäusen beträgt die Eliminationshalbwertszeit Morphins etwa zwei Stunden, bei Menschen 2,5 bis drei Stunden (Aceto et al., 1997; Inturrisi, 2002).

Als Grundstruktur enthält Morphin ein teilhydriertes Phenanthren mit je einer Hydroxylgruppe an den Positionen 3 und 6. Der tertiäre Stickstoff der Substanz soll maßgeblich für die analgetische Potenz verantwortlich sein, da nach Umwandlung in eine quaternäre Verbindung, aber auch bei Verlängerung des Methylsubstituenten die analgetische Wirkung des Morphins stark abnimmt (Trescot et al., 2008).

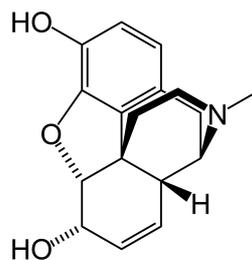


Abbildung 1-1. Strukturformel Morphins

Als Prototyp der Opioiden dient Morphin als Bezugssubstanz für die Berechnung der analgetischen Potenz von Opioiden und wird mit einer Potenz von 1 bewertet.

Fentanyl

Fentanyl, ein synthetisches Opioid, wirkt am μ -Opioid-Rezeptor als reiner Agonist und wird zu den am stärksten wirksamen Opioiden gezählt. Aufgrund seiner starken Lipophilie

(Trescot et al., 2008) flutet es sehr schnell im Zentralen Nervensystem an, woraufhin eine rasche Umverteilung in andere Gewebe erfolgt. Mit einer analgetischen Potenz von 125 ist Fentanyl mehr als 100-fach stärker analgetisch wirksam als Morphin und hat eine Kontext-sensitive Halbwertszeit, welche nach parenteraler Gabe wesentlich kürzer ist als die des Morphins. Dieses Charakteristikum macht es gut steuerbar, weshalb es als starkes Analgetikum parenteral vor allem in der Narkoseprämedikation und intraoperativ Einsatz findet (Inturrisi, 2002). Daneben stehen auch transdermale sowie transbukale Formulierungen zur Verfügung.

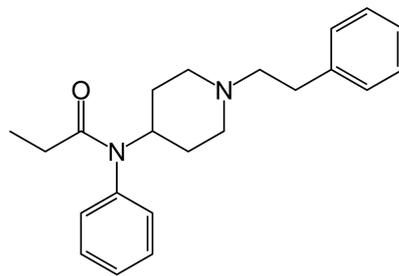


Abbildung 1-2. Strukturformel von Fentanyl

Fentanyl wird maßgeblich in der Leber durch CYP3A4 zu den unwirksamen Metaboliten Hydroxyfentanyl und Norfentanyl abgebaut (Feierman & Lasker, 1996).

Etonitazen

Das Benzimidazol-Derivat Etonitazen (2-[2-(4-Ethoxybenzyl)-5-nitro-1-benzimidazolyl]-triethylamin) ist in der Bundesrepublik Deutschland als nicht verkehrsfähiges Betäubungsmittel eingestuft und wird ausschließlich in der Opioid-Forschung verwendet.

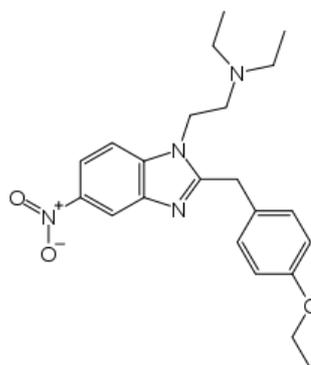


Abbildung 1-3. Strukturformel von Etonitazen

Es handelt sich dabei um einen sehr potenten, selektiven Agonisten am μ -Opioid-Rezeptor, welcher etwa 1000-fach stärker wirksam ist als Morphin, im Gegensatz zu diesem jedoch eine robuste Phosphorylierung und Internalisierung des μ -Opioid-Rezeptors auslöst. Aufgrund ihrer weitaus höheren Affinität zum μ_1 -Opioid-Rezeptor im Vergleich zu Morphin findet diese Substanz häufig Einsatz, wenn es grundlegende Prozesse der Toleranzentwicklung *in vivo* aufzuklären gilt (Moolten et al., 1993). Etonitazen ist stark lipophil, was zur Konsequenz hat, dass es rasch die Blut-Hirn-Schranke überwindet und selektiv an den Opioid-Rezeptoren im Zentralen Nervensystem seine Wirkung entfaltet (Sala et al., 1992).

Naloxon

Naloxon stellt einen der gebräuchlichsten Opioid-Rezeptor-Antagonisten dar. Es wirkt an μ -, δ - und κ -Opioid-Rezeptoren als kompetitiver Antagonist (Raynor et al., 1994) und weist eine deutlich höhere Affinität für diese Rezeptoren auf als alle klinisch eingesetzten Agonisten. Mit Hilfe von Naloxon besteht daher die Möglichkeit alle erwünschten und unerwünschten Wirkungen der Opioide aufzuheben, was ihm in der klinischen Praxis eine große Bedeutung zukommen lässt (Inturrisi, 2002). Aufgrund seiner schlechten Bioverfügbarkeit nach oraler Gabe wird Naloxon maßgeblich parenteral verabreicht um schnellstmöglich akute Wirkungen von Opioiden zu antagonisieren; dieser Applikationsweg bedingt einen raschen Wirkungseintritt, der allerdings von kurzer Dauer ist (Trescot et al., 2008). Naloxon findet daher hauptsächlich in der Notfallmedizin als Antidot bei Opioid-Vergiftungen seinen Einsatz, da es auch die Opioid-induzierte Atemdepression zuverlässig aufzuheben vermag (Inturrisi, 2002).

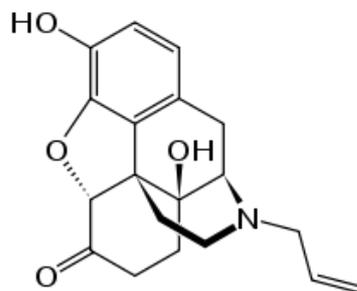


Abbildung 1-4. Strukturformel von Naloxon

Trotz des Jahrtausende andauernden Gebrauchs von Opium und der im letzten Jahrhundert sukzessive folgenden Entdeckung neuer Opioid-Analgetika konnte erst in den 60er und 70er

Jahren des letzten Jahrhunderts die Vielfältigkeit der Opioid-Wirkungen mit der Identifizierung unterschiedlicher Opioid-Rezeptoren genauer entschlüsselt werden. Den drei Opioid-Rezeptor-Typen μ -Opioid-Rezeptor, κ -Opioid-Rezeptor und δ -Opioid-Rezeptor ist eine starke Homologie in den transmembranären Domänen gemein und sie zählen zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR; *G protein-coupled receptors*) vom Typ A (Childers, 1991; Gilman, 1987; Waldhoer et al., 2004).

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen mit weit über 1000 zugehörigen Mitgliedern die facettenreichste Gruppe von Signalproteinen dar (Bockaert & Pin, 1999). Eine Vielzahl unterschiedlichster physiologischer Prozesse sind der Regulierung durch diese Rezeptoren unterworfen, demzufolge agieren sie als Rezeptoren für sensorische Reize wie Schmerz, Licht und Gerüche, aber auch für zahlreiche Neurotransmitter, Hormone, Chemokine oder Calciumionen (Pierce et al., 2002). Diese Diversität macht sie zur wichtigsten pharmakologischen Zielstruktur; so entfalten 30-50% aller verfügbaren Medikamente ihre Wirkung über GPCRs (Groom & Hopkins, 2002; Gruber et al., 2010). Bisher konnte jedoch für circa ein Drittel der GPCRs weder ein Agonist identifiziert, noch konnte ihre Funktion aufgeklärt werden (Bockaert & Pin, 1999; Gruber et al., 2010). Strukturell spezifisch für alle GPCRs sind die durch drei extrazelluläre und drei intrazelluläre Schleifen verbundenen sieben helikalen Transmembrandomänen mit einem extrazellulären Amino-Terminus und einem intrazellulären Carboxyl-Terminus. Daneben ist ein weiteres Charakteristikum der GPCRs die Liganden-induzierte Kopplung an intrazelluläre heterotrimere G-Proteine, welche daraufhin Signale in das Zellinnere weiterleiten (Lohse, 1993; Pierce & Lefkowitz, 2001).

1.3.1 Signaltransduktion G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Auf die Aktivierung des Rezeptors durch einen extrazellulären Stimulus folgt die damit verbundene Signalweiterleitung in das Innere der Zelle, woraus eine anschließende Aktivierung intrazellulärer Effektormoleküle resultiert. Diese Signalweiterleitung wird durch die Aktivierung von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteine) und β -Arrestinen vermittelt (Rajagopal et al., 2010). Heterotrimere G-Proteine stellen integrale Membranproteine dar und werden anhand der Funktionalität ihrer $G\alpha$ -Untereinheit in G_s , G_i , G_q und G_{12} eingeteilt.

Tabelle 1-1. Klassifizierung heterotrimerer G-Proteine: Beispiele der Isoform-spezifischen Regulation von Effektormolekülen

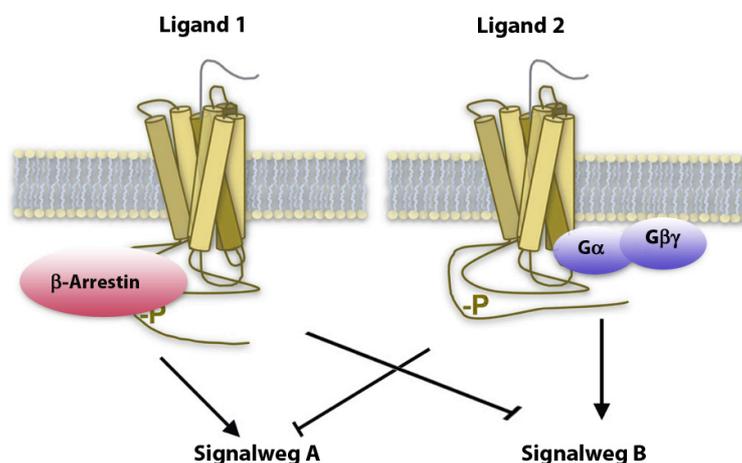
KLASSE	EFFEKTOREN
$G_s (G\alpha_s, G\alpha_{olf})$	↑ Adenylylcyclase ↑ Calcium-Kanäle ↓ Natrium-Kanäle
$G_i (G\alpha_{i1}, G\alpha_{i2}, G\alpha_{i3}, G\alpha_o, G\alpha_z)$	↑ Kalium-Kanäle ↑ Phospholipase C ↑ Phospholipase A ₂ ↑ cGMP-spezifische Phosphodiesterasen ↓ Adenylylcyclase ↓ Calcium-Kanäle
$G_{q/11} (G\alpha_q, G\alpha_{11}, G\alpha_{14}, G\alpha_{15}, G\alpha_{16})$	↑ Phospholipase C
$G\beta\gamma$	↑ GIRK ↑ Adenylylcyclase ↑ Phospholipase C ↑ Phosphatidylinositol-3-Kinase

Modifiziert nach (Pierce et al., 2002)

Abkürzungen: G_i , inhibitorisches G-Protein; G_s , stimulierendes G-Protein; G_{olf} olfaktorisches G-Protein; G_q , historisch bedingte, alphabetische Bezeichnung einer G-Protein-Subfamilie; cGMP, cyclisches Guanosinmonophosphat; GIRK, *G protein-activated inwardly rectifying potassium channel* ↑, Aktivierung; ↓ Inaktivierung

Alle G-Proteine bestehen aus den drei Untereinheiten α (36 - 52 kDa), β (35 - 36 kDa) und γ (8 - 10 kDa), wobei für die α -Untereinheit 21, für die β -Untereinheit vier und für die γ -Untereinheit sechs Subtypen bekannt sind. Die β - und γ -Untereinheiten sind dabei fest miteinander assoziiert und bilden einen stabilen Komplex, welcher als funktionelle Einheit agiert (Downes & Gautam, 1999; Hepler & Gilman, 1992). Die α -Untereinheit stellt eine Bindungsstelle für Guanosin-5'-triphosphat (GTP) und Guanosin-5'-diphosphat (GDP) dar und ist im inaktiven Zustand des Rezeptors an den $\beta\gamma$ -Komplex gebunden. Durch Liganden-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors kann dieser selbst als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) agieren und den Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit katalysieren, was die Aktivierung des G-Proteins zur Folge hat (Oldham & Hamm, 2008; Pierce et al., 2002). Infolgedessen löst sich das heterotrimere G-Protein vom

Rezeptor und dissoziiert in die $G\alpha_{GTP}$ - und $\beta\gamma$ -Untereinheiten, welche als Signalmoleküle nun selbst weitere Effektormoleküle regulieren können (Gautam et al., 1998; Neer, 1995). Die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit vermittelt die nachfolgende Hydrolyse von GTP zu GDP an der $G\alpha$ -Untereinheit, woraus schließlich die Einstellung der Interaktionen der G-Proteine mit Effektormolekülen resultiert. Nach Bindung der freien $\beta\gamma$ -Untereinheit an die $G\alpha$ -Untereinheit kann das heterotrimere G-Protein anschließend erneut an den Rezeptor gebunden und aktiviert werden (Bourne et al., 1990; Gilman, 1987; Oldham & Hamm, 2008). Das klassische Modell der Signalweitergabe nach GPCR-Aktivierung basiert demzufolge auf einer von G-Proteinen vermittelten Signaltransduktion. Im Laufe des letzten Jahrzehnts wurde jedoch auch eine G-Protein-unabhängige Beteiligung von β -Arrestinen an der Signalweiterleitung nachgewiesen, nicht nur an der Regulation von GPCRs im Hinblick auf die Desensibilisierung und Internalisierung, sondern eben auch als multifunktionale Adaptor-Proteine, welche selbst mit unterschiedlichen intrazellulären Signalmolekülen interagieren, diese rekrutieren und infolgedessen Signalwege modulieren können (Rajagopal et al., 2010; Reiter & Lefkowitz, 2006). Diesbezüglich wird von „*biased agonism*“ oder „funktioneller Selektivität“ gesprochen, wenn die Induktion Liganden-spezifischer Rezeptorkonformationen die selektive Aktivierung eines Teils der verfügbaren zellulären Signalwege zur Folge hat.



Modifiziert nach Raehal et al. (2011)

Abbildung 1-5. Schema zur Erklärung des „*biased agonism*“. Ligand 1 stimuliert einzig β -Arrestin-vermittelte Signalwege („ β -Arrestin bias“), während die Rezeptoraktivierung durch Ligand 2 ausschließlich zu G-Protein-abhängigen Signaleffekten führt („G-Protein bias“).

Eines der ersten Beispiele für diese Hypothese ist SII-Angiotensin, eine synthetisch modifizierte Form von Angiotensin, das an den Angiotensin_{1A}-Rezeptor bindet (Holloway et al., 2002; Wei et al., 2003). Nach Applikation dieser Substanz bleibt das $G_{\alpha q}$ -Signalling aus,

jedoch wird β -Arrestin2 rekrutiert, was eine β -Arrestin2-abhängige Internalisierung des Rezeptors und Aktivierung von ERK (*extracellular signal-regulated kinase*; extrazellulär regulierte Kinase) zur Folge hat (Wei et al., 2003). Ebenso können die ino- und lusitropen Effekte von SII-Angiotensin durch β -Arrestin2-Deletion inhibiert werden, nicht aber nach Hemmung der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion (Rajagopal et al., 2006).

Um auf Reize adäquat reagieren zu können, also die Zelle vor akuter oder chronischer Überstimulation zu bewahren, haben sich vielfältige Mechanismen herausgebildet, welche zu einer Beendigung der Signalweiterleitung auf Rezeptorebene führen. Dieser notwendige Mechanismus wird als Desensibilisierung bezeichnet. Die Entkopplung des Rezeptors von den G-Proteinen ist dabei grundlegend für die Termination der Signalübertragung (Ferguson, 2001). Die hierfür erforderliche intrazelluläre Phosphorylierung des Rezeptors wird maßgeblich von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs), Arrestinen und *second-messenger*-Kinasen (wie Proteinkinase A und Proteinkinase C) herbeigeführt (Ferguson et al., 1996; Ferguson & Caron, 1998; Krupnick & Benovic, 1998). Daneben haben auch der vermehrte Abbau von Rezeptoren sowie die Reduktion der Rezeptorexpression regulatorischen Charakter (Bouvier et al., 1988; Lohse, 1993).

1.3.2 Desensibilisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Nahezu alle bekannten GPCRs unterliegen einem Desensibilisierungsprozess und trotz ihrer Diversität nutzen sämtliche Zellen einen universalen Mechanismus, um GPCRs zu desensibilisieren, woraus in eine verminderte Ansprechbarkeit des Rezeptors nach andauernder oder wiederholter Agonisten-Stimulation resultiert. Dieser Prozess wird durch die Liganden-vermittelte Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten innerhalb der dritten intrazellulären Schleife und des Carboxyl-Terminus von GPCRs eingeleitet und scheint maßgeblich die Beteiligung zweier Familien von Proteinkinasen zur Bedingung zu haben: die G-Protein-gekoppelten Serin-/Threonin-Kinasen (GRKs), welche am Agonist-besetzten Rezeptor eine homologe Phosphorylierung bedingen, sowie die *second messenger*-Kinasen, Proteinkinase A (PKA) und Proteinkinase C (PKC), die Liganden-gebundene, aber auch inaktive GPCRs heterolog phosphorylieren können (Ferguson, 2001; Hausdorff et al., 1990). Zwar weisen die cAMP-abhängige Proteinkinase A sowie die Proteinkinase C und GRKs untereinander einen hohen Verwandtschaftsgrad auf, jedoch unterscheiden sich ihre Kinetiken (Roth et al., 1991).

Die homologe Phosphorylierung von GPCRs involviert die koordinierte Interaktion der GRKs und Arrestine (Ferguson et al., 1996; Freedman & Lefkowitz, 1996; Krupnick & Benovic,

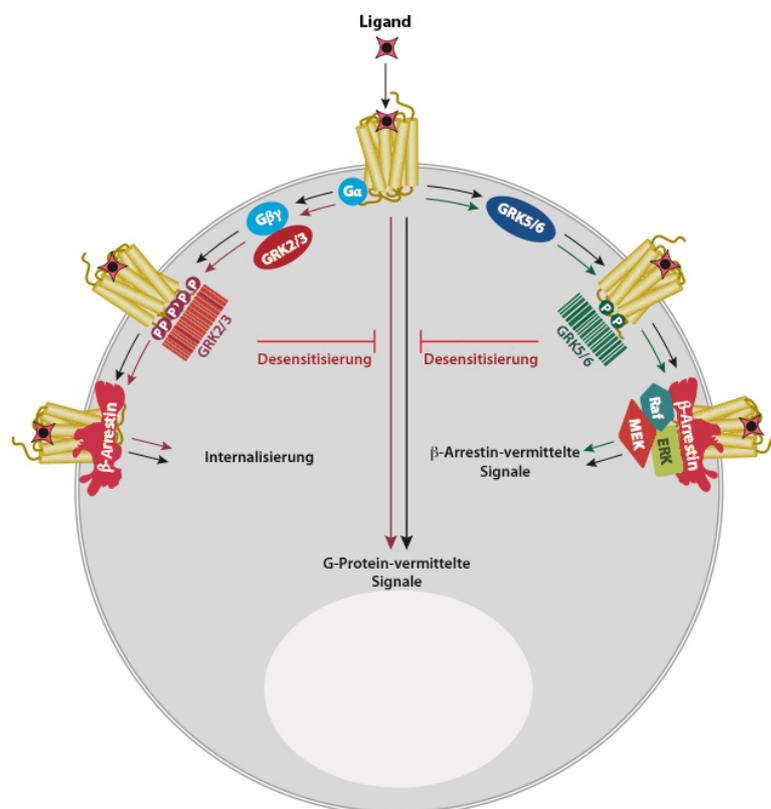
1998; Pitcher et al., 1998). Durch eine Agonist-induzierte Konformationsänderung der Rezeptoren wird die Bindung einer oder mehrerer GRKs ermöglicht, woraufhin der Rezeptor an Aminosäure-Resten der intrazellulären Schleifen und am Carboxyl-Terminus phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung erhöht die Rezeptoraffinität für β -Arrestin1 und β -Arrestin2, was nach Bindung der β -Arrestine eine sterische Behinderung der weiteren G-Protein-Kopplung zur Folge hat und eine Verminderung des Rezeptor-Signallings um bis zu 80% bewirken kann (Attramadal et al., 1992; Lohse et al., 1992; Pierce & Lefkowitz, 2001).

Die Codierung der humanen GRKs erfolgt durch sieben Gene, anhand ihrer Funktion und Gewebeverteilung werden diese Kinasen in drei Untergruppen eingeteilt (Pitcher et al., 1998). Die GRK1 und GRK7 bilden als visuelle GRKs eine Untergruppe, die ausschließlich in Zellen der Retina exprimiert werden. Die nicht-visuellen GRKs bilden zwei Untergruppen, zum einen die GRK2-Unterfamilie, bestehend aus der GRK2 (auch β -Adreno-Rezeptor-Kinase1) und GRK3 (auch β -Adreno-Rezeptor-Kinase2), welche weitestgehend ubiquitär vorkommen, zum anderen die GRK4-Untergruppe aus der GRK4, GRK5 und GRK6. Die GRK4 wird im Wesentlichen in den Hoden, in geringerem Maße in den Purkinje Zellen des Gehirns und den Nieren exprimiert, während die GRK5 und GRK6 ubiquitär vorkommen (Gainetdinov et al., 2000; Sallèse et al., 1997; Virlon et al., 1998)

Alle nicht-visuellen GRKs weisen eine hochkonservierte zentrale katalytische Domäne und eine RGS (*regulator of G protein signaling*)-Domäne im N-Terminus auf. Zusätzlich besitzen die cytoplasmatisch lokalisierten GRK2 und GRK3 im C-Terminus eine PH (*pleckstrin homology*)-Domäne, welche Bindungsstellen für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) und freie G $\beta\gamma$ -Untereinheiten enthält, die für Translokation der cytosolischen GRKs zur Plasmamembran von Bedeutung sind (Carman et al., 1999; Pitcher et al., 1995; Willets et al., 2003). Die Palmitoylierung der GRK4 und GRK6 an C-terminalen Cystein-Resten bedingt hingegen eine konstitutive Membran-Lokalisation dieser GRKs. Die GRK5 enthält indes im N-Terminus eine PIP₂-bindende Domäne und zusätzlich eine basenreiche Domäne im C-Terminus, über welche sie mit der Zellmembran assoziiert ist (Pitcher et al., 1996). Im Gegensatz zu anderen GRKs phosphoryliert die GRK5 bevorzugt nicht-saure Peptide und kann durch Heparin oder Dextransulfate inhibiert werden. Neben ihrer Bedeutung in Bezug auf die Phosphorylierung von μ -Opioid-Rezeptoren, ist sie auch bei der Regulation der β_2 -adrenergen und M₂-cholinergen Rezeptoren sowie des Rhodopsins von Relevanz (Kunapuli et al., 1994).

Abgesehen von strukturellen Unterschieden weisen die verschiedenen GRKs auch funktionelle Ungleichheiten auf. Diesbezüglich sind die GRK5 und GRK6 vorwiegend

hinsichtlich der β -Arrestin-vermittelten ERK-Aktivierung von Bedeutung, während die GRK2 und GRK3 überwiegend bei der Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung eine Rolle spielen (Premont & Gainetdinov, 2007; Reiter & Lefkowitz, 2006). In diesem Kontext wird als Hypothese die „*bar code*“-Theorie angeführt, der zufolge aufgrund der Rezeptorphosphorylierung durch verschiedene GRKs und *second messenger*-Kinasen spezifische Phosphorylierungsmuster oder „*bar codes*“ an den intrazellulären Schleifen und am Carboxyl-Terminus des Rezeptor entstehen, welche infolgedessen die intrazellulären Wirkungen des β -Arrestins regulieren und somit das Signalling beeinflussen (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Nobles et al., 2011).



Modifiziert nach Reiter et al. (2012)

Abbildung 1-6. GRK-spezifische Signaltransduktion. Nach Liganden-Stimulation werden die GRK2 und GRK3 durch Interaktion mit den G $\beta\gamma$ -Untereinheiten zur Membran rekrutiert und phosphorylieren dort spezifische Serine und Threonine. Dieses Phosphorylierungsmuster führt nach β -Arrestin-Rekrutierung zur Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung. Das Phosphorylierungsmuster der konstitutiv mit der Membran assoziierten GRK5 und GRK6 hat die β -Arrestin-vermittelte Interaktion des aktivierten Rezeptors mit Effektormolekülen wie ERK und MEK zur Folge, kann aber auch in der Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors resultieren. **Abkürzungen:** GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; Raf, *rapidly accelerated fibrosarcoma kinase*; ERK, *extracellular signal-regulated kinase*; MEK, MAP-Kinase-Kinase

Auch wenn mittlerweile bekannt ist, dass die Agonist-vermittelte Aktivierung von GPCRs die Bedingung für die GRK-medierte Phosphorylierung darstellt, ist bisher wenig über die genauen Signale für eine Rekrutierung der GRKs zum Rezeptor publiziert. Hinsichtlich der

Regulation insbesondere der GRK2, aber auch der GRK5 konnten jedoch schon einige Proteine identifiziert werden, wie beispielsweise die p42/p44-Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK; MAP-Kinase; *mitogen-activated protein kinase*) und die c-Src (*cellular sarcoma*)-Kinase, welche die katalytische Aktivität der GRK2 negativ, respektive positiv beeinflussen (Fan et al., 2001; Pitcher et al., 1999). Des Weiteren schwächt die Calcium-Calmodulin-Bindung die Aktivität der GRK5 wesentlich stärker als die der GRK2 und verhindert überdies auch die Membran-Assoziation der GRK5 (Chuang et al., 1996; Pronin et al., 1997). Ebenso scheint eine Aktivierung der PKC die GRK5-Aktivität im Hinblick auf die Phosphorylierung von GPCRs zu vermindern, während sie im Gegensatz dazu die Aktivität der GRK2 zu steigern vermag und die Rekrutierung derselben zur Zellmembran fördert (Krasel et al., 2001; Pronin & Benovic, 1997; Pronin et al., 1997; Willets et al., 2003; Winstel et al., 1996).

Anhand zahlreicher experimenteller Untersuchungen konnte bereits die Beteiligung der GRKs hinsichtlich der Desensibilisierung von GPCRs nachgewiesen werden (Peppel et al., 1997; Pitcher et al., 1998; Terman et al., 2004). Nach Inhibierung der GRKs wird zwar die Desensibilisierung von GPCRs abgeschwächt, infolgedessen die Signaltransduktion verstärkt, jedoch erfordert eine gänzliche Verhinderung der Desensibilisierung meist eine Blockade weiterer Mechanismen (Freedman et al., 1995; Pei et al., 1995). So konnte mit dem GRK-selektiven Inhibitor Heparin die Desensibilisierung des β -Adreno-Rezeptors nur zu circa 60% gemindert werden, erst nach zusätzlicher Hemmung des PKA-Signalweges war die Desensibilisierung vollständig unterbunden (Lohse et al., 1990a).

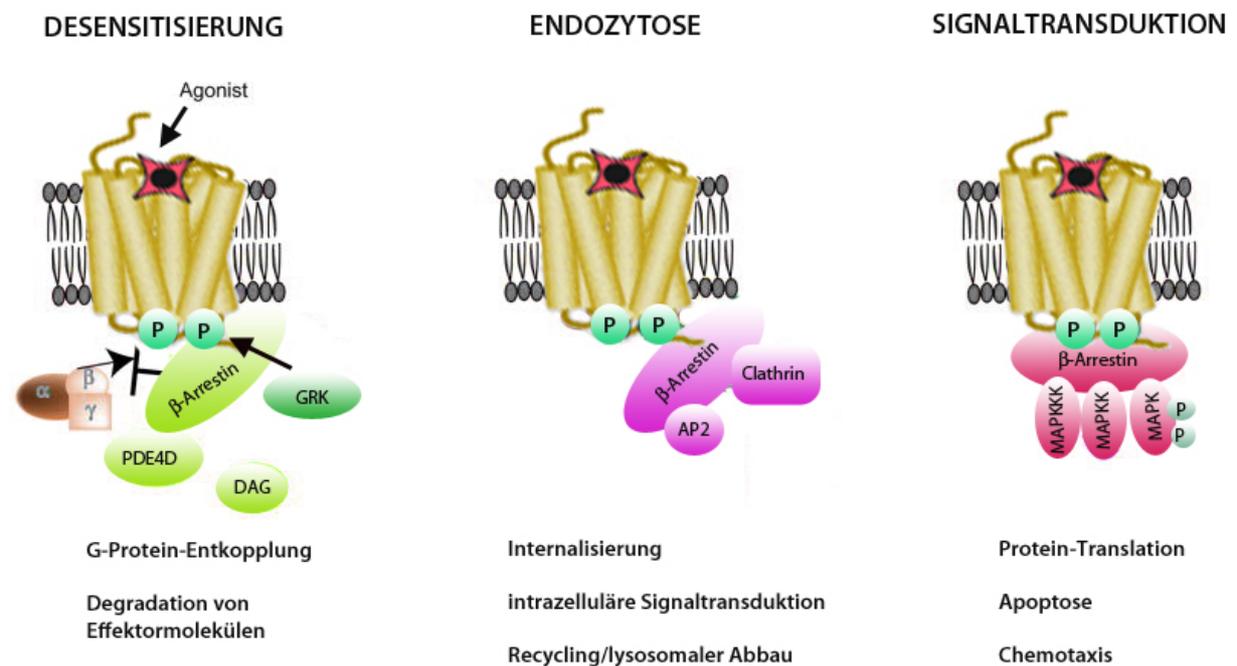
Neben der PKA-medierte Phosphorylierung kann die Phosphorylierung von GPCRs auch durch andere Kinasen wie der Proteinkinase C (Benovic et al., 1985; Pitcher et al., 1992; Roth et al., 1991) und c-Src-Kinase (Fan et al., 2001) in einer Rezeptordesensibilisierung resultieren. Dieser Prozess stellt einen Rückkopplungsmechanismus dar, bei welchem infolge der Agonisten-Stimulation der GPCRs gebildete *second messenger* die Aktivität der Rezeptoren dämpfen und ebenso die Produktion weiterer *second messenger* mindern (Kohout & Lefkowitz, 2003; Lohse, 1993). Als Phosphotransferasen katalysieren die PKA und PKC den Transfer einer Phosphatgruppe des Adenositriphosphats (ATPs) auf Serine und Threonine. Nach GPCR-vermittelter Zunahme vorgeschalteter *second messenger* wie cAMP, Calcium oder Diacylglycerin (DAG) werden diese Kinasen aktiviert und modulieren durch Phosphorylierung nachgeschalteter Effektormoleküle die Signaltransduktion (Ferguson, 2001). Ebenso können sie Agonisten-unabhängig GPCRs phosphorylieren, was abhängig vom

Phosphorylierungsmuster zu einer Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung führt (Ferguson & Caron, 1998). Dieser Prozess wird als heterologe Desensibilisierung bezeichnet. Daneben stellen die Arrestine einen wesentlichen Kofaktor im Zusammenhang mit der Desensibilisierung von GPCRs dar. Als bedeutsam in diesem Prozess haben sich vier Subtypen von Arrestinen erwiesen, welche alle an Licht-aktivierte oder Agonist-besetzte GPCRs binden können, die GRK-vermittelt phosphoryliert wurden. Hierzu zählen die visuellen Arrestine (Shinohara et al., 1987; Yamaki et al., 1987) und Cone-Arrestine (Murakami et al., 1993), welche fast ausschließlich in der Retina exprimiert werden (Craft et al., 1994; Smith et al., 1994), wo sie die Photorezeptoren regulieren, daneben die β -Arrestine (Lohse et al., 1990b), β -Arrestin1 und β -Arrestin2, die ubiquitär, jedoch hauptsächlich in Gehirn und Niere exprimiert werden (Attramadal et al., 1992). β -Arrestine sind Bestandteil unterschiedlicher neuronaler Signalwege und anhand von Immuno-Elektronenmikroskopie konnte eine Ansammlung dieser Proteine gemeinsam mit GRKs an neuronalen Synapsen sichtbar gemacht werden (Arriza et al., 1992; Attramadal et al., 1992). Somit sind diese Proteine bestmöglich lokalisiert, um neuronale Signale zu modulieren. Die herausragende Bedeutung von β -Arrestinen bezüglich der Funktionsweise von GPCRs *in vivo* konnte anhand von β -Arrestin1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden. Diese Tiere weisen physiologische kardiale Ruhe-Parameter auf, jedoch führt die Applikation von β -adrenergen Rezeptor-Agonisten zu einer übermäßigen hämodynamischen Reaktion; demzufolge wird β -Arrestin1 eine wesentliche Bedeutung bezüglich der Desensibilisierung des kardialen β -adrenergen Rezeptors beigemessen (Conner et al., 1997). Auch β -Arrestin2-defiziente Mäuse weisen nach Morphin-Applikation eine beeinträchtigte Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors auf (Bohn et al., 1999).

β -Arrestine stellen cytosolische Proteine mit einer Vielzahl potentieller PKC-Phosphorylierungsstellen dar. Nach Agonist-induzierter Rezeptorstimulation werden sie zur Zellmembran transloziert und binden dort an den phosphorylierten Rezeptor (Barak et al., 1997; Ferguson et al., 1996). Eine stabile β -Arrestin-Bindung kann jedoch nur ausgebildet werden, wenn der Rezeptor in seiner aktiven Konformation vorliegt und GRK-vermittelt phosphoryliert ist (Luttrell & Lefkowitz, 2002; Perry & Lefkowitz, 2002). Indes führt eine PKC- und PKA-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors ebenso zur β -Arrestin-Rekrutierung, jedoch lediglich zu einer schwachen β -Arrestin-Bindung (Lohse et al., 1992; Lohse et al., 1990b). Für den nachfolgenden Transport des Rezeptors in das Zellinnere ist die Stabilität des β -Arrestin-Rezeptor-Komplexes maßgebend, für welche insbesondere die Phosphorylierung der C-terminalen Serine und Threonine des Rezeptors sowie die

Ubiquitinierung des β -Arrestins bestimmend sind (Oakley et al., 2001; Oakley et al., 2000; Shenoy & Lefkowitz, 2003).

Neben ihrer Funktion als Signalterminatoren, Rezeptoren von G-Proteinen zu entkoppeln und die Clathrin-vermittelte Internalisierung zu induzieren (Goodman et al., 1996; Zhang et al., 1996), vermögen β -Arrestine auch als Modulatoren anderer Kinasen und regulatorischer Proteine zu agieren, wie der MAPK-Kaskade oder der c-Src-Kinase (DeFea et al., 2000; Luttrell et al., 2001; Shenoy & Lefkowitz, 2005).



Modifiziert nach Shenoy & Lefkowitz (2011)

Abbildung 1-7. Unterschiedliche Funktionen des β -Arrestins. **Desensibilisierung:** Nach Agonist-induzierter Aktivierung des Rezeptors erfolgt die GRK-vermittelte Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung, was die nachfolgende Entkopplung von G-Proteinen und die Desensibilisierung zur Folge hat sowie die Degradation der Phosphodiesterase 4D (PDE4D) und von Diacylglycerin (DAG). **Endozytose:** Die Agonist-induzierte β -Arrestin-Bindung an den Rezeptor führt zur Bindung von endozytotischen Proteinen wie Clathrin und AP2 an β -Arrestin, was eine schnelle Rezeptorinternalisierung bedingt. **Signalweiterleitung:** Die Agonist-induzierte β -Arrestin-Bindung an den Rezeptor führt zur β -Arrestin-vermittelten Aktivierung der MAPK-Kaskade, die weitere zelluläre Prozesse wie z.B. Apoptose und Proteintranslation reguliert. **Abkürzungen:** PDE4D, cAMP-spezifische Phosphodiesterase 4D; DAG, Diacylglycerin; GRK, G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase; AP2, Adapter-Protein-2; MAPK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase; MAPKK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase; MAPKKK, Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase; P, Phosphat-Gruppe.

Dem strukturellen Aufbau der β -Arrestine, mit einer N-Domäne im N-Terminus, einem polaren Kern und einer C-Domäne im C-Terminus wird in dieser Hinsicht ausschlaggebende Bedeutung beigemessen. Die geladenen Phosphatgruppen des Rezeptors interagieren während der β -Arrestin-Bindung mit dem polaren Kern der β -Arrestine, was in einer

Konformationsänderung und Überführung des β -Arrestins in einen aktiven Zustand resultiert (Gurevich & Gurevich, 2006). Infolgedessen ist das spezifische Phosphorylierungsmuster der GPCRs von maßgeblicher Bedeutung für die strukturellen Änderungen der β -Arrestine, welche im Weiteren die intrazellulären Effekte der β -Arrestine beeinflussen (Moore et al., 2007).

1.3.3 Internalisierung und Resensitisierung G-Protein-gekoppelter Rezeptoren

Die Internalisierung von GPCRs ist nicht nur bezüglich der Desensitisierung ein wichtiger Prozess, sie hat auch im Hinblick auf die Resensitisierung der Rezeptoren eine große Bedeutung (Ferguson, 2001). Neben der Rezeptorinternalisierung über Caveolen, deren genauer Mechanismus noch unklar ist, stellt eine weitere Möglichkeit die β -Arrestin-abhängige Internalisierung des Rezeptors durch Clathrin-beschichtete Vesikel dar. β -Arrestin fungiert hierbei als Linker, indem es sowohl an die schwere Kette des Clathrin-Proteins als auch an die β_2 -Adaptin-Untereinheit des Adaptor-Proteinkomplexes-2 (AP2) bindet. Als strukturgebende Proteine der *coated pits* bilden Clathrine unter Dynamin-vermittelter Abschnürung von der Zellmembran Clathrin-beschichtete Vesikel. AP2 induziert dabei die Translokation des Rezeptors an die *coated pits* und die nachfolgende Aufnahme in die Vesikel. Eine Internalisierung von GPCRs, vermittelt durch Clathrin und Dynamin, jedoch ohne Beteiligung von β -Arrestin2, scheint dagegen nicht ausgeschlossen zu sein (Paing et al., 2002). Nach Aufnahme in Endosomen wird der Rezeptor entweder durch Liganden-Abbau und Dephosphorylierung recycelt und in resensitisierte Form, als wieder aktivierbarer Rezeptor, an die Zellmembran transloziert oder zu Lysosomen transportiert und dort degradiert, was demnach eine Down-Regulierung der Rezeptoren bedeutet (Goodman et al., 1996; Pierce et al., 2002; Zhang et al., 1996). Als klassisches Beispiel hierfür gilt der β_2 -adrenerge Rezeptor, welcher nach der Internalisierung in frühen Endosomen durch die Proteinphosphatase 2A dephosphoryliert und nach Abbau des Agonisten zurück an die Zellmembran transportiert wird (Krueger et al., 1997). Jedoch wird die Internalisierung der Rezeptoren mittlerweile nicht mehr als notwendige Voraussetzung für eine Dephosphorylierung angesehen. Diesbezüglich zeigen Studien an β_2 -adrenergen und μ -Opioid-Rezeptoren, dass diese Rezeptoren auch ohne vorangegangene Internalisierung dephosphoryliert und resensitisiert werden können (Arttamankul et al., 2006; Iyer & Canty, 2005; Kelly, 2006). Diese verschiedenen Prozesse geben Hinweise auf das Vorhandensein unterschiedlicher Adaptationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der zellulären Reaktionsfähigkeit, wobei bei Bedarf einer heftigen, akuten Reaktion die Resensitisierung

Folge einer Rezeptordephosphorylierung an der Zellmembran ist, während hinsichtlich längerfristiger, adaptiver Reaktionen die Internalisierung des Rezeptors und Dephosphorylierung in den frühen Endosomen der Resensibilisierung vorausgehen (Vasudevan et al., 2011).

1.4 Opioid-Rezeptoren

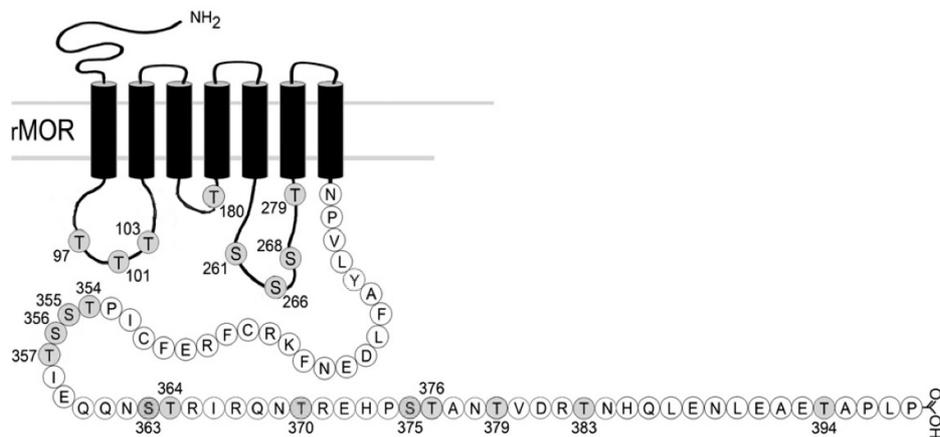
Opioid-Rezeptoren werden anhand ihrer Primärstruktur in die drei Rezeptor-Typen μ , δ und κ eingeteilt, welche eine Sequenzhomologie von circa 60% aufweisen, wobei sich die größte Divergenz im N-Terminus, den extrazellulären Schleifen und dem C-Terminus findet (Chen et al., 1993). Diese Strukturen sind insbesondere für die Bindung von Agonisten und Antagonisten, respektive für die Aktivierung von G-Proteinen und die Rezeptordesensibilisierung von Bedeutung. Daneben sind die Opioid-Rezeptoren durch unterschiedliche Gewebeverteilungen und Signalkaskaden charakterisiert (Tso & Wong, 2003) und können aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften den Subtypen δ_1 und δ_2 , beziehungsweise μ_1 und μ_2 , sowie κ_1 , κ_2 und κ_3 zugeordnet werden (Goldstein & Naidu, 1989; Standifer & Pasternak, 1997). Basierend auf seiner Sequenzhomologie wird auch der Nozizeptin-Rezeptor (ORL1) der Familie der Opioid-Rezeptoren zugerechnet. Die Opioid-Rezeptoren werden hauptsächlich im Hirnstamm, Thalamus, Hypothalamus, dem limbischen System, der Formatio reticularis, dem Cortex, aber auch im Hinterhorn des Rückenmarks in den prä- und postsynaptischen Neuronen exprimiert (Czlonkowski et al., 1983; Delfs et al., 1994; Mansour et al., 1995; Mansour et al., 1994; Mansour et al., 1986). Der μ -Opioid-Rezeptor vermittelt Wirkungen wie Analgesie, Euphorie, Bradykardie, Atemdepression, Sedation, Obstipation, Hypothermie, Miosis sowie Toleranz, der κ -Opioid-Rezeptor neben Analgesie, Sedation und Atemdepression dagegen eine Dysphorie. Die mediierten Wirkungen des δ -Opioid-Rezeptors sind neben Analgesie, Atemdepression und Toleranz auch Hypotension und Erregung (Waldhoer et al., 2004).

Opioid-Rezeptoren koppeln vor allem an die Pertussistoxin-sensitiven heterotrimeren $G_{i(1-3)}/G_{0(A-B)}$ -Proteine, allerdings sind auch Interaktionen dieser Rezeptoren mit G_s - oder G_z -Proteinen beschrieben (Crain & Shen, 1996; Garzon et al., 1998; Hendry et al., 2000; Waldhoer et al., 2004). Da nahezu alle klinisch relevanten Opioide ihre Wirkungen über eine Interaktion mit dem μ -Opioid-Rezeptor entfalten, soll im Weiteren vornehmlich auf diesen eingegangen werden.

1.4.1 μ -Opioid-Rezeptor

Der μ -Opioid-Rezeptor wird von dem Gen OPRM1 codiert, welches mehrere Exons besitzt, die alternativ gespleißt werden können. Bis heute sind elf humane Spleißvarianten, 25 bei der Maus und acht bei der Ratte bekannt (Pan, 2005), deren physiologische Relevanz allerdings noch nicht geklärt ist. Bislang konnte immunhistochemisch einzig die MOR1B-Spleißvariante im Zentralen Nervensystem der Ratte nachgewiesen werden (Schulz et al., 1998; Zhang et al., 2006). Neben seiner Expression im Zentralen und peripheren Nervensystem ist der μ -Opioid-Rezeptor auch in den Darmganglien und der Gallenblase lokalisiert (Lupp et al., 2011).

Innerhalb der intrazellulären Schleifen und im Bereich des C-Terminus des μ -Opioid-Rezeptors finden sich mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen, die im Hinblick auf die Desensibilisierung des Rezeptors ausschlaggebend sein können.



Modifiziert nach Williams et al. (2013)

Abbildung 1-8. Potentielle Phosphorylierungsstellen des Ratten- μ -Opioid-Rezeptors: die potentiell phosphorylierbaren Serine (S) und Threonine (T) in den intrazellulären Schleifen und im Carboxyl-Terminus sind grau unterlegt.

Hinsichtlich der homologen Desensibilisierung wird dabei insbesondere den GRKs Bedeutung beigemessen, deren Agonist-spezifische Aktivierung am Carboxyl-Terminus des Rezeptors unterschiedliche Phosphorylierungsmuster oder “*bar codes*” entstehen lässt, welche die intrazellulären Wirkungen des β -Arrestins regulieren und somit das weitere Signalling beeinflussen (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Nobles et al., 2011). So induziert die Stimulation des μ -Opioid-Rezeptors durch DAMGO ([d-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin) eine maßgeblich GRK2- und GRK3-vermittelte Phosphorylierung am Serin³⁷⁵ und Threonin³⁷⁰, was eine β -Arrestin-Rekrutierung zur Zellmembran und nachfolgende Internalisierung des β -Arrestin-Rezeptorkomplexes zur Folge hat. Eine

Morphin-Stimulation bewirkt dagegen die Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ durch die GRK5, was keine β -Arrestin-Rekrutierung und Internalisierung des Rezeptors bedingt (Doll et al., 2011; Doll et al., 2012; Schulz et al., 2004b). Im Hinblick auf die Phosphorylierung des Threonins¹⁸⁰ und Threonins³⁵⁷ sowie des Serins²⁶⁶ und Serins³⁵⁵ wird die Involvierung anderer Kinasen wie der PKA, der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II oder der c-Src-Kinase diskutiert (Celver et al., 2001; Koch et al., 2000; Koch et al., 1998).

Wie auch endogene Opioide induzieren die meisten synthetischen Opioide eine starke Internalisierung des μ -Opioid-Rezeptors, eine Ausnahme stellt jedoch Morphin dar, das sich in seiner Art der Rezeptorregulierung von den anderen Substanzen unterscheidet, da es in nahezu allen Zelltypen keine oder nur eine minimale Internalisierung des μ -Opioid-Rezeptors hervorrufen kann (Arden et al., 1995; He & Whistler, 2005; Keith et al., 1996). Bei Überexpression der GRK2 oder des β -Arrestins kann allerdings auch Morphin eine Internalisierung bewirken (Whistler & von Zastrow, 1998). Daneben wird auch die maßgebliche Bedeutung der PKC am Prozess der Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors nach Applikation von Agonisten wie Morphin diskutiert (Bailey et al., 2006).

1.4.2 Regulation von Effektormolekülen durch den μ -Opioid-Rezeptor

Die vielfältigen pharmakologischen und physiologischen Wirkungen als Folge der μ -Opioid-Rezeptor-Aktivierung sind der selektiven Beeinflussung unterschiedlicher Effektormoleküle durch diesen Rezeptor zuzuschreiben. Hierzu sind die Inhibierung der Adenylylcyclase (AC) (Sharma et al., 1977) und der Calcium-Kanäle vom N- und L-Typ (Piros et al., 1996; Piros et al., 1995) sowie die Stimulierung einwärts gerichteter Kalium-Kanäle (GIRK; *G protein-activated inwardly rectifying potassium channel*) (North et al., 1987), der Phospholipase C (PLC) (Johnson et al., 1994) und die Beeinflussung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 (Li & Chang, 1996) zu zählen.

Abhängig von seiner Liganden-selektiven Konformation und der zellspezifischen Expression von Effektormolekülen kann der μ -Opioid-Rezeptor dabei mit unterschiedlichen G-Proteinen interagieren (Koch & Hollt, 2008; Martini & Whistler, 2007; Tso & Wong, 2003). In bestimmten Neuronen koppelt der μ -Opioid-Rezeptor an spezifische G_z -Proteine, in Hinterwurzelganglien hingegen maßgeblich an G_0 -Proteine, was eine Inhibierung der Adenylylcyclase zur Folge hat (Garzon et al., 1997; Moises et al., 1994). In vielen Hirnregionen wird die Adenylylcyclase dagegen aufgrund der Interaktion von μ -Opioid-Rezeptoren mit G_{i1}/G_{i3} -Proteinen gehemmt (Chalecka-Franaszek et al., 2000). Hinsichtlich dieser divergierenden, selektiven Interaktionsmöglichkeiten mit unterschiedlichen G-

Proteinen sind Zelltyp-spezifisch exprimierte *regulator of G protein signaling* (RGS)-Proteine von Bedeutung (De Vries et al., 2000).

Es existieren zehn Isoformen der Adenylylcyclase mit zell- und gewebespezifischem Expressionsmuster, von welchen nur die AC₁₀ cytosolisch lokalisiert ist (Zhuo, 2012). Adenylylcyclasen katalysieren die Spaltung von ATP in cyclisches AMP und Pyrophosphat (Taussig & Gilman, 1995); cyclisches AMP aktiviert als *second messenger* die Proteinkinase A, eine Serin/Threonin-Kinase, welche durch Phosphorylierung die Wirkungen weiterer Proteine, sogenannter *target*-Proteine moduliert (Ingram & Williams, 1994; Pierce et al., 2002). Die Inhibierung der Isoformen AC₁, AC₅, AC₆ und AC₈ der Adenylylcyclase kann durch die G_{oi}-Untereinheit vermittelt werden, während βγ-Untereinheiten die Isoformen AC₂, AC₄ und AC₇ aktivieren können (Avidor-Reiss et al., 1997; Law et al., 2000). Die βγ-Dimere können daneben eine Vielzahl weiterer Effektoren modulieren, wie beispielsweise einwärts gerichtete Kalium-Kanäle, GRKs, Phosphoinositid-3-Kinasen, MAP- und c-Src-Kinasen sowie die Transkription bestimmter Proteine (Tso & Wong, 2003).

In Neuronen der Hinterwurzelganglien führt die Aktivierung des μ-Opioid-Rezeptors zu einer verminderten Neurotransmitterfreisetzung in den synaptischen Spalt durch Inhibierung des Calcium-Einstroms an Calcium-Kanälen. Die Aktivierung von GIRKs durch die βγ-Untereinheiten bedingt daneben eine postsynaptische Hyperpolarisation; demzufolge wird prä- sowie postsynaptisch die Weiterleitung nozizeptiver Signale inhibiert (Berger & Whistler, 2010; Marker et al., 2005; Mitrovic et al., 2003; Moises et al., 1994).

Hinsichtlich des Einflusses auf die Desensibilisierung des μ-Opioid-Rezeptors, aber auch auf die Toleranzentwicklung im Zusammenhang mit Opioiden wird den MAP-Kinasen, insbesondere ERK1 und ERK2, große Bedeutung beigemessen (Kramer & Simon, 2000; Schmidt et al., 2000). Sie stellen eine Gruppe von cytosolischen Serin/Threonin-Kinasen dar, welche durch Phosphorylierung aktiviert in den Zellkern transloziert werden und dort über Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die Genregulation modulieren (Blenis, 1993). Agonisten-abhängig können unterschiedliche Signalwege der ERK-Aktivierung existieren; so erfolgt nach Morphin-Applikation eine G_α-induzierte, β-Arrestin-unabhängige ERK-Aktivierung, welche keine Translokation dieser Kinase in den Zellkern zur Folge hat, sondern eine Aktivierung von CREB (*cAMP responsive element-binding protein*), wohingegen die β-Arrestin-vermittelte ERK-Aktivierung eine Translokation der Kinase in den Zellkern bewirkt (Zheng et al., 2008).

1.5 Toleranz

Opioid-Toleranz ist durch eine reduzierte Wirksamkeit von Opioid-Agonisten wie Morphin nach wiederholter Gabe charakterisiert und manifestiert sich in der Notwendigkeit, stetig höhere Dosen dieser Substanzen applizieren zu müssen, um den gewünschten Effekt zu erreichen. Diese Entwicklung einer analgetischen Toleranz macht in der Klinik teils Dosissteigerungen um das zehnfache erforderlich, um Patienten mit chronischen Schmerzen adäquat behandeln zu können (Buntin-Mushock et al., 2005).

Im Hinblick auf die Korrelation der Wirkungsstärke von Opioiden und deren Desensitisierungs- und Internalisierungsvermögen in Bezug auf Rezeptoren wird von einigen Forschungsgruppen ein inverser Zusammenhang angenommen. Morphin bedingt in Zellkulturexperimenten eine geringe Desensitisierung und Internalisierung des μ -Opioid-Rezeptors, der Grad der Morphin-vermittelten Toleranzentwicklung ist in Versuchen mit Nagern jedoch größer als die Toleranzentwicklung nach Applikation hochwirksamer Agonisten wie etwa Fentanyl oder Etorphin, welche eine starke Desensitisierung und Internalisierung des μ -Opioid-Rezeptors herbeiführen (Duttaroy & Yoburn, 1995; Koch et al., 2005; Madia et al., 2009; Whistler & von Zastrow, 1998; Zhang et al., 1998). Dementgegen weisen Publikationen anderer Autoren daraufhin, dass Opioide mit starkem Internalisierungsvermögen bei Mäusen sowie beim Menschen eine nicht unerhebliche Toleranzentwicklung bewirken können (Collett, 1998; Rosenblum et al., 2008). Diese Divergenzen sind teilweise in den unterschiedlichen Applikationsarten – intermittierend beziehungsweise kontinuierlich – begründet (Madia et al., 2009); allerdings impliziert dies zum einen, dass eine Internalisierung des Rezeptors per se eine Toleranzentwicklung nicht zu verhindern vermag, zum anderen, dass die Rezeptordesensitisierung einen potentiellen Einfluss auf die Toleranzentwicklung nach Applikation potenter Agonisten haben kann.

Nach langfristiger Applikation von Agonisten wie Morphin wird die Induktion sekundärer adaptiver Prozesse vermutet, welche die Toleranzentwicklung verstärken (He & Whistler, 2005; Koch et al., 2005; Schulz et al., 2004b). So wurden nach chronischer Morphingabe erhöhte cAMP-Spiegel beobachtet, welche nicht als Folge der Entkopplung des μ -Opioid-Rezeptors von inhibitorischen G-Proteinen angesehen werden, stattdessen als Konsequenz adaptiver Mechanismen der Zellen wie beispielsweise einer Hochregulierung der Adenylylcyclase, der Proteinkinase A und von CREB (Nestler, 1996). Den Agonist-selektiven Einfluss auf die akute Toleranzentwicklung konnten in jüngster Zeit neben anderen Forschungsgruppen auch Melief et al. (2010) zeigen: die Inhibierung der c-Jun-N-terminalen Kinase (JNK), nicht aber die Deletion der GRK3, verhinderte die akute antinozizeptive

Toleranzentwicklung nach Morphin-Applikation. Im Gegensatz hierzu entwickelten GRK3-defiziente Mäuse keine analgetische Toleranz nach Fentanyl-Applikation, eine Inhibierung der JNK hatte hingegen keinen Einfluss auf die Toleranzentwicklung nach Applikation dieser Substanz. Andere Studien postulieren ebenso die Beteiligung sekundärer Proteinkinasen wie der PKC, so rief die Inhibierung dieser Kinase bei Mäusen keine Toleranz nach Fentanyl- oder Morphin-Applikation hervor, jedoch nach Gabe von DAMGO (Hull et al., 2010).

Toleranz in Zusammenhang mit Opioid-Analgetika ist ein komplexer Prozess, der sich nicht nur auf Regulierung des μ -Opioid-Rezeptors und biochemische Modifikationen innerhalb der Signalkaskade der Opioid-Rezeptoren beschränkt, sondern auch kompensatorische Verhaltensmechanismen (Siegel et al., 2000) und physiologische Adaptationen an die Substanzen (Mitchell et al., 2000) impliziert. In Bezug auf kompensatorische physiologische Mechanismen, welche die Opioid-Toleranz *in vivo* vermitteln, wird Neurotransmittern wie Glutamat am NMDA-Rezeptor (Mayer et al., 1999), Dynorphin (Vanderah et al., 2001), Cholecystokinin (Mitchell et al., 2000) und Stickstoffoxid (Mao et al., 1995) Bedeutung beigemessen. Werden in entsprechenden Versuchen Opioide abgesetzt, resultiert dies in Hyperalgesie und weiteren Entzugssymptomen (Harrison et al., 1998). Hinsichtlich der Morphin-Toleranz beispielsweise ist seit geraumer Zeit eine nicht unerhebliche Lernkomponente bekannt (Siegel et al., 2000). In diesem Zusammenhang haben NMDA-Antagonisten, die bekanntermaßen in unterschiedlichen Modellen den Lernprozess inhibieren können (Morris et al., 1986), auch die Eigenschaft Opioid-Toleranz zu hemmen (Trujillo & Akil, 1991). Ihr inhibitorischer Effekt auf die Morphin-Toleranz ist hierbei größer als der auf die Fentanyl-Toleranz (Bilsky et al., 1996). In Bezug auf Verhaltensversuche mit toleranz erzeugenden Substanzen ist es daher von Bedeutung, die Verbindung von Umwelteinflüssen jeglicher Art mit der Substanz-Applikation, demnach assoziative Mechanismen während der Entstehung der Opioid-Toleranz, zu minimieren (Kim et al., 1999).

1.6 Abhängigkeit

Die Entwicklung und der Einsatz selektiver Substanzen für μ -, δ - oder κ -Opioid-Rezeptoren war von geringem Erfolg gekrönt, da sowohl die wichtigste erwünschte Wirkung, die Analgesie, allerdings auch die unerwünschten Effekte wie Toleranz und Abhängigkeit durch Aktivierung des μ -Opioid-Rezeptors vermittelt werden (Kieffer & Gaveriaux-Ruff, 2002). So können sämtliche analgetisch-wirkende Opioide Toleranz, Abhängigkeit und

Entzugserscheinungen hervorrufen und finden ebenfalls missbräuchliche Anwendung (Hernandez & Nelson, 2010).

Abhängigkeit ist durch die sich ergebende Notwendigkeit gekennzeichnet, die Entstehung von Entzugserscheinungen mittels stetig steigender Dosen der Opioide zu verhindern. Neben der Bedeutung neuronaler Adaptationen im Zuge chronischer Applikation von Opioiden wird auch unterschiedlichen Bereichen des Zentralen Nervensystems eine kontrollierende Funktion der physiologischen und psychologischen Prozesse zugesprochen (Koob et al., 1992; Nestler, 2001a; Nestler, 2002).

Eine Schlüsselrolle während der Entwicklung von Abhängigkeit spielt das Belohnungssystem des Gehirns, wobei im Zusammenhang mit den positiven Verstärkungseffekten von Substanzen mit Abhängigkeitspotential das mesolimbische Dopamin-System als besonders wichtig erachtet wird, aber auch der ventralen tegmentalen Zone, dem Nucleus accumbens und Teilen der Amygdala wird in dieser Hinsicht große Bedeutung beigemessen (Koob, 2006). Neben seiner Beteiligung bei Prozessen des Lernens und Erinnerns ist auch der Hippocampus aufgrund einer direkten Interaktion mit dem Nucleus accumbens in Bezug auf Verstärkungseffekte bedeutsam (Ito et al., 2008; Le Merrer et al., 2009; Sharifzadeh et al., 2006). Innerhalb dieser Strukturen vermitteln Neurotransmitter und Neuromodulatoren wie Dopamin, Serotonin und γ -Amino-Buttersäure die positiven Verstärkungseffekte von Opioiden während der Entwicklung von Abhängigkeit, dagegen tragen Faktoren des Stress-Systems wie Corticotropin-releasing Faktor und Noradrenalin sowie die Verminderung von Neuropeptid Y als Antagonist zum negativen Empfinden während des Entzugs bei (Koob et al., 1998; Koob & Volkow, 2010).

Im Entzugsstadium wird ebenfalls eine Beteiligung des dopaminergen Systems diskutiert, diesbezüglich sind funktionelle Veränderungen in den mesolimbischen dopaminergen Neuronen an den aversiven Effekten in diesem Stadium beteiligt, während sie dagegen im Stadium der chronischen Applikation die Belohnungseffekte der Opioide vermitteln (De Vries & Shippenberg, 2002). Daneben wird auch das Zusammenwirken von Dynorphinen und κ -Opioid-Rezeptoren als „Anti-Belohnungssystem“ angesehen, indem hierdurch Dysphorie vermittelt wird und infolgedessen Opioid-bedingte Belohnungseffekte antagonisiert werden. Insbesondere nach chronischer Applikation suchterzeugender Substanzen ist die Aktivität des Dynorphin/ κ -Opioid-Rezeptor-Systems verstärkt (Bruchas et al., 2010), ebenso wird Dynorphin bei Abstinenz nach wiederholter Opioid-Applikation verstärkt exprimiert, was als Folge der Opioid-induzierten Hochregulierung der cAMP-Signalkaskade und der Induktion von CREB angesehen wird (Bronstein et al., 1988; Nestler, 2001a). Die Deletion der Gene,

welche für CREB oder den κ -Opioid-Rezeptor codieren, bedingt dagegen abgeschwächte Symptome bei Opioid-Entzug (Maldonado et al., 1996; Simonin et al., 1998).

Auf zellulärer Ebene wurde bezüglich der Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit vor einiger Zeit noch ein potentieller gemeinsamer Mechanismus angenommen, da sowohl *in vivo* (Way et al., 1969) wie auch *in vitro* (Rezvani et al., 1990) eine Korrelation bezüglich der Ausprägung von Entzugerscheinungen sowie dem Grad der Toleranzentwicklung gezeigt werden konnte. Daneben wurde NMDA-Rezeptor-Antagonisten die Eigenschaft zugesprochen, Toleranzentwicklung, aber auch die Entstehung einer Abhängigkeit zu verhindern (Gonzalez et al., 1997; Kolesnikov et al., 1993; Trujillo & Akil, 1991; Way et al., 1969). Jedoch mehren sich in jüngster Zeit Hinweise darauf, dass Toleranzentwicklung und Abhängigkeit zumindest partiell auch als voneinander unabhängige Phänomene betrachtet werden können: δ -Opioid-Rezeptor-, NMDA-Rezeptor- und auch β -Arrestin- defiziente Mäuse entwickeln nach Morphin-Applikation zwar eine verminderte Toleranz, eine physische Abhängigkeit jedoch, gemessen als Entzugssymptome nach Applikation eines μ -Opioid-Rezeptor-Antagonisten, bilden diese Tiere aus (Bohn et al., 2000; Nitsche et al., 2002). Konträr hierzu zeigen CB1-Rezeptor-defiziente Mäuse eine abgeschwächte physische Abhängigkeit nach Morphin-Applikation, allerdings keine veränderte Toleranzentwicklung (Ledent et al., 1999).

Infolge längerfristiger Applikation von Opioiden werden entsprechend der Entstehung von Toleranz auch während der Ausbildung von Abhängigkeit adaptative Prozesse innerhalb der Signalkaskade von Opioid-Rezeptoren angenommen. In dieser Hinsicht wird die Adenylylcyclase-Superaktivierung als ein potentieller gemeinsamer Mechanismus angesehen, der an der Entstehung von Toleranz sowie von Abhängigkeit eine maßgebliche Bedeutung hat. Als Kennzeichen zellulärer Adaptation infolge chronischer Stimulation durch Opioide stellt dieser Prozess eine Sensibilisierung der Adenylylcyclase dar, woraus während der Applikation dieser Substanzen und bei deren Entzug eine übersteigerte Produktion von cAMP resultiert (Williams et al., 2001). Diese intrazelluläre Erhöhung von cAMP bewirkt zum einen CREB-vermittelte Änderungen in der Genexpression, was die Ausbildung langfristiger Effekte auf die neuronale Plastizität im Zusammenhang mit Abhängigkeit zur Folge hat (Moron et al., 2010; Nestler, 1992; Widnell et al., 1996); die CREB-Aktivierung im Nucleus accumbens – als eine der maßgeblichen Belohnungsregionen des Gehirns – ist demzufolge an der Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit beteiligt, indem hierdurch einerseits die Sensitivität für wiederholte Opioid-Exposition herabgesetzt, andererseits die Ausbildung negativer Empfindungen während des Entzugs beeinflusst wird (Nestler, 2004). Zum anderen

wird cAMP auch im Zusammenhang mit der Entstehung einer Langzeit-Depression (*long-term depression*; LTD) und Langzeit-Potenzierung (*long-term potentiation*; LTP) Bedeutung beigemessen. Diese beiden Mechanismen bilden als Formen der synaptischen Plastizität die Grundlage von Lernen und Gedächtnis und werden als adaptative Prozesse mit der Entwicklung von Abhängigkeit in Verbindung gebracht. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der synaptischen Plastizität der Synapsen der Moosfasern der CA3-Region des Hippocampus und chronischer Morphin-Applikation ist dabei von Interesse; so resultiert zum einen chronische Morphin-Exposition in einer Hochregulation der Isoformen der Adenylylcyclasen AC1 und AC8 in dieser Region – eine Deletion beider Isoformen hat die vollständige Blockade der LTP zur Folge (Ovbiagele et al., 2010) –, wobei Opioid-Rezeptoren an dieser Synapse die Glutamat-Freisetzung inhibieren (Buntin-Mushock et al., 2005; Collett, 1998), zum anderen kommt in diesem Bereich der cAMP-Signalkaskade eine maßgebliche Rolle zu (Hernandez et al., 2010; Hernandez et al., 2011). Die CA3-Region des Hippocampus stellt demzufolge eine potentielle Region dar, an der langfristige Opioid-induzierte Effekte eine veränderte Plastizität bewirken können (Williams et al., 2001).

1.7 Mausmodelle

Toleranzentwicklung bezüglich der analgetischen Wirkung von Opioiden wird gemeinhin als eine Änderung antinozizeptiver Reaktionen nach Applikation der zu testenden Substanzen bestimmt. Die beiden gängigsten Tests in diesem Zusammenhang sind der *hot plate*-Test und der *tail flick*-Test, in welchen eine Wärmequelle auf die Pfote, respektive den Schwanz der Tiere einwirkt und die Latenzzeit bis zur Äußerung von Schmerzempfinden gemessen wird. Abhängigkeit Opioid-toleranter Mäuse wird weithin anhand der Entzugssymptome ermittelt, welche mittels Applikation von Opioid-Antagonisten wie Naloxon oder durch Entziehung des Opioids ausgelöst werden. Eine Abhängigkeit kennzeichnende Entzugssymptome stellen hierbei Springen, Schütteln (sogenannte *wet dog shakes*), verstärkte Lokomotion und Lautäußerungen, Hyperalgesie sowie Tremor dar.

Die suchterzeugende Eigenschaft von Opioiden wird – wie bereits angeführt – als ein komplexes Geschehen angesehen, das sich aus der Modulierung von neuronalen Bahnen entwickelt, welche mit Stress und Angst, Belohnung, sowie Lernen und Gedächtnis assoziiert sind. Für die Beurteilung positiver Verstärkungseffekte, welche die belohnenden Eigenschaften von Opioiden widerspiegeln, dient gemeinhin das Prinzip der konditionierten Platz-Präferenz (*conditioned place preference*; CPP), einer Methode, mit welcher ermittelt

wird, ob das Tier eine Präferenz für eine bestimmte Umgebung entwickelt, wenn diese mit dem Opioid assoziiert ist (Waldhoer et al., 2004).

1.7.1 Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse

Mittlerweile wurden in mehreren wissenschaftlichen Einrichtungen μ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse generiert, welche je nachdem ob das μ -Opioid-Rezeptor-Gen in Exon 1 oder Exon 2 beziehungsweise Exon 2 und Exon 3 ausgeschaltet ist, unterschiedliche Phänotypen aufweisen. Opioid-induzierte Wirkungen wie Analgesie, Hyperlokomotion, Atemdepression, Obstipation und Immunsuppression sind in Exon-2- μ -Opioid-Rezeptor-defizienten Tieren nicht mehr auslösbar (Fuchs et al., 1999; Loh et al., 1998; Matthes et al., 1996; Qiu et al., 2000; Sora et al., 1997). Dementgegen zeigen Exon-1- μ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse eine selektive Analgesie nach Applikation der Agonisten Morphin-6-Glucuronid und Heroin (Schuller et al., 1999). Viele Substanzen mit suchterzeugendem Charakter lösen bei μ -Opioid-Rezeptor-defizienten Mäusen eine reduzierte Präferenz im CPP-Modell aus, was auf die Bedeutung des μ -Opioid-Rezeptors in neuronalen Schaltkreisen in Bezug auf Belohnungseffekte hindeutet (Berrendero et al., 2002; Ghozland et al., 2002; Hall et al., 2001). Auch geben einige Studien Hinweis auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen μ -Opioid- und δ -Opioid-Rezeptoren, da selektive δ -Opioid-Rezeptor-Liganden bei μ -Opioid-Rezeptor-defizienten Mäusen eine reduzierte Analgesie hervorrufen (Matthes et al., 1998; Sora et al., 1997).

Bei *Knock-in*-Mäusen, die eine phosphorylierungsdefiziente S375A-Mutante des μ -Opioid-Rezeptors exprimieren, entfalten Morphin und Fentanyl dosisabhängig verstärkte antinozizeptive Effekte verglichen mit Wildtypen, daneben ist bei diesen Tieren die Toleranzentwicklung nach chronischer Applikation hochwirksamer Opiode wie DAMGO vermindert, nicht aber nach chronischer Gabe von Morphin; diese Ergebnisse weisen dem Serin³⁷⁵ als Phosphorylierungsstelle des μ -Opioid-Rezeptors bezüglich Opioid-vermittelter Wirkungen eine maßgebliche Bedeutung zu (Grecksch et al., 2011).

δ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse zeigen bezüglich δ -Opioid-Rezeptor-Agonisten immer noch eine gewisse Sensitivität, gleichwohl sind hohe Dosen dieser Substanzen erforderlich, um eine Analgesie zu bewirken; dieses Phänomen kann mit der zusätzlichen Wirkung dieser hochdosierten δ -Opioid-Rezeptor-Liganden auch auf andere Opioid-Rezeptoren begründet werden (Waldhoer et al., 2004). Daneben entwickeln δ -Opioid-Rezeptor-defiziente Tiere eine reduzierte Morphin-Toleranz verglichen mit Wildtypen sowie stärker ausgeprägte Angstsymptome in entsprechenden Verhaltenstests, jedoch keine Morphin-Präferenz im CPP-

Modell, was eine Beteiligung des δ -Opioid-Rezeptors an der Morphin-Toleranz, jedoch nicht bezüglich der Vermittlung von Belohnungseffekten nahe legt (Abdelhamid et al., 1991; Filliol et al., 2000; Fundytus et al., 1995; Pradhan et al., 2011; Roberts et al., 2001; Zhu et al., 1999). κ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse weisen im Gegensatz zu Wildtypen keine Platz-Aversion oder Dysphorie nach Applikation von κ -Opioid-Rezeptor-Agonisten auf, ebenso sind nach chronischer Morphin-Applikation die Naloxon-induzierten Entzugssymptome bei diesen Tieren abgeschwächt (Gaveriaux-Ruff & Kieffer, 2002). Des Weiteren zeigen Tiere mit defektem Prodynorphin-Gen eine verminderte Stress-induzierte Analgesie und Immobilität; das gleiche Phänomen war auch bei Wildtyp-Mäusen nach Applikation des κ -Opioid-Rezeptor-Antagonisten NorBNI erkennbar (McLaughlin et al., 2003).

Bei Nozizeptin-Rezeptor- sowie Nozizeptin-defizienten Mäusen ist ebenfalls die Stress-induzierte Analgesie verändert, während die analgetische Wirkung Morphins bei diesen Tieren jener bei Wildtyp-Mäusen entspricht (Kest et al., 2001; Koster et al., 1999; Mamiya et al., 2001; Ueda et al., 1997).

1.7.2 GRK-defiziente Mäuse

Unter Verwendung GRK-defizienter Mausmodelle kann die spezifische Funktionalität der GRKs, auf welche schon die teils unterschiedliche Gewebeverteilung dieser Enzyme hinweist, sukzessive weiter aufgeklärt werden.

GRK1-defiziente Mäuse weisen aufgrund der Phosphorylierungsdefizienz des Rhodopsins nach Lichteinwirkung verlängerte und verstärkte Reaktionen der retinalen Zellen sowie Degenerationen der Retina auf (Chen et al., 1995; Lyubarsky et al., 2000).

Ein Fehlen der GRK2 bedingt embryonale Letalität an Embryonaltag 15, wobei GRK2-defiziente Embryonen eine ventrikuläre Myokard-Hyperplasie ausbilden. Heterozygote adulte Tiere zeigen kardial kontraktile Dysfunktionen, was die GRK2 bezüglich der Embryogenese und kardialen Entwicklung essentiell erscheinen lässt (Jaber et al., 1996; Rockman et al., 1998).

Den Einfluss der GRK3 auf die Fentanyl-vermittelte Toleranz konnten Terman et al. (2004) nachweisen; GRK3-defiziente Mäuse entwickeln eine schwächere antinozizeptive Toleranz nach Fentanyl-Applikation im Vergleich zu Wildtypen, jedoch unterscheiden sich die beiden Genotypen nicht im Grad der Ausprägung von Entzugssymptomen nach Injektion von Naloxon. Zudem zeigen GRK3-defiziente Mäuse keine schnelle Desensitisierung des olfaktorischen Epithels wie sie physiologisch nach Agonisten-vermittelter Stimulation erfolgt (Peppel et al., 1997).

Bis zum Zeitpunkt der Entstehung dieser Arbeit wurde der Phänotyp GRK4-defizienter Mäuse nicht beschrieben. Die spezifische Reduktion der Expression der GRK4 in den proximalen Tubulus-Zellen der Niere zieht eine verminderte Desensibilisierung des Dopamin-D₁-Rezeptors nach sich, daneben existieren Hinweise auf eine maßgebliche Bedeutung der GRK4 bezüglich der Desensibilisierung von GABA_B-Rezeptoren in zerebralen Granular-Zellen (Perroy et al., 2003; Salles et al., 2000; Watanabe et al., 2002).

Bei GRK5-defizienten Mäusen ist eine erhöhte Sensitivität der muskarinergen Rezeptoren nach Applikation von Oxotremorin bekannt, was eine Steigerung der durch Oxotremorin vermittelten Effekte sowie eine länger anhaltende Wirkdauer dieser Substanz zur Folge hat und sich phänotypisch bei diesen Tieren in beispielsweise verstärkter Hypothermie und Hypoaktivität sowie Tremor äußert (Gainetdinov et al., 1999).

GRK6-defiziente Mäuse weisen eine Überempfindlichkeit gegenüber Psychostimulanzien auf, wie etwa eine gesteigerte Lokomotion nach Cocain- und Amphetamin-Applikation, jedoch unveränderte Spiegel an Dopamin im Vergleich zu Wildtypen. Auch ist bei diesen Tieren die Kopplung von Dopamin-D₂- und Dopamin-D₃-Rezeptoren an G_{i/o}-Proteine verstärkt, was auf eine GRK6-medierte postsynaptische Regulation der Dopamin-D₂- und Dopamin-D₃-Rezeptoren hinweist (Gainetdinov et al., 2003).

Aufgrund der Zell- und Gewebe-spezifischen Verteilung der verschiedenen GRKs, aber auch im Hinblick auf die oben angeführten Ergebnisse scheint die Selektivität einzelner GRKs für bestimmte GPCRs nahezuliegen, so dass GPCRs nicht von allen in der Zelle exprimierten GRKs gleichsam reguliert werden, sondern gewisse GRKs bestimmte Rezeptoren funktionell spezifisch regulieren (Kohout & Lefkowitz, 2003).

2 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit bestand zum einen darin, das Agonist-spezifische Phosphorylierungsmuster endogener μ -Opioid-Rezeptoren *in vivo* zu untersuchen. Besonderes Augenmerk lag diesbezüglich auf den Aminosäureresten Threonin³⁷⁰, Serin³⁷⁵ und Threonin³⁷⁹, für welche eigens phosphospezifische Antikörper generiert wurden. Diese Aminosäurereste waren in vorangegangenen Arbeiten als wichtige Phosphorylierungsstellen des μ -Opioid-Rezeptors identifiziert worden, wobei diesen Ergebnissen zufolge die Applikation von Morphin spezifisch eine Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ induziert.

Wir haben deshalb im Folgenden *in vivo* anhand GRK3- und GRK5-defizienter Mäuse den Einfluss der GRK5- sowie der GRK3-Deletion auf die Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ nach Applikation verschiedener Opioide ermittelt, weil sich diese Kinasen schon in Vorarbeiten als sehr bedeutsam bezüglich der Opioid-vermittelten Aktivierung des μ -Opioid-Rezeptors herausgestellt haben.

Aus vorangegangenen Studien existierten ebenfalls bereits Hinweise, dass eine gestörte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors die Opioid-induzierte Analgesie beeinflussen kann; so sollte zum anderen anhand GRK3- und GRK5-defizienter sowie phosphorylierungsdefizienter MOR^{S375A/S375A}-Mäuse erforscht werden, inwieweit sich die Agonist-selektive Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors auf die Antinozizeption sowie das Suchtverhalten dieser Tiere nach Opioid-Applikation auswirkt.

3 Material

3.1 Chemikalien

Sämtliche Chemikalien wurden von folgenden Herstellern bezogen: AppliChem, Bachem, Biozym, Boehringer/Roche, Clontech, Gibco, Invitrogen, Carl-Roth, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific und VWR. Sie wurden in der Qualität pro analysi (p.a.) eingesetzt. Die Lösungen wurden mit deionisiertem Wasser hergestellt (Milli-Q®, Millipore), welches zusätzlich autoklaviert (Laboclav®, SHP Steriltechnik) wurde. Spezielle Chemikalien und Lösungen werden bei der jeweiligen Methodenbeschreibung angegeben.

3.2 Antikörper

Die Generierung und Charakterisierung des phosphorylierungsunabhängigen monoklonalen Kaninchen-Antikörpers anti-MOR (UMB-3, Epitomics, Burlingame, USA), des phosphorylierungsspezifischen polyklonalen Meerschweinchen-Antikörpers anti-pS375 gegen die Phosphorylierungsstelle Serin³⁷⁵ sowie des phosphorylierungsunabhängigen polyklonalen Meerschweinchen-Antikörpers anti-MOR (GP6) wurden bereits publiziert (Grecksch et al., 2011; Lupp et al., 2011).

Der phosphorylierungsspezifische Antikörper für die Phosphorylierungsstelle Threonin³⁷⁰ wurde gegen die Aminosäuresequenz IRQN(pT)REHP generiert, welche einen phosphorylierten Threoninrest enthält und den Aminosäuren 366-374 des μ -Opioid-Rezeptors der Maus entspricht. Daneben wurde der phosphorylierungsspezifische Antikörper für die Phosphorylierungsstelle Threonin³⁷⁹ gegen die Aminosäuresequenz STAN(pT)VDRT erzeugt, welche ebenfalls einen phosphorylierten Threoninrest enthält und den Aminosäuren 375-383 des μ -Opioid-Rezeptors der Maus entspricht.

Die beiden phosphorylierungsspezifischen polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper anti-pT370 (GPM370-1) und anti-pT379 (GPM379-2) wurden entsprechend den beiden bereits publizierten polyklonalen Kaninchen-Antikörpern anti-pT370 (3196) und anti-T379 (3686) für die Phosphorylierungsstellen Threonin³⁷⁰ und Threonin³⁷⁹ des μ -Opioid-Rezeptors generiert und charakterisiert (Doll et al., 2011; Just et al., 2013).

Eine zusammenfassende Aufstellung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper findet sich im Anhang.

3.3 Versuchstiere

Die Generierung und Charakterisierung der *Knock-in*-Mäuse (MOR^{S375A/S375A}), welche eine phosphorylierungsdefiziente S375A-Mutante des μ -Opioid-Rezeptors (Oprm1^{tm1Shlz}) exprimieren, wurden bereits publiziert (Grecksch et al., 2011).

Die verwendeten GRK5-defizienten (Grk5^{tm1Rjl}) und GRK3-defizienten (Adrbk2^{tm1Rjl}) Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbour, Maine, USA) bezogen.

Die μ -Opioid-Rezeptor-defizienten Mäuse stammen von Dr. H. Loh (University of Minnesota, Minneapolis, USA). Bei diesen Tieren sind Exon 2 und Exon 3 des μ -Opioid-Rezeptors ausgeschaltet. Die Charakterisierung dieser Tiere wurde ebenfalls bereits publiziert (Loh et al., 1998).

Die Wildtyp-Tiere stammen aus der J-Linie des C57BL6-Zuchtstamms von Charles River Laboratories (Sulzfeld).

Alle Linien wurden in den Tierhaltungsräumen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Klinikums der Friedrich-Schiller-Universität Jena untergebracht und dort weiter gezüchtet. Die Mäuse wurden einzeln oder in Gruppen zu maximal fünf Tieren unter kontrollierten Laborbedingungen mit einem Hell-Dunkel-Rhythmus von zwölf Stunden bei einer Temperatur von 20±2°C und einer Luftfeuchtigkeit von 55-60% bei *ad libitum*-Zugang zu Futter (Altromin, Lage) und Wasser gehalten.

4 Methoden

4.1 Tierversuche

Die Tierversuche sind unter der Registriernummer 02-044/11 beim Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz geführt und wurden gemäß den Bestimmungen der Europäischen Kommission zum Schutz von Versuchstieren und im Einklang mit den ARRIVE (Animals in Research: Reporting *In Vivo* Experiments)-Richtlinien durchgeführt (Kilkenny et al., 2010; McGrath et al., 2010). Die genotypisch unterschiedlichen Mauslinien sind anhand ihres Phänotyps nicht zu unterscheiden, so dass eine Verblindung der Versuche problemlos möglich war.

In sämtlichen Tierversuchen wurden männliche Mäuse im Alter von zwölf bis 18 Wochen mit einem Gewicht zwischen 25g und 30g verwendet. Ein maximaler Altersunterschied der Tiere von vier Wochen wurde gewählt, um unterschiedliche Verhaltensweisen, die auf Lernprozessen und Erfahrungen im Zusammenhang mit dem Lebensalter beruhen könnten,

weitgehend ausschließen zu können. Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die Erwartungshaltung des Versuchsdurchführenden zu verhindern, erfolgten die Verabreichung der Substanzen und die anschließende Schmerzmessung durch zwei verschiedene Personen. Bei der Messung selbst waren demzufolge Genotyp sowie nach Möglichkeit auch die Testsubstanzen dem die Messung Durchführenden nicht bekannt.

Die Behandlung der Tiere erfolgte entsprechend den verschiedenen Versuchsmodellen mit unterschiedlichen Dosierungen an Morphin-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt), Etonitazen-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim), Fentanyl-Citrat (Rotexmedica, Trittau), Naloxon-Hydrochlorid (Merck, Darmstadt) sowie Cocain-Hydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim). Die Substanzen wurden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und in einem Volumen von 10 ml/kg Körpergewicht subkutan injiziert. Als Kontrollsubstanz diente 0,9%ige Natriumchloridlösung.

4.1.1 Ermittlung der Antinozizeption

Zur Bestimmung der basalen Schmerzschwelle wurde zunächst die Reaktionszeit der unbehandelten Tiere im *hot plate*-Test (Ugo Basile, Comerio, Italien) bei Temperaturen von 52°C, 54°C und 56°C an aufeinanderfolgenden Tagen bestimmt. Während jeder Messung wurde die Latenz vom ersten Kontakt der Maus mit der heißen Platte bis zu einer eindeutigen Schmerzäußerung des Tieres aufgezeichnet. Als derartige Reaktion wurde das Wegziehen oder ruckartige Zucken sowie Lecken einer der beiden Hinterpfoten festgelegt, wie auch ein auffällig schnelles Trippeln des Tieres, was nicht dem gewöhnlichen Verhalten auf einer unbeheizten Unterlage entspricht und demzufolge als Schmerzempfinden interpretiert werden kann. Bei allen Versuchen wurde die maximale Messzeit auf 30 Sekunden beschränkt, um die Tiere vor ernsthaften Gewebeschäden oder Verbrennungen zu bewahren. Erwartungsgemäß nimmt die Reaktionszeit der Tiere bei steigender Temperatur in etwa gleichmäßig ab; die kürzeste Reaktionszeit mit der geringsten Abweichung wurde bei 56°C aufgezeichnet und in allen folgenden Versuchen als Messtemperatur beibehalten.

Die ermittelten Latenzzeiten sind als Prozentsatz des maximalen möglichen Effekts (% MPE) dargestellt und errechnen sich nach folgender Formel:

$$100\% \times [(Latenzzeit - \text{Basalwert}) / (30 \text{ s} - \text{Basalwert})] = \% \text{ MPE}$$

Zur Bestimmung der Dosis-Wirkungskurve von Morphin wurden die antinozizeptiven Reaktionen der Tiere jeweils 30 Minuten nach subkutaner Injektion dieser Substanz in fünf aufeinanderfolgenden steigenden Dosierungen gemessen (siehe Tabelle 4-1).

Tabelle 4-1. Dosierungen und Injektionszeitpunkte von Morphin

Zeitpunkt (min)	0	30	60	90	120
injizierte Dosis	3 mg/kg	+ 2 mg/kg	+ 5mg/kg	+ 20 mg/kg	+ 70 mg/kg
kumulative Dosis	3 mg/kg	5 mg/kg	10 mg/kg	30 mg/kg	100 mg/kg

Fentanyl wurde aufgrund seiner geringeren Eliminationshalbwertszeit in einem Abstand von 15 Minuten subkutan in steigenden Dosen appliziert, wobei die daraus resultierende analgetische Wirkung dementsprechend alle 15 Minuten ermittelt wurde (siehe Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2. Dosierungen und Injektionszeitpunkte von Fentanyl

Zeitpunkt (min)	0	15	30	45
injizierte Dosis	0,02 mg/kg	+ 0,03 mg/kg	+ 0,05mg/kg	+ 0,2mg/kg
kumulative Dosis	0,02 mg/kg	0,05 mg/kg	0,1 mg/kg	0,3 mg/kg

Zur Bestimmung der analgetischen Wirkung Morphins nach Injektion des MEK1/MEK2-Inhibitors SL327 wurde einer Gruppe Wildtypen eine Stunde vor subkutaner Applikation von 10 mg/kg Morphin intraperitoneal SL327 in einer Dosierung von 10 mg/kg appliziert. Die Kontrollgruppe der Wildtypen erhielt stattdessen physiologische Kochsalzlösung. SL327 (Tocris Bioscience, Bristol, UK) wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit 5% DMSO (Merck, Darmstadt) und 20% Cremophor (Sigma-Aldrich, Steinheim) gelöst injiziert. Die Messung des Schmerzempfindens erfolgte, wie oben beschrieben, mittels *hot plate*-Test bei 56°C 30 Minuten nach Morphin-Applikation.

4.1.2 Ermittlung der akuten Toleranz

Die akute Opioid-induzierte analgetische Toleranz wurde mithilfe des *hot plate*-Tests bei 56°C bestimmt. Zunächst wurde die basale Schmerzschwelle der Mäuse ermittelt, daraufhin wurde den Tieren 10 mg/kg Morphin subkutan injiziert und über einen Zeitraum von vier Stunden nach 30 Minuten, 180 Minuten und 240 Minuten die Reaktionszeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden wie oben ausgeführt gemessen. Nach Erreichen der Basalwerte nach 240 Minuten wurden erneut 10 mg/kg Morphin injiziert und 30 Minuten später die Entwicklung der akuten analgetischen Toleranz anhand der Messung der Latenzzeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden ermittelt.

Zur Ermittlung der akuten Fentanyl-induzierten analgetischen Toleranz wurde ebenfalls zunächst die basale Schmerzschwelle der Mäuse bestimmt, daraufhin wurde den Tieren 0,3 mg/kg Fentanyl subkutan injiziert und über einen Zeitraum von drei Stunden nach 15 Minuten, 90 Minuten und 180 Minuten die Reaktionszeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden wie oben dargestellt gemessen. Nach Erreichen der Basalwerte nach 180 Minuten wurden erneut 0,3 mg/kg Fentanyl injiziert und 15 Minuten später die Entwicklung der akuten analgetischen Toleranz anhand der Messung der Latenzzeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden ermittelt. Der Vergleich dieser Messwerte mit denjenigen 30 Minuten beziehungsweise 15 Minuten nach der ersten Injektion erlaubt einen Rückschluss auf die akute analgetische Toleranzentwicklung nach Applikation von Morphin beziehungsweise Fentanyl.

4.1.3 Ermittlung der chronischen Toleranz und physischen Abhängigkeit

Im chronischen Modell wurde den Tieren zur Induktion einer Toleranz über einen Zeitraum von zehn Tagen im Abstand von zwölf Stunden 10 mg/kg Morphin oder 10 µg/kg Etonitazen appliziert; die Schmerzmessungen mittels *hot plate*-Test erfolgten jeweils an den Tagen 1, 3, 6 und 10 bei einer Temperatur der heißen Platte von 56°C. 30 Minuten nach Verabreichung der Opioide beziehungsweise der Kontrolllösung wurden die Reaktionszeiten der Tiere bis zur Äußerung von Schmerzempfinden, wie oben erläutert, ermittelt, wodurch ein Rückschluss auf die analgetische Wirkung der verabreichten Substanzen gezogen sowie eine etwaige Toleranzentwicklung im Verlauf der Versuchsreihe erkannt werden kann, welche sich in einer Abnahme der analgetischen Wirkung der Substanzen im zeitlichen Verlauf bei gleichbleibender Dosierung äußert.

An Tag 10 wurde den Tieren zwei Stunden nach der letzten Morphin- beziehungsweise Etonitazen-Applikation der Opioid-Rezeptor-Antagonist Naloxon in einer Dosierung von 2 mg/kg subkutan injiziert. Der Antagonist verdrängt innerhalb weniger Minuten vollständig die zuvor applizierten Opioide und blockiert den Rezeptor, was unmittelbar starke, physische Entzugssymptome zur Folge hat. Diese Symptome äußern sich als schnelle, unkontrollierte Sprünge, Zähneknirschen, schnelles Lecken der Vorderpfoten oder unwillkürliches, in Schüben auftretendes, starkes Schütteln des gesamten Körpers (sogenannte *wet dog shakes*). Nach der Injektion von Naloxon wurden anschließend 30 Minuten lang die daraus resultierenden Entzugssymptome Springen und Schütteln beobachtet und protokolliert.

4.1.4 Ermittlung der Opioid-induzierten Belohnungseffekte und deren Extinktion

Um Belohnungseffekte untersuchen zu können, welche durch die Applikation von Morphin, Fentanyl und Cocain bedingt werden, wurde das Modell der konditionierten Platz-Präferenz (*conditioned place preference*; CPP) genutzt.

Die Versuche fanden in einem eigens eingerichteten Versuchsraum statt, in welchem die Tiere in keinerlei Hinsicht wie etwa durch Geräusche oder fremde Gerüche irritiert und gestört werden konnten. Das Versuchsgerät war eine CPP-Box mit drei farblich unterschiedlich gestalteten Kammern (TSE Systems, Bad Homburg), wobei die kleinere, mittige Kammer eine Durchgangskammer zu den beiden größeren, äußeren Kammern darstellt, von welchen die eine mit schwarz-weiß gestreiften Wänden und gerilltem Boden, die andere mit hellgrauen Wänden und ringförmigen Vertiefungen im Boden ausgekleidet ist. Als Testsubstanzen wurden Morphin und Kokain in einer Dosierung von 10 mg/kg und Fentanyl in einer Dosierung von 0,05 mg/kg gelöst in physiologischer Kochsalzlösung subkutan injiziert. Der MEK1/MEK2-Inhibitor SL327 wurde in physiologischer Kochsalzlösung mit 5% DMSO und 20% Cremophor gelöst und jeweils eine Stunde vor Morphin-Injektion intraperitoneal appliziert.

Während der Habituerungsphase von vier aufeinanderfolgenden Tagen hatten die Tiere jeweils über einen Zeitraum von 30 Minuten freien Zugang zu allen Kammern. An Tag 5 wurde die Platz-Präferenz der Tiere bestimmt, indem über zehn Minuten die Zeitdauer aufgezeichnet wurde, welche die Mäuse jeweils in einer der beiden größeren Kammern verbrachten. Ausschließlich diejenigen Tiere, welche keine signifikante Präferenz für eine der beiden Kammern aufwiesen, wurden in die sich anschließende Konditionierungsphase einbezogen. Hierfür wurden die Mäuse in zwei Gruppen eingeteilt, wobei die eine Gruppe vormittags Morphin, Fentanyl oder Kokain sowie nachmittags physiologische Kochsalzlösung erhielt, während der anderen Gruppe vormittags physiologische Kochsalzlösung und nachmittags entsprechende Dosen der wirksamen Substanzen appliziert wurden. Bei Experimenten mit dem MEK1/MEK2-Inhibitor SL327 wurde dieser eine Stunde vor Morphin-Applikation intraperitoneal injiziert. Einer der beiden Kammern wurde Morphin, Fentanyl oder Kokain zugeteilt, demzufolge wurden die Mäuse unmittelbar nach Applikation eben jener Substanz in diese Kammer gesetzt, in welcher sie für 30 Minuten nach Morphin- und Kokain-Gabe beziehungsweise für 15 Minuten nach Fentanyl-Applikation verbleiben mussten. Nach Injektion von physiologischer Kochsalzlösung wurden sie dagegen in die andere Kammer gesetzt und dort 30 Minuten, respektive 15 Minuten gehalten.

Im Anschluss an die viertägige Konditionierungsphase wurde am darauffolgenden Tag die ausgebildete Platz-Präferenz der Tiere bestimmt, indem wiederum über einen Zeitraum von zehn Minuten die Zeit aufgezeichnet wurde, welche die Mäuse bei freiem Zutritt zu allen Kammern in den beiden äußeren Kammern verweilten. Die CPP wird mithilfe folgender Formel errechnet: (Aufenthalt in der Kammer assoziiert mit der wirksamen Substanz) – (Aufenthalt in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer).

Die Extinktion der Platz-Präferenz wurde in den nachfolgenden vier Wochen einmal wöchentlich ermittelt, indem jeweils über zehn Minuten die Zeitdauer aufgezeichnet wurde, welche die Mäuse in einer der beiden größeren Kammern verbrachten.

4.2 Biochemische Methoden

Um die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors ermitteln und quantitativ erfassen zu können, wurde den Tieren nach Behandlung mit verschiedenen Agonisten μ -Opioid-Rezeptor-reiches Gewebe entnommen. Dazu wurden die Tiere jeweils 30 Minuten nach Verabreichung von Morphin oder Etonitazen beziehungsweise 15 Minuten nach Applikation von Fentanyl mit Isofluran betäubt und durch Genickdislokation getötet. Anschließend wurden die Gehirne ohne Rückenmark vollständig entnommen, nach Entfernung des Cerebellums kurz mit Phosphatpuffer gespült und unmittelbar in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die weitere Lagerung der Proben bis zur vollständigen Aufarbeitung erfolgte bei -80°C .

4.2.1 Anreicherung der Rezeptorproteine mittels Immunpräzipitation

Für eine Detektion des μ -Opioid-Rezeptors mussten die Rezeptoren mithilfe von Protein-A-*beads* angereichert werden. Zunächst wurde je Gehirn 60 μl Protein-A-Suspension mit 2 ml des für den μ -Opioid-Rezeptor spezifischen Antikörpers UMB-3 vermengt und bei 4°C zwei Stunden geschüttelt. Hierbei erfolgt die Bindung der Antikörper an die Protein A-*beads*, welche nach anschließender Zentrifugation für zwei Minuten bei 2500 rpm für eine Anreicherung der Rezeptorproteine verwendet werden konnten.

Um den Rezeptor für die Analyse zugänglich zu machen, wurden die Gehirne in einem Reaktionsgefäß mit 1,5 ml kaltem RIPA-Puffer (150 mM NaCl; 50 mM Tris-HCl pH 7,4; 5 mM EDTA; 1 Vol.% Igepal [Nonidet P-40]; 0,5 Vol.% Na-Deoxycholat; 0,1 Vol.% SDS) mit Protease-Inhibitoren (Complete-Mini[®] EDTA-free, Roche) und Phosphatase-Inhibitoren (PHOSStop[®], Roche) versetzt und für einige Sekunden mit einem Ultraschallstab auf Eis aufgeschlossen. Im Anschluss wurde das homogenisierte Gewebe zwei Stunden bei 4°C

geschüttelt, um eine vollständige Lyse der Zellen durch den RIPA-Puffer zu gewährleisten. Die lysierten Proben wurden daraufhin bei 16000 x g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, wobei die festen zellulären Bestandteile abgetrennt wurden. Der Überstand des Zelllysats, welcher die gelösten Proteine beinhaltet, wurde auf Protein-A-beads gegeben, welche Immunglobuline binden, und auf einem Überkopf-Rotator für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Bindung der Proteine an die *beads* wurden diese mittels Zentrifugation für zwei Minuten bei 2000 rpm von den restlichen gelösten Proteinen abgetrennt. Das Sediment wurde mit 60 µl SDS-Probenpuffer versetzt und für 20 Minuten bei 43°C inkubiert.

4.2.2 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Proteintrennung erfolgte mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page), bei der die Proteine unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung entsprechend ihrer relativen Molekülmasse aufgetrennt werden. Hierfür wurde das Mini-PROTEAN®-Tetra-System (Bio-Rad Laboratories, München) mit einem Tris-HCl-Puffersystem verwendet. Das zu trennende Proteingemisch wurde zunächst in einem Sammelgel konzentriert, bevor es durch das eigentliche Trenngel wanderte. Der pH-Gradient zwischen Sammel- und Trenngel bedingt die Konzentrierung der Proteine an der Grenze der Gele (Davis, 1964; Doucet & Trifaro, 1988) (Zusammensetzung der Sammel- und Trenngele, siehe Tabelle 4-3).

Tabelle 4-3. Zusammensetzung der SDS-Page-Gele

	Trenngel	Sammelgel
Acrylamid-Konzentration	7,5%	4%
Wasser	8 ml	4,7 ml
Trenngel-Puffer	4 ml	-
Sammelgel-Puffer	-	1,8 ml
Acrylamid 30%	4 ml	1 ml
TEMED	20 µl	18 µl
APS 10%	80 µl	48 µl

Im ersten Durchlauf wurden jeweils 15 µl Probenlösung pro Geltasche aufgetragen. Nach Trennung und Detektion des Gesamtzeptors wurde die in diesem Volumen enthaltene Proteinmenge quantifiziert, sodass im zweiten Durchlauf das Probenvolumen entsprechend dem Gesamtzeptor angepasst werden konnte, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten. Um eine Größenabschätzung der aufgetrennten Proteine zu ermöglichen,

wurde zusätzlich zu den Proben 6 µl eines Größenmarkers (Prestained PageRuler, Thermo Scientific Fermentas, Waltham, USA) aufgetragen.

Die Laufzeiten betragen für das Sammelgel 15 Minuten bei einer angelegten Spannung von 90 Volt und für das Trenngel ungefähr 60 Minuten bei 120 Volt.

4.2.3 Western-Blot-Analyse

Nach der Auftrennung mussten die Rezeptorproteine auf einer geeigneten Trägermembran fixiert werden, um eine anschließende Identifizierung und Quantifizierung zu ermöglichen. Als Matrix dienten Polyvinylidenfluorid-Membranen (PVDF-Membran), welche für circa 15 Sekunden in 100%igem Methanol getränkt wurden, um sie für die anschließende wässrige Behandlung zugänglich zu machen. Im Anschluss wurde die Membran kurz in Blot-Puffer (3,03 g/l Tris; 11,25 g/l Glyzin; 100 ml/l Methanol, pH 8,3) gewaschen, ebenso wurden das Polyacrylamid-Gel und die *Whatman*-Papiere in Blot-Puffer vorinkubiert. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran wurde mit einem Trans-Blot® Semi-Dry-Gerät (BioRad) durchgeführt, indem die Membran und das Proteingel zwischen *Whatman*-Papiere gelegt und eine Spannung von 200 mA/Gel für 60 Minuten angelegt wurde.

4.2.4 Immundetektion

Die folgenden Schritte und Inkubationszeiten wurden auf einem Orbital-Schüttelinkubator (90 rpm) durchgeführt. Die Membran wurde für 30 Minuten mit 5% Milchpulver in einer Tris-gepufferten Salzlösung mit Tween (TBS-T: 50 ml/l 1M Tris-HCl; 8,7 g/l NaCl, pH 7,6; 1 ml/l Tween) inkubiert, um unbesetzte Proteinbindungsstellen der Membran mit unspezifischem Milchprotein zu blockieren. Nach dreimaligem Waschen der Membran in TBS-T wurde die Primärantikörper-Lösung zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle Primär- und Sekundär-Antikörper wurden in TBS-T mit 5% Milchpulver, wie im Anhang angegeben, verdünnt. Nach mehreren Waschzyklen von jeweils 10 Minuten mit TBS-T wurde die Membran in die Sekundärantikörper-Lösung gelegt und für weitere zwei Stunden inkubiert. Nach drei erneuten Waschzyklen mit TBS-T von jeweils 10 Minuten wurde die Chemilumineszenzreaktion mittels SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce) nach Angaben des Herstellers induziert und mit chemilumineszenz-sensitiven Röntgenfilmen (T-Mat Plus DG Film, Kodak) detektiert. Die Entwicklung der Filme erfolgte mit der Entwicklermaschine Cawomat 2000 (Cawo).

Um die Rezeptormenge der einzelnen Proben zu quantifizieren, wurden die Membranen für 30 Minuten in Stripping- Puffer (0,76 g / 100 ml Tris; 2 g / 100 ml Natriumdodecylsulfat

[SDS]; 700 µl β-Mercaptoethanol) bei 50 C° inkubiert und danach mit Aqua bidest. gewaschen. Nachfolgend wurden die Membranen, wie oben beschrieben, blockiert und mit dem phosphorylierungsunabhängigen polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper GP6 inkubiert, um eine gleichmäßig erfolgte Beladung der Gele zu gewährleisten.

4.2.5 Quantifizierung der Rezeptorphosphorylierung

Mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ 1.40g wurden zunächst die Rezeptorkonzentrationen quantifiziert. Hierzu wurde die Anzahl der Pixel jeder Rezeptorbande ermittelt und auf den Hintergrund kalibriert, wobei die Probe mit der höchsten Rezeptormenge als 100% definiert wurde. Das Volumen der anderen Proben wurde daraufhin auf diese 100% normalisiert. Anschließend wurde die Anzahl der Pixel der Phosphorylierungsbanden gemessen und auf den Hintergrund sowie auf die Rezeptorkonzentration der entsprechenden Probe normalisiert. Als Kontrolle diente die Referenzprobe, welche als 100% definiert wurde. Ausgehend von diesen 100% wurde die prozentuale Rezeptorphosphorylierung der anderen Proben berechnet.

4.3 Datenauswertung und statistische Analyse

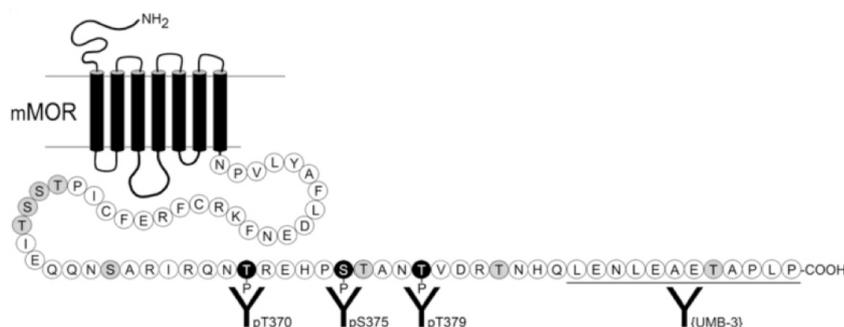
Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe von Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmont, USA) und GraphPad Prism 4.0 (GraphPad Software, San Diego, USA).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse, einschließlich Signifikanzanalyse, wurde mit Hilfe der einfaktoriellen ANOVA mit folgender Bonferroni-Korrektur durchgeführt; p-Werte < 0,05 wurden als statistisch signifikant angesehen; bei größeren Werten gilt die gemessene Differenz zwischen den beiden Versuchsgruppen als statistisch nicht eindeutig, sodass keine Interpretation in Bezug auf mögliche Unterschiede erfolgen kann.

5 Ergebnisse

5.1 Agonist-selektive Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors *in vivo*

Die Signaltransduktion des μ -Opioid-Rezeptors unterliegt einer strengen Regulation durch die koordinierte Phosphorylierung intrazellulärer Serin- und Threonin-Reste. An HEK293-Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass der μ -Opioid-Rezeptor an der konservierten, zehn Aminosäurereste langen Sequenz ³⁷⁰TREHPSTANT³⁷⁹ (Abbildung 5-1), welche sich am Carboxyl-Terminus des Rezeptors befindet, Agonist-induziert phosphoryliert wird (Doll et al., 2011; Just et al., 2013). Während nach Morphin-Applikation eine selektive Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ (S375) mittig dieser Sequenz erfolgt, welche insbesondere durch die GRK5 katalysiert wird, induzieren dagegen stark wirksame Opiode neben der Phosphorylierung des S375 auch eine Phosphorylierung der dieses flankierenden Aminosäurereste Threonin³⁷⁰ (T370), Threonin³⁷⁶ (T376) und Threonin³⁷⁹ (T379). Dieser Prozess folgt einer hierarchischen Phosphorylierungskaskade, für welche spezifisch die GRK-Isoformen GRK2 und GRK3 unabdingbar sind (Doll et al., 2012; Just et al., 2013). *In vivo* - an Mausgehirnen - konnte bisher einzig die Phosphorylierung des S375 nachgewiesen werden (Grecksch et al., 2011; Lupp et al., 2011).



Modifiziert nach Just et al. (2013)

Abbildung 5-1. Schematische Darstellung der potentiellen Phosphorylierungsstellen des Maus- μ -Opioid-Rezeptors. Abgebildet sind die Antikörper gegen die Phosphorylierungsstellen T370, S375 und T379 sowie der phosphorylierungsunabhängige anti- μ -Opioid-Rezeptor-Antikörper UMB-3. Die weiteren phosphorylierbaren Serine (S) und Threonine (T) in den intrazellulären Schleifen und am C-Terminus sind grau unterlegt.

Um zudem die Phosphorylierung der weiteren genannten Aminosäurereste ebenfalls *in vivo* ermitteln zu können, generierte unsere Arbeitsgruppe die polyklonalen Meerschweinchen-Antikörper anti-pT370 und anti-pT379. Für den Nachweis des Agonist-induzierten Phosphorylierungsmusters des μ -Opioid-Rezeptors wurden zunächst Wildtyp-Mäuse (MOR^{+/+}) mit Morphin sowie den stark wirksamen Opioid-Agonisten Etonitazen und Fentanyl behandelt. In den mithilfe des monoklonalen phosphorylierungsunabhängigen anti-

MOR-Antikörpers UMB-3 immunopräzipitierten Gehirnhomogenaten der behandelten Tiere ließ sich deutlich demonstrieren, dass die Applikation des starken Agonisten Etonitazen die Phosphorylierung der Aminosäurereste T370, S375 und T379 bedingt (Abbildung 5-2A). Dementgegen hatte die Gabe von Morphin einzig eine Phosphorylierung des S375 zur Folge, eine starke Phosphorylierung der beiden anderen Aminosäurereste wie nach Etonitazen-Applikation trat nach Injektion des schwächeren Agonisten jedoch nicht auf. Aus den unteren Blots in Abbildung 5-2, in welchen die Detektion des unphosphorylierten Epitops im Carboxyl-Terminus des μ -Opioid-Rezeptors in den selben Proben abgebildet ist, geht hervor, dass eine äquivalente Rezeptorkonzentration in den verschiedenen Proben vorhanden war. Als Kontrolle der Spezifität der Antikörper dienten μ -Opioid-Rezeptor-defiziente Tiere ($MOR^{-/-}$). Nach identischer Behandlung mit Etonitazen konnte in Gehirnhomogenaten dieser Tiere keine Bande detektiert werden (Abbildung 5-2A, rechter Blot).

Wie aus Abbildung 5-2B ersichtlich ist, bewirkte auch die Applikation des ebenfalls stark wirksamen Opioid-Agonisten Fentanyl die Phosphorylierung der drei Aminosäurereste T370, S375 sowie T379, obgleich sich das Signal bezüglich T379 und insbesondere bei T370 vergleichsweise schwächer darstellte als nach Etonitazen-Behandlung (Abbildung 5-2B).

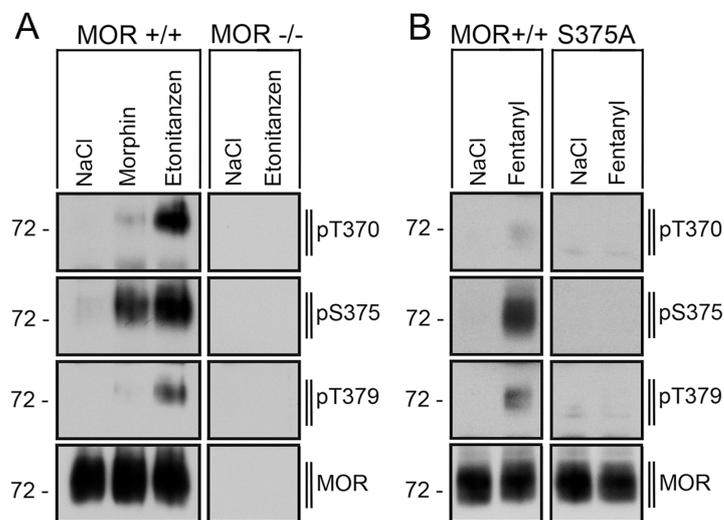


Abbildung 5-2. A: Agonist-selektive Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors (MOR) *in vivo* – Agonist-spezifische Phosphorylierungsmuster. B: Hierarchische Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors (MOR). Wildtyp-Mäusen ($MOR^{+/+}$) und MOR-defizienten Mäusen ($MOR^{-/-}$) wurde physiologische Kochsalzlösung (NaCl), 30 mg/kg Morphin oder 30 μ g/kg Etonitazen subkutan injiziert (A). $MOR^{+/+}$ - und $MOR^{S375A/S375A}$ -Mäusen wurde NaCl oder 0,3 mg/kg Fentanyl injiziert (B). Nach 30 Minuten (A) bzw. 15 Minuten (B) wurden die Tiere betäubt und getötet, die Gehirne entnommen und nach Entfernung des Cerebellums homogenisiert. Die MORs wurden mit dem UMB-3 immunopräzipitiert und die Rezeptorphosphorylierung mit den Meerschweinchen-Antikörpern anti-pT370 (erste Felder), anti-pS375 (zweite Felder) oder anti-pT379 (dritte Felder) detektiert. Die Blots wurden gestrippt und der Gesamtrezeptor mit dem Phosphorylierungs-unabhängigen Meerschweinchen anti-MOR-Antikörper GP6 (vierte Felder) nachgewiesen, um eine äquivalente Beladung des Gels zu bestätigen. Die Position des Größenmarkers (in kDA) ist links dargestellt.

Nach der Behandlung von MOR^{S375A/S375A}-Mäusen mit Fentanyl war erwartungsgemäß keine Phosphorylierung des S375 detektierbar (Abbildung 5-2B, rechter Blot). Bemerkenswert ist jedoch die gleichermaßen verringerte Phosphorylierung des T370 und T379, gleichwohl diese beiden Aminosäurereste bei MOR^{S375A/S375A}-Mäusen nicht mutiert sind. Infolgedessen lassen diese Ergebnisse eine hierarchische Phosphorylierungskaskade in der cytoplasmatischen Region des μ -Opioid-Rezeptors vermuten, wobei die Phosphorylierung des S375 als initialer Schritt für die nachfolgende Phosphorylierung des T379 und T370 notwendig ist.

Wie Doll et al. (2012) in HEK293-Zellen nachweisen konnten, kann die Liganden-induzierte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors sowohl durch die GRK-Isoformen GRK2/3 als auch durch die GRK5 vermittelt werden. Um dementsprechend die spezifische Beteiligung der unterschiedlichen GRKs *in vivo* aufzuklären, haben wir GRK3-defiziente (GRK3^{-/-}) und GRK5-defiziente (GRK5^{-/-}) Mäuse mit Morphin oder Fentanyl behandelt und nachfolgend die Phosphorylierung des S375 in den Gehirnlysaten dieser Tiere untersucht (Abbildung 5-3).

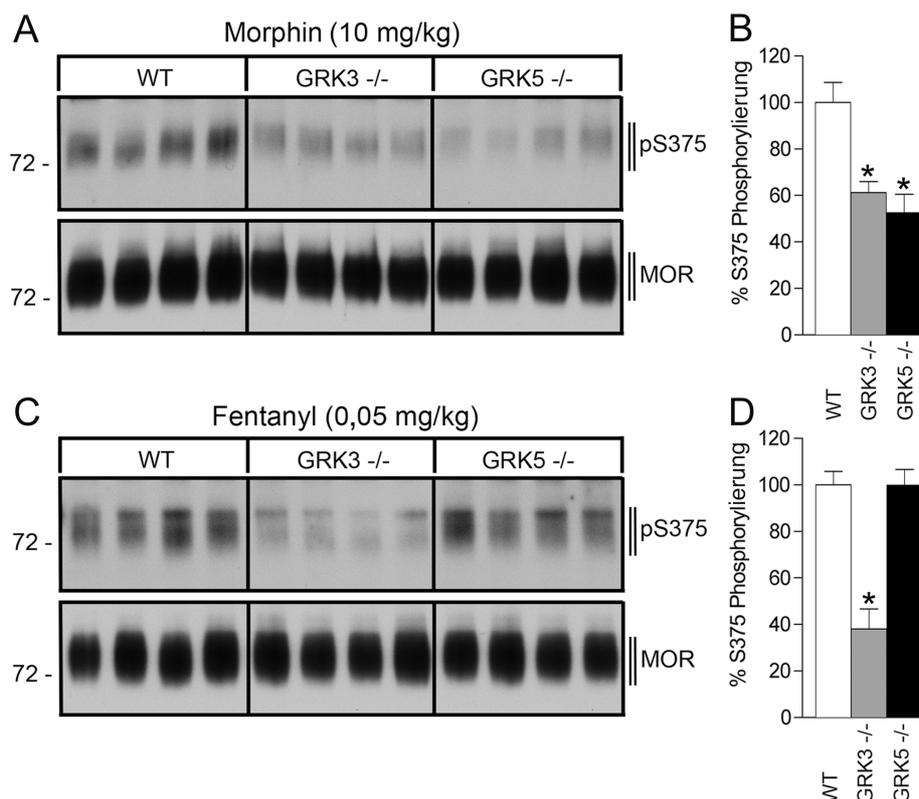


Abbildung 5-3. Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ nach Opioid-Applikation bei GRK3- und GRK5-defizienten Mäusen. A, C: Wildtyp- (WT, n=10), GRK3-defizienten (GRK3^{-/-}, n=10) und GRK5-defizienten (GRK5^{-/-}, n=10) Mäusen wurde 10 mg/kg Morphin (A) oder 0,05 mg/kg Fentanyl (C) subkutan injiziert. Die Gehirne wurden nach 30 Minuten (A) bzw. 15 Minuten (C) entnommen und wie unter Abbildung 5-2 beschrieben weiter behandelt. B, D: Die Phosphorylierung des S375 (pS375) wurde quantifiziert und ist als Prozentsatz der maximalen Phosphorylierung bei Wildtypmäusen dargestellt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM angegeben (n=10 pro Genotyp). Die Position des Größenmarkers (in kDA) ist links dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Die Morphin-induzierte Phosphorylierung des S375 war bei GRK3^{-/-}-Mäusen etwa 40% reduziert, bei GRK5-defizienten Tieren ungefähr 50% (Abbildung 5-3A und 5-3B). Nach Applikation von Fentanyl dagegen bedingte einzig das Fehlen der GRK3 eine geminderte Phosphorylierung um etwa 60%, die Deletion der GRK5 hatte keinen Einfluss auf den Grad der Fentanyl-induzierten Phosphorylierung (Abbildung 5-3C und 5-3D). Hieraus lässt sich auf eine selektive Beteiligung der GRK5 an der Morphin-vermittelten Phosphorylierung *in vivo* schließen, die GRK3 trägt hingegen sowohl zur Morphin- wie auch zur Fentanyl-induzierten Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors bei.

5.2 Antinozizeption GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse im *hot plate*-Test

In Anbetracht der bisher angeführten Ergebnisse und daraus resultierenden Hypothesen stellte sich die Frage, inwieweit sich die Liganden-spezifische Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors und die Agonist-selektive Rekrutierung von GRKs auf die Opioid-induzierte Antinozizeption im lebenden Organismus auswirken.

Infolgedessen haben wir, jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, GRK5^{-/-}-Mäuse sowie GRK3^{-/-}-Mäuse nach Applikation unterschiedlicher Opioide Untersuchungen zur Schmerzwahrnehmung unterzogen, um die analgetische Wirksamkeit jener Substanzen in verschiedenen Modellen bei den genannten Maus-Linien zu untersuchen.

5.2.1 Basales Schmerzempfinden GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse

Zunächst wurde das basale Schmerzempfinden der GRK5^{-/-}-Mäuse sowie der GRK3^{-/-}-Mäuse mit jenem der Wildtyp-Mäuse im *hot plate*-Test verglichen. Hierfür wurden die Tiere der heißen Platte jeweils ein Mal täglich an aufeinanderfolgenden Tagen ausgesetzt, um jegliche Verfälschung der Resultate durch Konditionierung der Mäuse aufgrund des unangenehmen Hitzereizes ausschließen zu können. Pro Tag wurde dabei die Temperatur der Schmerzquelle um zwei Grad Celsius heraufgesetzt und die Messung basalen Nozizeption mit den jeweils selben Tieren der drei Mauslinien durchgeführt.

Abbildung 5-4 ist zu entnehmen, dass die basalen Schmerzschwellen der drei Genotypen im Vergleich zueinander keine signifikanten Unterschiede erkennen lassen. Als eindeutige Schmerzreaktionen wurden hierbei schnelles Tippeln sowie das Lecken oder schnelles, reflexartiges Wegziehen einer der beiden Hinterpfoten gewertet. Mit ansteigender Temperatur nahm die Latenzzeit bis zu einer Schmerzäußerung der getesteten Tiere gleichmäßig stetig ab, die Mäuse zeigten demnach ein ähnlich stark ausgeprägtes Temperaturempfinden.

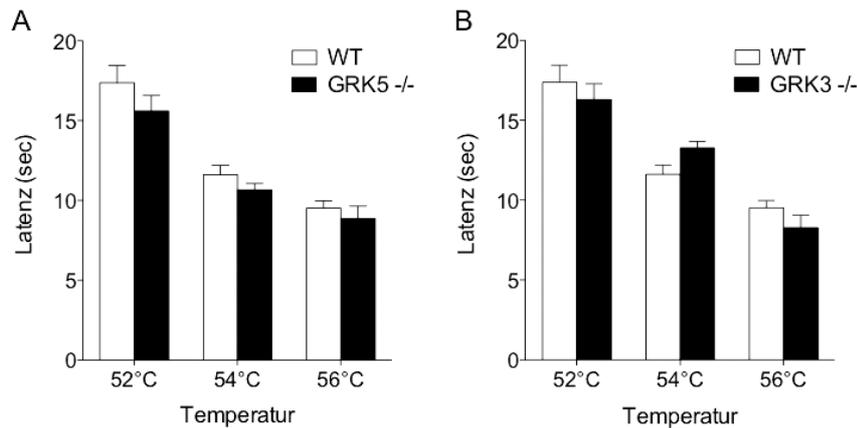


Abbildung 5-4. A: Basale Schmerzschwelle der GRK5^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen. B: Basale Schmerzschwelle der GRK3^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen. GRK5^{-/-} (n=16), GRK3^{-/-} (n=15) und Wildtyp- (WT, n=15) Mäuse wurden an aufeinanderfolgenden Tagen dem *hot plate*-Test unterzogen. Die Messung des Schmerzempfindens erfolgte bei 52°C, 54°C sowie 56°C und ist als Latenzzeit in Sekunden bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion (Tippeln, Lecken oder schnelles Wegziehen der Hinterpfoten) angegeben. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± SEM dargestellt.

Aus diesen Ergebnissen resultiert, dass weder die Deletion der GRK5 noch die der GRK3 auf die basale Nozizeption Einfluss haben. Die Resultate bezüglich der GRK3-defizienten Tiere stehen im Einklang mit bereits veröffentlichten Daten von Terman et al. (2004), wonach GRK3^{-/-}-Mäuse ein mit Wildtypen vergleichbares basales Schmerzempfinden aufweisen. Gleichartige Ergebnisse betreffend MOR^{S375A/S375A}-Mäusen wurden ebenfalls bereits von Grecksch et al. (2011) publiziert; so weisen auch die Tiere jenes Genotyps keine signifikanten Unterschiede zu Wildtyp-Mäusen bezüglich ihres basalen thermischen Schmerzempfindens im *hot plate*-Test auf.

Für sämtliche im Folgenden beschriebenen Versuche wurde stets eine Temperatur der heißen Platte von 56°C gewählt, da bei dieser Temperatur die Streuung der ermittelten Daten während der Untersuchungen zur basalen Schmerzschwelle der drei Genotypen am geringsten ausgefallen war.

5.2.2 Akute antinozizeptive Reaktionen GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach Opioid-Applikation

Nach Feststellung einer ähnlichen basalen Schmerzschwelle von GRK5^{-/-}- und GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen im *hot plate*-Test untersuchten wir nachfolgend die akuten analgetischen Wirkungen von μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten in unterschiedlichen Dosierungen.

Zunächst wurden die antinozizeptiven Reaktionen der Tiere nach subkutaner Applikation steigender, kumulativer Dosen Morphins (3-100 mg/kg) im Sinne einer Dosis-Wirkungs-Beziehung verglichen. In Abbildung 5-5 ist die analgetische Wirkung der unterschiedlichen Dosierungen Morphins, welche sich aus der Reaktionszeit der Tiere bis zur Äußerung von Schmerzempfinden ergibt, sowohl bei GRK5^{-/-} (Abbildung 5-5A) als auch bei GRK3^{-/-}-Mäusen (Abbildung 5-5B) dargestellt. GRK5-defiziente Tiere entwickelten im Vergleich zu Wildtypen nach sämtlichen Konzentrationen des Opioid-Agonisten eine verminderte Analgesie, welche allerdings erst ab einer Dosierung von 10 mg/kg signifikant schwächer zu Tage trat (Abbildung 5-5A). Im Gegensatz hierzu ließ sich bei GRK3^{-/-}-Mäusen verglichen mit Wildtypen kein Unterschied bezüglich der Morphin-induzierten Analgesie nach Applikation unterschiedlicher Konzentrationen dieser Substanz erkennen (Abbildung 5-5B).

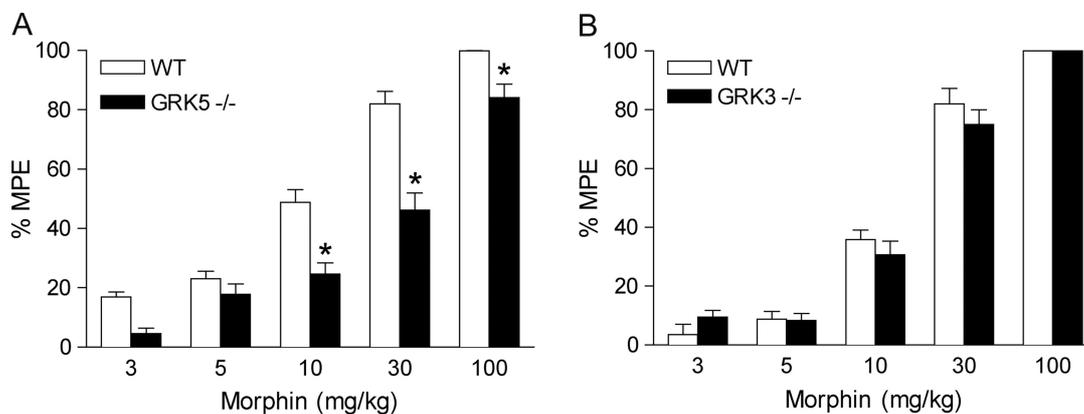


Abbildung 5-5. A: Verminderte akute antinozizeptive Reaktionen der GRK5^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen nach kumulativer Applikation von Morphin. B: Akute analgetische Wirkung kumulativer Dosen Morphins bei GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-} (n=20) und Wildtyp- (WT, n=20) Mäusen (A) sowie GRK3^{-/-} (n=10) und Wildtyp- (WT, n=10) Mäusen (B) erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 30 Minuten nach subkutaner Applikation kumulativer Dosen Morphins in 30-minütigem Abstand, wobei nach folgendem Schema dosiert wurde: 3 mg/kg, +2 mg/kg (kumulative Dosis: 5 mg/kg), +5 mg/kg (kumulative Dosis: 10 mg/kg), +20 mg/kg (kumulative Dosis: 30 mg/kg), +70 mg/kg (kumulative Dosis: 100 mg/kg). Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

In Hinblick auf diese Resultate sowie den bereits angeführten Nachweis eines Agonist-spezifischen Phosphorylierungsmusters, welches durch die GRK3, aber auch die GRK5, vermittelt wird, drängte sich die Frage auf, in welcher Art die akute Applikation eines potenteren μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten die Antinozizeption von GRK5- und GRK3-

defizienten Mäusen beeinflusst.

Daher untersuchten wir die Dosis-Wirkungs-Beziehungen nach kumulativer Injektion steigender Dosen Fentanyls (0,02-0,1 mg/kg) bei GRK5^{-/-}- und GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen (Abbildung 5-6). Hierbei stellte sich heraus, dass sowohl GRK5-defiziente (Abbildung 5-6A) als auch GRK3-defiziente Tiere (Abbildung 5-6B) nach Applikation dieses stark wirksamen Opioid-Agonisten im Vergleich zu Wildtypen ähnlich ausgeprägte antinozizeptive Reaktionen aufwiesen, Fentanyl beeinflusste demzufolge das Schmerzempfinden aller drei Genotypen vergleichbar stark.

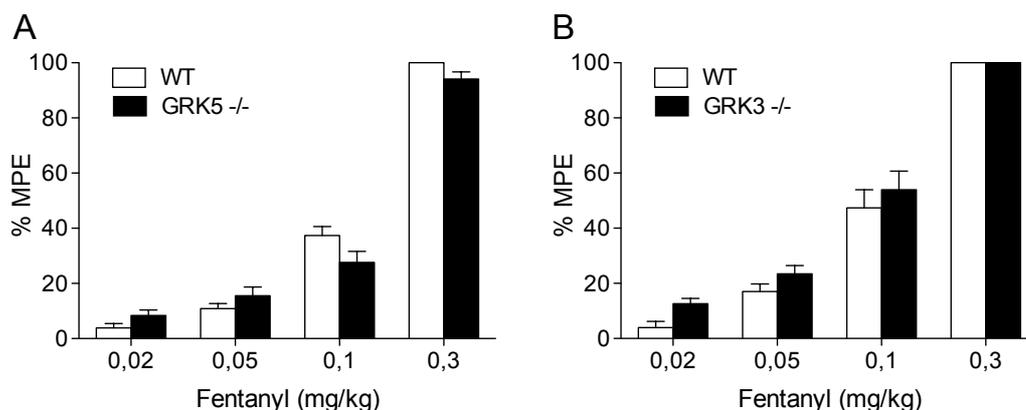


Abbildung 5-6. Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der analgetischen Eigenschaften steigender Dosen Fentanyls bei GRK5^{-/-}-Mäusen (A) sowie GRK3^{-/-}-Mäusen (B) jeweils im Vergleich zu Wildtypen. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-}- (n=18) und Wildtyp- (WT, n=19) Mäusen (A) sowie GRK3^{-/-}- (n=18) und Wildtyp- (WT, n=20) Mäusen (B) erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 15 Minuten nach subkutaner Applikation kumulativer Dosen Fentanyls in 15-minütigem Abstand, wobei nach folgendem Schema dosiert wurde: 0,02 mg/kg, +0,03 mg/kg (kumulative Dosis: 0,05 mg/kg), +0,05 mg/kg (kumulative Dosis: 0,1 mg/kg), +0,2 mg/kg (kumulative Dosis: 0,3 mg/kg). Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Aus den angeführten Resultaten ergibt sich, dass sich die Deletion der GRK3 weder auf die Morphin- noch auf die Fentanyl-vermittelte akute Antinozizeption auswirkt, die akute Sensitivität der μ -Opioid-Rezeptoren nach Opioid-Applikation ist demzufolge aufgrund des Fehlens der GRK3 nicht beeinträchtigt. Bezüglich der Nozizeption GRK3-defizienter Mäuse konnten Terman et al. (2004) ebenfalls die mangelnde Bedeutung der GRK3 nach Injektion unterschiedlicher Konzentrationen an Fentanyl und Morphin in einem ähnlichen Modell nachweisen.

Zudem lassen diese Ergebnisse vermuten, dass die GRK5-medierte Phosphorylierung des S375 für die akute Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors zumindest nach Morphin-Gabe

nicht erforderlich ist; um diese Hypothese zu untermauern, nutzten wir das im Folgenden beschriebene Modell zur Ermittlung der akuten analgetischen Toleranzentwicklung nach wiederholter Opioid-Applikation.

5.2.3 Akute analgetische Toleranz GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach Opioid-Applikation

Da bereits die einmalige Applikation von Opioid-Agonisten zu einer akuten Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors führt, welche sich *in vivo* in der Entwicklung einer akuten analgetischen Toleranz nach Injektion eben dieses Agonisten äußert, untersuchten wir im folgenden Modell den Effekt der GRK5- und GRK3-Deletion auf die Ausbildung der akuten analgetischen Toleranz nach Morphin- (Abbildung 5-7) und Fentanyl-Applikation (Abbildung 5-8).

Hierzu injizierten wir nach Messung des nozizeptiven Basalwertes zunächst GRK5^{-/-}- (Abbildung 5-7A) und GRK3^{-/-}-Mäusen (Abbildung 5-7B) im Vergleich zu Wildtypen 10 mg/kg Morphin (Zeitpunkt 0) und untersuchten nach 30 Minuten die analgetische Wirkung dieser Substanz, indem wir die antinozizeptive Reaktionszeit der drei genannten Genotypen im *hot plate*-Test ermittelten. Aus Abbildung 5-7A geht hervor, dass GRK5-defiziente Mäuse eine im Vergleich zu Wildtypen signifikant reduzierte Reaktionszeit aufwiesen. Diese Resultate bezüglich der analgetischen Wirkung Morphins bei GRK5^{-/-}-Mäusen stehen im Einklang mit unseren vorangegangenen Ergebnissen hinsichtlich der akuten antinozizeptiven Wirkung steigender Dosen Morphins bei diesen Tieren (siehe Abbildung 5-5A). Gegensätzlich hierzu entsprachen die antinozizeptiven Reaktionen der GRK3-defizienten Mäuse denjenigen der Wildtypen (Abbildung 5-7B). Der analgetische Effekt Morphins war demnach vergleichbar ausgeprägt bei diesen beiden Genotypen; dies korreliert ebenso mit unseren Resultaten aus den Versuchen zur Ermittlung der Dosis-Wirkungs-Beziehung nach Applikation steigender Konzentrationen Morphins (siehe Abbildung 5-5B).

Daraufhin wurde über einen Zeitraum von vier Stunden die Wirkungsabnahme von Morphin bestimmt, indem zu den Zeitpunkten 180 sowie 240 Minuten nach Morphin-Injektion erneut die Verweilzeit der Tiere auf der heißen Platte bis zu einer Äußerung von Schmerzempfinden gemessen wurde. Die drei Genotypen wiesen eine im Verlauf vergleichbare Reduktion der analgetischen Wirkungsstärke auf, obgleich der analgetische Effekt Morphins bei GRK5^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen nach 180 Minuten ebenfalls signifikant vermindert war (Abbildung 5-7A). Nach vier Stunden entsprach die Antinozizeption sämtlicher Tiere wieder der zu Zeitpunkt 0 ermittelten basalen Latenzzeit, woraufhin den drei Genotypen erneut

Morphin in einer Dosierung von 10 mg/kg appliziert wurde und nach 30 Minuten die analgetische Toleranz anhand der antinozizeptiven Reaktionszeit der Mäuse auf der heißen Platte ermittelt wurde. Aus Abbildung 5-7 wird ersichtlich, dass die analgetische Wirkung von 10 mg/kg Morphin 30 Minuten nach wiederholter Injektion bei GRK5- und GRK3-defizienten Tieren sowie bei Wildtypen signifikant reduziert war im Vergleich zu der Wirkung 30 Minuten nach der ersten Injektion; demnach haben alle drei Genotypen eine analgetische Toleranz nach der Applikation von 10 mg/kg Morphin ausgebildet. Entsprechend den bisherigen Daten bezüglich der reduzierten analgetischen Effekte von Morphin bei GRK5^{-/-}-Mäusen, war auch bei dem letzten Messzeitpunkt die Latenzzeit dieser Tiere bis zum Auftreten von Schmerzreaktionen im Vergleich zu Wildtypen signifikant vermindert (Abbildung 5-7A: 270 Minuten).

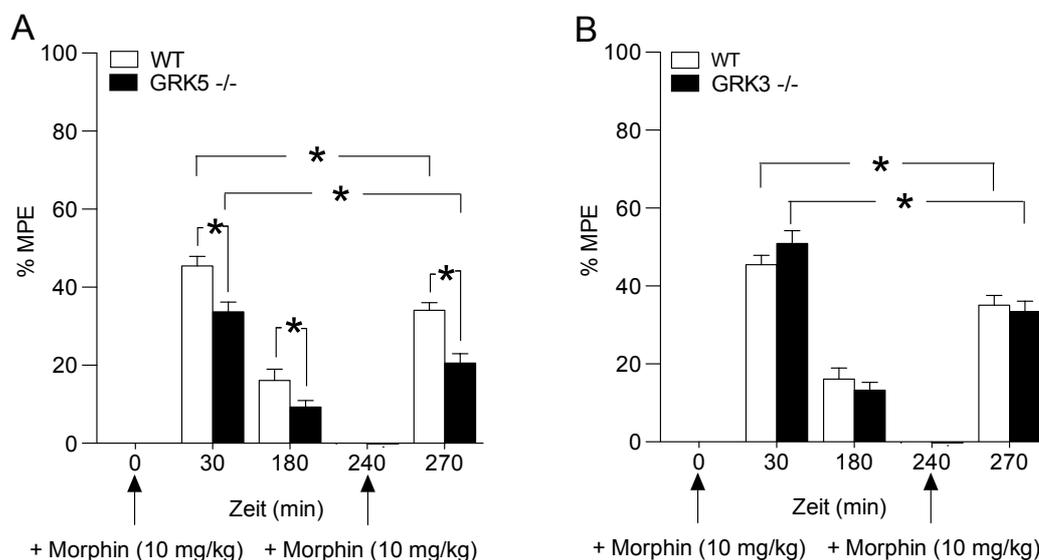


Abbildung 5-7. Akute analgetische Toleranzentwicklung nach Morphin-Applikation bei GRK5^{-/-}-Mäusen (A) sowie GRK3^{-/-}-Mäusen (B) jeweils im Vergleich zu Wildtypen. Nach subkutaner Injektion von Morphin (10 mg/kg) zu Zeitpunkt 0 wurden über vier Stunden zu den Zeitpunkten 30 Minuten, 180 Minuten und 240 Minuten die Reaktionszeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden gemessen. Bei Erreichen der Basalwerte zu Zeitpunkt 240 Minuten (entsprechend Zeitpunkt 0) wurde erneut 10 mg/kg Morphin injiziert und 30 Minuten später die Entwicklung der akuten analgetischen Toleranz anhand der Messung der Latenzzeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden ermittelt (Zeitpunkt 270 Minuten). Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-} (GRK5^{-/-}; n=20), GRK3^{-/-} (GRK3^{-/-}; n=20) und Wildtyp- (WT; n=20) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Im Weiteren untersuchten wir in Anlehnung an das oben beschriebene Modell die Effekte der GRK5- und GRK3-Deletion im Hinblick auf die akute analgetische Toleranzentwicklung nach wiederholter Applikation des potenten μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten Fentanyl.

Hierzu wurde GRK5^{-/-} (Abbildung 5-8A) und GRK3^{-/-}-Mäusen (Abbildung 5-8B) sowie Wildtypen nach Ermittlung der basalen Nozizeption zu Zeitpunkt 0 subkutan Fentanyl in einer Dosierung von 0,3 mg/kg injiziert. Nach 15 Minuten wurde die Latenzzeit der Tiere auf der heißen Platte bis zum Auftreten von Schmerzsymptomen gemessen. Aus Abbildung 5-8 geht hervor, dass GRK5- und GRK3-defiziente Tiere hierbei im Vergleich zu Wildtypen ähnlich lange Reaktionszeiten aufwiesen, sich demnach keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Mauslinien hinsichtlich der analgetischen Wirkung Fentanyls erkennen ließen, was sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus unseren vorhergehenden Versuchen deckt (siehe Abbildung 5-6).

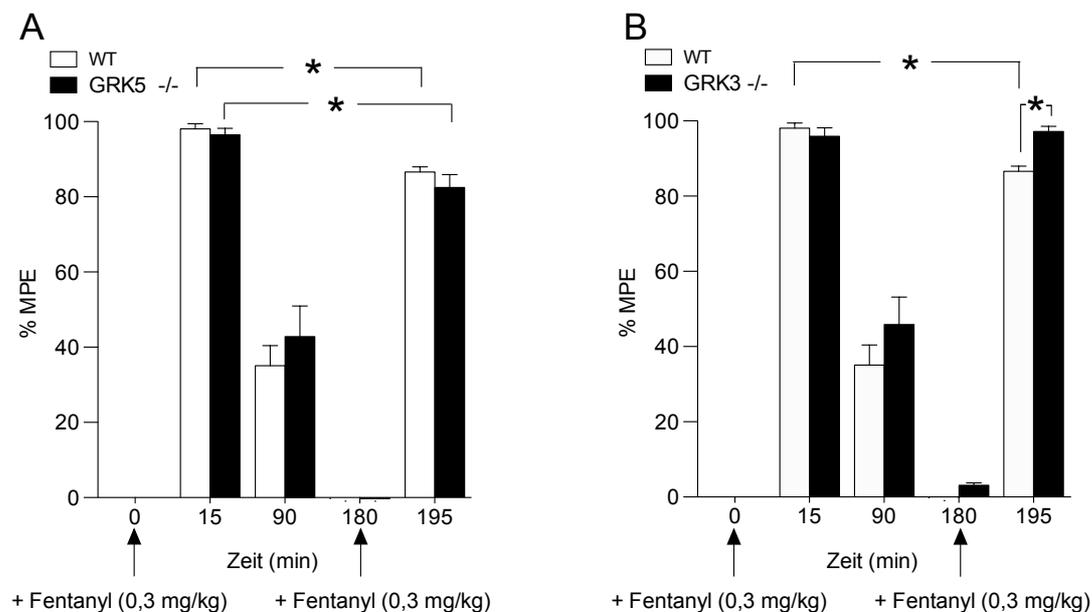


Abbildung 5-8. A: Akute analgetische Toleranzentwicklung nach Fentanyl-Applikation bei GRK5^{-/-}-Mäusen. B: Fehlen der akuten analgetischen Toleranzentwicklung nach Fentanyl-Applikation bei GRK3^{-/-}-Mäusen. Nach subkutaner Injektion von Fentanyl (0,3 mg/kg) zu Zeitpunkt 0 wurden über drei Stunden zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 90 Minuten und 180 Minuten die Reaktionszeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden gemessen. Bei Erreichen der Basalwerte entsprechend Zeitpunkt 0 zu Zeitpunkt 180 Minuten wurde erneut 0,3 mg/kg Fentanyl injiziert und 15 Minuten später die Entwicklung der akuten analgetischen Toleranz anhand der Messung der Latenzzeiten bis zur Äußerung von Schmerzempfinden ermittelt (Zeitpunkt 195 Minuten). Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-} (GRK5^{-/-}; n=20), GRK3^{-/-} (GRK3^{-/-}; n=20) und Wildtyp- (WT; n=20) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Auch konnten in den der Injektion folgenden drei Stunden keine signifikanten Abweichungen in der Wirkungsabnahme dieser Substanz zwischen GRK5- und GRK3-defizienten Tieren sowie Wildtypen festgestellt werden, die analgetische Wirkung Fentanyls nahm demnach bei den drei Genotypen gleichmäßig ab, ebenso entsprach die Reaktionszeit von GRK5^{-/-}- und GRK3^{-/-}-Mäusen 90 und 180 Minuten nach der ersten Injektion jeweils jener der getesteten Wildtypen. 180 Minuten nach der ersten Applikation waren zwischen der Latenzzeit der Tiere bis zu einer Schmerzreaktion zu jenem Zeitpunkt und dem Basalwert zu Zeitpunkt 0 keine signifikanten Unterschiede zwischen GRK5- und GRK3-defizienten Tieren sowie Wildtypen erkennbar, woraufhin den drei Genotypen erneut 0,3 mg/kg Fentanyl injiziert wurde.

Abbildung 5-8A ist zu entnehmen, dass 15 Minuten nach der wiederholten Injektion (195 Minuten) sowohl GRK5^{-/-}-Mäuse als auch Wildtypen eine im Vergleich zueinander ähnlich lange, jedoch bezogen auf die Latenzzeit 15 Minuten nach der ersten Injektion (15 Minuten) signifikant verkürzte antinozizeptive Reaktionszeiten aufwiesen, was die Entwicklung einer akuten analgetischen Toleranz bei beiden Genotypen bedeutet. Im Gegensatz hierzu entwickelten GRK3-defiziente Tiere nach wiederholter Applikation von Fentanyl keine analgetische Toleranz (Abbildung 5-8B). Die Reaktionszeit dieser Mäuse entsprach 15 Minuten nach der zweiten Injektion derjenigen, welche 15 Minuten nach der ersten Applikation ermittelt worden war. Auch verweilten diese Mäuse 15 Minuten nach der zweiten Injektion Fentanyls signifikant länger auf der heißen Platte im Vergleich zu Wildtypen; die analgetische Wirkung Fentanyls blieb demzufolge bei GRK3-defizienten Tieren nach wiederholter Applikation dieser Substanz gänzlich erhalten.

In Einklang mit unseren Ergebnissen konnten auch Terman et al. (2004) bereits eine den Wildtypen entsprechende analgetische Toleranzentwicklung nach Implantation von Morphin-Pellets bei GRK3^{-/-}-Mäusen nachweisen; ebenso entwickelten GRK3-defiziente Tiere den Ergebnissen dieser Forschungsgruppe zufolge keine analgetische Toleranz nach Applikation von Fentanyl mittels Pumpen.

Aus den oben genannten Resultaten lässt sich schließen, dass die GRK3-Expression keinen Einfluss auf die akute analgetische Toleranzentwicklung nach Morphin-Gabe, wohl aber maßgebliche Bedeutung bezüglich der akuten analgetische Toleranzentwicklung nach Fentanyl-Applikation hat. Zudem erhärtet sich aufgrund unserer Ergebnisse betreffend die GRK5-defizienten Mäuse unsere Hypothese, dass nach Morphin-Gabe die GRK5-vermittelte Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ für die akute Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors nicht erforderlich ist.

5.2.4 Antinozizeption und Entzugssymptomatik GRK5- und GRK3-defizienter Mäuse nach chronischer Opioid-Applikation

Eines der unerwünschten Phänomene im Zusammenhang mit chronischer Applikation von Opioiden stellt die analgetische Toleranzentwicklung dar, welche stetige Dosiserhöhungen erfordert, um eine angemessene Analgesie herbeizuführen.

Um die Relevanz der GRK5 im Hinblick auf die Auswirkungen einer längerfristigen Opioid-Applikation – insbesondere hinsichtlich der chronischen analgetischen Toleranzentwicklung – zu eruieren, applizierten wir GRK5-defizienten und Wildtyp-Mäusen über zehn Tage hinweg zunächst zweimal täglich in zwölfstündigem Abstand 10 mg/kg Morphin. An den Tagen 1, 3, 6 und 10 wurde die Antinozizeption der Tiere jeweils 30 Minuten nach Injektion des Opioids im *hot plate*-Test untersucht (Abbildung 5-9A).

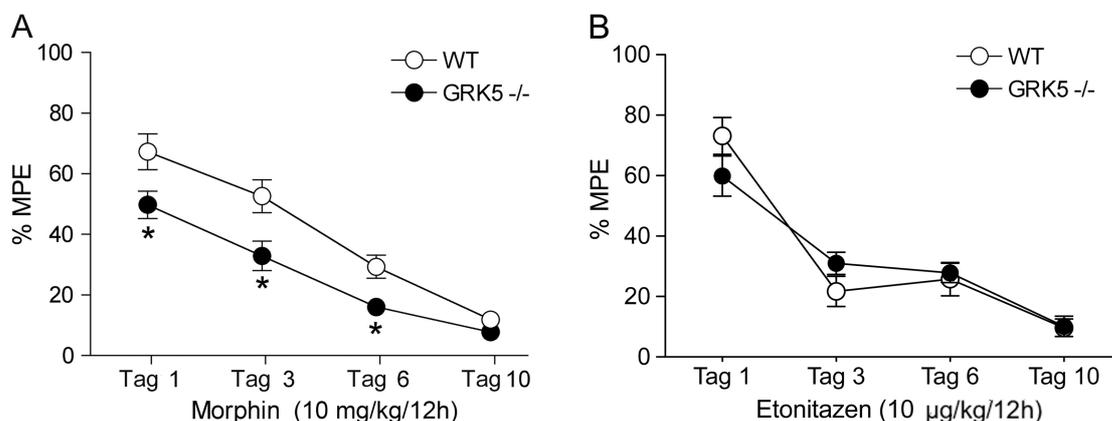


Abbildung 5-9. Analgetische Toleranzentwicklung bei GRK5^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. A: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Morphin-Applikation. Chronische Toleranz wurde durch subkutane Injektion von 10 mg/kg Morphin zweimal täglich in zwölfstündigem Abstand an zehn aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-} (n=30) und Wildtyp- (WT, n=30) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 30 Minuten nach Applikation des Opioids an den Tagen 1, 3, 6 und 10. **B: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Etonitazen-Applikation.** Chronische Toleranz wurde durch Applikation von 10 µg/kg Etonitazen zweimal täglich in zwölfstündigem Abstand an zehn aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK5^{-/-} (n=20) und Wildtyp- (WT, n=20) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 30 Minuten nach Applikation des Opioids an den Tagen 1, 3, 6 und 10. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte ± SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Entsprechend den Ergebnissen aus den vorangegangenen Versuchen bezüglich der akuten analgetischen Wirkung Morphins zeigten GRK5^{-/-}-Tiere auch in diesem Versuchsaufbau eine signifikant verminderte Analgesie im Vergleich zu den Wildtypen, welche sich als verkürzte

antinozizeptive Reaktionszeit äußerte. Aus den beiden parallel zueinander abfallenden Kurven in Abbildung 5-9A, welche die im Zeitverlauf abnehmende analgetische Wirksamkeit Morphins und demzufolge die analgetische Toleranzentwicklung bei den beiden Mauslinien beschreiben, geht zudem hervor, dass beide Genotypen, über den Zeitraum von zehn Tagen chronischer Morphin-Applikation betrachtet, eine vergleichbare analgetische Toleranz entwickeln, welche an Tag 10 bei GRK5-defizienten wie auch Wildtyp-Mäusen analog stark ausgebildet war.

Nachfolgend untersuchten wir die analgetische Toleranzentwicklung von GRK5^{-/-}-Tieren im Vergleich zu Wildtypen während chronischer Applikation von Etonitazen (Abbildung 5-9B). Hierzu wurde den Mäusen ebenfalls über einen Zeitraum von 10 Tagen in zwölfstündigem Abstand subkutan Etonitazen in einer Dosierung von 10 µg/kg verabreicht. Jeweils 30 Minuten nach der Injektion wurden an den Tagen 1, 3, 6 und 10 die antinozizeptiven Reaktionen der Tiere gemessen. Abbildung 5-9B ist zu entnehmen, dass die getesteten Genotypen weder an Tag 1 noch zu den folgenden Testzeitpunkten signifikante Unterschiede in ihrer Reaktionszeit nach Injektion dieses stark wirksamen Opioid-Agonisten erkennen ließen, woraus sich eine vergleichbare akute analgetische Wirkung dieser Substanz bei beiden Genotypen ergibt. Zudem weisen beide Kurven einen ähnlichen Verlauf auf, was ebenfalls eine gleichartige analgetische Toleranzentwicklung der beiden Genotypen – auch nach chronischer Applikation von Etonitazen – demonstriert.

Die bisher festgestellten Morphin-induzierten Effekte bei GRK5-defizienten Mäusen lassen die mögliche Folgerung zu, dass bei Fehlen der GRK5 anstelle dieser die GRK2/3 Zugang zu den durch Morphin aktivierten µ-Opioid-Rezeptoren erhalten, wodurch aufgrund der Sequestrierung von G-Proteinen eine Desensibilisierung dieser Rezeptoren resultiert. Die bei GRK5^{-/-}-Mäusen beobachtete verringerte analgetische Wirkung von Morphin kann demzufolge die verstärkte µ-Opioid-Rezeptor-Desensibilisierung zur Ursache haben.

Um daneben die Bedeutung der GRK3 hinsichtlich der Antinozizeption nach chronischer Applikation von Opioiden zu ermitteln, testeten wir unter identischen Versuchsbedingungen ebenfalls GRK3-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypen. Aus Abbildung 5-10A wird deutlich, dass GRK3^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen nach zehntägiger Applikation von Morphin eine ähnlich lange Latenz bis zur Äußerung von Schmerzempfinden aufwiesen, die akute Morphin-induzierte analgetische Wirkung bei beiden Genotypen demzufolge gleichsam stark war. Beide Kurven zeigen zudem einen in etwa gleichförmigen Abfall während des zeitlichen Verlaufs, was sich aus der Reduktion der analgetischen Wirkung bei

gleichbleibender Dosierung Morphins ergibt, und infolgedessen auf eine gleichartige Toleranzentwicklung im Zuge der chronischen Morphin-Applikation bei beiden Genotypen schließen lässt.

Da wir bereits die Relevanz der GRK3 hinsichtlich der akuten analgetischen Toleranzentwicklung nach Applikation des stark wirksamen Opioid-Agonisten Fentanyl nachweisen konnten, untersuchten wir folglich bei den GRK3^{-/-}-Mäusen den Einfluss der GRK3 im Hinblick auf die chronische Toleranzentwicklung nach zehntägiger Gabe des ebenfalls stark wirksamen μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten Etonitazen. Aufgrund der kurzen Eliminationshalbwertszeit von Fentanyl erachteten wir die Injektion des ähnlich potenten, aber in seiner Wirkungsdauer wesentlich länger anhaltenden Agonisten Etonitazen in diesem Versuchsaufbau für geeigneter. Abbildung 5-10B ist zu entnehmen, dass die akute analgetische Wirkung von Etonitazen bei GRK3-defizienten Tieren jener bei Wildtypen entsprach. Im Zuge der chronischen Injektion dieses Agonisten bildete sich jedoch bei GRK3^{-/-}-Mäusen eine signifikant verminderte Toleranz heraus, die sich aus der verlängerten Latenz bis zum Auftreten von Schmerzäußerungen nach Tag 3 bei diesen Tieren ergibt.

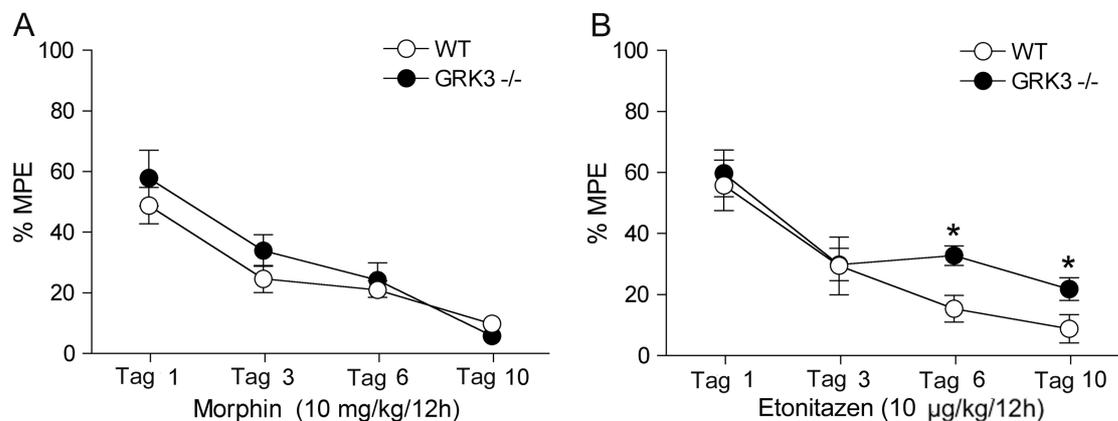


Abbildung 5-10. Analgetische Toleranzentwicklung bei GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. A: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Morphin-Applikation. Chronische Toleranz wurde durch subkutane Injektion von 10 mg/kg Morphin zweimal täglich in zwölfstündigem Abstand an zehn aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK3^{-/-} (n=20) und Wildtyp- (WT, n=20) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 30 Minuten nach Applikation des Opioids an den Tagen 1, 3, 6 und 10. **B: Verminderte analgetische Toleranzentwicklung GRK3-defizienter Mäuse während chronischer Etonitazen-Applikation.** Chronische Toleranz wurde durch Applikation von 10 µg/kg Etonitazen zweimal täglich in zwölfstündigem Abstand an zehn aufeinanderfolgenden Tagen induziert. Die Messung des Schmerzempfindens von GRK3^{-/-} (n=20) und Wildtyp- (WT, n=20) Mäusen erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C jeweils 30 Minuten nach Applikation des Opioids an den Tagen 1, 3, 6 und 10. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und ist als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Die bisher angeführten Resultate aus den Versuchen zur Ermittlung der akuten Antinozizeption sowie der akuten und chronischen analgetischen Toleranz bei GRK3-defizienten Mäusen legen den Schluss nahe, dass das GRK3-induzierte Phosphorylierungsmuster an den Aminosäureresten T370, S375 und T379 die akute Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors nach Gabe potenter μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten wie Etonitazen und Fentanyl beeinflusst und ebenso an der Toleranzentwicklung nach Applikation jener Substanzen beteiligt ist. Das Fehlen der GRK3 bedingt bei GRK3^{-/-}-Mäusen nach Injektion jener Substanzen ein verändertes Phosphorylierungsmuster (vergleiche Abbildung 5-1C und D), aus welchem die verminderte Toleranzentwicklung der GRK3-defizienten Tiere im Vergleich zu Wildtypen resultiert.

Diese Hypothese steht in Einklang mit unseren bereits publizierten Arbeiten an MOR^{S375A/S375A}-Mäusen. So konnten wir nachweisen, dass die gestörte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors bei diesen Tieren die Opioid-induzierte Antinozizeption beeinflussen kann; insbesondere Fentanyl rief bei MOR^{S375A/S375A}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen eine stärkere Analgesie hervor, daneben entwickelten diese Mäuse eine schwächere Toleranz nach Etonitazen- und DAMGO-, nicht aber nach Morphin-Gabe (Grecksch et al, 2011).

Eine weitere noch nicht erklärbare unerwünschte Wirkung langfristiger Opioid-Applikation stellt die Entwicklung einer physischen Abhängigkeit dar, welche nach Absetzen dieser Substanzen Entzugsscheinungen zur Folge hat.

Daher wurden im Anschluss an die Versuche zur Untersuchung der Toleranzentwicklung bei chronischer Applikation von Opioid-Agonisten bei GRK5-defizienten Mäusen nach Injektion der letzten Morphin-Dosis sowie bei GRK3^{-/-}-Tieren nach der letzten Etonitazen-Gabe jeweils an Tag 10 mittels des μ -Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon Entzugssymptome ausgelöst und diese jeweils im Vergleich zu der bei Wildtypen hervorgerufenen Entzugssymptomatik evaluiert. Die Antagonisierung jeweils unterschiedlicher Opioide am Ende der langfristigen Applikation ergab sich aus den divergierenden Morphin-vermittelten Effekten bei GRK5^{-/-}-Mäusen sowie unterschiedlichen Etonitazen-induzierten Reaktionen bei GRK3-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtypen. Die subkutane Injektion von 2 mg/kg Naloxon erfolgte zwei Stunden nach der letzten Opioid-Applikation, woraufhin in unmittelbarem Anschluss die hierdurch ausgelösten Entzugssymptome wie Springen oder unwillkürliches, in Schüben auftretendes starkes Schütteln des gesamten Körpers (sogenannte *wet dog shakes*) für 30 Minuten beobachtet und protokolliert wurden.

Die durch die Antagonisierung Morphins bedingten Entzugssymptome waren bei GRK5^{-/-}-

Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei Wildtypen (Abbildung 5-11A). Insbesondere die Anzahl der Sprünge wird in diesem Zusammenhang als sehr aussagekräftig gewertet, da diese stark mit dem Grad der Abhängigkeit korrelieren soll (Kest et al., 2002). Aus der schwächer ausgeprägten Entzugssymptomatik im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen lässt sich auf die Entwicklung einer verminderten physischen Abhängigkeit der GRK5-defizienten Tiere nach Morphin-Gabe schließen.

Ergebnisse hierzu betreffend MOR^{S375A/S375A}-Mäuse konnten wir bereits publizieren. Diese Tiere wiesen nach chronischer Morphin-Applikation keine signifikanten Unterschiede zu Wildtypen in ihren durch Naloxon-Injektion ausgelösten Entzugserscheinungen auf, woraus sich eine vergleichbar starke physische Abhängigkeit jener beiden Genotypen ergibt – ganz im Gegensatz zu GRK5-defizienten Mäusen.

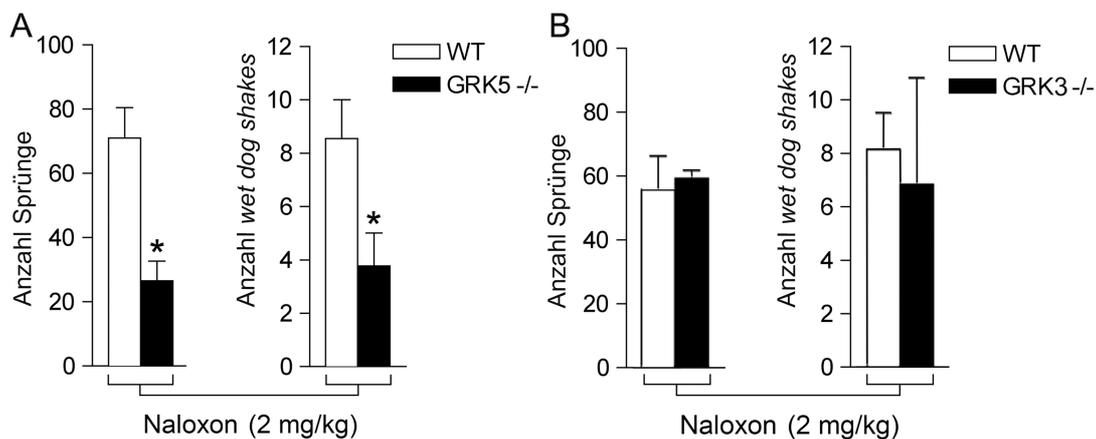


Abbildung 5-11. Naloxon-induzierte Entzugssymptome nach chronischer Applikation von Opioiden. A: Reduzierte Entzugssymptomatik bei GRK5^{-/-}-Mäusen nach zehntägiger Morphin-Applikation. Nach Entwicklung chronischer Morphin-Toleranz wurden durch subkutane Injektion von 2 mg/kg Naloxon zwei Stunden nach der letzten Morphin-Injektion die hierdurch ausgelösten Entzugssymptome bei GRK5^{-/-} (n=9) und Wildtyp- (WT, n=9) Mäusen für 30 Minuten evaluiert. **B: Entzugsverhalten von GRK3^{-/-}-Mäusen nach zehntägiger Etonitazen-Applikation.** Nach Entwicklung chronischer Etonitazen-Toleranz wurden durch subkutane Injektion von 2 mg/kg Naloxon zwei Stunden nach der letzten Etonitazen-Injektion die hierdurch ausgelösten Entzugssymptome bei GRK3^{-/-} (n=9) und Wildtyp- (WT, n=9) Mäusen für 30 Minuten evaluiert. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte der beobachteten Anzahl der Sprünge und *wet dog shakes* pro 30 Minuten ± SEM angegeben. * bedeutet $p < 0,05$.

In gleicher Weise untersuchten wir die Auswirkungen einer Naloxon-induzierten Antagonisierung der Etonitazen-Wirkung bei GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Aus Abbildung 5-11B wird deutlich, dass die Entzugssymptomatik bei GRK3-defizienten Tieren jener von Wildtypen entspricht, bei beiden Mauslinien die chronische Etonitazen-Applikation also eine vergleichbare physische Abhängigkeit bedingte.

Konforme Resultate veröffentlichten bereits Terman et al. (2004): nach siebentägiger

Applikation von Fentanyl über osmotische Pumpen sowie nach chronischer Morphin-Gabe zeigten GRK3-defiziente Mäuse im Vergleich zu Wildtypen ähnlich ausgeprägte Naloxon-induzierte Entzugssymptome.

Demzufolge scheint das Vorhandensein der GRK3 für die kompensatorischen Adaptations-Mechanismen, welche sich während der chronischen Opioid-Applikation entwickeln und aufgrund der Antagonisierung mittels Naloxon zu Tage treten, nicht erforderlich zu sein. Unter Einbeziehung der Resultate aus unseren Versuchen zur chronischen Toleranzentwicklung kann somit von einer Unabhängigkeit von Opioid-induzierter Toleranzentwicklung und daraus folgender Entzugssymptomatik ausgegangen werden.

5.3 Opioid-vermittelte Belohnungseffekte bei GRK5- und GRK3-defizienten Mäusen sowie MOR^{S375A/S375A}-Mäusen

Neben der analgetischen Toleranzentwicklung im Zuge chronischer Opioid-Applikation sowie der Ausbildung einer physischen Abhängigkeit mit dem Auftreten von Entzugserscheinungen bei nachfolgendem Absetzen dieser Substanzen zählt auch die psychische Abhängigkeit aufgrund der Vermittlung von Belohnungseffekten zu einer meist unerwünschten Wirkung von Opioiden.

Um zu eruieren, inwieweit das durch Opioide bedingte Suchtverhalten durch Deletion der GRK5, der GRK3 oder die Phosphorylierungs-Defizienz des S375 beeinflusst wird, nutzten wir das Modell der konditionierten Platz-Präferenz (*conditioned place preference*; CPP) und untersuchten die durch Morphin- und Fentanyl-Applikation ausgelösten Belohnungseffekte bei GRK5^{-/-} und GRK3^{-/-}-Mäusen sowie MOR^{S375A/S375A}-Mäusen jeweils im Vergleich zu Wildtypen.

5.3.1 *Conditioned place preference* und Extinktion der Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen nach Konditionierung mit Substanzen mit suchterzeugendem Charakter

Zunächst wurden GRK5-defiziente Tiere und Wildtypmäuse als Kontrollgruppe in einer viertägigen Habituerungsphase bei freiem Zugang zu allen Kammern der Box an die Gerätschaft gewöhnt. Am fünften Tag wurde die Platz-Präferenz aufgezeichnet und einzig Tiere ohne signifikante Präferenz für eine der beiden Kammern in die nachfolgende viertägige Konditionierungsphase einbezogen, während der beide Genotypen jeweils mit Morphin in einer Dosierung von 10 mg/kg (Abbildung 5-12A) oder 0,05 mg/kg Fentanyl (Abbildung 5-12B) auf eine der beiden Kammern konditioniert wurden. Als Kontrollsubstanz diente

physiologische Kochsalzlösung.

Wie aus Abbildung 5-12A zu erkennen ist, entwickelten die Wildtypen während der Konditionierungsphase eine starke Präferenz für die mit Morphin verknüpfte Kammer, was den suchterzeugenden Charakter dieser Substanz demonstriert und durch die verlängerte Zeitspanne an Tag 1 nach der Konditionierung zum Ausdruck gebracht wird, die sich diese Tiere in der mit Morphin assoziierten Kammer im Vergleich zu der Präkonditionierungsphase aufhielten. Konträr zu den getesteten Wildtypen bildeten GRK5-defiziente Mäuse beachtlicherweise keine Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer aus, sondern zeigten ganz im Gegenteil eine starke Aversion bezüglich dieser Kammer. Diese Aversion war anhand der längeren Verweildauer der GRK5^{-/-}-Mäuse in der mit physiologischer Kochsalzlösung verknüpften Kammer ersichtlich. An den darauffolgenden Versuchstagen Tag 7 und Tag 14 verstärkte sich zudem diese negative Assoziation mit der Morphin-verknüpften Kammer, erst an Tag 21 und Tag 28 war eine merkliche Reduktion der Aversion wahrnehmbar. Im Gegensatz hierzu wies die Gruppe der Wildtypen während Tag 7 und Tag 14 eine ähnlich stark ausgeprägte Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer auf – erkennbar an der längeren Verweildauer der Tiere in jener Kammer im Vergleich zu der mit physiologischer Kochsalzlösung verknüpften Kammer – welche im Laufe der Zeit an Tag 21 und Tag 28 stetig abnahm. Die von den Wildtypen entwickelte Präferenz für die Morphin-verknüpfte Kammer belegt die suchterzeugenden Eigenschaften Morphins in diesem Modell und weist die erfolgreiche Konditionierung beider Genotypen nach. Aufgrund der Morphin-induzierten Aversion bei GRK5-defizienten Mäusen ist demnach von einem gänzlichen Ausbleiben des Belohnungseffektes und positiven Verstärkungseffektes Morphins auszugehen, welche bei diesen Tieren sogar ins Gegenteil gekehrt sind.

Aufgrund dieser Ergebnisse untersuchten wir zudem die Fentanyl-vermittelten Belohnungseffekte bei GRK5^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen mittels des gleichen Versuchsaufbaus. Aus Abbildung 5-12B wird deutlich, dass Fentanyl in einer Dosierung von 0,05 mg/kg bei GRK5-defizienten Tieren ähnlich Morphin eine Aversion bezüglich der mit dieser Substanz verbundenen Kammer induzierte, welche zwei Wochen Bestand hatte.

Die gleichartig behandelten Wildtyp-Mäuse entwickelten indessen nach Konditionierung mit Fentanyl eine ausgeprägte Präferenz für die entsprechende Kammer, welche bis Tag 14 gleichmäßig bestehen blieb und daraufhin stetig geringer wurde. Demzufolge konnte auch in diesem Versuchsaufbau die erfolgreiche Konditionierung der beiden Mauslinien sowie der suchterzeugende Charakter von Fentanyl nachgewiesen werden.

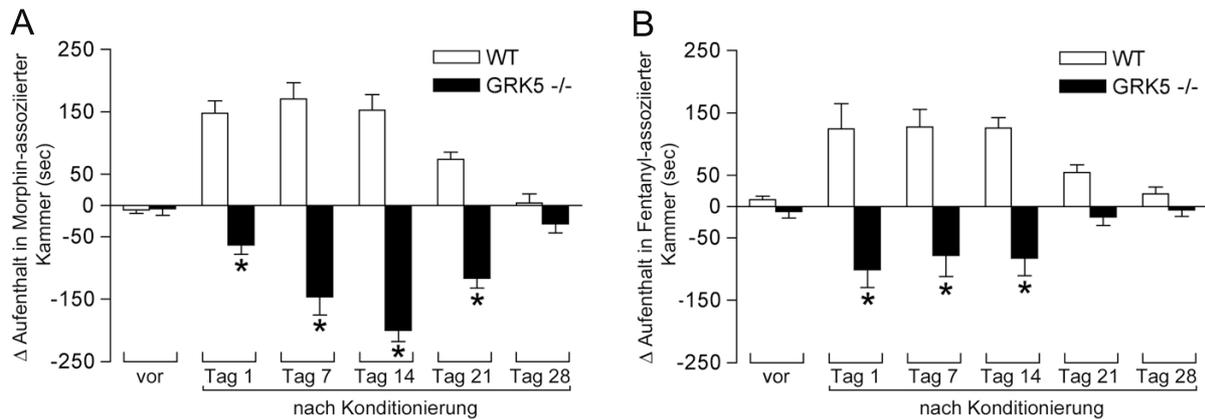


Abbildung 5-12. Morphine-induzierte (A) und Fentanyl-vermittelte (B) Aversion im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen. Auf die viertägige Habitierungsphase folgend, während der die Tiere täglich über einen Zeitraum von 30 Minuten jeweils einen freien Zugang zu allen Kammern der Box erhielten, wurden die Tiere am nachfolgenden Tag je zehn Minuten in die Box gesetzt und die Zeit, welche sie sich jeweils in einer der beiden äußeren unterschiedlich gestalteten Kammern aufhielten, wurde aufgezeichnet (vor Konditionierung). Daraufhin wurden einzig Tiere ohne signifikante Präferenz für eine der beiden Kammern in die nachfolgende viertägige Konditionierungsphase einbezogen. Hierfür wurden die Mäuse in zwei Gruppen aufgeteilt, der einen Gruppe wurde vormittags die Sucht-erzeugende Substanz und nachmittags physiologische Kochsalzlösung, der anderen Gruppe vormittags physiologische Kochsalzlösung und nachmittags die Sucht-erzeugende Substanz subkutan injiziert. Die beiden Kammern wurden willkürlich einer der beiden Substanzen zugeordnet, in die die Tiere entsprechend unmittelbar nach der Injektion gesetzt wurden und dort für 30 Minuten nach Morphin-Applikation in einer Dosierung von 10 mg/kg oder für 15 Minuten nach Gabe von 0,05 mg/kg Fentanyl verweilen mussten. Am darauffolgenden Tag (Tag 1) erhielten beide Genotypen erneut über einen Zeitraum von 10 Minuten freien Zugang zu allen Kammern und die Verweildauer der Tiere in den beiden äußeren Kammern wurde protokolliert. In siebentägigem Rhythmus (Tag 7, 14, 21 und 28) wurde diese Prozedur wiederholt, um die Extinktion des durch die suchterzeugende Substanz vermittelten Belohnungseffektes zu untersuchen. GRK5-defiziente Mäuse (GRK5^{-/-}, n=12); Wildtypen (WT, n=12). Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte der Differenz zwischen Verweildauer in der mit der suchterzeugenden Substanz verknüpften Kammer und Verweildauer in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer in Sekunden (Δ Aufenthalt in Morphin-/Fentanyl-assoziierter Kammer) \pm SEM angegeben. * bedeutet $p < 0,05$.

Da hinsichtlich der Morphin-vermittelten Verstärkungseffekte neben μ -Opioid-Rezeptoren auch der Aktivierung von D2-Dopamin-Rezeptoren eine kritische Rolle zukommt (Maldonado et al., 1997; Matthes et al., 1996), untersuchten wir die Tragweite der GRK5-Deletion bezüglich ihres Einflusses auf das dopaminerge Signalling. Hierfür nutzten wir den gleichen Versuchsaufbau wie oben beschrieben und konditionierten GRK5-defiziente sowie Wildtyp-Mäuse mit 10 mg/kg Kokain auf eine der beiden Kammern der CPP-Box. Wir konnten feststellen, dass die Funktionen der Dopamin-Rezeptoren durch Deletion der GRK5 nicht beeinträchtigt sind, da beide Mauslinien eine ähnlich stark ausgeprägte Präferenz für die mit Kokain assoziierte Kammer entwickelten, demzufolge die Applikation von Kokain vergleichbare Belohnungseffekte auszulösen vermochte (Abbildung 5-13).

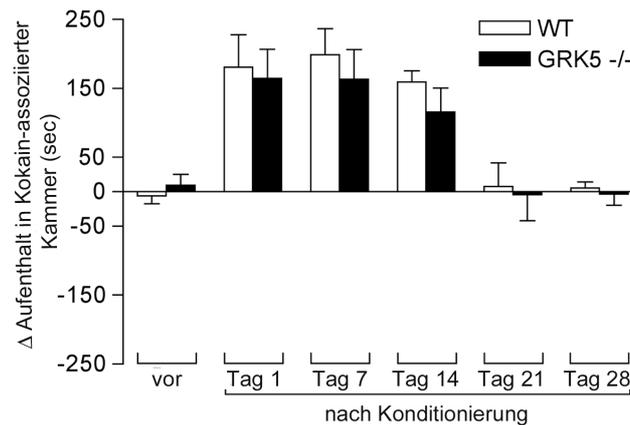


Abbildung 5-13. Kokain-induzierte Effekte im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Der Versuchsaufbau entsprach der Beschreibung für die Morphin-Konditionierung unter Abbildung 5-12. Die Konditionierung erfolgte mit 10 mg/kg Kokain. GRK5-defiziente Mäuse (GRK5^{-/-}, n=12); Wildtypen (WT, n=12). Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte der Differenz zwischen Verweildauer in der mit der suchterzeugenden Substanz verknüpften Kammer und Verweildauer in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer in Sekunden (Δ Aufenthalt in Kokain-assoziiierter Kammer) \pm SEM angegeben.

Zudem konnte aufgrund des Resultats, dass GRK5^{-/-}-Mäuse imstande sind eine Kokain-Präferenz auszubilden, das eventuelle Bestehen einer beeinträchtigten Gedächtnisleistung dieser Tiere ausgeschlossen werden. Es ist demnach naheliegend, dass die GRK5 speziell bezüglich der durch Morphin und Fentanyl ausgelösten positiven Verstärkungseffekte von Relevanz ist.

5.3.2 Conditioned place preference und Extinktion der Präferenz bei GRK3-defizienten Mäusen nach Konditionierung mit Morphin und Fentanyl

In Anlehnung an die bereits angeführten Experimente untersuchten wir ebenfalls den Einfluss der GRK3-Deletion auf Entwicklung und Extinktion der Platz-Präferenz nach Morphin- und Fentanyl-Applikation.

Zunächst wurden GRK3-defiziente Mäuse und Wildtypen entsprechend oben genanntem Versuchsaufbau mittels viertägiger Morphin-Applikation auf eine Kammer konditioniert. GRK3^{-/-}-Mäuse und Wildtypen entwickelten eine vergleichbar ausgeprägte Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer, welche aus der längeren Verweildauer der Tiere an Tag 1 nach der Konditionierung ersichtlich ist, die sich beide Genotypen in der entsprechenden Kammer im Vergleich zu der Präkonditionierungsphase aufhielten (Abbildung 5-14A). Interessanterweise nahm im weiteren Verlauf des Versuches die Zeitspanne, welche GRK3-defiziente Tiere in der Morphin-verknüpften Kammer verbrachten, im Vergleich zu der Verweilzeit der Wildtypen in eben dieser Kammer jedoch wesentlich schneller ab

(Abbildung, 5-14A: Tag7, Tag 14, Tag 21), was auf eine raschere Extinktion der Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer schließen lässt.

Daneben untersuchten wir zudem den Einfluss der GRK3-Deletion auf die Fentanyl-vermittelten Belohnungseffekte und deren Extinktion. Hierfür wurden beide Genotypen ebenfalls entsprechend dem bereits beschriebenen Versuchsaufbau mit 0,05 mg/kg Fentanyl willkürlich auf eine der beiden Kammern konditioniert. An Tag 1 wiesen auch nach Konditionierung mit dieser Substanz beide Genotypen eine vergleichbar lange Aufenthaltsdauer in der entsprechenden Kammer auf, bildeten infolgedessen eine ähnlich ausgeprägte Präferenz aus (Abbildung 5-14B). Allerdings nahm auch die Fentanyl-induzierte Platz-Präferenz bei GRK3-defizienten Tieren signifikant schneller ab im Vergleich zu Wildtypen, was auf eine raschere Extinktion auch der Fentanyl-vermittelten Belohnungseffekte hinweist.

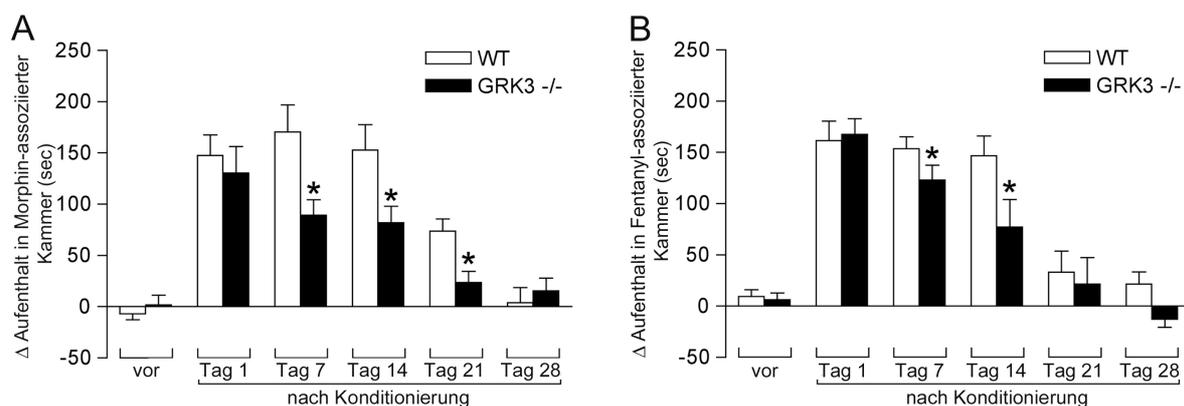


Abbildung 5-14. Morphin-induzierte (A) und Fentanyl-vermittelte (B) Präferenz und deren schnellere Extinktion im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK3-defizienten Mäusen. Der Versuchsaufbau entsprach der Beschreibung unter Abbildung 5-12. GRK3-defiziente Mäuse (GRK3^{-/-}, n=12); Wildtypen (WT, n=12). Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte der Differenz zwischen Verweildauer in der mit der Sucht-erzeugenden Substanz verknüpften Kammer und Verweildauer in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer in Sekunden (Δ Aufenthalt in Morphin-/Fentanyl-assoziiierter Kammer) \pm SEM angegeben. * bedeutet $p < 0,05$.

Extinktion wird nicht lediglich als das Vergessen ehemals Gelernten, sondern als Folge eines neuen Lernprozesses angesehen, wobei insbesondere der ERK-Aktivierung in unterschiedlichen Gehirnregionen bei verschiedenen Lernmustern Bedeutung zugeschrieben wird (Atkins et al., 1998; Blum et al., 1999; Bouton, 1993; Schafe et al., 2000). Macey et al. (2006) konnten eine Beteiligung der GRK3 an der μ -Opioid-Rezeptor-vermittelten Zunahme der ERK-Phosphorylierung nach Fentanyl-Applikation nachweisen; diese Befunde können somit eine Erklärung für die schnellere Extinktion der Präferenz der GRK3-defizienten Mäuse darstellen, zumindest nach Konditionierung mit Fentanyl. Andere Forschungsgruppen

konnten zudem nach chronischer Morphin-Applikation eine verstärkte ERK-Phosphorylierung in unterschiedlichen Gehirnarealen von Mäusen erkennen, unter anderem in der Stria terminalis, dem Nucleus accumbens, dem somato-sensorischen Cortex und dem Locus coeruleus (Eitan et al., 2003; Valjent et al., 2004). Im Falle einer Mitwirkung der GRK3 innerhalb dieses Prozesses wäre dies eine potentielle Erklärung für die schnellere Extinktion auch der Morphin-vermittelten Belohnungseffekte bei den GRK3-defizienten Mäusen.

5.3.3 Conditioned place preference und Extinktion der Präferenz bei MOR^{S375A/S375A}-Mäusen nach Konditionierung mit Morphin

Aufgrund unserer Erkenntnis, dass die GRK5 für die S375-Phosphorylierung des Morphin-aktivierten μ -Opioid-Rezeptors von maßgeblicher Bedeutung ist, haben wir anhand der Phosphorylierungs-defizienten MOR^{S375A/S375A}-Mäuse untersucht, inwieweit die GRK5-vermittelte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors für die Morphin-induzierten Belohnungseffekte erforderlich ist.

Hierzu konditionierten wir analog dem oben beschriebenen Versuchsaufbau ebenfalls MOR^{S375A/S375A}-Mäuse und Wildtypen mit 10 mg/kg Morphin und evaluierten daraufhin die durch diese Substanz vermittelten Belohnungseffekte sowie deren Extinktion über einen Zeitraum von 28 Tagen (Abbildung 5-15).

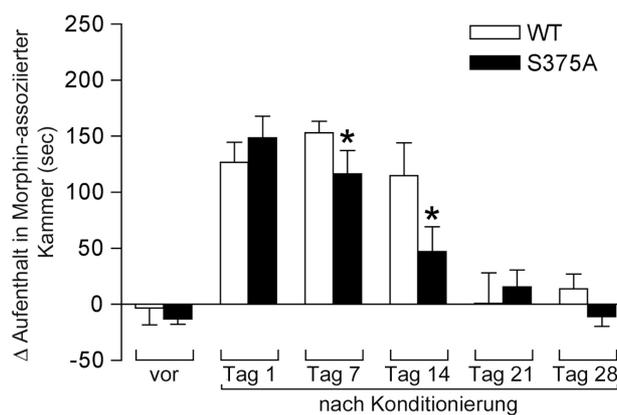


Abbildung 5-15. Morphin-induzierte Effekte im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei MOR^{S375A/S375A}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen. Der Versuchsaufbau entsprach der Beschreibung unter Abbildung 5-12. MOR^{S375A/S375A}-Mäuse (S375A): n=12, Wildtypen (WT): n=12. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte der Differenz zwischen Verweildauer in der mit Morphin verknüpften Kammer und Verweildauer in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer in Sekunden (Δ Aufenthalt in Morphin-assoziierter Kammer) \pm SEM angegeben. * bedeutet $p < 0,05$.

Analog den GRK3^{-/-}-Mäusen manifestierte sich während der Konditionierungsphase auch bei den MOR^{S375A/S375A}-Tieren eine starke Präferenz für die mit Morphin assoziierte Kammer, die zudem mit jener der Wildtypen vergleichbar war (Abbildung 5-15: Tag 1). Die ausgebildete Präferenz für diese Kammer reduzierte sich allerdings auch bei den MOR^{S375A/S375A}-Mäusen signifikant schneller als bei den Wildtypen, was entsprechend den GRK3^{-/-}-Mäusen eine ebenfalls beschleunigte Extinktion der mit Morphin verbundenen Belohnungseffekte bedeutet.

Aus unseren Ergebnissen, dass MOR^{S375A/S375A}-Mäuse – ganz im Gegensatz zu GRK5-defizienten Tieren – imstande sind, eine Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer auszubilden, resultiert, dass der Morphin-vermittelte Belohnungseffekt nicht durch die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors am Serin³⁷⁵ bedingt wird, sondern Folge anderer Effekte der GRK5 ist.

5.3.4 Unterbindung Morphin-induzierter Belohnungseffekte durch Inhibierung des ERK-Signallings

Auf die Bedeutung der ERK hinsichtlich verschiedener Lernprozesse wurde bereits eingegangen. Bezüglich der ERK-Aktivierung scheint auch die GRK5 eine erhebliche Rolle zu spielen, da in vielen Rezeptor-Systemen der siRNA-*knock down* der GRK5 diesen Signalweg inhibieren konnte (Reiter et al., 2012). Falls *in vivo* die Signaltransduktion der GRK5 im Zuge der Entwicklung der Morphin-vermittelten Präferenz über ERK erfolgte, würde aus der chemischen Inhibierung eben dieses Signalweges ein ähnlicher Effekt resultieren, wie er bei GRK5-defizienten Tieren aufgetreten war.

Um dieser Hypothese nachzugehen, injizierten wir Wildtyp-Mäusen während der Konditionierungsphase im CPP-Modell jeweils eine Stunde vor Morphin-Applikation den MEK1/MEK2-Inhibitor SL327 in einer Dosierung von 10 mg/kg. Als Kontrollgruppe dienten Wildtypen, welchen jeweils eine Stunde vor Morphin-Gabe physiologische Kochsalzlösung appliziert wurde. Aus Abbildung 5-16A wird ersichtlich, dass sich bei der Kontrollgruppe eine starke Präferenz für die Morphin-assoziierte Kammer manifestierte, während im Gegensatz hierzu die Entwicklung einer Präferenz für diese Kammer bei den mit SL327 behandelten Tieren gänzlich unterbunden wurde. Entsprechend den vorangegangenen Resultaten nahm die Morphin-induzierte Präferenz der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Wildtypen (Abbildung 5-16A, NaCl) bis zu Tag 7 zu, die sich in der zunehmenden Aufenthaltszeit jener Tiere in der mit Morphin verknüpften Kammer widerspiegelt. In den folgenden drei Wochen (Tag 14, 21 und 28) reduzierte sich die

Verweilzeit der Tiere in dieser Kammer stetig, worin sich die kontinuierliche Extinktion der Morphin-CPP zeigt. Hingegen wiesen diejenigen Tiere, bei welchen das ERK-Signalling mittels SL327 inhibiert wurde (Abbildung 5-16A, SL327), über den Zeitraum von vier Wochen keinerlei Präferenz für eine der beiden Kammern auf, woraus sich die vollständige Unterbindung jeglicher Morphin-vermittelter Belohnungseffekte durch Applikation des MEK1/MEK2 Inhibitors SL327 ergibt.

Vergleichbare Ergebnisse haben bereits Valjent et al. (2006) publiziert: eine ehemals gelernte Morphin-CPP konnte nach Applikation von SL327 während Morphin-Reexposition aufgehoben werden.

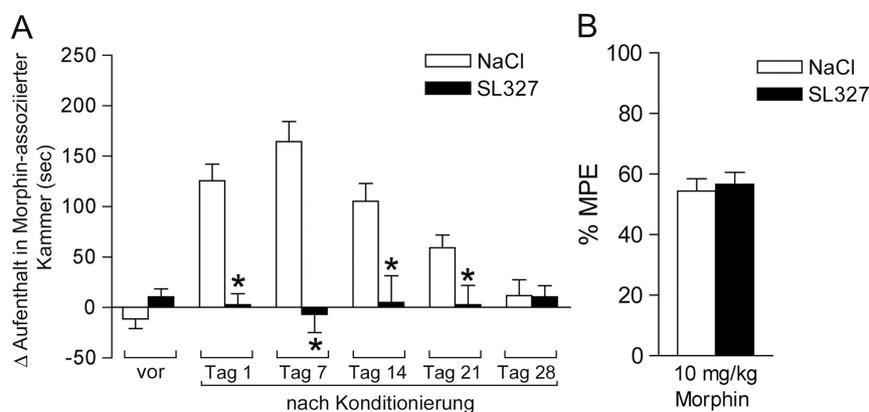


Abbildung 5-16. A: Inhibition der Morphin-CPP durch Applikation von SL327. Der Versuchsaufbau entsprach der Beschreibung unter Abbildung 5-12. Während der Konditionierungsphase wurde einer Gruppe Wildtypen jeweils eine Stunde vor subkutaner Morphin-Applikation (10 mg/kg) intraperitoneal 10 mg/kg des MEK1/MEK2-Inhibitors SL327 (SL327) injiziert, der Kontrollgruppe dagegen physiologische Kochsalzlösung (NaCl). SL327: n=10, NaCl: n=10. Die Daten sind als Mittelwerte der Differenz zwischen Verweildauer in der mit Morphin verknüpften Kammer und Verweildauer in der mit physiologischer Kochsalzlösung assoziierten Kammer in Sekunden (Δ Aufenthalt in Morphin-assoziierte Kammer) \pm mittlerer Standardfehler angegeben. **B: Analgetische Wirkung Morphins nach Injektion von SL327.** Eine Stunde vor subkutaner Applikation von 10 mg/kg Morphin wurde einer Gruppe Wildtypen 10 mg/kg SL327 intraperitoneal appliziert (SL327), die Kontrollgruppe Wildtypen erhielt physiologische Kochsalzlösung (NaCl). Die Messung des Schmerzempfindens erfolgte mittels *hot plate*-Test bei 56°C 30 Minuten nach Morphin-Applikation. Um Gewebeschädigungen bei den Tieren zu vermeiden, wurde die maximale Verweildauer der Tiere auf der heißen Platte auf 30 Sekunden begrenzt. Es wurde die Latenzzeit als Zeit bis zum Auftreten einer Schmerzreaktion gemessen und ist als %MPE (maximal möglicher Effekt; *maximum possible effect*) angegeben. SL327: n=10, NaCl: n=10. Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm SEM dargestellt. * bedeutet $p < 0,05$.

Im Weiteren wollten wir der Frage nachgehen, in welchem Maß sich eine Inhibierung des ERK-Signallings auf die Morphin-induzierte Analgesie auswirkt. Folglich injizierten wir einer Gruppe Wildtypen eine Stunde vor Morphin-Applikation 10 mg/kg SL327, der Kontrollgruppe wurde ebenfalls eine Stunde vor Injektion Morphins physiologische Kochsalzlösung appliziert. Daraufhin wurden die Effekte der SL327-Applikation auf die

analgetische Wirkung Morphins 30 Minuten nach Injektion des Opioids im *hot plate*-Test untersucht. Aus Abbildung 5-16B ist zu erkennen, dass die Inhibierung des ERK-Signallings durch SL327 keinen Einfluss auf die Analgesie nach Applikation von Morphin hatte. Sowohl die mit dem Inhibitor behandelten Wildtypen (Abbildung 5-16B, SL327), als auch die Kontrollgruppe, welcher physiologische Kochsalzlösung verabreicht wurde (Abbildung 5-16B, NaCl), wiesen vergleichbar lange antinozizeptive Reaktionszeiten auf der heißen Platte auf; die analgetische Wirkung Morphins blieb folglich trotz der Injektion von SL327 erhalten, woraus sich zum einen ergibt, dass die ERK-Aktivierung bezüglich der Morphin-vermittelten Analgesie nicht erforderlich ist.

Zum anderen lassen unsere Ergebnisse erkennen, dass die Effekte der GRK5-Deletion in diesem Modell zumindest partiell – im Sinne der Aufhebung der Morphin-induzierten Präferenz – mittels chemischer Inhibierung des ERK-Signallings nachgeahmt werden können.

6 Diskussion

Wie viele andere GPCRs werden auch Opioid-Rezeptoren Agonist-abhängig reguliert und sind Prozessen wie Rezeptorphosphorylierung, -desensibilisierung, -internalisierung und -downregulierung unterworfen (Law et al., 2000). Neben ihrer Subtyp-spezifischen Regulation (Chakrabarti et al., 1997; Chu et al., 1997; Gaudriault et al., 1997; Kovoov et al., 1997) werden die einzelnen Opioid-Rezeptoren auch individuell von unterschiedlichen Opioid-Agonisten reguliert (Arden et al., 1995; Blake et al., 1997; Keith et al., 1996; Segredo et al., 1997; Sternini et al., 1996; Yu et al., 1997). Als Zielstruktur für Morphin und andere Opioide, welche nicht nur zur Schmerztherapie verwendet werden, sondern auch aufgrund ihrer euphorisierenden Wirkung im Zusammenhang mit Sucht eine große Rolle spielen, nimmt der μ -Opioid-Rezeptor unter den GPCRs einen wichtigen Stellenwert ein. Hierbei trägt die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors einen Großteil zu dem Phänomen der Opioid-Toleranz bei, woraus sich die Notwendigkeit ergibt, stetig steigende Dosen der Substanzen applizieren zu müssen, um eine effektive Analgesie, beziehungsweise Euphorie zu erzielen (Arttamangkul et al., 2008; Bailey et al., 2009; Burd et al., 1998; Zhang et al., 1998). Immer mehr Kinasen, wie G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen (GRKs), die Proteinkinase C (PKC), die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK) und die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) werden dabei mit der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Toleranz am μ -Opioid-Rezeptor in Verbindung gebracht (Bailey et al., 2009; Dang et al., 2009; Melief et al., 2010). Auch wenn schon lange bekannt ist, dass der μ -Opioid-Rezeptor nach Agonisten-Gabe phosphoryliert wird (El Kouhen et al., 2001), ist man sich weder über das genaue Phosphorylierungsmuster einig noch über die Rolle der Phosphorylierungsstellen im Hinblick auf die Funktionsweise des μ -Opioid-Rezeptors oder die Opioid-Toleranz. Die Agonist-induzierte Phosphorylierung intrazellulärer Serine und Threonine reguliert direkt die Affinität vieler GPCRs zu β -Arrestinen (Oakley et al., 2001; Oakley et al., 2000). In jüngster Zeit häufen sich die Hinweise darauf, dass GPCRs in mehr als einer aktiven Form oder Konformation bestehen können (Bokoch et al., 2010; Kahsai et al., 2011; Swaminath et al., 2004) und dass unterschiedliche Liganden eine gewisse aktive Form besser zu stabilisieren vermögen als eine andere. Dieses Phänomen wird „*ligand bias*“, „funktionelle Selektivität“ oder auch „Liganden-gerichtetes Signalling“ genannt (Kelly, 2013; Kenakin, 2007; Urban et al., 2007). Durch Liganden-Bindung nehmen die Rezeptoren bestimmte Konformationen an, die wiederum die Rekrutierung unterschiedlicher GRKs bedingen, welche den Rezeptor dann phosphorylieren (Reiter et al., 2012; Reiter & Lefkowitz, 2006; Shenoy et al., 2006). Somit

agieren verschiedene GRK-Subtypen in gewisser Weise als „Sensoren“ für aktive, Liganden-stabilisierte Konformationszustände und haben selbst auch spezielle regulatorische Funktionen (Kim et al., 2005; Ren et al., 2005).

Je nachdem welche GRK rekrutiert wird, entstehen am Carboxyl-Terminus des Rezeptors spezifische Phosphorylierungsmuster oder „*bar codes*“, die die intrazellulären Wirkungen des β -Arrestins regulieren und somit das Signalling beeinflussen (Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Nobles et al., 2011). Bisher basierte diese „*bar code*-Hypothese“ allerdings einzig auf Ergebnissen aus *in vitro*-Studien, in denen in heterologen Expressionssystemen die Aminosäuren-spezifische Phosphorylierung und zellulären Funktionen der GRKs untersucht wurden.

Als erste Forschungsgruppe weltweit gelang es uns die „*bar code*-Hypothese“ *in vivo* nachzuweisen. Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Agonist-selektive Rekrutierung unterschiedlicher GRKs auch die mit Opioiden verbundenen Effekte auf die Antinozizeption und das Verhalten beeinflusst.

Mittels phosphorylierungsspezifischer Antikörper für Threonin³⁷⁰ (T370), Serin³⁷⁵ (S375), und Threonin³⁷⁹ (T379) konnten wir das Liganden-abhängige Phosphorylierungsmuster in Gehirn-Lysaten unterschiedlich behandelte Mäuse demonstrieren. Nach Gabe starker μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten, wie Etonitazen und Fentanyl, werden das T370, das S375 und das T379 phosphoryliert, welche sich innerhalb der konservierten, zehn Aminosäurereste langen Sequenz ³⁷⁰TREHPSTANT³⁷⁹ am cytoplasmatischen Ende des μ -Opioid-Rezeptors befinden. Dagegen tritt nach einem schwächeren Agonisten, wie Morphin, nur am S375 eine robuste Phosphorylierung auf. Bisher konnte *in vivo* einzig das S375 als Phosphorylierungsstelle im μ -Opioid-Rezeptor nachgewiesen werden (Grecksch et al., 2011). Gleichermäßen beachtenswert sind unsere Ergebnisse, die wir unter Verwendung von *knock-in*-Mäusen (MOR^{S375A/S375A}), die eine phosphorylierungsdefiziente S375A-Mutante des μ -Opioid-Rezeptors exprimieren, erzielen konnten. In Gehirn-Lysaten dieser Tiere zeigte sich, dass nach Fentanyl-Gabe auch die Phosphorylierungen des T370 und des T379 verringert sind, obwohl diese Phosphorylierungsstellen nicht mutiert sind. Diese Ergebnisse decken sich mit vorangegangenen Experimenten unserer Forschungsgruppe an transfizierten HEK293-Zellen (Just et al, 2013) und lassen auf ein hierarchisches Phosphorylierungsmuster des μ -Opioid-Rezeptors auch *in vivo* schließen, wobei das S375 den initial notwendigen Aminosäurerest für die Phosphorylierung darstellt und die darauf folgenden Phosphorylierungen des T370 und T379 erst ermöglicht.

Mit Hilfe GRK-defizienter Mäuse konnten wir der Frage nachgehen, welche spezifischen GRK-Isoformen an diesem Prozess beteiligt sind. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die GRK5 selektiv zur Morphin-induzierten Phosphorylierung des S375 beiträgt, während die GRK3 sowohl in die Morphin- wie auch in die Fentanyl-induzierte Phosphorylierung des S375 involviert ist. Es ist demnach zu vermuten, dass der Fentanyl-besetzte Rezeptor eine andere Konformation einnimmt als der Morphin-besetzte Rezeptor. Diese *in vivo*-Beobachtungen stehen ebenfalls in Einklang mit früheren Ergebnissen unserer Forschungsgruppe in transfizierten HEK293-Zellen (Doll et al., 2011; Doll et al., 2012; Just et al., 2013). In diesen Studien ließ sich gleichermaßen erkennen, dass nach Stimulation mit einem starken Agonisten die verminderte Expression sowohl der GRK2 als auch der GRK3 zu einer signifikanten Reduktion der μ -Opioid-Rezeptor-Phosphorylierung führt. Hierbei hatte die GRK3 einen stärkeren Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad als die GRK2. Allerdings spricht der hohe Verwandtschaftsgrad von GRK2 und GRK3 für ein möglicherweise redundantes Phosphorylierungssystem, in dem die verringerte Expression einer der beiden GRKs teilweise durch das Vorhandensein der anderen kompensiert werden kann. Allein ein gleichzeitiger *knockdown* beider GRKs konnte die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors nahezu vollständig inhibieren (Doll et al., 2012; Just et al., 2013). Im Hinblick auf die nachfolgenden Effekte dieser Befunde wurde in vorangegangenen *in vitro*-Studien postuliert, dass eine Phosphorylierung durch die GRK2/3 primär eine Desensibilisierung und Internalisierung nach sich zieht, während eine Phosphorylierung durch die GRK5/6 in β -Arrestin-vermittelter ERK-Aktivierung zu resultieren scheint (Heitzler et al., 2012; Nobles et al., 2011).

Die bisher angeführten Ergebnisse und daraus resultierenden Hypothesen drängten die Frage auf, inwieweit sich Liganden-gerichtetes Signalling und Agonist-selektive Rekrutierung von GRKs auf Opioid-induzierte Verhaltensweisen und Antinozizeption im lebenden Organismus auswirken. Um dieser Thematik nachgehen zu können, haben wir, jeweils im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, GRK5-defiziente (GRK5^{-/-}) Mäuse, GRK3-defiziente (GRK3^{-/-}) Mäuse und MOR^{S375A/S375A}-Mäuse nach Opioid-Applikation unterschiedlichen Versuchsmodellen unterzogen. Anhand dieser Modelle lassen sich die analgetische Wirkung, die Toleranzentwicklung und das Suchtpotential von Substanzen untersuchen und zwischen den Genotypen vergleichen. Nachdem sich zwischen GRK5^{-/-}-Mäusen und Wildtypen keine Unterschiede bezüglich der basalen Schmerzempfindung im *hot plate*-Test nachweisen ließen, haben wir die akute antinozizeptive Wirkung steigender Dosen Morphins zwischen den beiden Genotypen verglichen. Hierbei entwickelten die GRK5^{-/-}-Mäuse eine signifikant schwächere Analgesie im Vergleich zu den Wildtypen, nach entsprechender Fentanyl-

Applikation dagegen war dies nicht der Fall. In unseren Versuchen zur Ermittlung der akuten analgetischen Toleranzentwicklung ließen GRK5-defiziente Tiere ebenfalls eine reduzierte Antinozizeption nach Morphin-Applikation erkennen, während die akute analgetische Toleranz dieser Mäuse sowohl hinsichtlich Morphin als auch im Bezug auf Fentanyl derjenigen von Wildtypen entsprach. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die GRK5-medierte Phosphorylierung des S375 nicht für die akute Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors nach Morphin-Gabe erforderlich ist.

Im Anschluss haben wir die Toleranzentwicklung der Tiere nach chronischer Morphin- und Etonitazen-Applikation über einen Zeitraum von 10 Tagen ermittelt. Gemäß unseren Erwartungen war auch in diesem Versuchsaufbau die analgetische Wirkung von Morphin bei GRK5^{-/-}-Tieren im zeitlichen Verlauf schwächer als bei Wildtyp-Mäusen. Allerdings zeigten beide Genotypen über den Zeitraum betrachtet eine vergleichbar starke Toleranzentwicklung und hatten an Tag 10 eine analoge Toleranz ausgebildet. Nach chronischer Applikation von Etonitazen indes ließen sich zwischen GRK5-defizienten Mäusen und Wildtypen weder signifikante Unterschiede bezüglich der analgetischen Wirkung dieser Substanz noch hinsichtlich der Toleranzentwicklung ermitteln. Unter Berücksichtigung oben genannter Ergebnisse besteht die Möglichkeit, dass bei Fehlen der GRK5 anstelle dieser die GRK2/3 Zugang zu den durch Morphin aktivierten μ -Opioid-Rezeptoren erhalten, was aufgrund der Sequestrierung von G-Proteinen eine Desensibilisierung dieser Rezeptoren zur Folge hat. Die bei GRK5^{-/-}-Mäusen beobachtete verringerte analgetische Wirkung von Morphin kann somit die verstärkte μ -Opioid-Rezeptor-Desensibilisierung zur Ursache haben. Dieser Effekt scheint jedoch selektiv den μ -Opioid-Rezeptor zu betreffen. So konnten Gainetdinov et al. (1999) bei GRK5^{-/-}-Mäusen nach Oxotremorin-Applikation eine gesteigerte und verlängerte Antinozizeption feststellen, was auf eine maßgebliche Rolle der GRK5 in der Desensibilisierung der muskarinergen Rezeptoren hinweist.

Unter identischen Versuchsbedingungen konnten wir bei GRK3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypen weder bezüglich der akuten antinozizeptiven Wirkung unterschiedlicher Dosen Morphins oder Fentanyls noch im Hinblick auf die Toleranzentwicklung im Zuge chronischer Gabe von Morphin Unterschiede ermitteln. Ebenso wiesen GRK3-defiziente Tiere eine den Wildtypen entsprechende akute analgetische Toleranz-Entwicklung nach Injektion von Morphin auf. Jedoch bedingte die Applikation des potenten Opioid-Agonisten Fentanyl keinerlei akute analgetische Toleranz bei GRK3^{-/-}-Tieren – was in Einklang mit bereits publizierten Studien anderer Forschungsgruppen steht (Terman et al., 2004, Melief et al.,

2010) – daneben rief auch die chronische Gabe des länger wirkenden, ebenfalls hochwirksamen Agonisten Etonitazen, eine signifikant verminderte Toleranz hervor. Der Einfluss der GRK3 auf die Fentanyl-Toleranz konnte schon in heterologen Genexpressions-Studien mithilfe von *Xenopus* Oozyten nachgewiesen werden, wobei die Agonist-induzierte homologe Desensibilisierung des Opioid-Rezeptors abhängig von der Expression der GRK3 war (Appleyard et al., 1999; Kooor et al., 1998) und Morphin in geringerem Maße die GRK3 aktivieren konnte als Fentanyl (Kooor et al., 1998). In diesen Studien waren im Vergleich zu der GRK3 weder die GRK2 noch die GRK5 in dem gleichen Maß effektiv, den Opioid-Rezeptor zu desensibilisieren. Angesichts der angeführten Resultate ist anzunehmen, dass die GRK3-vermittelte Phosphorylierung des T370, des S375 und des T379 die akute μ -Opioid-Rezeptor-Desensibilisierung wie auch die Toleranzentwicklung nach Applikation hochwirksamer Agonisten begünstigt. Die Tatsache, dass eine gestörte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors die Opioid-induzierte Analgesie beeinflussen kann, zeigte bereits unsere Arbeit an MOR^{S375A/S375A}-Mäusen. Bei diesen Tieren ist insbesondere Fentanyl stärker analgetisch wirksam als bei Wildtypen, daneben entwickelten diese Mäuse eine schwächere Toleranz nach Etonitazen- und DAMGO-, nicht aber nach Morphin-Gabe (Grecksch et al., 2011).

Die mangelnde Desensibilisierung des μ -Opioid-Rezeptors tritt – wie beschrieben – nur nach mehrmaliger Aktivierung des Rezeptors mit hochwirksamen Agonisten zutage, nicht aber nach Stimulation mit Morphin, was darauf hindeutet, dass eine Deletion der GRK3 teilweise durch die GRK2 kompensiert werden kann. Es wird schon längere Zeit postuliert, dass auf zellulärer Ebene die Desensibilisierung nach Agonist-Gabe durch GRKs und nachfolgende β -Arrestin-Bindung an den phosphorylierten Rezeptor vermittelt wird (Cen et al., 2001; Ferguson et al., 1996; Lowe et al., 2002; Pitcher et al., 1998). Insbesondere *in vitro*-Studien haben gezeigt, dass die GRK3 innerhalb der GRKs die effektivste Kinase ist, Agonist-abhängig Opioid-Rezeptoren zu desensibilisieren, wobei sich auch die Überexpression der GRK5 als effektiv in dieser Hinsicht erwiesen hat (Appleyard et al., 1997). Die Morphin-vermittelte akute Antinozizeption unterscheidet sich sowohl bei GRK3^{-/-} als auch bei GRK5^{-/-}-Tieren von der bei β -Arrestin2-defizienten Mäusen, da diese Tiere eine verstärkte sowie länger andauernde Antinozizeption nach Morphin-Gabe aufweisen (Bohn et al., 2004; Bohn et al., 1999). Die gleiche Forschungsgruppe publizierte daneben Ergebnisse, die eine drastisch reduzierte analgetische Toleranzentwicklung bei diesen Tieren im Vergleich zu Wildtypen erkennen ließen, sowohl akuter Art, nach einer einmaligen hohen Dosis Morphins, als auch nach chronischer Gabe von Morphin (Bohn et al., 2000; Bohn et al., 2002).

Möglicherweise sind diese Differenzen darin begründet, dass β -Arrestin2 in der Signalkaskade nach den GRKs agiert und infolgedessen mit mehreren GRKs interagieren kann. Was allerdings den Vergleich der verschiedenen Genotypen erschwert, ist die Tatsache, dass β -Arrestin2-defiziente Mäuse sich nicht nur in der Toleranzentwicklung, sondern auch in der akuten Antinozizeption nach Morphin-Applikation von Wildtypen unterscheiden (Bohn et al., 1999; Terman et al., 2004). In der weiteren einschlägigen Literatur wird in diesem Kontext auch anderen regulatorischen Proteinen ein relevanter Stellenwert nachgesagt. Insbesondere der Protein-Kinase A (PKA) und der PKC misst man in der Entstehung antinozizeptiver Toleranz Bedeutung bei (Bailey et al., 2006; Gabra et al., 2008; Smith et al., 2006).

Des Weiteren wird im Hinblick auf die Desensibilisierung von GPCRs auch oftmals auf die heterogenen Fähigkeiten von Agonisten eingegangen, eine Rezeptorinternalisierung zu erzeugen, welche den Rezeptor von der Zellmembran entfernt, woraufhin er recycelt oder degradiert werden kann. Internalisierung kann aber auch der Kompartimentalisierung dienen und somit die Signaltransduktion begünstigen. So wurde postuliert, dass die μ -Opioid-Rezeptorinternalisierung der Rezeptordesensibilisierung entgegenwirkt, indem sie das Recycling der Rezeptoren vermittelt, aus welchem die Resensibilisierung des Rezeptors in einen wieder aktivierbaren Zustand resultiert (He & Whistler, 2005; Whistler et al., 1999). Infolgedessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass Agonisten wie Fentanyl, die eine starke Internalisierung bewirken, eine geringere antinozizeptive Toleranz hervorrufen als solche wie Morphin, die kaum eine Internalisierung bedingen (Finn & Whistler, 2001; He & Whistler, 2005; Whistler et al., 1999). Die erwähnten Mutmaßungen müssen jedoch infrage gestellt werden, da diese Substanzen in äquivalenten Dosen bei chronischer Infusion eine analoge antinozizeptive Toleranz bei Wildtyp-Mäusen entstehen lassen (Raehal & Bohn, 2011).

Im Anschluss an die chronische Morphin-Applikation lösten wir mithilfe des μ -Opioid-Rezeptor-Antagonisten Naloxon bei GRK5^{-/-}- und Wildtypmäusen Entzugssymptome aus und evaluierten diese im Vergleich zueinander. Die durch Injektion von Naloxon bedingten Entzugssymptome waren bei GRK5^{-/-}-Mäusen signifikant geringer ausgeprägt als bei Wildtypen. In diesem Zusammenhang wird insbesondere die Anzahl der Sprünge als sehr aussagekräftig gewertet, da diese stark mit dem Grad der Abhängigkeit korrelieren soll (Kest et al., 2002). Die schwächer ausgeprägte Entzugssymptomatik legt den Schluss nahe, dass GRK5^{-/-}-Tiere eine verminderte physische Abhängigkeit nach Morphin-Gabe entwickeln. Dies kann zum einen mit der Möglichkeit erklärt werden, dass die GRK5 innerhalb von Adaptationsvorgängen in Zusammenhang mit dem Einsetzen von Morphin-Abhängigkeit von

Bedeutung ist. Zum anderen wäre eine vorstellbare Interpretation, dass der GRK5 bei der Ausprägung und wahrnehmbaren Darstellung bestimmter somatischer Entzugssymptome eine entscheidende Rolle zukommt. Um der Ursache weiter auf den Grund gehen zu können, müsste man die einer Naloxon-Injektion folgenden Entzugssymptome nach chronischer Gabe weiterer Opioide untersuchen. Würden diese Analgetika ebenfalls schwächere Symptome bei GRK5^{-/-}-Tieren auslösen, wäre dies ein Hinweis auf eine Beteiligung der GRK5 an der Fähigkeit dieser Mäuse, überhaupt Entzugssymptome zeigen zu können. Zusammenfassend können die abgeschwächten Entzugssymptome bei den GRK5^{-/-}-Mäusen damit erklärt werden, dass die GRK5 das μ -Opioid-Rezeptor-Signalling in Neuronen begünstigt, die in die Entstehung von Abhängigkeit und/oder das Antagonist-induzierte Entzugsverhalten involviert sind (Zheng et al., 2008). Nach chronischer Applikation von Etonitazen ließen sich durch nachfolgende Antagonisierung mittels Naloxon bei GRK3-defizienten Mäusen und Wildtypen vergleichbar stark ausgeprägte Entzugssymptome hervorrufen. Aus vorangegangenen Publikationen anderer Forschungsgruppen ist bereits bekannt, dass nach chronischer Applikation unterschiedlicher Opioide die Injektion von Naloxon sowohl bei GRK3^{-/-}-Tieren (Terman et al., 2004) als auch bei β -Arrestin2-defizienten Mäusen (Bohn et al., 2000; Raehal & Bohn, 2011) ähnlich ausgeprägte Entzugssymptome auslöste wie bei Wildtypen. Vor nicht allzu langer Zeit wurde von Raehal & Bohn (2011) veröffentlicht, dass sich bei β -Arrestin2-defizienten Tieren nur nach hohen Dosen Morphins und darauffolgender Injektion von Naloxon vergleichbare Symptome wie bei Wildtypen provozieren lassen. Nach geringeren Dosen Morphins dagegen sind die somatischen Entzugserscheinungen der β -Arrestin2-defizienten Mäuse weniger ausgeprägt (Raehal & Bohn, 2011). Die GRK3 scheint infolgedessen hinsichtlich kompensatorischer Adaptationsprozesse während chronischer Opioid-Applikation, welche aufgrund der Antagonisierung durch Naloxon offensichtlich werden, nicht relevant zu sein. Unter Einbeziehung unserer Resultate sowie der Ergebnisse weiterer publizierter Studien bezüglich der Toleranzentwicklung liefern diese Erkenntnisse stützende Hinweise auf die hypothetische Unabhängigkeit von Opioid-induzierter Entzugssymptomatik und Toleranzentwicklung (Nitsche et al., 2002; Terman et al., 2004).

Aufgrund der beobachteten Divergenz der drei gentechnisch veränderten Mauslinien im Vergleich zu Wildtypen in den bisher verwendeten Modellen zur Ermittlung der Opioid-vermittelten Antinozizeption und Toleranz sowie der Naloxon-induzierten Antagonisierung chronischer Opioid-Effekte nutzten wir das Modell der konditionierten Platz-Präferenz (*conditioned place preference*; CPP), um zu eruieren, in welcher Weise das durch Opioide

bedingte Suchtverhalten durch Deletion der GRK5, der GRK3 oder aufgrund der Phosphorylierungs-Defizienz des S375 verändert wird. Das CPP-Modell ist allgemein anerkannt, um die Mechanismen von Kontext-abhängigem Lernen und Belohnungseffekten suchterzeugender Substanzen bei Nagern zu ergründen (Bardo et al., 1995; Cunningham et al., 2011; Sanchis-Segura & Spanagel, 2006; Tzschentke, 2007). Der erlernten Assoziation einer suchterzeugenden Substanz mit einer spezifischen Umgebung werden Prozesse der Pavlovschen Konditionierung zugrunde gelegt. Das Tier entwickelt eine Präferenz für eine der beiden spezifischen Umgebungen (konditionierter Stimulus), in welcher es wiederholt einer suchterzeugenden Substanz (unkonditionierter Stimulus) ausgesetzt ist, im Gegensatz zu der anderen Umgebung, in der es keinen Stimulus durch die Substanz erfährt. Nachfolgende Exposition gegenüber der mit der suchterzeugenden Substanz verbundenen Umgebung ruft auch in Abwesenheit dieser Substanz über einen gewissen Zeitraum Verhaltensmuster hervor, welche den durch die Substanz hervorgerufenen ähneln (Nestler, 2001b; Robbins & Everitt, 2002; Stephens et al., 2010). Die durch Opiate, aber auch durch eine Vielzahl anderer Substanzen hervorgerufene Präferenz steht in entscheidendem Zusammenhang mit dem μ -Opioid-Rezeptor, welchem eine maßgebliche Bedeutung in der Ausbildung eines Belohnungseffektes zukommt (Le Merrer et al., 2009; McBride et al., 1999; Nguyen et al., 2012; Tzschentke, 1998; Tzschentke, 2007). Allerdings stützt auch eine Fülle pharmakologischer Studien die wichtige Bedeutung der δ -Opioid-Rezeptoren im Hinblick auf Substanz-induzierte CPP (Le Merrer et al., 2011). So konnten δ -Opioid-Rezeptor-Agonisten eine CPP hervorrufen (Longoni et al., 1998; Morales et al., 2001; Suzuki et al., 1997), δ -Opioid-Rezeptor-Antagonisten diese dagegen nach Kokain, Metamphetamin oder Morphin abschwächen (Chefer & Shippenberg, 2009; Menkens et al., 1992; Moron et al., 2010; Suzuki et al., 1994). Diese Beobachtungen sprechen für eine Beteiligung der δ -Opioid-Rezeptoren an der Wirkungsvermittlung suchterzeugender Substanzen (Le Merrer et al., 2012), jedoch müssen auch Kreuzreaktionen von δ -Opioid-Rezeptor-Agonisten am μ -Opioid-Rezeptor in Erwägung gezogen werden (Hutcheson et al., 2001; Scherrer et al., 2004).

Im Laufe unserer Untersuchungen entwickelten GRK5^{-/-}-Mäuse, ganz im Gegensatz zu den getesteten Wildtypen, erstaunlicherweise keine Präferenz für die mit Morphin assoziierte Kammer, sondern eine starke Aversion, die auch während der Extinktionsphase in den folgenden drei Wochen bestehen blieb. Der Belohnungseffekt und positive Verstärkungseffekt Morphins ist bei diesen Tieren demnach gänzlich blockiert, ja sogar ins Gegenteil gekehrt. In ähnlicher Weise induzierte auch Fentanyl bei diesen Tieren eine Aversion bezüglich der mit dieser Substanz verbundenen Kammer, welche zwei Wochen

Bestand hatte. Der Einfluss von Opioiden auf Regelkreise im Gehirn, die mit Belohnungseffekten in Verbindung stehen, ist zwar sehr komplex, jedoch ist diesbezüglich die maßgebliche Bedeutung des mesolimbischen dopaminergen Systems gemeinhin anerkannt (De Vries & Shippenberg, 2002; Di Chiara & Imperato, 1988; White & Kalivas, 1998; Wise & Rompre, 1989). Neben der Aktivierung der μ -Opioid-Rezeptoren spielen D2-Dopamin-Rezeptoren eine kritische Rolle in den Verstärkungseffekten von Morphin (Maldonado et al., 1997; Matthes et al., 1996). So entwickeln zum einen D2-Dopamin-Rezeptor-defiziente Mäuse nach Konditionierung mit Morphin keine CPP (Elmer et al., 2002; Maldonado et al., 1997), zum anderen zieht die akute Gabe von Kokain aber auch von Morphin erhöhte extrazelluläre Konzentrationen an Dopamin in verschiedenen Gehirnanaren nach sich (Di Chiara & Imperato, 1988; He & Shippenberg, 2000; Pontieri et al., 1995; Rocha et al., 1998). Aus diesem Grunde untersuchten wir, inwieweit das dopaminerge Signalling von der GRK5-Deletion beeinflusst wird und konditionierten die Tiere mit Kokain auf eine der beiden Kammern. Hierbei ergab sich aus dem durch Kokain auslösbaren Belohnungseffekt, dass die Funktionen des Dopamin-Rezeptors durch Elimination der GRK5 nicht beeinträchtigt werden; dies wurde ersichtlich aus der entwickelten Präferenz der GRK5-defizienten Tiere für die Kokain-assoziierte Kammer. Auch schließt das Resultat, dass GRK5^{-/-}-Mäuse imstande sind, eine Kokain-Präferenz auszubilden, ein eventuelles Bestehen einer beeinträchtigten Gedächtnisleistung dieser Tiere aus. Es ist demnach naheliegend, dass die GRK5 speziell bezüglich der positiven Verstärkungseffekte durch Morphin und Fentanyl von hoher Relevanz ist.

Auch andere Forschungsgruppen konnten zeigen, dass die Regulation des μ -Opioid-Rezeptors durch Gabe verschiedener μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten unterschiedliche Effekte *in vivo* bedingt. Demnach entwickelten β -Arrestin2-defiziente Mäuse nach Morphin-Applikation eine stärkere Antinozizeption (Bohn et al., 1999), allerdings war auch die Dopamin-Freisetzung im Striatum dieser Tiere nach Morphin-Gabe stärker erhöht, was in Korrelation zu der gleichermaßen verstärkten CPP im Vergleich zu Wildtypen steht (Bohn et al., 2003). Morphin, Kokain, Fentanyl, aber auch viele andere suchterzeugende Substanzen führen zu einer verstärkten Aktivierung des Dopamin-Signallings in mesolimbischen Gehirnstrukturen, wie dem Nucleus accumbens (Koob, 1992; Steketee et al., 1992); diese Aktivierung ist ein wesentlicher Bestandteil der initialen Reaktion auf diese Substanzen (Di Chiara & Imperato, 1988; He & Shippenberg, 2000; Murphy et al., 2001; Pontieri et al., 1995). Das mesolimbische dopaminerge System projiziert von der ventralen tegmental Zone des Mittelhirns zum Nucleus accumbens, infolgedessen wird diesem System eine Schlüsselrolle

bezüglich der Belohnungseffekte suchterzeugender Substanzen zugesprochen (Shippenberg et al., 2007; Wee & Koob, 2010) und dem Nucleus accumbens eine kritische Funktion was das Verhalten in Verbindung mit Verstärkungs- und Belohnungseffekten dieser Substanzen betrifft (Everitt & Wolf, 2002). Kokain wirkt daneben zusätzlich über eine Blockade der Monoamin-Transporter; es inhibiert die Wiederaufnahme von Monoaminen wie Dopamin, woraus ein erhöhter Neurotransmitterspiegel im Extrazellulärraum resultiert. Verhaltensunterschiede zwischen GRK5-defizienten Tieren und Wildtypen konnten im CPP-Modell nur nach Gabe von Morphin und Fentanyl beobachtet werden, nicht aber nach Kokain-Applikation, wonach sich auch bei den GRK5^{-/-}-Tieren eine den Wildtypen vergleichbare CPP manifestierte. Folglich hat die Deletion der GRK5 keinen offensichtlichen physiologischen Effekt auf die Wirkung von Kokain – zumindest im Bezug auf die durch diese Substanz vermittelten Belohnungseffekte – und scheint im Hinblick auf die Dopamin-Rezeptor-mediierte Signaltransduktion keine kritische Rolle einzunehmen. Bezüglich der Frage, weshalb nicht alle GPCRs von der Deletion der GRK5 als regulatorischem Element beeinträchtigt sind, bietet sich eine attraktive Hypothese an: das Fehlen der GRK5 kann mit einem Ersatz durch andere GRK-Isoformen ausreichend kompensiert werden; demzufolge kann die Regulation der Dopamin-Rezeptoren aufrecht erhalten werden. In transfizierten Zellkulturen konnte dies für β -Arrestin gezeigt werden: Dopamin-D1- und Dopamin-D2-Rezeptoren können mit beiden Typen von β -Arrestinen interagieren (Kim et al., 2001; Oakley et al., 2000). Des Weiteren können auch über den κ -Opioid-Rezeptor ausgelöste Effekte an der Aversion der GRK5^{-/-}-Tiere nach Morphin- und Fentanyl-Konditionierung beteiligt sein. Eine Vielzahl an Studien hat eine starke Expression von κ -Opioid-Rezeptoren und deren endogenen Agonisten, den Dynorphinen, in der präfrontal-cortico-striatalen Schleife nachgewiesen und konnte somit den inhibitorischen Effekt des Dynorphin/ κ -Opioid-Rezeptor-Systems auf das Belohnungssystem des Gehirns deutlich machen. Dieser Effekt wird durch eine supprimierte Dopamin-Freisetzung innerhalb des mesolimbischen Belohnungspfades und der nigro-striatalen Bahn erzielt (Koob, 1992; Narita et al., 2005). Eine Aktivierung des κ -Opioid-Rezeptors geht mit der Entwicklung einer Aversion bei Nagern und Dysphorie beim Menschen einher (Herz, 1998; Nguyen et al., 2012). Sowohl Morphin als auch Fentanyl wird eine agonistische Wirkung am κ -Opioid-Rezeptor zugesprochen (Gharagozlou et al., 2006). Mehreren Studien zufolge war es möglich mittels κ -Opioid-Rezeptor-Agonisten, wie beispielsweise Dynorphin oder U50,488H, eine Aversion im CPP-Modell hervorzurufen, aber auch die mit Morphin oder Kokain verbundenen Belohnungseffekte abzuschwächen (Funada et al., 1993; Glick et al., 1995; Kuzmin et al.,

1997; Wee & Koob, 2010). Dementgegen wiesen κ -Opioid-Rezeptor-defiziente Mäuse keine veränderte Präferenz nach Morphin-Applikation im CPP-Modell auf (Simonin et al., 1998). Folglich besteht die Möglichkeit, dass, obwohl wegen des Fehlens der GRK5 der Belohnungseffekt über die μ -Opioid-Rezeptoren nicht mehr hervorgerufen werden, sich demnach keine Präferenz herausbilden kann, eine Aktivierung der κ -Opioid-Rezeptoren dagegen nach wie vor besteht. Die Wirkung der Opioide infolge der Aktivierung der κ -Opioid-Rezeptoren wird bei Wildtypmäusen von den noch bestehenden Belohnungseffekten über μ -Opioid-Rezeptoren maskiert, sie bilden eine robuste Präferenz aus; bei GRK5-defizienten Tieren ist dies nicht mehr möglich, was eine negative Assoziation zur Folge hat und demnach zu der Entwicklung einer Aversion führt. Die Tatsache, dass die Kokain-induzierte Präferenz nicht beeinträchtigt ist, trägt dem Faktum Rechnung, dass Kokain seine Wirkungen auch über Dopamin-Rezeptoren entfaltet.

In Anlehnung an die bereits angeführten Experimente untersuchten wir ebenfalls den Einfluss der GRK3-Deletion auf die Entwicklung und Extinktion der Platz-Präferenz nach Morphin- und Fentanyl-Applikation. Während der Konditionierungsphase entwickelten GRK3^{-/-}-Mäuse und Wildtypen eine robuste CPP. Beachtenswert ist jedoch die signifikant schnellere Extinktion der Präferenz gegenüber der Opioid-assoziierten Kammer bei GRK3^{-/-}-Tieren verglichen mit den Wildtypen.

Aufgrund unserer Erkenntnis, dass die GRK5 in die S375-Phosphorylierung des durch Morphin aktivierten μ -Opioid-Rezeptors involviert ist, haben wir anhand der Phosphorylierungs-defizienten MOR^{S375A/S375A}-Mäuse untersucht, ob die GRK5-vermittelte μ -Opioid-Rezeptorosphorylierung für die Verstärkungseffekte von Morphin erforderlich ist. Analog den GRK3^{-/-}-Mäusen manifestierte sich während der Konditionierung auch bei diesen Tieren eine starke Präferenz für die mit Morphin assoziierte Kammer, die sich ebenfalls während der Extinktionsphase signifikant schneller reduzierte als bei Wildtypen.

In der Literatur findet sich eine Fülle an Information hinsichtlich der neurobiologischen Mechanismen, die der Extinktion des Belohnungsgedächtnisses zugrunde liegen (Feltenstein & See, 2007; Hsu & Packard, 2008; Torregrossa et al., 2010). Extinktion scheint Folge eines neuen Lernprozesses zu sein, nicht lediglich Vergessen oder Auslöschen des ehemals Gelernten (Bouton, 1993). Demzufolge besteht die Möglichkeit, dass Entstehung und Extinktion von Verhaltensweisen im Zusammenhang mit Substanzen, die Belohnungseffekte vermitteln, unterschiedlichen Prozessen des Lernens und Erinnerns unterliegen (Gong et al., 2010). In diesem Kontext wird unter anderem die ERK-Aktivierung in unterschiedlichen

Gehirnregionen bei verschiedenen Lernmustern beschrieben (Atkins et al., 1998; Blum et al., 1999; Schafe et al., 2000), ebenso konnte mit ERK-Inhibitoren in einer Vielzahl von Lern-Modellen das entsprechende Verhalten gehemmt werden (Herry et al., 2006; Hugues et al., 2004; Lu et al., 2001). So scheinen ERK wie auch CREB (*cAMP response element-binding protein*), ein wichtiges *Downstream*-Molekül von ERK (West et al., 2001), eine große Bedeutung bezüglich der längerfristigen synaptischen Plastizität (Chwang et al., 2007; Thomas & Huganir, 2004; Yin et al., 2002) zu besitzen, ferner wird ERK als wirksames Regulationsprotein der Gentranskription bei der Ausbildung des Langzeitgedächtnisses angesehen (Impey et al., 1998; Miller & Marshall, 2005; Wang et al., 2012). Auch werden Änderungen in der Aktivität der Adenylylcyclase neben der Aktivierung des MAPK (*mitogen-activated protein kinase*, Mitogen-aktivierte Protein-Kinase)-Signalweges als potentielle Mechanismen in Verbindung mit langfristigen Wirkungen von Opioiden angeführt (Ammer & Christ, 2002; Clark et al., 2004; Schulz et al., 2004a). In dieser Hinsicht konnten Macey et al. (2006) in Neuronen aus dem Striatum von Wildtyp-Tieren eine verstärkte ERK-Phosphorylierung nach Fentanyl-, jedoch nicht nach Morphin-Stimulation nachweisen. In Neuronen von GRK3^{-/-}-Mäusen war dagegen die Fentanyl-induzierte ERK-Aktivierung reduziert, was eine Beteiligung der GRK3 an der μ -Opioid-Rezeptor-vermittelten Zunahme der ERK-Phosphorylierung nach Fentanyl-Applikation vermuten lässt. Diese Befunde können eine Erklärung für die schnellere Extinktion der Präferenz der GRK3-defizienten Mäuse darstellen, zumindest nach Konditionierung mit Fentanyl. Jedoch muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass die angeführten Versuche von Macey et al. (2006) lediglich in isolierten striatalen Neuronen durchgeführt worden sind, welche nur einen Teil der relevanten Gehirnareale im Zusammenhang mit Sucht und deren Extinktion repräsentieren. Konträr zu oben Erwähntem ließ sich nach chronischer Morphin-Applikation eine verstärkte ERK-Phosphorylierung in unterschiedlichen Gehirnarealen von Mäusen erkennen, unter anderem in der Stria terminalis, dem Nucleus accumbens, dem somato-sensorischen Cortex und dem Locus coeruleus (Eitan et al., 2003; Valjent et al., 2004). Eine Beteiligung der GRK3 an diesem Prozess könnte eine potentielle Ursache für die raschere Extinktion der Morphin-vermittelten Belohnungseffekte bei GRK3-defizienten Mäusen darstellen. Die maßgebliche Bedeutung der ERK-Aktivierung bezüglich der Extinktion dieser Effekte konnten Valjent et al. (2006) nachweisen: so konnte nach Applikation von SL327, einem MEK1/MEK2 Inhibitor, nach Morphin-Reexposition eine ehemals gelernte Morphin-CPP aufgehoben werden (Valjent et al., 2006).

In Anbetracht dieser Ergebnisse ergibt sich als Konsequenz, dass nicht die GRK5-vermittelte Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors am Serin³⁷⁵, sondern andere Funktionen der GRK5 den Belohnungseffekt durch Morphin bedingen. In vielen Rezeptor-Systemen inhibiert der siRNA-*knock down* der GRK5 die Aktivierung von ERK nach Morphinapplikation, was auf eine erhebliche Bedeutung der GRK5 innerhalb dieses Signalwegs hindeutet (Reiter et al., 2012). Vorausgesetzt, die Signaltransduktion der GRK5 erfolgt *in vivo* während der Entstehung der Morphin-CPP über ERK, würde eine chemische Inhibierung eben dieses Signalweges einen ähnlichen Effekt nach sich ziehen, wie er bei den GRK5^{-/-}-Mäusen aufgetreten ist. Aus diesem Grunde wurde Wildtyp-Mäusen während der Konditionierungsphase im CPP-Modell und der Messung der Analgesie jeweils eine Stunde vor Morphin-Applikation der MEK1/MEK2 Inhibitor SL327 injiziert. Tatsächlich konnte die Entwicklung einer Präferenz bei den mit SL327 behandelten Tieren gänzlich unterbunden werden, während die analgetische Wirkung Morphins trotz der Injektion von SL327 erhalten blieb. Aus diesem Resultat lässt sich schließen, dass die Effekte der Deletion der GRK5 in diesem Modell zumindest partiell – im Sinne der Aufhebung der Morphin-induzierten Präferenz – mittels chemischer Inhibierung des ERK-Signallings nachgeahmt werden können. Allerdings sind die durch SL327 ausgelösten Effekte nicht selektiv: so hemmt die systemische Applikation dieses Inhibitors auch die Entwicklung einer Kokain-CPP (Valjent et al., 2006; Valjent et al., 2000). Die Inhibierung der GRK5-Aktivität kann somit eine potentiell vielversprechende Möglichkeit zur Prävention der Opioid-Sucht darstellen, während die analgetische Potenz der Opioide in einem wirkungsvollen Rahmen erhalten bleibt.

Zusammenfassend belegen die angeführten Ergebnisse die Hypothese, dass die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors *in vivo* durch Substanz-selektive Bindung unterschiedlicher GRKs reguliert wird. Wie schon mit der *bar code*-Hypothese postuliert, agieren verschiedene GRKs als Sensoren, indem sie aktive Rezeptor-Konformationen erkennen, welche von unterschiedlichen Liganden stabilisiert werden. Diese Rekrutierung der GRKs führt zu spezifischen Phosphorylierungsmustern am μ -Opioid-Rezeptor, welche wiederum unterschiedliche Opioid-induzierte Effekte und Verhaltensmuster hervorrufen.

7 Zusammenfassung

Opioide zählen zu den potentesten Analgetika, jedoch ist ihr Einsatz in der klinischen Praxis aufgrund ihrer zahlreichen unerwünschten Wirkungen limitiert, besonders die schnelle Toleranzentwicklung, jedoch auch das Abhängigkeitspotential und der sucherzeugende Charakter dieser Substanzen stehen nachteilig der erwünschten Analgesie gegenüber. Morphin, ein Inhaltsstoff des Opiums, stellt hierbei das wohl bekannteste Betäubungs- und Rauschmittel dar. Opioide entfalten den Großteil ihrer Wirkungen über Interaktion mit dem μ -Opioid-Rezeptor, welcher Agonist-selektiven Regulationsmechanismen unterworfen ist. Insbesondere das Agonist-spezifische Phosphorylierungsmuster an intrazellulären Serinen und Threoninen des Carboxyl-Terminus des μ -Opioid-Rezeptors ist in dieser Hinsicht von maßgeblicher Bedeutung. Bisher konnte lediglich *in vitro* an HEK293-Zellen gezeigt werden, dass Morphin eine selektive Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ induziert, welche vorwiegend über die GRK5 vermittelt wird, worauf keine Internalisierung des Rezeptors folgt. Potente Opioid-Agonisten dagegen induzieren nicht nur eine Phosphorylierung des Serin³⁷⁵, sondern auch der flankierenden Aminosäurereste Threonin³⁷⁰, Threonin³⁷⁶ und Threonin³⁷⁹ einem hierarchischen Muster entsprechend, wofür die GRK2 und GRK3 erforderlich sind. Bislang ist jedoch wenig über die physiologischen Konsequenzen dieser unterschiedlichen Phosphorylierungsmuster bekannt. *In vivo* konnte bisher einzig die Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ in Gehirnen von Mäusen nachgewiesen werden.

Wir konnten erstmals *in vivo* mithilfe eigens generierter Phosphorylierungsstellen-spezifischer Antikörper in Gehirnen von Mäusen bestätigen, dass die Applikation des potenten μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten Etonitazen die Phosphorylierung mehrerer Aminosäurereste am Carboxyl-Terminus des Rezeptors zur Folge hat. Diese hierarchische Phosphorylierungskaskade mit Serin³⁷⁵ als initialer Phosphorylierungsstelle, darauffolgend Threonin³⁷⁰ und Threonin³⁷⁹, wird insbesondere durch die GRK3 katalysiert. Im Gegensatz hierzu ist auch *in vivo* für die Morphin-induzierte Phosphorylierung des Serin³⁷⁵ spezifisch die GRK5 erforderlich.

Hinweise bezüglich des Einflusses einer veränderten Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors auf Opioid-induzierte Effekte *in vivo* ergaben sich bereits aus Ergebnissen mit *Knock-in*-Mäusen, die eine phosphorylierungsdefiziente S375A-Mutante des μ -Opioid-Rezeptors exprimieren (MOR^{S375A/S375A}); diese Tiere weisen eine verstärkte Analgesie und reduzierte Toleranz nach Applikation potenter μ -Opioid-Rezeptor-Agonisten auf, nach

Morphin-Applikation jedoch entsprechen die antinozizeptiven Reaktionen dieser Tiere denjenigen von Wildtypen.

In Anbetracht dieser Resultate untersuchten wir, inwieweit sich die Agonist-selektive Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors durch unterschiedliche GRK-Isoformen auf die Antinozizeption und das Entzugsverhalten nach Opioid-Applikation auswirkt. Hierfür nutzten wir GRK5- und GRK3-defiziente Mäuse jeweils im Vergleich zu Wildtypen und untersuchten in gängigen Tests zur Ermittlung der Opioid-induzierten Analgesie, der akuten und chronischen Toleranzentwicklung sowie zur Evaluierung von Entzugssymptomen nach chronischer Opioid-Applikation die durch Deletion der GRK5 beziehungsweise GRK3 bedingten Effekte. Unseren Ergebnissen zufolge wiesen GRK5-defiziente Tiere reduzierte antinozizeptive Reaktionen und geringer ausgeprägte Entzugssymptome nach Injektion von Morphin auf. GRK3-defiziente Mäuse entwickelten dagegen nach Gabe Fentanyls keine akute analgetische Toleranz und zeigten ebenso nach langfristiger Etonitazen-Applikation eine signifikant verminderte chronische Toleranzentwicklung im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Um zudem den Einfluss der GRK5- beziehungsweise GRK3-Deletion sowie der Phosphorylierungsdefizienz des Serin³⁷⁵ bezüglich der suchterzeugenden Eigenschaften von Opioiden und der Opioid-vermittelten Belohnungseffekte sowie deren Extinktion zu ermitteln, testeten wir GRK5- und GRK3-defiziente sowie MOR^{S375A/S375A}-Mäuse jeweils im Vergleich zu Wildtypen im Modell der konditionierten Platz-Präferenz. Weder nach Konditionierung mit Morphin noch nach Konditionierung mit Fentanyl entwickelten GRK5-defiziente Mäuse eine Präferenz für die mit der entsprechenden Substanz assoziierte Kammer, ganz im Gegensatz, diese Tiere zeigten sogar eine starke Aversion bezüglich der mit Opioiden verknüpften Umgebung. Bei GRK3-defizienten und ebenso bei MOR^{S375A/S375A}-Mäusen waren die Belohnungseffekte der Opioiden dagegen erhalten; es manifestierte sich eine ausgeprägte Präferenz für die Opioid-assoziierte Umgebung, obgleich die Extinktion dieser Präferenz signifikant schneller vonstatten ging als bei Wildtyp-Mäusen.

Aufgrund der erheblichen Bedeutung von ERK hinsichtlich verschiedener Lernprozesse, aber auch wegen der Relevanz der GRK5 im Zusammenhang mit der Aktivierung des ERK-Signalweges haben wir die Wirkung des MEK1/MEK2-Inhibitors SL327 im Hinblick auf die Morphin-vermittelten Belohnungseffekte und die Antinozizeption nach Morphin-Applikation bei Wildtyp-Mäusen untersucht. Tatsächlich konnte die Entwicklung einer Präferenz bei den mit SL327 behandelten Tieren gänzlich unterbunden werden, während die analgetische Wirkung Morphins trotz der Injektion von SL327 erhalten blieb. Die Effekte der GRK5-Deletion konnten demzufolge zumindest partiell – im Sinne der Aufhebung der Morphin-

induzierten Präferenz – mittels chemischer Inhibierung des ERK-Signallings nachgeahmt werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen erstmals *in vivo*, dass die Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors durch Opioid-selektive Bindung unterschiedlicher GRKs reguliert wird. In Einklang mit der *bar code*-Hypothese führt die Rekrutierung verschiedener GRKs zu spezifischen Phosphorylierungsmustern am μ -Opioid-Rezeptor, welche in der Folge die Antinozizeption und analgetische Toleranzentwicklung divers beeinflussen und unterschiedliche Opioid-induzierte Verhaltensmuster hervorrufen. Die Inhibierung der GRK5 kann also als ein neuer Ansatz angesehen werden, die suchterzeugenden Eigenschaften von Opioiden zu unterbinden, während die analgetische Wirkung jener Substanzen in abgeschwächter Form erhalten bleibt.

8 Summary

Although opioid drugs are the most potent analgesics, their clinical benefits are counteracted by the rapid development of tolerance and the potential development of dependence and addiction after repeated or extended administration. Among the opioids, morphine, an opioid alkaloid, probably represents the best-known narcotic drug. Morphine exerts all of its pharmacological effects through interactions with the μ -opioid receptor. The efficiency of μ -opioid receptor signalling is tightly regulated and ultimately limited by the coordinated phosphorylation of intracellular serine and threonine residues. So far it could be shown in HEK293 cells only that morphine induces a selective phosphorylation of serine³⁷⁵ of the μ -opioid receptor that is predominantly catalysed by G protein-coupled receptor kinase 5 and does not lead to an internalization of the receptor. By contrast, high-efficacy opioids not only induce phosphorylation of serine³⁷⁵, but additionally drive higher-order phosphorylation on the flanking residues threonine³⁷⁰, threonine³⁷⁶ and threonine³⁷⁹ in a hierarchical phosphorylation cascade that specifically requires GRK2/3 isoforms. However, little is known about the physiological consequences of these distinct opioid-induced μ -opioid receptor phosphorylation signatures. Until now, only phosphorylation of the serine³⁷⁵ has been demonstrated *in vivo*.

Here, we provide the first evidence that phosphorylation of endogenous μ -opioid receptors in the mouse brain *in vivo* is regulated by drug-selective recruitment of distinct GRK isoforms, which influence opioid-mediated antinociception and different opioid-related behaviours. We show that high-efficacy agonists such as etonitazene and fentanyl stimulate the phosphorylation of multiple carboxyl-terminal phosphate acceptor sites. This multi-site phosphorylation is predominantly mediated by G protein-coupled receptor kinase 3, and occurs in a hierarchical phosphorylation-cascade; serine³⁷⁵ is the initial site followed subsequently by the phosphorylation of threonine³⁷⁰ and threonine³⁷⁹. In contrast, morphine promotes a selective phosphorylation of serine³⁷⁵, which specifically requires GRK5.

Knock-in mice expressing a phosphorylation-deficient S375A mutant of the μ -opioid receptor (MOR^{S375A/S375A}) show enhanced analgesic responses and reduced tolerance to high-efficacy agonists but not morphine, suggesting that disruption of μ -opioid receptor phosphorylation alters the behavioural effects of opioids.

Following up these results, we examined the influence of agonist-specific phosphorylation of the μ -opioid receptor by distinct GRK isoforms on opioid-related antinociception and behaviours. By challenging GRK3- and GRK5-deficient mice and their wild type littermates

in different models regarding opioid-induced analgesia, the development of acute and chronic tolerance and naloxone-induced withdrawal symptoms we investigated the effects of GRK3- or GRK5-deletion. Unlike GRK3 knock-out mice, GRK5 knock-out mice exhibited reduced anti-nociceptive responses after morphine administration but fewer signs of physical dependence. Instead GRK3-deficient mice did not develop acute tolerance after administration of fentanyl. Also after chronic application of etonitazene these mice exhibited chronic tolerance to a lesser extent than the wild types.

In order to examine the influence of GRK3- and GRK5-deletion as well as the phosphorylation-deficiency of the serine³⁷⁵ regarding the addictive and rewarding effects of opioids and their extinction we tested GRK5- and GRK3-deficient mice as well as MOR^{S375A/S375A}-mice using the conditioned place preference model. Neither morphine nor fentanyl were effective in inducing conditioned place preference in GRK5 knock-out mice. In contrast, they developed a robust aversion, whereas cocaine conditioned place preference was retained. The rewarding properties of opioids, however, were evident in GRK3-deficient mice and knock-in mice expressing a phosphorylation-deficient S375A mutation of the μ -opioid receptor, although the extinction of this preference reduced more rapidly in these animals compared to their wild type littermates.

Due to the importance of ERK regarding processes of learning, but also because of the relevance of GRK5 in respect to activation of ERK signaling, we investigated the effects of the MEK1/MEK2 inhibitor SL327 on morphine-induced analgesia and conditioned place preference. In fact, systemic application of SL327 shortly before each conditioning session was sufficient to completely block morphine CPP in wild type mice without affecting morphine analgesia, so the effects of GRK5 deletion could be partially mimicked by chemical inhibition of ERK signalling, implicating that they function the .

These findings show, for the first time, that μ -opioid receptor phosphorylation *in vivo* is regulated by drug-selective engagement of distinct GRK isoforms that, in turn, influence different opioid-related behaviors. Therefore, inhibiting GRK5 function could serve as a new approach for preventing addiction to opioids while preserving their analgesic properties in an attenuated manner.

9 Literaturverzeichnis

- Abdelhamid EE, Sultana M, Portoghese PS, Takemori AE (1991) Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **258**: 299-303
- Aceto MD, Harris LS, Bowman ER (1997) Etorphines: mu-opioid receptor-selective antinociception and low physical dependence capacity. *European journal of pharmacology* **338**: 215-223
- Ammer H, Christ TE (2002) Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity. *J Neurochem* **83**: 818-827
- Appleyard SM, Celver J, Pineda V, Kovoor A, Wayman GA, Chavkin C (1999) Agonist-dependent desensitization of the kappa opioid receptor by G protein receptor kinase and beta-arrestin. *The Journal of biological chemistry* **274**: 23802-23807
- Appleyard SM, Patterson TA, Jin W, Chavkin C (1997) Agonist-induced phosphorylation of the kappa-opioid receptor. *J Neurochem* **69**: 2405-2412
- Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lameh J, Sadee W (1995) Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem* **65**: 1636-1645
- Arriza JL, Dawson TM, Simerly RB, Martin LJ, Caron MG, Snyder SH, Lefkowitz RJ (1992) The G-protein-coupled receptor kinases beta ARK1 and beta ARK2 are widely distributed at synapses in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**: 4045-4055
- Arttamangkul S, Quillinan N, Low MJ, von Zastrow M, Pintar J, Williams JT (2008) Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Molecular pharmacology* **74**: 972-979
- Arttamangkul S, Torrecilla M, Kobayashi K, Okano H, Williams JT (2006) Separation of mu-opioid receptor desensitization and internalization: endogenous receptors in primary neuronal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **26**: 4118-4125
- Atkins CM, Selcher JC, Petraitis JJ, Trzaskos JM, Sweatt JD (1998) The MAPK cascade is required for mammalian associative learning. *Nature neuroscience* **1**: 602-609
- Attramadal H, Arriza JL, Aoki C, Dawson TM, Codina J, Kwatra MM, Snyder SH, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *The Journal of biological chemistry* **267**: 17882-17890
- Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, Bayewitch M, Vogel Z (1997) Opiate-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific. *The Journal of biological chemistry* **272**: 5040-5047
- Bailey CP, Oldfield S, Llorente J, Caunt CJ, Teschemacher AG, Roberts L, McArdle CA, Smith FL, Dewey WL, Kelly E, Henderson G (2009) Involvement of PKC alpha and G-protein-coupled receptor kinase 2 in agonist-selective desensitization of mu-opioid receptors in mature brain neurons. *British journal of pharmacology* **158**: 157-164
- Bailey CP, Smith FL, Kelly E, Dewey WL, Henderson G (2006) How important is protein kinase C in mu-opioid receptor desensitization and morphine tolerance? *Trends in pharmacological sciences* **27**: 558-565

- Barak LS, Ferguson SS, Zhang J, Caron MG (1997) A beta-arrestin/green fluorescent protein biosensor for detecting G protein-coupled receptor activation. *The Journal of biological chemistry* **272**: 27497-27500
- Bardo MT, Rowlett JK, Harris MJ (1995) Conditioned place preference using opiate and stimulant drugs: a meta-analysis. *Neuroscience and biobehavioral reviews* **19**: 39-51
- Benovic JL, Pike LJ, Cerione RA, Staniszewski C, Yoshimasa T, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1985) Phosphorylation of the mammalian beta-adrenergic receptor by cyclic AMP-dependent protein kinase. Regulation of the rate of receptor phosphorylation and dephosphorylation by agonist occupancy and effects on coupling of the receptor to the stimulatory guanine nucleotide regulatory protein. *The Journal of biological chemistry* **260**: 7094-7101
- Berger AC, Whistler JL (2010) How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. *Annals of neurology* **67**: 559-569
- Berrendero F, Kieffer BL, Maldonado R (2002) Attenuation of nicotine-induced antinociception, rewarding effects, and dependence in mu-opioid receptor knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 10935-10940
- Bilsky EJ, Inturrisi CE, Sadee W, Hruby VJ, Porreca F (1996) Competitive and non-competitive NMDA antagonists block the development of antinociceptive tolerance to morphine, but not to selective mu or delta opioid agonists in mice. *Pain* **68**: 229-237
- Blake AD, Bot G, Freeman JC, Reisine T (1997) Differential opioid agonist regulation of the mouse mu opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* **272**: 782-790
- Blenis J (1993) Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 5889-5892
- Blum S, Moore AN, Adams F, Dash PK (1999) A mitogen-activated protein kinase cascade in the CA1/CA2 subfield of the dorsal hippocampus is essential for long-term spatial memory. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **19**: 3535-3544
- Bockaert J, Pin JP (1999) Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *The EMBO journal* **18**: 1723-1729
- Bohn LM, Dykstra LA, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS (2004) Relative opioid efficacy is determined by the complements of the G protein-coupled receptor desensitization machinery. *Molecular pharmacology* **66**: 106-112
- 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
- Bohn LM, Gainetdinov RR, Sotnikova TD, Medvedev IO, Lefkowitz RJ, Dykstra LA, Caron MG (2003) Enhanced rewarding properties of morphine, but not cocaine, in beta(arrestin)-2 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 10265-10273
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Caron MG (2002) Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 10494-10500
- Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT (1999) Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2. *Science* **286**: 2495-2498

- Bokoch MP, Zou Y, Rasmussen SG, Liu CW, Nygaard R, Rosenbaum DM, Fung JJ, Choi HJ, Thian FS, Kobilka TS, Puglisi JD, Weis WI, Pardo L, Prosser RS, Mueller L, Kobilka BK (2010) Ligand-specific regulation of the extracellular surface of a G-protein-coupled receptor. *Nature* **463**: 108-112
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1990) The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* **348**: 125-132
- Bouton ME (1993) Context, time, and memory retrieval in the interference paradigms of Pavlovian learning. *Psychological bulletin* **114**: 80-99
- Bouvier M, Hausdorff WP, De Blasi A, O'Dowd BF, Kobilka BK, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Removal of phosphorylation sites from the beta 2-adrenergic receptor delays onset of agonist-promoted desensitization. *Nature* **333**: 370-373
- Bronstein D, Trujillio K, Akil H (1988) Effects of morphine treatment on endogenous opioid biosynthesis. *NIDA research monograph* **90**: 256-265
- Bruchas MR, Land BB, Chavkin C (2010) The dynorphin/kappa opioid system as a modulator of stress-induced and pro-addictive behaviors. *Brain research* **1314**: 44-55
- Buntin-Mushock C, Phillip L, Moriyama K, Palmer PP (2005) Age-dependent opioid escalation in chronic pain patients. *Anesthesia and analgesia* **100**: 1740-1745
- Burd AL, El-Kouhen R, Erickson LJ, Loh HH, Law PY (1998) Identification of serine 356 and serine 363 as the amino acids involved in etorphine-induced down-regulation of the mu-opioid receptor. *The Journal of biological chemistry* **273**: 34488-34495
- Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL (2010) Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry* **285**: 7805-7817
- Butcher AJ, Prihandoko R, Kong KC, McWilliams P, Edwards JM, Bottrill A, Mistry S, Tobin AB (2011) Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *The Journal of biological chemistry* **286**: 11506-11518
- Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T (1999) Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *The Journal of biological chemistry* **274**: 34483-34492
- Celver JP, Lowe J, Kovoor A, Gurevich VV, Chavkin C (2001) Threonine 180 is required for G-protein-coupled receptor kinase 3- and beta-arrestin 2-mediated desensitization of the mu-opioid receptor in Xenopus oocytes. *The Journal of biological chemistry* **276**: 4894-4900
- Cen B, Xiong Y, Ma L, Pei G (2001) Direct and differential interaction of beta-arrestins with the intracellular domains of different opioid receptors. *Molecular pharmacology* **59**: 758-764
- Chakrabarti S, Yang W, Law PY, Loh HH (1997) The mu-opioid receptor down-regulates differently from the delta-opioid receptor: requirement of a high affinity receptor/G protein complex formation. *Molecular pharmacology* **52**: 105-113
- Chalecka-Franaszek E, Weems HB, Crowder AT, Cox BM, Cote TE (2000) Immunoprecipitation of high-affinity, guanine nucleotide-sensitive, solubilized mu-opioid receptors from rat brain: coimmunoprecipitation of the G proteins G(alpha o), G(alpha i1), and G(alpha i3). *J Neurochem* **74**: 1068-1078

- Chefer VI, Shippenberg TS (2009) Augmentation of morphine-induced sensitization but reduction in morphine tolerance and reward in delta-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **34**: 887-898
- Chen CK, Inglese J, Lefkowitz RJ, Hurley JB (1995) Ca²⁺-dependent interaction of recoverin with rhodopsin kinase. *The Journal of biological chemistry* **270**: 18060-18066
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *The Biochemical journal* **295 (Pt 3)**: 625-628
- Childers SR (1991) Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life sciences* **48**: 1991-2003
- Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M (1997) Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *The Journal of biological chemistry* **272**: 27124-27130
- Chuang TT, Paolucci L, De Blasi A (1996) Inhibition of G protein-coupled receptor kinase subtypes by Ca²⁺/calmodulin. *The Journal of biological chemistry* **271**: 28691-28696
- Chwang WB, Arthur JS, Schumacher A, Sweatt JD (2007) The nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase 1 regulates hippocampal chromatin remodeling in memory formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**: 12732-12742
- Clark MJ, Neubig RR, Traynor JR (2004) Endogenous regulator of G protein signaling proteins suppress Galphao-dependent, mu-opioid agonist-mediated adenylyl cyclase supersensitization. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **310**: 215-222
- Collett BJ (1998) Opioid tolerance: the clinical perspective. *British journal of anaesthesia* **81**: 58-68
- Conner DA, Mathier MA, Mortensen RM, Christie M, Vatner SF, Seidman CE, Seidman JG (1997) beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. *Circulation research* **81**: 1021-1026
- Craft CM, Whitmore DH, Wiechmann AF (1994) Cone arrestin identified by targeting expression of a functional family. *The Journal of biological chemistry* **269**: 4613-4619
- Crain SM, Shen KF (1996) Modulatory effects of Gs-coupled excitatory opioid receptor functions on opioid analgesia, tolerance, and dependence. *Neurochemical research* **21**: 1347-1351
- Cunningham KA, Fox RG, Anastasio NC, Bubar MJ, Stutz SJ, Moeller FG, Gilbertson SR, Rosenzweig-Lipson S (2011) Selective serotonin 5-HT_{2C} receptor activation suppresses the reinforcing efficacy of cocaine and sucrose but differentially affects the incentive-salience value of cocaine- vs. sucrose-associated cues. *Neuropharmacology* **61**: 513-523
- Czlonkowski A, Costa T, Przewlocki R, Pasi A, Herz A (1983) Opiate receptor binding sites in human spinal cord. *Brain research* **267**: 392-396
- Dang VC, Napier IA, Christie MJ (2009) Two distinct mechanisms mediate acute mu-opioid receptor desensitization in native neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **29**: 3322-3327
- Davis BJ (1964) Disc Electrophoresis. II. Method and Application to Human Serum Proteins. *Annals of the New York Academy of Sciences* **121**: 404-427
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000) The regulator of G protein signaling family. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**: 235-271

- De Vries TJ, Shippenberg TS (2002) Neural systems underlying opiate addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 3321-3325
- DeFea KA, Zalevsky J, Thoma MS, Dery O, Mullins RD, Bunnett NW (2000) beta-arrestin-dependent endocytosis of proteinase-activated receptor 2 is required for intracellular targeting of activated ERK1/2. *The Journal of cell biology* **148**: 1267-1281
- Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF (1994) Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *The Journal of comparative neurology* **345**: 46-68
- Dhawan BN, Cesselin F, Raghbir R, Reisine T, Bradley PB, Portoghese PS, Hamon M (1996) International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacological reviews* **48**: 567-592
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**: 5274-5278
- Doll C, Konietzko J, Poll F, Koch T, Holtt V, Schulz S (2011) Agonist-selective patterns of micro-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *Br J Pharmacol* **164**: 298-307
- Doll C, Poll F, Peuker K, Loktev A, Gluck L, Schulz S (2012) Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* **167**: 1259-1270
- Donnelly S, Davis MP, Walsh D, Naughton M, World Health O (2002) Morphine in cancer pain management: a practical guide. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer* **10**: 13-35
- Doucet JP, Trifaro JM (1988) A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel system of high resolution. *Analytical biochemistry* **168**: 265-271
- Downes GB, Gautam N (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**: 544-552
- Duttaroy A, Yoburn BC (1995) The effect of intrinsic efficacy on opioid tolerance. *Anesthesiology* **82**: 1226-1236
- Eitan S, Bryant CD, Saliminejad N, Yang YC, Vojdani E, Keith D, Jr., Polakiewicz R, Evans CJ (2003) Brain region-specific mechanisms for acute morphine-induced mitogen-activated protein kinase modulation and distinct patterns of activation during analgesic tolerance and locomotor sensitization. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 8360-8369
- El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang CY, Law PY, Loh HH (2001) Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12774-12780
- Elmer GI, Pieper JO, Rubinstein M, Low MJ, Grandy DK, Wise RA (2002) Failure of intravenous morphine to serve as an effective instrumental reinforcer in dopamine D2 receptor knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: RC224
- Everitt BJ, Wolf ME (2002) Psychomotor stimulant addiction: a neural systems perspective. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 3312-3320
- Fan G, Shumay E, Malbon CC, Wang H (2001) c-Src tyrosine kinase binds the beta 2-adrenergic receptor via phospho-Tyr-350, phosphorylates G-protein-linked receptor kinase 2, and mediates agonist-induced receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* **276**: 13240-13247

- Feierman DE, Lasker JM (1996) Metabolism of fentanyl, a synthetic opioid analgesic, by human liver microsomes. Role of CYP3A4. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* **24**: 932-939
- Feltenstein MW, See RE (2007) NMDA receptor blockade in the basolateral amygdala disrupts consolidation of stimulus-reward memory and extinction learning during reinstatement of cocaine-seeking in an animal model of relapse. *Neurobiology of learning and memory* **88**: 435-444
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**: 1-24
- Ferguson SS, Barak LS, Zhang J, Caron MG (1996) G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **74**: 1095-1110
- Ferguson SS, Caron MG (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology* **9**: 119-127
- Filliol D, Ghozland S, Chluba J, Martin M, Matthes HW, Simonin F, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Dierich A, LeMeur M, Valverde O, Maldonado R, Kieffer BL (2000) Mice deficient for delta- and mu-opioid receptors exhibit opposing alterations of emotional responses. *Nature genetics* **25**: 195-200
- Finn AK, Whistler JL (2001) Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* **32**: 829-839
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1996) Desensitization of G protein-coupled receptors. *Recent progress in hormone research* **51**: 319-351; discussion 352-313
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ (1995) Phosphorylation and desensitization of the human beta 1-adrenergic receptor. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and cAMP-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry* **270**: 17953-17961
- Freye E, Latasch L (2003) [Development of opioid tolerance -- molecular mechanisms and clinical consequences]. *Anesthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS* **38**: 14-26
- Fuchs PN, Roza C, Sora I, Uhl G, Raja SN (1999) Characterization of mechanical withdrawal responses and effects of mu-, delta- and kappa-opioid agonists in normal and mu-opioid receptor knockout mice. *Brain research* **821**: 480-486
- Funada M, Suzuki T, Narita M, Misawa M, Nagase H (1993) Blockade of morphine reward through the activation of kappa-opioid receptors in mice. *Neuropharmacology* **32**: 1315-1323
- Fundyus ME, Schiller PW, Shapiro M, Weltrowska G, Coderre TJ (1995) Attenuation of morphine tolerance and dependence with the highly selective delta-opioid receptor antagonist TIPP[psi]. *European journal of pharmacology* **286**: 105-108
- Gabra BH, Bailey CP, Kelly E, Smith FL, Henderson G, Dewey WL (2008) Pre-treatment with a PKC or PKA inhibitor prevents the development of morphine tolerance but not physical dependence in mice. *Brain research* **1217**: 70-77
- Gainetdinov RR, Bohn LM, Sotnikova TD, Cyr M, Laakso A, Macrae AD, Torres GE, Kim KM, Lefkowitz RJ, Caron MG, Premont RT (2003) Dopaminergic supersensitivity in G protein-coupled receptor kinase 6-deficient mice. *Neuron* **38**: 291-303
- Gainetdinov RR, Bohn LM, Walker JK, Laporte SA, Macrae AD, Caron MG, Lefkowitz RJ, Premont RT (1999) Muscarinic supersensitivity and impaired receptor desensitization in G protein-coupled receptor kinase 5-deficient mice. *Neuron* **24**: 1029-1036

- Gainetdinov RR, Premont RT, Caron MG, Lefkowitz RJ (2000) Reply: receptor specificity of G-protein-coupled receptor kinases. *Trends in pharmacological sciences* **21**: 366-367
- Gartner V, Watzke H (2006) [Palliative treatment. Basic principles and symptom control]. *Wiener klinische Wochenschrift* **118**: 123-133; quiz 134
- Garzon J, Castro M, Sanchez-Blazquez P (1998) Influence of Gz and Gi2 transducer proteins in the affinity of opioid agonists to mu receptors. *The European journal of neuroscience* **10**: 2557-2564
- Garzon J, Martinez-Pena Y, Sanchez-Blazquez P (1997) Gx/z is regulated by mu but not delta opioid receptors in the stimulation of the low Km GTPase activity in mouse periaqueductal grey matter. *The European journal of neuroscience* **9**: 1194-1200
- Gaudriault G, Nouel D, Dal Farra C, Beaudet A, Vincent JP (1997) Receptor-induced internalization of selective peptidic mu and delta opioid ligands. *The Journal of biological chemistry* **272**: 2880-2888
- Gautam N, Downes GB, Yan K, Kisselev O (1998) The G-protein betagamma complex. *Cell Signal* **10**: 447-455
- Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2002) Opioid receptor genes inactivated in mice: the highlights. *Neuropeptides* **36**: 62-71
- Gharagozlou P, Hashemi E, DeLorey TM, Clark JD, Lamah J (2006) Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors. *BMC pharmacology* **6**: 3
- Ghozland S, Matthes HW, Simonin F, Filliol D, Kieffer BL, Maldonado R (2002) Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 1146-1154
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* **56**: 615-649
- Glick SD, Maisonneuve IM, Raucci J, Archer S (1995) Kappa opioid inhibition of morphine and cocaine self-administration in rats. *Brain research* **681**: 147-152
- Goldstein A, Naidu A (1989) Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures. *Molecular pharmacology* **36**: 265-272
- 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
- Gong YX, Zhang WP, Shou WT, Zhong K, Chen Z (2010) Morphine induces conditioned place preference behavior in histidine decarboxylase knockout mice. *Neuroscience letters* **468**: 115-119
- Gonzalez P, Cabello P, Germany A, Norris B, Contreras E (1997) Decrease of tolerance to, and physical dependence on morphine by, glutamate receptor antagonists. *European journal of pharmacology* **332**: 257-262
- Goodman OB, Jr., Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL (1996) Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor. *Nature* **383**: 447-450
- Grecksch G, Just S, Pierstorff C, Imhof AK, Gluck L, Doll C, Lupp A, Becker A, Koch T, Stumm R, Hollt V, Schulz S (2011) Analgesic tolerance to high-efficacy agonists but not to morphine is diminished in phosphorylation-deficient S375A mu-opioid receptor knock-in mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 13890-13896

- Groom CR, Hopkins AL (2002) Protein kinase drugs--optimism doesn't wait on facts. *Drug discovery today* **7**: 801-802
- Gruber CW, Muttenthaler M, Freissmuth M (2010) Ligand-based peptide design and combinatorial peptide libraries to target G protein-coupled receptors. *Current pharmaceutical design* **16**: 3071-3088
- Gurevich VV, Gurevich EV (2006) The structural basis of arrestin-mediated regulation of G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* **110**: 465-502
- Hall FS, Sora I, Uhl GR (2001) Ethanol consumption and reward are decreased in mu-opiate receptor knockout mice. *Psychopharmacology* **154**: 43-49
- Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE (1998) Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopeptides. *Peptides* **19**: 1603-1630
- Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990) Turning off the signal: desensitization of beta-adrenergic receptor function. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **4**: 2881-2889
- He L, Whistler JL (2005) An opiate cocktail that reduces morphine tolerance and dependence. *Current biology : CB* **15**: 1028-1033
- He M, Shippenberg TS (2000) Strain differences in basal and cocaine-evoked dopamine dynamics in mouse striatum. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **293**: 121-127
- Heinl C, Drdla-Schutting R, Xanthos DN, Sandkuhler J (2011) Distinct mechanisms underlying pronociceptive effects of opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **31**: 16748-16756
- Heitzler D, Durand G, Gallay N, Rizk A, Ahn S, Kim J, Violin JD, Dupuy L, Gauthier C, Piketty V, Crepieux P, Poupon A, Clement F, Fages F, Lefkowitz RJ, Reiter E (2012) Competing G protein-coupled receptor kinases balance G protein and beta-arrestin signaling. *Molecular systems biology* **8**: 590
- Hendry IA, Kelleher KL, Bartlett SE, Leck KJ, Reynolds AJ, Heydon K, Mellick A, Megirian D, Matthaei KI (2000) Hypertolerance to morphine in G(z alpha)-deficient mice. *Brain research* **870**: 10-19
- Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *Trends in biochemical sciences* **17**: 383-387
- Hernandez A, Segura-Chama P, Albinana E, Hernandez-Cruz A, Hernandez-Guijo JM (2010) Down-modulation of Ca²⁺ channels by endogenously released ATP and opioids: from the isolated chromaffin cell to the slice of adrenal medullae. *Cellular and molecular neurobiology* **30**: 1209-1216
- Hernandez F, Bijlsma L, Sancho JV, Diaz R, Ibanez M (2011) Rapid wide-scope screening of drugs of abuse, prescription drugs with potential for abuse and their metabolites in influent and effluent urban wastewater by ultrahigh pressure liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight-mass spectrometry. *Analytica chimica acta* **684**: 87-97
- Hernandez SH, Nelson LS (2010) Prescription drug abuse: insight into the epidemic. *Clinical pharmacology and therapeutics* **88**: 307-317
- Herry C, Trifilieff P, Micheau J, Luthi A, Mons N (2006) Extinction of auditory fear conditioning requires MAPK/ERK activation in the basolateral amygdala. *The European journal of neuroscience* **24**: 261-269
- Herz A (1998) Opioid reward mechanisms: a key role in drug abuse? *Canadian journal of physiology and pharmacology* **76**: 252-258

- Holloway AC, Qian H, Pipolo L, Ziogas J, Miura S, Karnik S, Southwell BR, Lew MJ, Thomas WG (2002) Side-chain substitutions within angiotensin II reveal different requirements for signaling, internalization, and phosphorylation of type 1A angiotensin receptors. *Molecular pharmacology* **61**: 768-777
- Hsu E, Packard MG (2008) Medial prefrontal cortex infusions of bupivacaine or AP-5 block extinction of amphetamine conditioned place preference. *Neurobiology of learning and memory* **89**: 504-512
- Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L (1975) Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life sciences* **16**: 1753-1758
- Hugues S, Deschaux O, Garcia R (2004) Postextinction infusion of a mitogen-activated protein kinase inhibitor into the medial prefrontal cortex impairs memory of the extinction of conditioned fear. *Learning & memory* **11**: 540-543
- Hull LC, Llorente J, Gabra BH, Smith FL, Kelly E, Bailey C, Henderson G, Dewey WL (2010) The effect of protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by mu-opioid agonists of different efficacy. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **332**: 1127-1135
- Hutcheson DM, Matthes HW, Valjent E, Sanchez-Blazquez P, Rodriguez-Diaz M, Garzon J, Kieffer BL, Maldonado R (2001) Lack of dependence and rewarding effects of deltorphin II in mu-opioid receptor-deficient mice. *The European journal of neuroscience* **13**: 153-161
- Impey S, Obrietan K, Wong ST, Poser S, Yano S, Wayman G, Deloulme JC, Chan G, Storm DR (1998) Cross talk between ERK and PKA is required for Ca²⁺ stimulation of CREB-dependent transcription and ERK nuclear translocation. *Neuron* **21**: 869-883
- Ingram SL, Williams JT (1994) Opioid inhibition of I_h via adenylyl cyclase. *Neuron* **13**: 179-186
- Inturrisi CE (2002) Clinical pharmacology of opioids for pain. *The Clinical journal of pain* **18**: S3-13
- Ito R, Robbins TW, Pennartz CM, Everitt BJ (2008) Functional interaction between the hippocampus and nucleus accumbens shell is necessary for the acquisition of appetitive spatial context conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **28**: 6950-6959
- Iyer VS, Canty JM, Jr. (2005) Regional desensitization of beta-adrenergic receptor signaling in swine with chronic hibernating myocardium. *Circulation research* **97**: 789-795
- Jaber M, Koch WJ, Rockman H, Smith B, Bond RA, Sulik KK, Ross J, Jr., Lefkowitz RJ, Caron MG, Giros B (1996) Essential role of beta-adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12974-12979
- Johnson PS, Wang JB, Wang WF, Uhl GR (1994) Expressed mu opiate receptor couples to adenylyl cyclase and phosphatidylinositol turnover. *Neuroreport* **5**: 507-509
- Just S, Illing S, Trester-Zedlitz M, Lau EK, Kotowski SJ, Miess E, Mann A, Doll C, Trinidad JC, Burlingame AL, von Zastrow M, Schulz S (2013) Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation. *Molecular pharmacology* **83**: 633-639
- Kahsai AW, Xiao K, Rajagopal S, Ahn S, Shukla AK, Sun J, Oas TG, Lefkowitz RJ (2011) Multiple ligand-specific conformations of the beta2-adrenergic receptor. *Nature chemical biology* **7**: 692-700
- Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M (1996) Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of biological chemistry* **271**: 19021-19024

- Kelly E (2006) G-protein-coupled receptor dephosphorylation at the cell surface. *Br J Pharmacol* **147**: 235-236
- Kelly E (2013) Efficacy and ligand bias at the mu-opioid receptor. *Br J Pharmacol*
- Kenakin T (2007) Functional selectivity through protean and biased agonism: who steers the ship? *Molecular pharmacology* **72**: 1393-1401
- Kest B, Hopkins E, Palmese CA, Chen ZP, Mogil JS, Pintar JE (2001) Morphine tolerance and dependence in nociceptin/orphanin FQ transgenic knock-out mice. *Neuroscience* **104**: 217-222
- Kest B, Palmese CA, Hopkins E, Adler M, Juni A, Mogil JS (2002) Naloxone-precipitated withdrawal jumping in 11 inbred mouse strains: evidence for common genetic mechanisms in acute and chronic morphine physical dependence. *Neuroscience* **115**: 463-469
- Kieffer BL (1999) Opioids: first lessons from knockout mice. *Trends in pharmacological sciences* **20**: 19-26
- Kieffer BL, Gaveriaux-Ruff C (2002) Exploring the opioid system by gene knockout. *Progress in neurobiology* **66**: 285-306
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, Group NCRGW (2010) Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* **160**: 1577-1579
- Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ (2005) Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1442-1447
- Kim JA, Siegel S, Patenall VR (1999) Drug-onset cues as signals: intraadministration associations and tolerance. *Journal of experimental psychology Animal behavior processes* **25**: 491-504
- Kim KM, Valenzano KJ, Robinson SR, Yao WD, Barak LS, Caron MG (2001) Differential regulation of the dopamine D2 and D3 receptors by G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestins. *The Journal of biological chemistry* **276**: 37409-37414
- Koch T, Holtt V (2008) Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther* **117**: 199-206
- Koch T, Krosiak T, Averbek M, Mayer P, Schroder H, Raulf E, Holtt V (2000) Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling. *Molecular pharmacology* **58**: 328-334
- Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E, Holtt V (1998) Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry* **273**: 13652-13657
- Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Holtt V (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular pharmacology* **67**: 280-287
- Kohout TA, Lefkowitz RJ (2003) Regulation of G protein-coupled receptor kinases and arrestins during receptor desensitization. *Molecular pharmacology* **63**: 9-18
- Kolesnikov YA, Ferkany J, Pasternak GW (1993) Blockade of mu and kappa 1 opioid analgesic tolerance by NPC17742, a novel NMDA antagonist. *Life sciences* **53**: 1489-1494
- Koob GF (1992) Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways. *Trends in pharmacological sciences* **13**: 177-184

- Koob GF (2006) The neurobiology of addiction: a neuroadaptational view relevant for diagnosis. *Addiction* **101 Suppl 1**: 23-30
- Koob GF, Maldonado R, Stinus L (1992) Neural substrates of opiate withdrawal. *Trends in neurosciences* **15**: 186-191
- Koob GF, Sanna PP, Bloom FE (1998) Neuroscience of addiction. *Neuron* **21**: 467-476
- Koob GF, Volkow ND (2010) Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **35**: 217-238
- Koster A, Montkowski A, Schulz S, Stube EM, Knautt K, Jenck F, Moreau JL, Nothacker HP, Civelli O, Reinscheid RK (1999) Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 10444-10449
- Kovoor A, Celver JP, Wu A, Chavkin C (1998) Agonist induced homologous desensitization of mu-opioid receptors mediated by G protein-coupled receptor kinases is dependent on agonist efficacy. *Molecular pharmacology* **54**: 704-711
- Kovoor A, Nappey V, Kieffer BL, Chavkin C (1997) Mu and delta opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of beta-adrenergic receptor kinase 2 and beta-arrestin 2 in xenopus oocytes. *The Journal of biological chemistry* **272**: 27605-27611
- Kramer HK, Simon EJ (2000) mu and delta-opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization. *Neuropharmacology* **39**: 1707-1719
- Krasel C, Dammeier S, Winstel R, Brockmann J, Mischak H, Lohse MJ (2001) Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *The Journal of biological chemistry* **276**: 1911-1915
- Krueger KM, Daaka Y, Pitcher JA, Lefkowitz RJ (1997) The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *The Journal of biological chemistry* **272**: 5-8
- Krupnick JG, Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annual review of pharmacology and toxicology* **38**: 289-319
- Kunapuli P, Onorato JJ, Hosey MM, Benovic JL (1994) Expression, purification, and characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK5. *The Journal of biological chemistry* **269**: 1099-1105
- Kuzmin AV, Semenova S, Gerrits MA, Zvartau EE, Van Ree JM (1997) Kappa-opioid receptor agonist U50,488H modulates cocaine and morphine self-administration in drug-naive rats and mice. *European journal of pharmacology* **321**: 265-271
- Law PY, Wong YH, Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annual review of pharmacology and toxicology* **40**: 389-430
- Le Merrer J, Becker JA, Befort K, Kieffer BL (2009) Reward processing by the opioid system in the brain. *Physiological reviews* **89**: 1379-1412
- Le Merrer J, Faget L, Matifas A, Kieffer BL (2012) Cues predicting drug or food reward restore morphine-induced place conditioning in mice lacking delta opioid receptors. *Psychopharmacology* **223**: 99-106
- Le Merrer J, Plaza-Zabala A, Del Boca C, Matifas A, Maldonado R, Kieffer BL (2011) Deletion of the delta opioid receptor gene impairs place conditioning but preserves morphine reinforcement. *Biological psychiatry* **69**: 700-703

- Ledent C, Valverde O, Cossu G, Petitot F, Aubert JF, Beslot F, Bohme GA, Imperato A, Pedrazzini T, Roques BP, Vassart G, Fratta W, Parmentier M (1999) Unresponsiveness to cannabinoids and reduced addictive effects of opiates in CB1 receptor knockout mice. *Science* **283**: 401-404
- Li CH, Chung D (1976) Isolation and structure of an untriakontapeptide with opiate activity from camel pituitary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**: 1145-1148
- Li CH, Chung D, Doneen BA (1976) Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands. *Biochemical and biophysical research communications* **72**: 1542-1547
- Li LY, Chang KJ (1996) The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors. *Molecular pharmacology* **50**: 599-602
- Loh HH, Liu HC, Cavalli A, Yang W, Chen YF, Wei LN (1998) mu Opioid receptor knockout in mice: effects on ligand-induced analgesia and morphine lethality. *Brain research Molecular brain research* **54**: 321-326
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochimica et biophysica acta* **1179**: 171-188
- Lohse MJ, Andexinger S, Pitcher J, Trukawinski S, Codina J, Faure JP, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Receptor-specific desensitization with purified proteins. Kinase dependence and receptor specificity of beta-arrestin and arrestin in the beta 2-adrenergic receptor and rhodopsin systems. *The Journal of biological chemistry* **267**: 8558-8564
- Lohse MJ, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990a) Multiple pathways of rapid beta 2-adrenergic receptor desensitization. Delineation with specific inhibitors. *The Journal of biological chemistry* **265**: 3202-3211
- Lohse MJ, Benovic JL, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1990b) beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**: 1547-1550
- Longoni R, Cadoni C, Mulas A, Di Chiara G, Spina L (1998) Dopamine-dependent behavioural stimulation by non-peptide delta opioids BW373U86 and SNC 80: 2. Place-preference and brain microdialysis studies in rats. *Behavioural pharmacology* **9**: 9-14
- Lotsch J, Geisslinger G (2001) Morphine-6-glucuronide: an analgesic of the future? *Clinical pharmacokinetics* **40**: 485-499
- Lowe JD, Cerver JP, Gurevich VV, Chavkin C (2002) mu-Opioid receptors desensitize less rapidly than delta-opioid receptors due to less efficient activation of arrestin. *The Journal of biological chemistry* **277**: 15729-15735
- Lu KT, Walker DL, Davis M (2001) Mitogen-activated protein kinase cascade in the basolateral nucleus of amygdala is involved in extinction of fear-potentiated startle. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **21**: RC162
- Lupp A, Richter N, Doll C, Nagel F, Schulz S (2011) UMB-3, a novel rabbit monoclonal antibody, for assessing mu-opioid receptor expression in mouse, rat and human formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Regulatory peptides* **167**: 9-13
- Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2002) The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals. *Journal of cell science* **115**: 455-465
- Luttrell LM, Roudabush FL, Choy EW, Miller WE, Field ME, Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001) Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 2449-2454

- Lyubarsky AL, Chen C, Simon MI, Pugh EN, Jr. (2000) Mice lacking G-protein receptor kinase 1 have profoundly slowed recovery of cone-driven retinal responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 2209-2217
- Macey TA, Lowe JD, Chavkin C (2006) Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons. *The Journal of biological chemistry* **281**: 34515-34524
- Madia PA, Dighe SV, Sirohi S, Walker EA, Yoburn BC (2009) Dosing protocol and analgesic efficacy determine opioid tolerance in the mouse. *Psychopharmacology* **207**: 413-422
- Maldonado R, Blendy JA, Tzavara E, Gass P, Roques BP, Hanoune J, Schutz G (1996) Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science* **273**: 657-659
- Maldonado R, Saiardi A, Valverde O, Samad TA, Roques BP, Borrelli E (1997) Absence of opiate rewarding effects in mice lacking dopamine D2 receptors. *Nature* **388**: 586-589
- Mamiya T, Noda Y, Ren X, Nagai T, Takeshima H, Ukai M, Nabeshima T (2001) Morphine tolerance and dependence in the nociceptin receptor knockout mice. *Journal of neural transmission* **108**: 1349-1361
- Mansour A, Fox CA, Akil H, Watson SJ (1995) Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends in neurosciences* **18**: 22-29
- Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ (1994) Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study. *The Journal of comparative neurology* **350**: 412-438
- Mansour A, Lewis ME, Khachaturian H, Akil H, Watson SJ (1986) Pharmacological and anatomical evidence of selective mu, delta, and kappa opioid receptor binding in rat brain. *Brain research* **399**: 69-79
- Mao J, Price DD, Mayer DJ (1995) Mechanisms of hyperalgesia and morphine tolerance: a current view of their possible interactions. *Pain* **62**: 259-274
- Marker CL, Lujan R, Loh HH, Wickman K (2005) Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**: 3551-3559
- Martini L, Whistler JL (2007) The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr Opin Neurobiol* **17**: 556-564
- Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dolle P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL (1996) Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature* **383**: 819-823
- Matthes HW, Smadja C, Valverde O, Vonesch JL, Foutz AS, Boudinot E, Denavit-Saubie M, Severini C, Negri L, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Activity of the delta-opioid receptor is partially reduced, whereas activity of the kappa-receptor is maintained in mice lacking the mu-receptor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **18**: 7285-7295
- Mayer DJ, Mao J, Holt J, Price DD (1999) Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7731-7736
- McBride WJ, Murphy JM, Ikemoto S (1999) Localization of brain reinforcement mechanisms: intracranial self-administration and intracranial place-conditioning studies. *Behavioural brain research* **101**: 129-152

- McGrath JC, Drummond GB, McLachlan EM, Kilkenny C, Wainwright CL (2010) Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* **160**: 1573-1576
- McLaughlin JP, Marton-Popovici M, Chavkin C (2003) Kappa opioid receptor antagonism and prodynorphin gene disruption block stress-induced behavioral responses. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 5674-5683
- Melief EJ, Miyatake M, Bruchas MR, Chavkin C (2010) Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 11608-11613
- Menkens K, Bilsky EJ, Wild KD, Portoghese PS, Reid LD, Porreca F (1992) Cocaine place preference is blocked by the delta-opioid receptor antagonist, naltrindole. *European journal of pharmacology* **219**: 345-346
- Miller CA, Marshall JF (2005) Molecular substrates for retrieval and reconsolidation of cocaine-associated contextual memory. *Neuron* **47**: 873-884
- Mitchell JM, Basbaum AI, Fields HL (2000) A locus and mechanism of action for associative morphine tolerance. *Nature neuroscience* **3**: 47-53
- Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bader S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum AI (2003) Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 271-276
- Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL (1994) mu-Opioid receptor-mediated reduction of neuronal calcium current occurs via a G(o)-type GTP-binding protein. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**: 3842-3851
- Moolten MS, Fishman JB, Chen JC, Carlson KR (1993) Etonitazene: an opioid selective for the mu receptor types. *Life sciences* **52**: PL199-203
- Moore CA, Milano SK, Benovic JL (2007) Regulation of receptor trafficking by GRKs and arrestins. *Annual review of physiology* **69**: 451-482
- Morales L, Perez-Garcia C, Alguacil LF (2001) Effects of yohimbine on the antinociceptive and place conditioning effects of opioid agonists in rodents. *Br J Pharmacol* **133**: 172-178
- Moron JA, Gullapalli S, Taylor C, Gupta A, Gomes I, Devi LA (2010) Modulation of opiate-related signaling molecules in morphine-dependent conditioned behavior: conditioned place preference to morphine induces CREB phosphorylation. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **35**: 955-966
- Morris RG, Anderson E, Lynch GS, Baudry M (1986) Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist, AP5. *Nature* **319**: 774-776
- Murakami A, Yajima T, Sakuma H, McLaren MJ, Inana G (1993) X-arrestin: a new retinal arrestin mapping to the X chromosome. *FEBS letters* **334**: 203-209
- Murphy NP, Lam HA, Maidment NT (2001) A comparison of morphine-induced locomotor activity and mesolimbic dopamine release in C57BL/6, 129Sv and DBA2 mice. *J Neurochem* **79**: 626-635
- Narita M, Kishimoto Y, Ise Y, Yajima Y, Misawa K, Suzuki T (2005) Direct evidence for the involvement of the mesolimbic kappa-opioid system in the morphine-induced rewarding effect under an inflammatory pain-like state. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **30**: 111-118
- Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80**: 249-257

- Nestler EJ (1992) Molecular mechanisms of drug addiction. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **12**: 2439-2450
- Nestler EJ (1996) Under siege: The brain on opiates. *Neuron* **16**: 897-900
- Nestler EJ (2001a) Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. *Nature reviews Neuroscience* **2**: 119-128
- Nestler EJ (2001b) Neurobiology. Total recall-the memory of addiction. *Science* **292**: 2266-2267
- Nestler EJ (2002) Common molecular and cellular substrates of addiction and memory. *Neurobiology of learning and memory* **78**: 637-647
- Nestler EJ (2004) Molecular mechanisms of drug addiction. *Neuropharmacology* **47 Suppl 1**: 24-32
- Nguyen AT, Marquez P, Hamid A, Lutfy K (2012) The role of mu opioid receptors in psychomotor stimulation and conditioned place preference induced by morphine-6-glucuronide. *European journal of pharmacology* **682**: 86-91
- Nitsche JF, Schuller AG, King MA, Zeng M, Pasternak GW, Pintar JE (2002) Genetic dissociation of opiate tolerance and physical dependence in delta-opioid receptor-1 and preproenkephalin knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**: 10906-10913
- Nobles KN, Xiao K, Ahn S, Shukla AK, Lam CM, Rajagopal S, Strachan RT, Huang TY, Bressler EA, Hara MR, Shenoy SK, Gygi SP, Lefkowitz RJ (2011) Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin. *Science signaling* **4**: ra51
- North RA, Williams JT, Surprenant A, Christie MJ (1987) Mu and delta receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 5487-5491
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Barak LS, Caron MG (2001) Molecular determinants underlying the formation of stable intracellular G protein-coupled receptor-beta-arrestin complexes after receptor endocytosis*. *The Journal of biological chemistry* **276**: 19452-19460
- Oakley RH, Laporte SA, Holt JA, Caron MG, Barak LS (2000) Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**: 17201-17210
- Oldham WM, Hamm HE (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* **9**: 60-71
- Ovbiagele B, Schwamm LH, Smith EE, Hernandez AF, Olson DM, Pan W, Fonarow GC, Saver JL (2010) Patterns and predictors of discharge statin prescription among hospitalized patients with intracerebral hemorrhage. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **41**: 2271-2277
- Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J (2002) beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation. *The Journal of biological chemistry* **277**: 1292-1300
- Pan YX (2005) Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA and cell biology* **24**: 736-750
- Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ (1995) Agonist-dependent phosphorylation of the mouse delta-opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C. *Molecular pharmacology* **48**: 173-177

- Peng J, Sarkar S, Chang SL (2012) Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR. *Drug Alcohol Depend* **124**: 223-228
- Peppel K, Boekhoff I, McDonald P, Breer H, Caron MG, Lefkowitz RJ (1997) G protein-coupled receptor kinase 3 (GRK3) gene disruption leads to loss of odorant receptor desensitization. *The Journal of biological chemistry* **272**: 25425-25428
- Perroy J, Adam L, Qanbar R, Chenier S, Bouvier M (2003) Phosphorylation-independent desensitization of GABA(B) receptor by GRK4. *The EMBO journal* **22**: 3816-3824
- Perry SJ, Lefkowitz RJ (2002) Arresting developments in heptahelical receptor signaling and regulation. *Trends in cell biology* **12**: 130-138
- Peterson PK, Molitor TW, Chao CC (1993) Mechanisms of morphine-induced immunomodulation. *Biochemical pharmacology* **46**: 343-348
- Pierce KL, Lefkowitz RJ (2001) Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nature reviews Neuroscience* **2**: 727-733
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ (2002) Seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Molecular cell biology* **3**: 639-650
- Piros ET, Prather PL, Law PY, Evans CJ, Hales TG (1996) Voltage-dependent inhibition of Ca²⁺ channels in GH3 cells by cloned mu- and delta-opioid receptors. *Molecular pharmacology* **50**: 947-956
- Piros ET, Prather PL, Loh HH, Law PY, Evans CJ, Hales TG (1995) Ca²⁺ channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells. *Molecular pharmacology* **47**: 1041-1049
- Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ (1992) Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms. *Biochemistry* **31**: 3193-3197
- Pitcher JA, Fredericks ZL, Stone WC, Premont RT, Stoffel RH, Koch WJ, Lefkowitz RJ (1996) Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-enhanced G protein-coupled receptor kinase (GRK) activity. Location, structure, and regulation of the PIP₂ binding site distinguishes the GRK subfamilies. *The Journal of biological chemistry* **271**: 24907-24913
- Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ (1998) G protein-coupled receptor kinases. *Annu Rev Biochem* **67**: 653-692
- Pitcher JA, Tesmer JJ, Freeman JL, Capel WD, Stone WC, Lefkowitz RJ (1999) Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *The Journal of biological chemistry* **274**: 34531-34534
- Pitcher JA, Touhara K, Payne ES, Lefkowitz RJ (1995) Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *The Journal of biological chemistry* **270**: 11707-11710
- Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G (1995) Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 12304-12308
- Pradhan AA, Befort K, Nozaki C, Gaveriaux-Ruff C, Kieffer BL (2011) The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. *Trends in pharmacological sciences* **32**: 581-590

- Premont RT, Gainetdinov RR (2007) Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annual review of physiology* **69**: 511-534
- Pronin AN, Benovic JL (1997) Regulation of the G protein-coupled receptor kinase GRK5 by protein kinase C. *The Journal of biological chemistry* **272**: 3806-3812
- Pronin AN, Satpaev DK, Slepak VZ, Benovic JL (1997) Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. *The Journal of biological chemistry* **272**: 18273-18280
- Qiu C, Sora I, Ren K, Uhl G, Dubner R (2000) Enhanced delta-opioid receptor-mediated antinociception in mu-opioid receptor-deficient mice. *European journal of pharmacology* **387**: 163-169
- Raehal KM, Bohn LM (2011) The role of beta-arrestin2 in the severity of antinociceptive tolerance and physical dependence induced by different opioid pain therapeutics. *Neuropharmacology* **60**: 58-65
- Raehal KM, Schmid CL, Groer CE, Bohn LM (2011) Functional selectivity at the mu-opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacological reviews* **63**: 1001-1019
- Rajagopal K, Whalen EJ, Violin JD, Stiber JA, Rosenberg PB, Premont RT, Coffman TM, Rockman HA, Lefkowitz RJ (2006) Beta-arrestin2-mediated inotropic effects of the angiotensin II type 1A receptor in isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 16284-16289
- Rajagopal S, Rajagopal K, Lefkowitz RJ (2010) Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nature reviews Drug discovery* **9**: 373-386
- Raynor K, Kong H, Hines J, Kong G, Benovic J, Yasuda K, Bell GI, Reisine T (1994) Molecular mechanisms of agonist-induced desensitization of the cloned mouse kappa opioid receptor. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **270**: 1381-1386
- Reisine T, Bell GI (1993) Molecular biology of opioid receptors. *Trends in neurosciences* **16**: 506-510
- Reiter E, Ahn S, Shukla AK, Lefkowitz RJ (2012) Molecular mechanism of beta-arrestin-biased agonism at seven-transmembrane receptors. *Annual review of pharmacology and toxicology* **52**: 179-197
- Reiter E, Lefkowitz RJ (2006) GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* **17**: 159-165
- Ren XR, Reiter E, Ahn S, Kim J, Chen W, Lefkowitz RJ (2005) Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1448-1453
- Rezvani A, Hwang F, Song ZH, Lin ET, Way EL (1990) Supersensitivity to electrical stimulation for assessing physical dependence on opioids in isolated tissues. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **254**: 52-57
- Robbins TW, Everitt BJ (2002) Limbic-striatal memory systems and drug addiction. *Neurobiology of learning and memory* **78**: 625-636
- Roberts AJ, Gold LH, Polis I, McDonald JS, Filliol D, Kieffer BL, Koob GF (2001) Increased ethanol self-administration in delta-opioid receptor knockout mice. *Alcoholism, clinical and experimental research* **25**: 1249-1256
- Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, Jones SR, Ator R, Giros B, Miller GW, Caron MG (1998) Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nature neuroscience* **1**: 132-137

- Rockman HA, Choi DJ, Akhter SA, Jaber M, Giros B, Lefkowitz RJ, Caron MG, Koch WJ (1998) Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. *The Journal of biological chemistry* **273**: 18180-18184
- Rosenblum A, Marsch LA, Joseph H, Portenoy RK (2008) Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions. *Experimental and clinical psychopharmacology* **16**: 405-416
- Roth NS, Campbell PT, Caron MG, Lefkowitz RJ, Lohse MJ (1991) Comparative rates of desensitization of beta-adrenergic receptors by the beta-adrenergic receptor kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6201-6204
- Rowbotham DJ (2001) Endogenous opioids, placebo response, and pain. *Lancet* **357**: 1901-1902
- Sala M, Braida D, Calcaterra P, Leone MP, Gori E (1992) Dose-dependent conditioned place preference produced by etonitazene and morphine. *European journal of pharmacology* **217**: 37-41
- Sallese M, Mariggio S, Collodel G, Moretti E, Piomboni P, Baccetti B, De Blasi A (1997) G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *The Journal of biological chemistry* **272**: 10188-10195
- Sallese M, Salvatore L, D'Urbano E, Sala G, Storto M, Launey T, Nicoletti F, Knopfel T, De Blasi A (2000) The G-protein-coupled receptor kinase GRK4 mediates homologous desensitization of metabotropic glutamate receptor 1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **14**: 2569-2580
- Sanchis-Segura C, Spanagel R (2006) Behavioural assessment of drug reinforcement and addictive features in rodents: an overview. *Addiction biology* **11**: 2-38
- Schafe GE, Atkins CM, Swank MW, Bauer EP, Sweatt JD, LeDoux JE (2000) Activation of ERK/MAP kinase in the amygdala is required for memory consolidation of pavlovian fear conditioning. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 8177-8187
- Scherrer G, Befort K, Contet C, Becker J, Matifas A, Kieffer BL (2004) The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice. *The European journal of neuroscience* **19**: 2239-2248
- Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Handel M, Holtt V (2000) Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells. *J Neurochem* **74**: 414-422
- Schuller AG, King MA, Zhang J, Bolan E, Pan YX, Morgan DJ, Chang A, Czick ME, Unterwald EM, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of heroin and morphine-6 beta-glucuronide analgesia in a new line of mice lacking exon 1 of MOR-1. *Nature neuroscience* **2**: 151-156
- Schulz R, Eisinger DA, Wehmeyer A (2004a) Opioid control of MAP kinase cascade. *European journal of pharmacology* **500**: 487-497
- Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Holtt V (2004b) Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *The EMBO journal* **23**: 3282-3289
- Schulz S, Schreff M, Koch T, Zimprich A, Gramsch C, Elde R, Holtt V (1998) Immunolocalization of two mu-opioid receptor isoforms (MOR1 and MOR1B) in the rat central nervous system. *Neuroscience* **82**: 613-622

- Segredo V, Burford NT, Lamah J, Sadee W (1997) A constitutively internalizing and recycling mutant of the mu-opioid receptor. *J Neurochem* **68**: 2395-2404
- Sharifzadeh M, Haghghat A, Tahsili-Fahadan P, Khalaj S, Zarrindast MR, Zamanian AR (2006) Intra-hippocampal inhibition of protein kinase AII attenuates morphine-induced conditioned place preference. *Pharmacology, biochemistry, and behavior* **85**: 705-712
- Sharma SK, Klee WA, Nirenberg M (1977) Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3365-3369
- Shenoy SK, Drake MT, Nelson CD, Houtz DA, Xiao K, Madabushi S, Reiter E, Premont RT, Lichtarge O, Lefkowitz RJ (2006) beta-arrestin-dependent, G protein-independent ERK1/2 activation by the beta2 adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **281**: 1261-1273
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2003) Trafficking patterns of beta-arrestin and G protein-coupled receptors determined by the kinetics of beta-arrestin deubiquitination. *The Journal of biological chemistry* **278**: 14498-14506
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2005) Seven-transmembrane receptor signaling through beta-arrestin. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**: cm10
- Shenoy SK, Lefkowitz RJ (2011) beta-Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends in pharmacological sciences* **32**: 521-533
- Shinohara T, Dietzschold B, Craft CM, Wistow G, Early JJ, Donoso LA, Horwitz J, Tao R (1987) Primary and secondary structure of bovine retinal S antigen (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**: 6975-6979
- Shippenberg TS, Zapata A, Chefer VI (2007) Dynorphin and the pathophysiology of drug addiction. *Pharmacol Ther* **116**: 306-321
- Sibinga NE, Goldstein A (1988) Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Annual review of immunology* **6**: 219-249
- Siegel S, Baptista MA, Kim JA, McDonald RV, Weise-Kelly L (2000) Pavlovian psychopharmacology: the associative basis of tolerance. *Experimental and clinical psychopharmacology* **8**: 276-293
- Simonin F, Valverde O, Smadja C, Slowe S, Kitchen I, Dierich A, Le Meur M, Roques BP, Maldonado R, Kieffer BL (1998) Disruption of the kappa-opioid receptor gene in mice enhances sensitivity to chemical visceral pain, impairs pharmacological actions of the selective kappa-agonist U-50,488H and attenuates morphine withdrawal. *The EMBO journal* **17**: 886-897
- Smith FL, Javed RR, Smith PA, Dewey WL, Gabra BH (2006) PKC and PKA inhibitors reinstate morphine-induced behaviors in morphine tolerant mice. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society* **54**: 474-480
- Smith WC, Milam AH, Dugger D, Arendt A, Hargrave PA, Palczewski K (1994) A splice variant of arrestin. Molecular cloning and localization in bovine retina. *The Journal of biological chemistry* **269**: 15407-15410
- Sora I, Takahashi N, Funada M, Ujike H, Revay RS, Donovan DM, Miner LL, Uhl GR (1997) Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses and morphine-induced analgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 1544-1549
- Standifer KM, Pasternak GW (1997) G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal* **9**: 237-248

- Steketee JD, Sorg BA, Kalivas PW (1992) The role of the nucleus accumbens in sensitization to drugs of abuse. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* **16**: 237-246
- Stephens DN, Duka T, Crombag HS, Cunningham CL, Heilig M, Crabbe JC (2010) Reward sensitivity: issues of measurement, and achieving consilience between human and animal phenotypes. *Addiction biology* **15**: 145-168
- Sternini C, Spann M, Anton B, Keith DE, Jr., Bunnett NW, von Zastrow M, Evans C, Brecha NC (1996) Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 9241-9246
- Suzuki T, Tsuji M, Mori T, Ikeda H, Misawa M, Nagase H (1997) Involvement of dopamine-dependent and -independent mechanisms in the rewarding effects mediated by delta opioid receptor subtypes in mice. *Brain research* **744**: 327-334
- Suzuki T, Yoshiike M, Mizoguchi H, Kamei J, Misawa M, Nagase H (1994) Blockade of delta-opioid receptors prevents morphine-induced place preference in mice. *Japanese journal of pharmacology* **66**: 131-137
- Swaminath G, Xiang Y, Lee TW, Steenhuis J, Parnot C, Kobilka BK (2004) Sequential binding of agonists to the beta2 adrenoceptor. Kinetic evidence for intermediate conformational states. *The Journal of biological chemistry* **279**: 686-691
- Taussig R, Gilman AG (1995) Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases. *The Journal of biological chemistry* **270**: 1-4
- Terman GW, Jin W, Cheong YP, Lowe J, Caron MG, Lefkowitz RJ, Chavkin C (2004) G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal. *Br J Pharmacol* **141**: 55-64
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nature reviews Neuroscience* **5**: 173-183
- Torregrossa MM, Sanchez H, Taylor JR (2010) D-cycloserine reduces the context specificity of pavlovian extinction of cocaine cues through actions in the nucleus accumbens. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 10526-10533
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H (2008) Opioid pharmacology. *Pain physician* **11**: S133-153
- Trujillo KA, Akil H (1991) Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801. *Science* **251**: 85-87
- Tso PH, Wong YH (2003) Molecular basis of opioid dependence: role of signal regulation by G-proteins. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **30**: 307-316
- Tzschentke TM (1998) Measuring reward with the conditioned place preference paradigm: a comprehensive review of drug effects, recent progress and new issues. *Progress in neurobiology* **56**: 613-672
- Tzschentke TM (2007) Measuring reward with the conditioned place preference (CPP) paradigm: update of the last decade. *Addiction biology* **12**: 227-462
- Ueda H, Yamaguchi T, Tokuyama S, Inoue M, Nishi M, Takeshima H (1997) Partial loss of tolerance liability to morphine analgesia in mice lacking the nociceptin receptor gene. *Neuroscience letters* **237**: 136-138

- Urban JD, Clarke WP, von Zastrow M, Nichols DE, Kobilka B, Weinstein H, Javitch JA, Roth BL, Christopoulos A, Sexton PM, Miller KJ, Spedding M, Mailman RB (2007) Functional selectivity and classical concepts of quantitative pharmacology. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **320**: 1-13
- Valjent E, Corbille AG, Bertran-Gonzalez J, Herve D, Girault JA (2006) Inhibition of ERK pathway or protein synthesis during reexposure to drugs of abuse erases previously learned place preference. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 2932-2937
- Valjent E, Corvol JC, Pages C, Besson MJ, Maldonado R, Caboche J (2000) Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **20**: 8701-8709
- Valjent E, Pages C, Herve D, Girault JA, Caboche J (2004) Addictive and non-addictive drugs induce distinct and specific patterns of ERK activation in mouse brain. *The European journal of neuroscience* **19**: 1826-1836
- Vanderah TW, Ossipov MH, Lai J, Malan TP, Jr., Porreca F (2001) Mechanisms of opioid-induced pain and antinociceptive tolerance: descending facilitation and spinal dynorphin. *Pain* **92**: 5-9
- Vasudevan NT, Mohan ML, Goswami SK, Naga Prasad SV (2011) Regulation of beta-adrenergic receptor function: an emphasis on receptor resensitization. *Cell cycle* **10**: 3684-3691
- Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM (1998) Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology* **139**: 2784-2795
- Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL (2004) Opioid receptors. *Annu Rev Biochem* **73**: 953-990
- Wang WS, Kang S, Liu WT, Li M, Liu Y, Yu C, Chen J, Chi ZQ, He L, Liu JG (2012) Extinction of aversive memories associated with morphine withdrawal requires ERK-mediated epigenetic regulation of brain-derived neurotrophic factor transcription in the rat ventromedial prefrontal cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **32**: 13763-13775
- Watanabe H, Xu J, Bengra C, Jose PA, Felder RA (2002) Desensitization of human renal D1 dopamine receptors by G protein-coupled receptor kinase 4. *Kidney international* **62**: 790-798
- Way EL, Loh HH, Shen FH (1969) Simultaneous quantitative assessment of morphine tolerance and physical dependence. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **167**: 1-8
- Wee S, Koob GF (2010) The role of the dynorphin-kappa opioid system in the reinforcing effects of drugs of abuse. *Psychopharmacology* **210**: 121-135
- Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, Lefkowitz RJ (2003) Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10782-10787
- West AE, Chen WG, Dalva MB, Dolmetsch RE, Kornhauser JM, Shaywitz AJ, Takasu MA, Tao X, Greenberg ME (2001) Calcium regulation of neuronal gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11024-11031
- Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M (1999) Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**: 737-746
- Whistler JL, von Zastrow M (1998) Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9914-9919

- White FJ, Kalivas PW (1998) Neuroadaptations involved in amphetamine and cocaine addiction. *Drug Alcohol Depend* **51**: 141-153
- Widnell KL, Self DW, Lane SB, Russell DS, Vaidya VA, Miserendino MJ, Rubin CS, Duman RS, Nestler EJ (1996) Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **276**: 306-315
- Willems JM, Challiss RA, Nahorski SR (2003) Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture? *Trends in pharmacological sciences* **24**: 626-633
- Williams JT, Christie MJ, Manzoni O (2001) Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiological reviews* **81**: 299-343
- Winstel R, Freund S, Krasel C, Hoppe E, Lohse MJ (1996) Protein kinase cross-talk: membrane targeting of the beta-adrenergic receptor kinase by protein kinase C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 2105-2109
- Wise RA, Rompre PP (1989) Brain dopamine and reward. *Annual review of psychology* **40**: 191-225
- Yamaki K, Takahashi Y, Sakuragi S, Matsubara K (1987) Molecular cloning of the S-antigen cDNA from bovine retina. *Biochemical and biophysical research communications* **142**: 904-910
- Yin Y, Edelman GM, Vanderklish PW (2002) The brain-derived neurotrophic factor enhances synthesis of Arc in synaptoneuroosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 2368-2373
- Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB (1997) Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. *The Journal of biological chemistry* **272**: 28869-28874
- Zadina JE, Hackler L, Ge LJ, Kastin AJ (1997) A potent and selective endogenous agonist for the mu-opiate receptor. *Nature* **386**: 499-502
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY, Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7157-7162
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Menard L, Caron MG (1996) Dynamin and beta-arrestin reveal distinct mechanisms for G protein-coupled receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* **271**: 18302-18305
- Zhang Y, Pan YX, Kolesnikov Y, Pasternak GW (2006) Immunohistochemical labeling of the mu opioid receptor carboxy terminal splice variant mMOR-1B4 in the mouse central nervous system. *Brain research* **1099**: 33-43
- Zheng H, Chu J, Qiu Y, Loh HH, Law PY (2008) Agonist-selective signaling is determined by the receptor location within the membrane domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9421-9426
- Zhu Y, King MA, Schuller AG, Nitsche JF, Reidl M, Elde RP, Unterwald E, Pasternak GW, Pintar JE (1999) Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron* **24**: 243-252
- Zhuo M (2012) Targeting neuronal adenylyl cyclase for the treatment of chronic pain. *Drug discovery today* **17**: 573-582

10 Anhang

10.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1	Strukturformel Morphins	4
Abbildung 1-2	Strukturformel von Fentanyl	5
Abbildung 1-3	Strukturformel von Etonitazen	5
Abbildung 1-4	Strukturformel von Naloxon	6
Abbildung 1-5	Schema zur Erklärung des “ <i>biased agonism</i> ”	9
Abbildung 1-6	GRK-spezifische Signaltransduktion	12
Abbildung 1-7	Unterschiedliche Funktionen des β -Arrestins	15
Abbildung 1-8	Potentielle Phosphorylierungsstellen des Ratten- μ -Opioid-Rezeptors	18
Abbildung 5-1	Schematische Darstellung der potentiellen Phosphorylierungsstellen des Maus- μ -Opioid-Rezeptors	40
Abbildung 5-2	A: Agonist-selektive Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors <i>in vivo</i> – Agonist-spezifische Phosphorylierungsmuster B: Hierarchische Phosphorylierung des μ -Opioid-Rezeptors	41
Abbildung 5-3	Phosphorylierung des Serin ³⁷⁵ nach Opioid-Applikation bei GRK3- und GRK5-defizienten Mäusen	42
Abbildung 5-4	A: Basale Schmerzschwelle der GRK5 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu Wildtypen B: Basale Schmerzschwelle der GRK3 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu Wildtypen	44

Abbildung 5-5	A: Verminderte akute antinozizeptive Reaktionen der GRK5 ^{-/-} -Mäuse im Vergleich zu Wildtypen nach kumulativer Applikation von Morphin B: Akute analgetische Wirkung kumulativer Dosen Morphins bei GRK3 ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen.	45
Abbildung 5-6	Dosis-Wirkungs-Beziehung bezüglich der analgetischen Eigenschaften steigender Dosen Fentanyls bei GRK5 ^{-/-} -Mäusen (A) sowie GRK3 ^{-/-} -Mäusen (B) jeweils im Vergleich zu Wildtypen	46
Abbildung 5-7	Akute analgetische Toleranzentwicklung nach Morphin-Applikation bei GRK5 ^{-/-} -Mäusen (A) sowie GRK3 ^{-/-} -Mäusen (B) jeweils im Vergleich zu Wildtypen	48
Abbildung 5-8	A: Akute analgetische Toleranzentwicklung nach Fentanyl-Applikation bei GRK5 ^{-/-} -Mäusen B: Fehlen der akuten analgetischen Toleranzentwicklung nach Fentanyl-Applikation bei GRK3 ^{-/-} -Mäusen	49
Abbildung 5-9	Analgetische Toleranzentwicklung bei GRK5 ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen A: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Morphin-Applikation B: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Etonitazen-Applikation	51
Abbildung 5-10	Analgetische Toleranzentwicklung bei GRK3 ^{-/-} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen A: Antinozizeptive Reaktionen nach chronischer Morphin-Applikation B: Verminderte analgetische Toleranzentwicklung GRK3-defizienter Mäuse während chronischer Etonitazen-Applikation	53

Abbildung 5-11	Naloxon-induzierte Entzugssymptome nach chronischer Applikation von Opioiden A: Reduzierte Entzugssymptomatik bei GRK5 ^{-/-} -Mäusen nach zehntägiger Morphin-Applikation B: Entzugsverhalten von GRK3 ^{-/-} -Mäusen nach zehntägiger Etonitazen-Applikation	55
Abbildung 5-12	Morphin-induzierte (A) und Fentanyl-vermittelte (B) Aversion im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen	58
Abbildung 5-13	Kokain-induzierte Effekte im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK5-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtypen	59
Abbildung 5-14	Morphin-induzierte (A) und Fentanyl-vermittelte (B) Präferenz und deren schnellere Extinktion im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei GRK3-defizienten Mäusen	60
Abbildung 5-15	Morphin-induzierte Effekte im Modell der konditionierten Platz-Präferenz bei MOR ^{S375A/S375A} -Mäusen im Vergleich zu Wildtypen	61
Abbildung 5-16	A: Inhibierung der Morphin-CPP durch Applikation von SL327 B: Analgetische Wirkung Morphins nach Injektion von SL327	63

10.2 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
AP-2	Adapter-Protein-2
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CPP	<i>conditioned place preference</i> ; konditionierte Platz-Präferenz
c-Src-Kinase	<i>cellular sarcoma</i> -Kinase, Tyrosinkinase
C-Terminus	Carboxyl-Terminus
DAG	Diacylglycerin
DAMGO	[D-Ala ₂ , N-MePhe ₄ , Gly-ol]-enkephalin
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> : Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i> ; extrazellulär regulierte Kinase
FKS	fetales Kälberserum
GABA	<i>gamma-Aminobutyric acid</i> ; γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GIRK	<i>G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channel</i> ;; G-Protein-gekoppelter einwärtsgerichteter Kalium-Kanal
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i> ; G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanosin-5'-triphosphat-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinase(n)
GRK3 ^{-/-} -Mäuse	GRK3-defiziente Mäuse
GRK5 ^{-/-} -Mäuse	GRK5-defiziente Mäuse
GRP	G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Phosphatase
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HCl	Salzsäure
HEK293	humane embryonale Nieren-293-Zellen
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRP	<i>horse radish peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase

IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	Kilodalton
LC	Locus Coeruleus
LTD	<i>long-term depression</i> ; Langzeit-Depression
LTP	<i>long-term potentiation</i> ; Langzeit-Potenzierung
MAP-Kinase	<i>Mitogen-activated protein kinase</i> ; Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MEK1/2	MAP/ERK-Kinase1/2
min	Minute(n)
MOR	μ -Opioid-Rezeptor
MPE	<i>maximum possible effect</i> ; maximaler möglicher Effekt
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	Natrium-Chlorid (0,9%)
N-Terminus	Amino-Terminus
p38	p38-mitogenaktivierte Proteinkinase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PDE4D	Phosphodiesterase 4D
PH-Domäne	<i>pleckstrin homology</i> -Domäne
PI3-Kinase	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RGS	<i>Regulators of G protein signalling</i> , Regulatoren der G-Protein Signaltransduktion
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
sec	Sekunde(n)
MOR ^{S375A/S375A} -	<i>knock-in</i> Mäuse, die eine phosphorylierungsdefiziente S375A-Mutante des μ -Opioid-Rezeptors exprimieren
Mäuse	
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
siRNA	<i>small Interfering ribonucleic acid</i> , kleine interferierende Ribonukleinsäure

TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Tris	Tris-hydroxymethylendiamin
UGT2B7	UDP-Glucuronosyltransferase-2B7
ZNS	Zentrales Nervensystem

10.3 Antikörper

Tabelle 10-1. Primärantikörper

Antikörper	Spezies/Generierung	Konzentration	Hersteller/Quelle
anti-pT370 (GPM370-1)	Meerschweinchen, polyklonal	0,1 µg/ml	Gramsch, Schwabhausen
anti-pS375 (GP2)	Meerschweinchen, polyklonal	0,1 µg/ml	Gramsch, Schwabhausen
anti-pT379 (GPM379-2)	Meerschweinchen, polyklonal	0,1 µg/ml	Gramsch, Schwabhausen
anti-MOR (GP6)	Meerschweinchen, polyklonal	0,1 µg/ml	Gramsch, Schwabhausen

Tabelle 10-2. Sekundärantikörper

Antikörper	Spezies	Konzentration	Hersteller/Quelle
anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt	Ziege	0,08 µg/ml	Amersham, Freiburg

11 Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei Prof. S. Schulz für die Möglichkeit bedanken, dieses interessante Thema bearbeiten zu können, sowie für seine fachliche Unterstützung und seinen immer wieder motivierenden Optimismus.

Mein herzlicher Dank gilt auch Prof. H. Ammer, der sich spontan dazu bereit erklärt hat, meine Betreuung zu übernehmen. Vielen Dank für den freundlichen Kontakt und die Unterstützung bei der Erstellung und Einreichung dieser Arbeit.

Frau Prof. A. Lupp danke ich für ihre Hilfe bei der Korrektur meiner schriftlichen Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei Heidrun Guder und Heike Stadler für die gute Einarbeitung und ihre hervorragende Unterstützung im Labor bedanken.

Ein riesiges Dankeschön gilt auch meiner Kollegin und Freundin Anastasia Loktev für ihre große Hilfsbereitschaft und grandiose Unterstützung bei Versuchen, die regelmäßig nächtliche und Wochenend-Aufenthalte im Tierhaus erforderten.

Meinen Kolleginnen und Kollegen danke ich für die schöne Zeit in Jena sowie die nette und abwechslungsreiche Zusammenarbeit.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt zudem meiner Mutter und meinem Vater sowie meinen beiden Brüdern Moritz und Josa, die trotz ihrer Fachfremde ein gewaltiges Interesse für meine Arbeit aufbringen konnten. Danke euch Lieben, dass ihr mich so großartig unterstützt und immer wieder motiviert habt!