

Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Analyse der morphininduzierten Genexpression in Zellmodellen primär-sensorischer Neurone

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Kathrin Rothe
aus München
2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Bernd Sutor

Prof. Dr. Walter Zieglgänsberger

Prof. Dr. Klaus Jahn

Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer.nat. Andreas Breit

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2015

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	1
2	Summary	2
3	Einleitung.....	3
3.1	Nozizeption und Schmerzwahrnehmung	3
3.2	Endogenes Opioidsystem: Opioide und ihre Rezeptoren	4
3.3	Opioide in der Medizin	8
3.3.1	Einsatzbereiche und Therapieansätze	9
3.3.2	Medizinisch relevante Opioide	11
3.3.3	Limitationen und Nebenwirkungen	12
3.4	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	14
3.4.1	Durch GPCR induzierte Signaltransduktionskaskaden	15
3.4.2	Genregulation durch GPCR	19
3.5	Opioidrezeptoren.....	23
3.5.1	Signalkaskaden nach Aktivierung von $G\alpha_{i/o}$ gekoppelten GPCR durch Opioide.....	25
3.6	Toleranzentwicklung.....	27
3.6.1	Veränderungen an Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden	28
3.6.2	Veränderungen auf Genregulationsebene	32
3.7	Ziele der Arbeit	36
4	Material und Methoden.....	38
4.1	Material	38
4.1.1	Geräte	38
4.1.2	Verbrauchsmaterialien	40
4.1.3	Chemikalien	41
4.1.4	Liganden und Antikörper	43
4.1.5	Radioaktive Moleküle	44
4.1.6	Plasmide.....	45
4.1.7	Zellen und Nährmedien.....	46
4.2	Methoden.....	47
4.2.1	Zellkultur.....	47

4.2.2	Zellbiologische Methoden	50
4.2.3	Molekularbiologische Methoden	64
4.2.4	Auswertung und Statistik	75
5	Ergebnisse	76
5.1	Nachweis endogener Opioidrezeptoren in F11 Zellen	76
5.1.1	Sättigungs-Bindungskurve von [³ H]-Naloxon	76
5.1.2	Agonisteninduzierter Abbau der Opioidbindestellen	77
5.1.3	Kalziumfreisetzung nach Opioidrezeptorstimulation	78
5.1.4	Inhibition der AC durch Opioide	79
5.1.5	Einflüsse von Opioiden auf CREB-abhängige Genexpression	80
5.2	Genregulation durch Opioide in F11 Zellen	82
5.2.1	Opioidinduzierte CREB-abhängige Genexpression	82
5.2.2	Opioidinduzierte SRF/TCF-abhängige Genexpression	84
5.2.3	ERK-1/2 und Elk-1 Abhängigkeit der opioidinduzierten TCF/SRF-Aktivierung	91
5.3	Opioidabhängige Signalwege in NG108-15 Zellen	95
5.3.1	Nachweis einer funktionellen G _{αi/o} -Kopplung der endogenen Opioidrezeptoren	95
5.3.2	Aktivierung TCF/SRF-abhängiger Genexpression durch Opioide	96
5.4	ETS/SRE-abhängige Genregulation durch Morphin	98
5.4.1	mRNA-Induktion durch Morphin in F11 Zellen	98
5.4.2	Die morphininduzierte IEG-mRNA-Induktion erfolgt ERK-1/2-abhängig	102
5.4.3	Aktivierung eines Egr4-abhängigen Reporters durch Morphin in F11 Zellen	104
5.5	Morphinabhängige Signalwege in kultivierten primären DRG-Neuronen	105
5.5.1	ERK-1/2-Aktivierung durch Morphin	105
5.5.2	Induktion von mRNA-Expression durch Morphin	106
5.5.3	Morphinvermittelte Induktion der mRNA Expression erfolgt ERK-1/2-abhängig	109
6	Diskussion	110
6.1	Mögliche Mechanismen der ERK-1/2-Aktivierung durch Morphin in F11 Zellen	113
6.2	Zellsystemspezifische Regulation von CREB und TCF/SRF	114

6.3	Mögliche physiologische Bedeutung der ERK-1/2, Elk-1-regulierten Gene in DRG-Neuronen.....	118
6.3.1	Limitationen der verwendeten Modellsysteme.....	119
6.3.2	Morphinabhängige SRE-vermittelte Genregulation in weiteren ZNS-Regionen	120
6.3.3	Transkriptionsfaktorexpression und neuronale Plastizität - die Rolle von CREM, SRF, FosB und Egr4.....	121
6.4	Zusammenfassung und Ausblick	125
7	Anhang	127
7.1	Literaturverzeichnis.....	127
7.2	Abkürzungsverzeichnis	145
7.3	pAD-CRE-Fluc Plasmid	149
7.4	Tabellen - und Abbildungsverzeichnis	150
7.6	Danksagung.....	152
7.7	Eidesstattliche Versicherung.....	153

1 Zusammenfassung

Morphin spielt bei der Therapie starker und chronischer Schmerzen eine entscheidende Rolle, jedoch wird sein Einsatz durch Abhängigkeit und Toleranzentwicklung limitiert. Für die Entwicklung der Morphintoleranz ist Genregulation von großer Bedeutung. Morphininduzierte Genregulation ist bisher überwiegend in kortikalen Strukturen, aber weniger in primär-sensorischen Spinalganglien-Neuronen (DRG-Neuronen) untersucht. Der Einfluss von Morphin auf die Genregulation wird überwiegend dem Transkriptionsfaktor *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) zugeschrieben. Für andere endogene Opioidrezeptoragonisten ist zudem eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *E-twenty-six-like transkription factor-1* (Elk-1) und *serum response factor* (SRF) durch *extracellular-regulated kinases* (ERK-1/2) gezeigt. Allerdings wurde bisher eine morphinvermittelte Aktivierung von Elk-1/SRF nicht beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Mechanismen der morphininduzierten Transkriptionsregulation in DRG-Neuronen mit besonderer Berücksichtigung von Elk-1/SRF analysiert werden. Morphin konnte in der aus DRG-Neuronen generierten F11 Zelllinie, welche endogen Opioidrezeptoren exprimiert, Elk-1 phosphorylieren und ein Elk-1/SRF abhängiges Reportergen aktivieren, zeigte aber einen inhibitorischen Effekt auf CREB. Interessanterweise konnte Morphin in einem kortikalen Modellsystem (NG108-15 Zellen) CREB, aber nicht Elk-1 aktivieren. Damit konnten zelltypspezifische Genregulationsmechanismen durch Morphin aufgedeckt werden. Um Zielgene der morphinvermittelten Elk-1-Aktivierung zu identifizieren, wurde die mRNA-Expression von 15 Elk-1/SRF-regulierten Genen in F11 Zellen und kultivierten primären DRG-Neuronen der Ratte untersucht. In beiden Zelllinien wurde die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Egr4 und FosB durch Morphin induziert. In F11 Zellen wurde zusätzlich der morphinvermittelte Anstieg des Egr4 Proteins mittels Reportergenstudie bestätigt.

Die morphininduzierte, ERK-1/2-vermittelte Elk-1-Aktivierung stellt einen bisher unbekanntem Signalweg dar, über den Morphin in DRG-Neuronen auf Genregulation Einfluss nehmen kann. Diese neue Signalkaskade und die daraus resultierende Geninduktion könnten eine Rolle für die Morphintoleranz spielen und somit einen neuen Angriffspunkt zur Verbesserung der opioidbasierten Schmerztherapie liefern.

2 Summary

Morphine-based treatment of severe and chronic pain is limited by the development of tolerance and dependence. Altered gene expression plays a crucial role in the development of morphine tolerance. Mechanisms for morphine-induced changes in gene expression have so far mainly been analyzed in various brain regions, while little is known about dorsal root ganglia (DRG) in this context. Regulation of gene expression by morphine is attributed to the activation of cAMP-responsive element binding protein (CREB). Other opioid receptor ligands were shown to activate the transcription factors E-twenty-six-like transcription factor-1 (Elk-1) and serum response factor (SRF) via extracellular-regulated kinases (ERK-1/2). A morphine-induced activation of Elk-1/SRF has not yet been demonstrated.

This study aims to analyze regulation of gene expression by morphine in DRG-neurons to identify underlying mechanisms focusing specifically on Elk-1/SRF. In DRG-derived F11 cells which endogenously express opioid receptors, morphine stimulation led to Elk-1-phosphorylation and the activation of an Elk-1/SRF dependent reporter gene construct. However morphine had an inhibitory effect on CREB-dependent gene expression. Interestingly, morphine could not activate Elk-1 in an established cortical cell line which endogenously expresses opioid receptors (NG108-15 cells). The regulation of gene expression by morphine seems to be cell type specific. In order to identify putative target genes of morphine-induced activation of Elk-1/SRF, mRNA levels of 15 neuronal Elk-1/SRF regulated genes were analyzed in F11 cells and in cultured primary rat DRG-neurons. In both cell lines morphine induced mRNA-expression of the transcription factors Egr4 and FosB. Furthermore, in F11 cells elevated protein levels of Egr4 were confirmed by reporter gene studies.

Morphine-induced ERK-1/2-mediated activation of Elk-1 represents a newly discovered pathway for morphine-dependent gene regulation in DRG-neurons. This new signaling pathway with subsequent induction of gene expression is potentially relevant for development of morphine tolerance. This opens new perspectives for improvement of opioid-based treatment of pain.

3 Einleitung

3.1 Nozizeption und Schmerzwahrnehmung

Schmerz ist definiert als ein „unangenehmes Sinnes -und Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potentieller Gewebsschädigung verknüpft ist oder mit Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird.“ (*International Association for the Study of Pain*, 1979). Damit ist Schmerz ein Warnsymptom, infolge dessen die Aufmerksamkeit auf die bedrohte Stelle gelenkt wird, wodurch Schutzmaßnahmen ergriffen werden können. Neben der räumlichen Wahrnehmung des Schmerzes gehört zur Wahrnehmung eine negative emotionale Komponente, eine vegetative und eine reflexartige motorische Antwort (Apkarian, 2008).

Nozizeption, also Aufnahme und Weiterleitung potentiell schmerzhafter Reize, erfolgt über spezialisierte, afferente Nervenfasern, sog. Nozizeptoren. Als Afferenzen bezeichnet man Nervenfasern, die Information aus der Peripherie in das zentrale Nervensystem (ZNS) leiten. Die bewusste Schmerzwahrnehmung, sog. Schmerzperzeption, entsteht nach der Nozizeption durch die kortikale Interpretation von nozizeptiven Reizen (Tracey und Mantyh, 2007). Morphologisch handelt es sich bei Nozizeptoren um freie Nervenendigungen, die durch mechanische, chemische und/oder thermische Reize erregt werden. Direkt am Nozizeptor kann die nozizeptive Information moduliert werden. So kann es durch Entzündungsmediatoren zu Sensibilisierungsvorgängen kommen, woraus ein persistierender oder übersteigter sensorischer Input von Nozizeptoren resultiert (Detjeen et al., 2009). Bei einem inflammatorischen Zelluntergang werden Bradykinin, Prostaglandine, Serotonin, Purine, Neurotrophine und Protonen freigesetzt. Diese Botenstoffe können periphere Nozizeptoren sensibilisieren und führen außerdem dazu, dass aus den Nozizeptoren selbst Neurotransmitter wie Substanz P und *calcitonin-gene-related peptide* (CGRP) freigesetzt werden, welche die Entzündung weiter unterhalten (Julius und Basbaum, 2001).

Nozizeptive Information wird über zwei Fasertypen zum Rückenmark geleitet: schnelle A δ -Fasern, welchen den spitzen, gut lokalisierbaren Oberflächenschmerz leiten und langsame C-Fasern die den dumpfen Schmerz vermitteln. Das Perikaryon der

nozizeptiven Afferenzen liegt im Spinalganglion, englisch *dorsal root ganglion* (DRG). Die Umschaltung der sensiblen Afferenz findet in der *Substantia gelatinosa* im Hinterhorn des Rückenmarks mittels der Transmitter Substanz P, CGRP und Glutamat statt. Die Weiterleitung erfolgt zunächst über den *Tractus spinothalamicus*, der vom Hinterhorn des Rückenmarks über die *Medulla oblongata* zum Thalamus zieht. Von dort aus wird die Information in den Kortex weitergeleitet. Daneben existiert über den *Tractus spinoreticularis* eine Verbindung zwischen Rückenmark, *Formatio reticularis* und Thalamus. Diese erreicht dann den *Gyrus cinguli* und das limbische System. Dadurch werden einerseits im Hirnstamm eine Weckreaktion, motorische Abwehrbewegungen und vegetative Reaktionen auf den Schmerz initiiert und andererseits im limbischen System emotionale und affektive Folgen des Schmerzes ausgelöst (Freye, 2010, pp 9-12). Der *Tractus spinothalamicus* wird in dem *Tractus neospinothalamicus* und den entwicklungs geschichtlich älteren *Tractus paleospinothalamicus* unterteilt. Die Leitungsbahnen des *Tractus neospinothalamicus* sind markhaltig und ziehen über spezifische Thalamuskern direkt zum *Gyrus postcentralis* der Großhirnrinde. Sie leiten den akuten scharfen Schmerz und ermöglichen die Schmerzlokalisierung (Freye, 2010, pp 29-31). Die Information dieser Leitungsbahn kann nicht durch die absteigenden antinozizeptiven Neurone beeinflusst werden (Lüllmann et al., 2010, p 297). Für die medikamentöse Schmerztherapie hingegen sind die marklosen Fasern des *Tractus paleospinothalamicus* entscheidend, sie projizieren über unspezifische Thalamuskern in fast alle Bereiche der Großhirnrinde. Somit wird ein dumpfer Schmerzreiz erzeugt, durch den das eigentliche Gefühl von Schmerz und außerdem die affektive Schmerzkomponente entsteht (Freye, 2010, pp 29-31). Die über diese Bahn geleitete Information kann zudem durch enkephalinerger Interneuronen des antinozizeptiven Systems beeinflusst werden (Lüllmann et al., 2010, p 297).

3.2 Endogenes Opioidsystem: Opioide und ihre Rezeptoren

Der Organismus besitzt durch das endogene Opioidsystem eine effektive Reaktionsmöglichkeit auf nozizeptive Reize.

Schon auf Rückenmarksebene ist eine hemmende Beeinflussung der Nozizeption möglich. Diese erfolgt über deszendierende antinozizeptive Bahnen aus Kernen in Hypothalamus und dem zentralem Höhlengrau, einer Mittelhirnstruktur (Lüllmann et al., 2010, p 297, Tracey und Mantyh, 2007, Pinto-Ribero et al., 2007, Wang und Nakai, 1994, Mao und Han, 1990) Die Bahnen aus dem zentralen Höhlengrau verwenden die Neurotransmitter Serotonin und Noradrenalin und ziehen direkt oder über die Raphé-Kerne und den *Locus coeruleus* zum Hinterhorn des Rückenmarks, wo sie enkephalinerge Interneurone aktivieren, welche wiederum die Freisetzung von Substanz P und anderen exzitatorischen Überträgerstoffen und dadurch die Weiterleitung der nozizeptiven Information hemmen (Freye, 2010, p 21).

Die Modulation der Schmerzreize im Hinterhorn des Rückenmarks kann aber auch im Sinne einer Verstärkung ablaufen. Durch langanhaltende nozizeptive Reize kommt es zu Umbauvorgängen, die zur Chronifizierung des Schmerzes führen können (Freye, 2010, p 13).

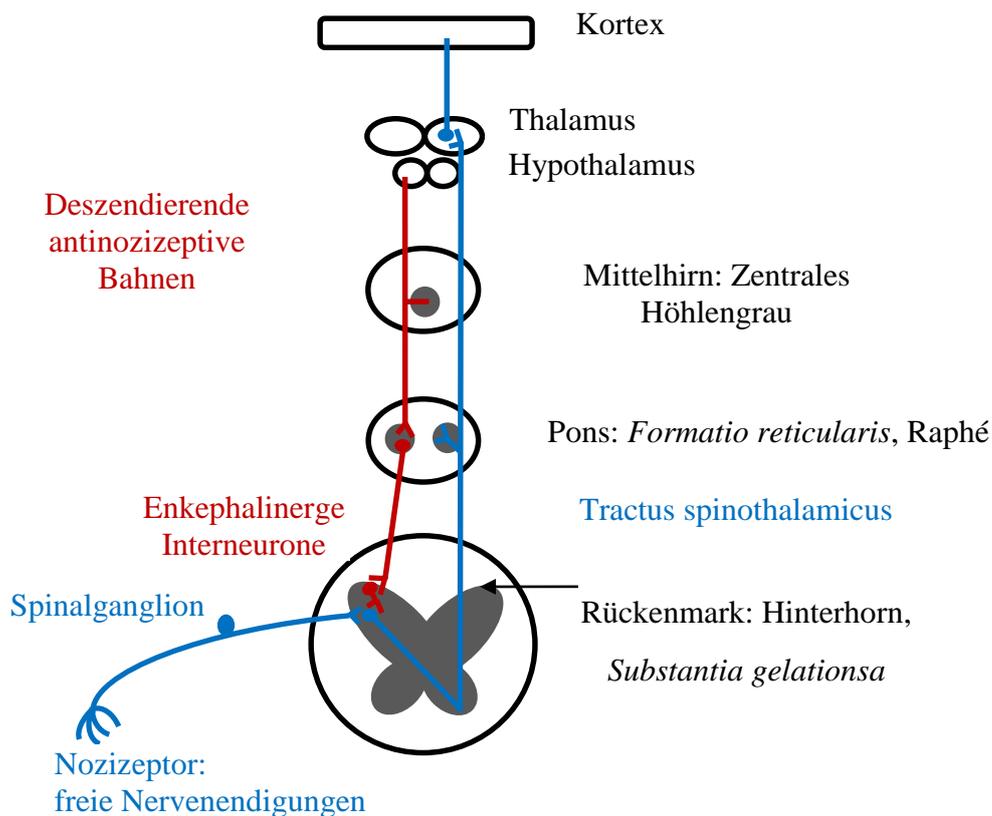
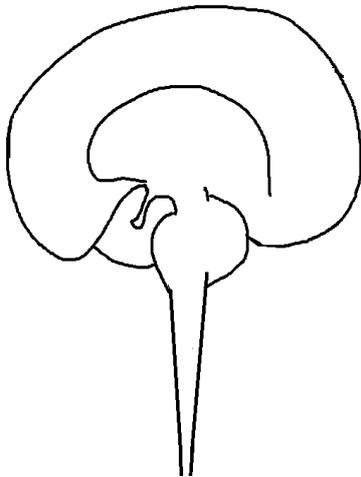


Abbildung 3.1: Schmerzweiterleitung auf Rückenmarksebene und deszendierende Hemmsysteme
 Die Umschaltung der Schmerzafferenz erfolgt im Hinterhorn des Rückenmarks auf den *Tractus Spinothalamicus* durch den Transmitter Substanz P. Parallel zur aufsteigenden Schmerzbahn existieren deszendierende Hemmsysteme aus dem Mittelhirn, welche auf enkephalinerge Interneurone im Hinterhorn des Rückenmarks projizieren (nach Lüllmann et al., 2010, p 297).

Substanzen, die an Rezeptoren binden, bezeichnet man als Liganden des jeweiligen Rezeptors. Die Liganden des endogenen Opioidsystems sind Endorphine, Enkephaline und Dynorphine. Endorphine (Endorphin α , β und γ) entstehen aus dem Vorläuferpeptid Proopiomelanocortin (POMC) (Eipper und Mains, 1980). Proenkephaline sind die Vorläuferpeptide der Enkephaline, bei denen man Leu-Enkephalin und Met-Enkephalin anhand ihrer Aminosäuresequenz unterscheidet. Dynorphine (Dynorphin A und B, α - und β -Neoendorphin) entstehen aus Prodynorphin (Cox, 1982). Opioidrezeptorliganden wirken an Opioidrezeptoren, von denen es drei Subtypen gibt, die als μ , δ und κ -Opioidrezeptoren bezeichnet werden. Zudem ist der den Opioidrezeptoren strukturell sehr ähnliche, OP_4 -Rezeptor bekannt. Er wird auch als *opioid-receptor-like*-Rezeptor (früher Orphan-Rezeptor) bezeichnet und wird durch den endogenen Liganden Nociceptin alias Orphanin FQ aktiviert. Enkephaline zeigen die stärkste Affinität zum δ -Opioidrezeptor (δ OR), während Dynorphine vor allem an den κ -Opioidrezeptor (κ OR) binden. Die höchste Affinität zum μ -Opioidrezeptor (μ OR) zeigen Endomorphine (Endomorphin 1 und Endomorphin 2).

Opioidrezeptoren kommen im ZNS vor, werden aber auch in peripheren Geweben wie der Darmmukosa, auf Immunzellen, dem Nebennierenmark und im enterischen Nervensystem exprimiert (Hedner und Cassuto, 1987). μ OR finden sich im Kortex, Rückenmark, Hippocampus, Thalamus, *Amygdala*, Mesenzephalon, *Medulla oblongata* und der Pons. κ OR zeigen ein sehr ähnliches Verteilungsmuster, sie sind jedoch zusätzlich auch im Hypothalamus zu finden. δ OR kommen generell seltener vor, werden aber auch im Telenzephalon und im Rückenmark exprimiert (Mansour et al., 1988). Auch für primär-sensorische DRG-Neurone konnte eine Opioidrezeptorexpression gezeigt werden (Wang und Wessendorf, 2001, Ji et al., 1995). Als eventuelles physiologisches Korrelat ist für diese primär-sensorische Neurone eine opioidvermittelte präsynaptische Inhibition nozizeptiver Reize gezeigt. Außerdem scheinen Opioide hier über μ OR und κ OR einer Hyperalgesie entgegenzuwirken, indem sie die periphere inflammatorische Sensibilisierung afferenter Neurone verhindern (Yaksh, 1997). Daher wurde postuliert, dass schon auf Ebene der primären Afferenzen eine Modulation der Schmerzweiterleitung durch Opioide erfolgen kann.



Telenzephalon:

Kortex $\mu \sim \kappa \sim \delta$

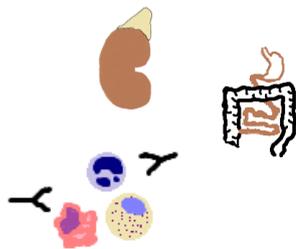
Amygdala $\mu > \kappa > \delta$

Nucleus accumbens $\mu \sim \delta > \kappa$

Diencephalon: $\kappa > \mu > \delta$

Mesenzephalon / *Medulla oblongata*: $\mu > \kappa > \delta$

Rückenmark: $\mu > \kappa > \delta$



Periphere Expressionsorte von Opioidrezeptoren:

Nebennierenmark

enterisches Nervensystem, Darmmukosa

Immunzellen

Abbildung 3.2: Verteilungsmuster von Opioidrezeptoren im ZNS

Während in Mittelhirn und Hirnstamm der Anteil an μ OR-Rezeptoren am höchsten ist, ist die Subtypverteilung im Kortex relativ ausgewogen. Der δ OR kommt überwiegend im *Nucleus accumbens*, dem Putamen und dem *Nucleus caudatus* vor (nach „TABLE I: Distribution of opioid receptors and peptides in the rat brain“ (Mansour et al., 1988)). Der Vollständigkeit halber werden auch periphere Expressionsorte von Opioidrezeptoren genannt.

Aus der Verteilung der Rezeptorsubtypen lassen sich Rückschlüsse auf die Wirkung der jeweiligen Liganden ziehen. Die starke Präsenz des μ OR im Hirnstamm, wo sich auch Atem- und Kreislaufzentren befinden, lässt die Beeinflussung dieser Zentren durch μ -Liganden wahrscheinlich werden. Die vermehrte Expression des μ OR in *Amygdala* und *Nucleus accumbens* kann einen Grund für die starke Sucht- und Abhängigkeitsentwicklung durch μ -Liganden darstellen (Freye, 2010, pp 53-53). Alle Opioidrezeptoren vermitteln Analgesie. Während über δ OR- und μ OR-vermittelte Effekte ein hohes Abhängigkeitspotential haben, ist dies bei den durch κ -Liganden vermittelten Effekten geringer (Martin et al., 1976). Hier ist dafür eine Dysphorie und Induktion von Diurese typisch. Liganden am μ OR wird die Vermittlung einer besonders ausgeprägten Euphorie, einer Bradykardie und einer ausgeprägten Obstipation

zugeschrieben. Eine Aktivierung des δ OR wirkt regulativ im Sinne einer Hormonsekretion und Koordinierung der Stressreaktion (Martin et al., 1976).

	μ OR	κ OR	δ OR
Bevorzugte endogene Liganden	β -Endorphin Endomorphin 1/2 Leu/Met-Enkephalin	β -Endorphin Dynorphin A/B	β -Endorphin Leu/Met-Enkephalin
Wirkung	Analgesie Atemdepression Euphorie Obstipation Harnretention Bradykardie Hypothermie Miosis	Analgesie Dysphorie Diurese Hyperthermie Miosis	Analgesie Atemdepression Obstipation Harnretention Stressreaktion, Hormonsekretion
	hohes Abhängigkeitspotential	geringes Abhängigkeitspotential	hohes Abhängigkeitspotential

Tabelle 3.1: Überblick über die Opioidrezeptorsubtypen, deren Liganden und Wirkungsprofil
 μ OR-Liganden wirken hauptsächlich analgetisch, atemdepressiv und kreislaufdepressiv, κ OR-Liganden vorwiegend sedativ und δ OR-Liganden regulativ. (nach Freye, 2010, pp 48-52)

3.3 Opioide in der Medizin

Die meisten Opiate unterliegen in Deutschland der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung. Dies gilt jedoch nicht für die schwächer wirkenden Substanzen Tramadol und das Kombinationspräparat Tilidin/Naloxon. Das als Antitussivum eingesetzte Codein unterliegt bis zu einer festgelegten Höchstgrenze ebenfalls nicht dieser Verordnung (Arzneimittelbrief, 2011,45, 65).

3.3.1 Einsatzbereiche und Therapieansätze

Es existieren diverse Applikationsformen für Opioide. So stehen orale, bukkale, transdermale, rektale aber auch epidurale Verabreichungsformen zur Auswahl (Arzneimittelbrief, 2011,45, 65)

Indikationen zur Opioidtherapie sind starke akute oder chronische Schmerzen. Bei chronischen Schmerzen unterscheidet man zwischen tumorbedingten und nicht-tumorbedingten Schmerzen. Bei nicht-tumorbedingten chronischen Schmerzen ist es wahrscheinlicher, dass die Behandlung über längere Zeit hinweg andauert. Somit rücken hier Probleme der Abhängigkeitsentwicklung und Toleranzentwicklung stärker in den Vordergrund. Daher ist noch nicht endgültig geklärt, ob bei nicht-tumorbedingten chronischen Schmerzen Opioide als Mittel der Wahl zu sehen sind (Allegri et al., 2012, Ballantyne und Shin, 2008). Unter Berücksichtigung der individuellen Problematik sind Opioide jedoch auch hier meist als sehr effektiv einzustufen (Pergolizzi et al., 2008). In Deutschland werden bei chronischen Schmerzen häufig Opioide, besonders transdermale Fentanylpflaster, verordnet. Die Verordnungszahlen sind deutlich gestiegen und bei einem Großteil handelt es sich um nicht-tumorbedingte chronische Schmerzen. Fentanyl kann jedoch besonders bei Patienten, die zuvor keine Opioide erhielten eine gefährliche Atemdepression auslösen. Oftmals folgt die Verordnung jedoch direkt nach einem Therapieversuch mit nicht-Opioid-Analgetika. Der teilweise unangemessene Einsatz dieser transdermalen Systeme kann daher mit einem Risiko für den Patienten einhergehen (Garbe et al., 2012).

Zur Therapie tumorbedingter Schmerzen bietet das WHO-Stufenschema eine Übersicht über die verfügbaren Analgetika. Es unterscheidet zwischen nicht-Opioid-Analgetika (Stufe I), schwachen Opioiden (Stufe II) und starken Opioiden (Stufe III). Ein eskalierendes Vorgehen wird empfohlen. Stufe II und III sollten nicht miteinander kombiniert werden, aber Analgetika der Stufe I können mit Opioidanalgetika kombiniert werden. Zusätzlich kann man in jeder Stufe Adjuvantien verwenden, deren Angriffspunkt vegetative oder emotionale Schmerzkomponenten sind. Dazu zählt man beispielsweise bestimmte Antiepileptika oder Antidepressiva (WHO, 1990, Mercadante, 2010).

Stufe I	Stufe II	Stufe III
Nicht-Opioid-Analgetika	Schwache Opioide	Starke Opioide
ASS	Codein	Pethidin
Ibuprofen	Tramadol	Morphin
Paracetamol	Dihydrocodein	Oxycodon
		Methadon
		Hydromorphon
		Buprenorphin

Tabelle 3.2: WHO-Stufenschema zur Therapie von Tumorschmerzen

Nach *World Health Organisation. Cancer Pain Relief*. Genf, 1996

Primär sollte ein Nicht-Opioid-Analgetikum verwendet werden. Wenn hierdurch keine Schmerzlinderung erreicht wird, kann dieses mit einem schwachen Opioid kombiniert werden. Erst wenn dies wiederum keine Schmerzlinderung bringt, wird auf ein starkes Opioid ggf. in Kombination mit einem Nicht-Opioid-Analgetikum eskaliert, wobei eine Kombination von Vertretern der Stufe II und III nicht zulässig ist.

Eine orale Opioidtherapie sollte möglichst mit Retardpräparaten erfolgen, da hiermit genauso wie mit Dauerinfusionen ein relativ konstanter Blutspiegel erreicht werden kann. Das Ausmaß des euphorisierenden Effektes und dadurch das Suchtpotential eines Opioids hängt von der Geschwindigkeit des Anflutens im Gehirn ab. Deswegen sind stark lipophile Substanzen, welche die Blut-Hirn-Schranke leicht passieren, genauso wie schnelle und große Blutspiegelschwankungen besonders suchtfördernd (Lüllmann et al., 2010, p 300). Heroin hat verglichen mit Morphin ein deutlich höheres Suchtpotential, da es die Blut-Hirn-Schranke besonders gut passiert. Es werden rasch hohe Konzentrationen im ZNS erreicht, weshalb sich innerhalb von Minuten eine Euphorie, der sog. „Kick“ einstellt. Zudem ist der entstehende Metabolit 6-Monoacetylmorphin ein extrem potenter μ OR-Ligand (de Ridder, 2000). Diese suchtauslösenden Eigenschaften sind bei medizinisch verwendeten Opioiden zu vermeiden. Für die Behandlung von Tumorschmerzen nutzt man zusätzlich zu einem Retardpräparat noch ein schnell wirkendes Präparat desselben Wirkstoffes, um plötzlich auftretende, starke Durchbruchsschmerzen zu kupieren. Außerdem sollte zu Beginn jeder Opioidtherapie sofort mit der Behandlung von unerwünschten Wirkungen durch Adjuvantien begonnen werden. Als wichtige Adjuvantien kommen Laxantien und Antiemetika zum Einsatz, um opioidinduzierte Obstipation und Übelkeit zu bekämpfen (Arzneimittelbrief, 2011,45, 65).

3.3.2 Medizinisch relevante Opiode

Morphin gilt als der Goldstandard bei der Therapie mit Stufe III Opioiden. Eine Überlegenheit der neueren synthetischen Liganden, wie beispielsweise Oxycodon, Fentanyl, Methadon oder Hydromorphon ist nicht bewiesen (Quigley, 2008).

Morphin wirkt als aktivierender Ligand am μ OR (Dhawan et al., 1996, Rowbotham, 2001). Es wird als Referenzsubstanz mit einer analgetischen Wirkstärke von 1 verwendet. Die Anschlagszeit beträgt 5 min nach intravenöser Gabe und 20 min nach oraler Applikation. Die Halbwertszeit liegt bei 2-3 h (Sitte, 2007). Hohe Dosen führen zusätzlich zum analgetischen Effekt auch zu Hypnose -und Narkose-ähnlichen Zuständen. Morphin wird in der Leber zu biologisch aktiven Metaboliten, hauptsächlich Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid, umgebaut. Morphin-6-Glucuronid gelangt über bislang ungeklärte Transportmechanismen über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn, wo es im Extrazellulärraum vorliegt. Es hat eine mit Morphin vergleichbar hohe Affinität zum μ OR. Bei oraler Morphinzufuhr kumuliert Morphin-6-Glucuronid im Blutplasma und kann dort für bis zu 10 h gemessen werden. Morphin-3-Glucuronid erreicht bei Kumulation Plasmakonzentrationen, die um das 10-fache höher sind. Allerdings ist dieser Metabolit nur ein schwacher μ OR-Agonist (Ziegler und Prokopek, 1992, Frolich et al., 2011). Weitere wichtige Opiode der Stufe III sind Fentanyl, Buprenorphin und Methadon. Fentanyl ist stark lipophil und hat eine sehr kurze und extrem potente Wirkung. Es wird im Rahmen der Anästhesie sowie in transdermalen Applikationssystemen verwendet und besitzt ein großes Suchtpotential. Seine Wirkdauer beträgt eine Stunde, es wird jedoch im Fettgewebe gespeichert und aus diesem erst über einen Zeitraum von 6-12 h wieder freigesetzt. Buprenorphin wirkt sehr lange und stark. Es wirkt als Agonist am μ OR und als Antagonist am κ OR. Aufgrund der starken Rezeptoraffinität kann im Falle einer Vergiftung nicht mit dem Opioidantagonist Naloxon therapiert werden. Methadon hat eine lange, jedoch individuell variable Halbwertszeit und wirkt außerdem ketaminähnlich am NMDA-Rezeptor, einem Glutamaterezeptor. Es wird zur Substitutionstherapie bei Opioidabhängigkeit verwendet (Lüllmann et al., 2010, pp 296-303, Lemmer und Fülgraff, 2010, Sitte, 2007).

Zu den schwach wirkenden Opioiden gehören Tilidin, Tramadol und Codein. Tilidin ist in Deutschland aus gesetzlichen Gründen nur in Kombination mit Naloxon im Handel. Es wird in der Leber zu seinem aktiven Metaboliten Nortilidin umgebaut, daher ist es bei Leberinsuffizienz ungeeignet. Tramadol ist ein Racemat. Das (+)-Enantiomer ist ein μ OR-Agonist und hemmt zusätzlich die Serotonin-Wiederaufnahme in Neuronen. Es wirkt mittelstark und rasch, hat eine hohe orale Bioverfügbarkeit und weniger Nebenwirkungen als Morphin. Tramadol unterliegt nicht der Betäubungsmittelverschreibungsverordnung. Codein und Dihydrocodein werden in der Leber zu Morphin metabolisiert. Dies geschieht durch Zytochrom P450-Enzyme, wobei dieser Stoffwechselweg bei etwa 5 % der Mitteleuropäer genetisch eingeschränkt ist (Lüllmann et al., 2010, pp 296-303, Lemmer und Fülgraff, 2010). Codein und Dihydrocodein werden vorrangig als Antitussiva eingesetzt. Die antitussive Wirkung beruht auf einer Blockade des Hustenzentrums in der *Medulla oblongata* (Freye, 2010, p 79).

3.3.3 Limitationen und Nebenwirkungen

Opioide hemmen das Atemzentrum, daher sind sie kontraindiziert bei Säuglingen mit noch unreifem Atemzentrum, bei Therapie mit anderen atemdepressiven Pharmaka und bei chronisch verminderter Ansprechbarkeit des Atemzentrums. Opioide wirken parasymphomimetisch, wodurch es zu Miosis kommt. Über periphere Wirkungen kommt es zur Tonussteigerung der glatten Muskulatur. Dies führt zu Darmträgheit, Blasenentleerungsstörungen und Abflussstörungen in Gallenblase und Pankreas. Opioide wirken hypnosedativ. Sie verändern die Stimmungslage häufig hin zu einer Dysphorie, manchmal auch hin zu Unruhe, Erregungszuständen und Psychosen (Lüllmann et al., 2010, pp 296-303). Außerdem wirken Opioide emetogen indem sie die Chemorezeptortriggerzone reizen, die wiederum das Brechzentrum aktiviert. Opioide können Muskelrigidität bis hin zu Muskelstarre induzieren, da sie Opioidbindstellen im *Striatum* binden und dort eine gesteigerte cholinerge Aktivität hervorrufen. Durch Wirkung am *Nucleus dorsalis nervi vagi* bewirken Opioide eine Herzfrequenzabnahme

(Freye, 2010, pp 88, 92, 9). Weitere unerwünschte Wirkungen sind Juckreiz, Somnolenz und Mundtrockenheit (Labianca et al., 2012).

Bei längerer Opioidgabe kommt es zu Toleranzentwicklung, Hyperalgesie und Abhängigkeit (Koch und Höllt, 2008, Chang et al., 2007). Unter Toleranzentwicklung versteht man eine Abnahme von Wirkdauer und Wirkstärke eines Pharmakons. In seltenen Fällen beobachtet man sogar eine vollständige Opioidtoleranz, so dass keine erfolgreiche Schmerztherapie mehr durchgeführt werden kann (Johnstone und Smith, 1992). Chronische Opioidgabe führt zu selektiver Toleranzentwicklung auf Übelkeit, Sedierung, Atemdepression und Euphorie während Obstipation und Miosis kaum einer Toleranzentwicklung unterliegen. Außerdem führt chronische Opioidgabe zu pathologischen Schmerzzuständen wie Hyperalgesie, Allodynie und Spontanschmerzen. Dies erfolgt durch zentrale Sensibilisierung und pronozizeptive Gegenregulationsmechanismen über die Aktivierung spinaler NMDA-Rezeptoren (Freye, 2010, pp 319-336). Opioidabhängigkeit besteht aus physischen Komponenten wie Entzugssymptomen und psychischen Anteilen wie Euphorie. Abhängigkeit entsteht im dopaminergen Belohnungssystem, über das Opioide ihre euphorisierenden Effekte vermitteln, wo es dann aber langfristig zu Veränderungen auf molekularer Ebene kommt. Diese langfristigen Veränderungen entstehen durch Genexpressionsveränderungen (Nestler und Aghajanian, 1997). Toleranzentwicklung durch Opioide im Sinne einer abgeschwächten Wirkstärke findet man auch bei peripheren Opioidrezeptoren in Rückenmark und DRG-Neuronen (Hong et al., 2010, Belanger et al., 2002, Crain et al., 1988).

Es gibt Schmerzen, die nur schlecht auf eine Opioidtherapie ansprechen. Diese sog. opioidrefraktären Schmerzen sind meist chronisch und sehr schwer zu therapieren. Dazu gehören Verspannungsmuskelschmerzen, neuropathische Schmerzen wie Neuralgien oder Phantomschmerzen, viszerale Schmerzen und Schmerzen im Rahmen einer psychischen Erkrankung (Freye, 2010, pp 56-57).

Neuropathischer Schmerz wird definiert als ein Schmerz, dessen Ursache eine Läsion oder Dysfunktion des zentralen oder peripheren Nervensystems ist (Internationale Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP)). Bei neuropathischen Schmerzen finden sich Veränderungen im Nervensystem, wie zum Beispiel

Ionenkanalveränderungen, neurogene Entzündungsprozesse, erhöhte neuronale Spontanaktivität und Sensibilisierung primär-sensorischer Neurone (Freye, 2010, pp 56-57). Theoretisch könnten Opioide durchaus auch bei neuropathischem Schmerz eingesetzt werden, jedoch sind hierfür so hohe Opioiddosen nötig, dass die auftretenden Nebenwirkungen in der Praxis oft zum Therapieabbruch führen (DelleMijn, 1999). Hätte man zukünftig Opioidanalgetika mit günstigerem Nebenwirkungsprofil, könnten in der Behandlung neuropathischer Schmerzen Fortschritte gemacht werden.

3.4 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Rezeptoren auf Zelloberflächen ermöglichen die interzelluläre Kommunikation im Organismus. Die Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) stellt die größte und vielfältigste Gruppe von Transmembranrezeptoren dar. Durch eine Ligand-Rezeptor-Interaktion wird ein intrazelluläres Signal ausgelöst (Larhammar et al., 1993). Man unterscheidet in Abhängigkeit von dem Effekt, den ein Ligand an einem Rezeptor induziert zwischen Agonisten und Antagonisten. Nach dem Modell der Selektion der Rezeptorkonformation liegt eine Rezeptorpopulation im Grundzustand in einem insgesamt inaktiven Zustand vor. Das bedeutet, ein Großteil der Rezeptoren befindet sich in der inaktiven Konformation. Da jedoch spontane Übergänge in die aktive Konformation möglich sind, befindet sich ein Bruchteil in der aktiven Konformation (Lüllmann et al., 2010, pp 12-15). Ein Agonist bindet bevorzugt an die aktive Konformation und stabilisiert diese, so dass das Gleichgewicht in Richtung aktiver Konformation verschoben wird. Ein inverser Agonist bindet die inaktive Konformation, so dass das Gleichgewicht in Richtung inaktiv verschoben wird. Ein Antagonist bindet hingegen gleich gut an die aktive und die inaktive Konformation. Die Wirkstärke eines Liganden ergibt sich daraus, wie stark er das Gleichgewicht verschieben kann. (Hill, 2006, Gether und Kobilka, 1998, Samama et al., 1993). Die Affinität eines Liganden und somit seine Verdrängbarkeit am Rezeptor wird durch die Bindungsgleichgewichtskonstante K_D angegeben. Sie entspricht der Ligandenkonzentration, bei der 50 % der Rezeptoren belegt sind. Durch Sättigungs-Bindungskurven wird die maximale Anzahl der Bindungsstellen

(B_{\max}) auf der Zelloberfläche ermittelt und somit die Sättigbarkeit der Ligand-Rezeptor-Bindung definiert (Lüllmann et al., 2010, pp 12-15).

Bei Naloxon handelt es sich um einen inversen Agonist (Cruz et al., 1996). Buprenorphin ist ein Partialagonist (Sitte, 2007). DAMGO, Morphin, DPDPE und DSLET sind Agonisten an Opioidrezeptoren und CTAP ist ein selektiver μ OR-Antagonist (Dhawan et al., 1996, Itzhak und Pasternak, 1987). Siehe auch 4.1.4.1

3.4.1 Durch GPCR induzierte Signaltransduktionskaskaden

GPCR bestehen aus sieben Transmembrandomänen mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus. Eingeteilt werden sie in drei große Familien (Typ A, B und C), deren größte die Rhodopsin (Typ A) Subfamilie darstellt (Gether und Kobilka, 1998). An die hydrophoben Transmembrandomänen ist ein heterotrimeres G-Protein assoziiert, das aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit besteht (Fong, 1996). Die namensgebende α -Untereinheit bindet Guanosintriphosphat (GTP) oder Guanosindiphosphat (GDP) und besitzt GTP-Hydrolyse (GTPase) Aktivität. Die anderen beiden Untereinheiten bilden den fest verbundenen $\beta\gamma$ -Komplex. Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor verursacht Konformationsänderungen, die einerseits zur Dissoziation des $\beta\gamma$ -Komplexes und andererseits zu einer Aktivierung der α -Untereinheit durch GTP Bindung führen, da der aktivierte Rezeptor den Austausch von GDP durch GTP reguliert. Die intrinsische GTP-Hydrolyse zu GDP beendet die Ligandenwirkung wieder und ermöglicht die Reassoziierung der α -Untereinheit mit dem $\beta\gamma$ -Komplex (Conklin und Bourne, 1993, Birnbaumer et al., 1990, Bourne et al., 1989). Sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit können intrazelluläre Signalkaskaden initiieren. Abhängig von der Art der α -Untereinheit kommt es nun zu verschiedenen Effekten (Freissmuth et al., 1989). $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren bewirken bei Aktivierung eine Inhibition der Adenylylcyclase (AC). $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren sind *Pertussis Toxin* (PTX)-sensitiv. Das Toxin führt über eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit zu dessen Inaktivierung (Parolaro et al., 1990). Eine Inhibition der AC bewirken auch $G\alpha_z$ -gekoppelte GPCR, jedoch sind diese PTX-insensitiv. Des Weiteren findet man GPCR mit

einem $G\alpha_s$ -Protein, die nach Ligandenbindung zur Aktivierung der AC führen. $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren aktivieren die Phospholipase C β (PLC β) und GPCR mit $G\alpha_{12}$ -Kopplung aktivieren Rho-*guaninenucleotide exchange factor* (Rho-GEF) (Pierce et al., 2002, Birnbaumer, 2007). Rho (*Ras homologue*) gehört zur Ras-Familie kleiner GTPasen. Rho-GEF katalysiert den GDP-GTP-Austausch von Rho (Narumiya, 1996).

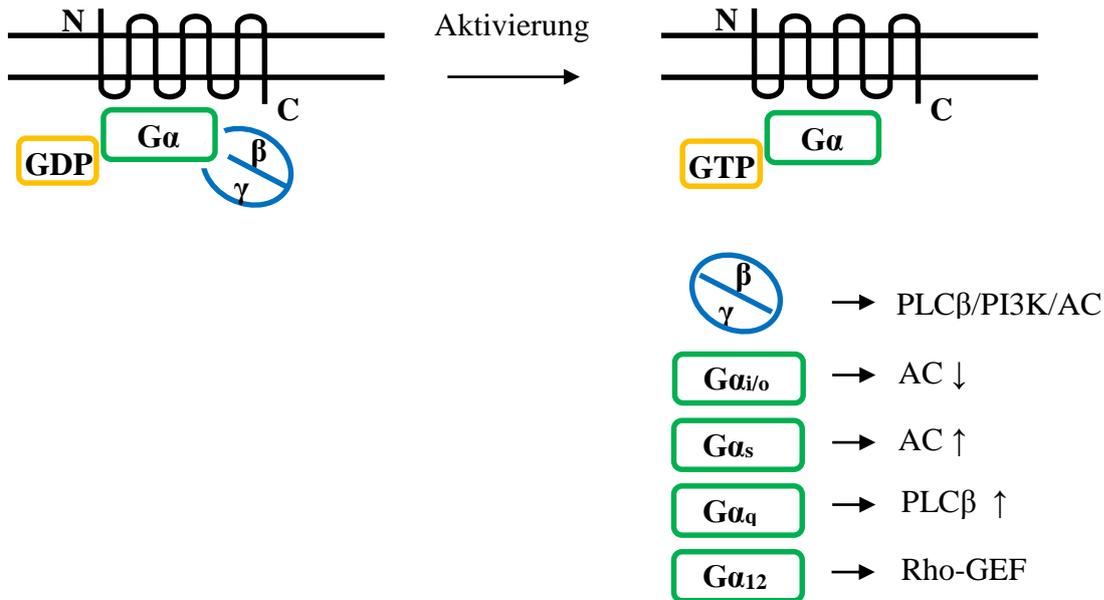


Abbildung 3.3: vereinfachte Darstellung der Vorgänge nach Aktivierung eines GPCR

Nach Aktivierung eines GPCR kommt es zur Dissoziation des $\beta\gamma$ -Komplexes und zum Austausch des an die α -Untereinheit gebundenen GDP durch GTP. Weitere Signalkaskaden werden angestoßen. Diese sind abhängig von der Art der $G\alpha$ -Untereinheit.

$G\alpha_s$ -gekoppelten Rezeptoren aktivieren die AC, ein Transmembranenzym, das den Botenstoff cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP) synthetisiert. cAMP bewirkt über eine Bindung an die Proteinkinase A (PKA) deren Konformationsänderung und somit deren Aktivierung (Rassow, 2006). PKA ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Die cAMP-Bindung an die regulatorischen Untereinheiten setzt die katalytischen Untereinheiten frei, welche die Phosphorylierung der PKA-Substrate vermitteln. Aktive katalytische Untereinheiten können auch in den Zellkern translozieren und dort Transkriptionsfaktoren aktivieren (Shemarova, 2009). Durch die PKA-vermittelte Phosphorylierung von *cAMP-responsive-element-binding-protein* (CREB)

kann dieses nun an *cAMP-responsive-elements* (CRE) binden und cAMP-abhängige Gene werden transkribiert (Rassow, 2006).

Den gegenteiligen Effekt auf die AC haben $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte GPCR. Jedoch dient hier besonders auch der $\beta\gamma$ -Komplex als Initiator von intrazellulären Signalkaskaden wie der Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), der PLC β , Kaliumkanälen und der AC (Neves et al., 2002). Durch PLC β -Aktivierung werden Diacylglycerol (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) freigesetzt, was zu Aktivierung von Proteinkinase C (PKC) und zur Kalziumfreisetzung führt (Fukami et al., 2010). PKC wiederum kann *Mitogen Activated Protein Kinases* (MAPK) aktivieren (Belcheva und Coscia, 2002). Die $G\alpha_q$ -Untereinheit führt bei Aktivierung zur Stimulation der PLC β . Die Familie der PLC besteht aus den vier Subtypen PLC β , PLC γ , PLC δ und PLC ϵ . Die PLC katalysiert die Freisetzung der *second messenger* DAG und IP₃ aus Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂). Die Subtypen werden unterschiedlich reguliert, so aktivieren $G\alpha_q$ -gekoppelte Rezeptoren und $\beta\gamma$ -Untereinheiten PLC β . PLC δ wird vor allem kalziumabhängig reguliert, PLC γ wird kalziumabhängig, aber auch durch Tyrosinkinasen aktiviert und PLC ϵ kann durch das monomere G-Protein Ras beeinflusst werden (Fukami, 2002). DAG aktiviert die PKC durch Bindung an eine regulatorische Untereinheit. Die Aktivierung der Serin/Theroninkinase PKC hat v.a. eine Aktivierung der MAPK zur Folge. IP₃ führt zur Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration indem es an IP₃-Rezeptoren, Kalziumkanäle am Endoplasmatischen Retikulum, bindet. Kalzium bindet an das Bindeprotein Calmodulin, wodurch eine Aktivierung Calmodulin-abhängiger-Kinasen (CamK) erfolgt. Kalzium führt außerdem zu einer Aktivierung der PKC (Rassow, 2006, Gilman, 1987, Zeng et al., 2012).

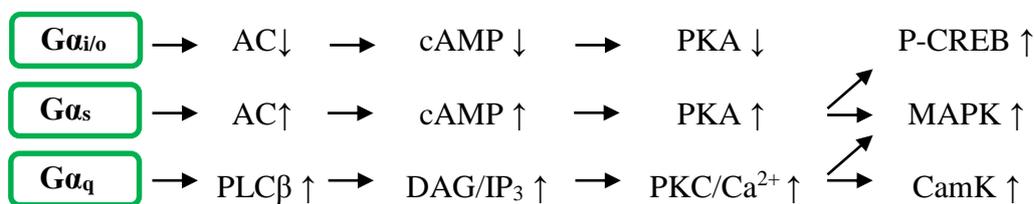


Abbildung 3.4: Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von G-Proteinen verschiedener Subtypen

Die intrazellulären Konsequenzen einer G-Protein-Aktivierung unterscheiden sich deutlich voneinander, jedoch kann jede Aktivierung eine Veränderung von Botenstoffen und Enzymen sowie eine veränderte Genregulation induzieren.

Ein Rezeptor besitzt die Fähigkeit die Signalstärke zu regulieren. Durch die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit kommt es über GTP-Hydrolyse zur Beendigung der Signaltransduktion. Durch *regulators-of-G-protein-signalling*-Proteine (RGS-Proteine) kann dies beschleunigt werden. RGS-Proteine sind GTPase Aktivatoren (Taylor und Fleming, 2001).

GPCR haben über Desensitisierung und Internalisierung die Möglichkeit, Rezeptordichte und Empfindlichkeit zu verändern und die Zelle so vor Überstimulation zu schützen. Hierzu tragen verschiedene Mechanismen bei. So entkoppelt der Rezeptor von seinem G-Protein, es kommt zur Rezeptorinternalisierung und längerfristig nimmt die Rezeptormenge ab (*down-regulation*) (Ferguson, 2001). Die Entkopplung des G-Proteins vom Rezeptor erfolgt nach dessen Phosphorylierung durch PKA und PKC. Man spricht von heterologer Desensitisierung, da die PKA/PKC-Aktivierung nicht unbedingt durch den Rezeptor selbst erfolgt sein muss, der nun desensitisiert wird (Pierce et al., 2002, Shukla et al., 2011). Homologe Desensitisierung hingegen erfolgt über das G-Protein-Rezeptor-Kinasen (GRK)-Arrestin-System. GRK phosphorylieren zuvor aktivierte Rezeptoren und ermöglichen somit die Bindung von Adapterproteinen, den Arrestinen, an den Rezeptor. Durch die Arrestinbindung wird eine erneute Bindung von G-Proteinen an den Rezeptor verhindert und somit der Rezeptor desensitisiert (Pierce et al., 2002, Shukla et al., 2011). Arrestine spielen eine wichtige Rolle bei der Rezeptorinternalisierung, da sie wiederum mit Clathrin interagieren und dieses an die Zellmembran zum Rezeptor dirigieren. Clathrin ermöglicht in Form der *clathrin-coated-pits* Endozytosevorgänge (Oakley et al., 1999). Des Weiteren können Arrestine über Interaktionen mit Ubiquitinligasen auch eine Ubiquitinierung und den darauffolgenden lysosomalen Abbau des Rezeptors initiieren (Shenoy et al., 2001). Ein Teil der Rezeptoren kann nach einer gewissen Zeit an die Zellmembran zurückkehren, man bezeichnet dies als Resensitisierung (Zhang et al., 1997). Außerdem können Arrestine als Signalmoleküle funktionieren, die im Falle einer Rezeptordesensitisierung G-Protein-unabhängig den MAPK-Signalweg aktivieren und somit Einfluss auf Genexpressionsregulation nehmen können. So ist eine Aktivierung von ERK-1/2, p38 und JNK3 aus der Familie der MAPK durch Arrestin möglich (Shukla et al., 2011, Ma und Pei, 2007).

3.4.2 Genregulation durch GPCR

Klassischerweise verursachen Wachstumsfaktoren Genexpressionsveränderungen in der Zelle (Rollins und Stiles, 1989, Johansen und Prywes, 1995). Der *nerve growth factor* (NGF) ist beispielsweise ein Wachstumsfaktor, der in sensorischen und sympathischen Neuronen Wachstum und Differenzierung induziert (Levi-Montalcini und Angeletti, 1968).

Auch andere extrazelluläre Signale sowie die Aktivierung eines GPCR können die Transkription bestimmter Gene initiieren. (van Biesen et al., 1996, Selbie und Hill, 1998). Eine zentrale Rolle bei der Transkriptionsregulation durch GPCR spielt die Familie der MAPK, mit ihren Subtypen *extracellular-regulated-kinases* 1 und 2 (ERK-1/2), *Jun-N-terminal-kinase* (JNK), p38 und ERK-5. Für ERK-1/2 ist bekannt, dass $G\alpha_q$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren eine Phosphorylierung induzieren können (van Biesen et al., 1996). $G\alpha_{i/o}$ -Rezeptoren aktivieren ERK-1/2 über den $\beta\gamma$ -Komplex und eine PKC-Aktivierung (Belcheva und Coscia, 2002). Außerdem kann die $\beta\gamma$ -Untereinheit über aktivierte PI3K mittels der Adapterproteine Shc (*SH2-domain-containing $\alpha 2$ collagen related proteins*) und Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*), dem GEF Sos (*son of sevenless*) und dem monomeren G-Protein Ras eine ERK-1/2 Phosphorylierung induzieren (van Biesen et al., 1996). Bei $G\alpha_q$ -Rezeptoren hingegen erfolgt die Aktivierung der ERK-1/2 über PLC und PKC, wobei als Mechanismus eine direkte Aktivierung der MAPK-Kinase-Kinase (Raf) durch PKC angenommen wird. $G\alpha_s$ -gekoppelte Rezeptoren können über PKA und das monomere G-Protein Rap1 Einfluss auf ERK-1/2 nehmen (van Biesen et al., 1996). All diese Signalwege konvergieren dann auf die MAPK-Kinase-Kinase (Raf), deren Aktivierung eine Aktivierung der MAPK-Kinase (MEK) nach sich zieht, wodurch ERK-1/2-aktiviert wird. Nach ihrer Aktivierung translozieren die MAPK in den Zellkern, wo sie durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren regulieren. Daher stellt der MAPK-Signalweg einen essentiellen Schritt in der Signaltransduktion vom Rezeptor zur Genregulation dar (Marinissen und Gutkind, 2001, Davis, 1995) (**Abbildung 3.5**).

Zu den Mechanismen der Aktivierung anderer MAPK ist nicht so viel bekannt wie für ERK-1/2. JNK kann durch freie $\beta\gamma$ -Untereinheiten über das kleine G-Protein rac aktiviert werden. Neben freien $\beta\gamma$ -Untereinheiten können auch $G\alpha_q$ -Rezeptoren p38 aktivieren.

Eine Aktivierung von ERK- 5 ist durch $G\alpha_q$ und $G\alpha_{13}$ -gekoppelte Rezeptoren möglich (Marinissen und Gutkind, 2001).

Eukaryotische Transkription erfolgt über Ribonukleinsäure (RNA)-Polymerase II, die durch Transkriptionskomplexe an einen Core Promotor rekrutiert wird. Im Falle der RNA-Polymerase II ist dieser Core Promotor häufig die TATA-Box. Zur Transkriptionsinitiation kommt es, wenn sich ein stabiler Initiationskomplex aus basalen Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerase II am Promotor gebildet hat. Die basale Transkriptionsrate ist jedoch relativ gering. Außerhalb der Core Promotor Region liegen zusätzlich regulatorische Elemente um die niedrige basale Transkriptionsrate zu steigern und Genexpression zu kontrollieren (Hawkins und Phillips, 1996). Genexpression ist gewebespezifisch und durch Stimuli induzierbar. *Response elements* wie das CRE zeichnen sich dadurch aus, dass sie Transkriptionsfaktoren spezifisch binden und über diese reguliert werden können. Manche Transkriptionsfaktoren werden unter basalen Bedingungen wenig exprimiert, sie sind induzierbar und regulieren dann die Transkription. Andere Transkriptionsfaktoren liegen schon an das *response element* gebunden vor und können dort direkt aktiviert werden. Die gängigste Aktivierungsmethode für einen Transkriptionsfaktor ist die Phosphorylierung durch eine Proteinkinase (Nestler und Hyman, 2002). Auf diesem Wege führen auch die Signalkaskaden, die nach Aktivierung eines GPCR angestoßen werden zur Genexpression. Transkriptionsfaktoren regulieren die Genexpression indem sie spezifische DNA-Sequenzen binden, Kofaktoren rekrutieren und somit den Transkriptionsapparat räumlich zusammenfügen (George et al., 2011).

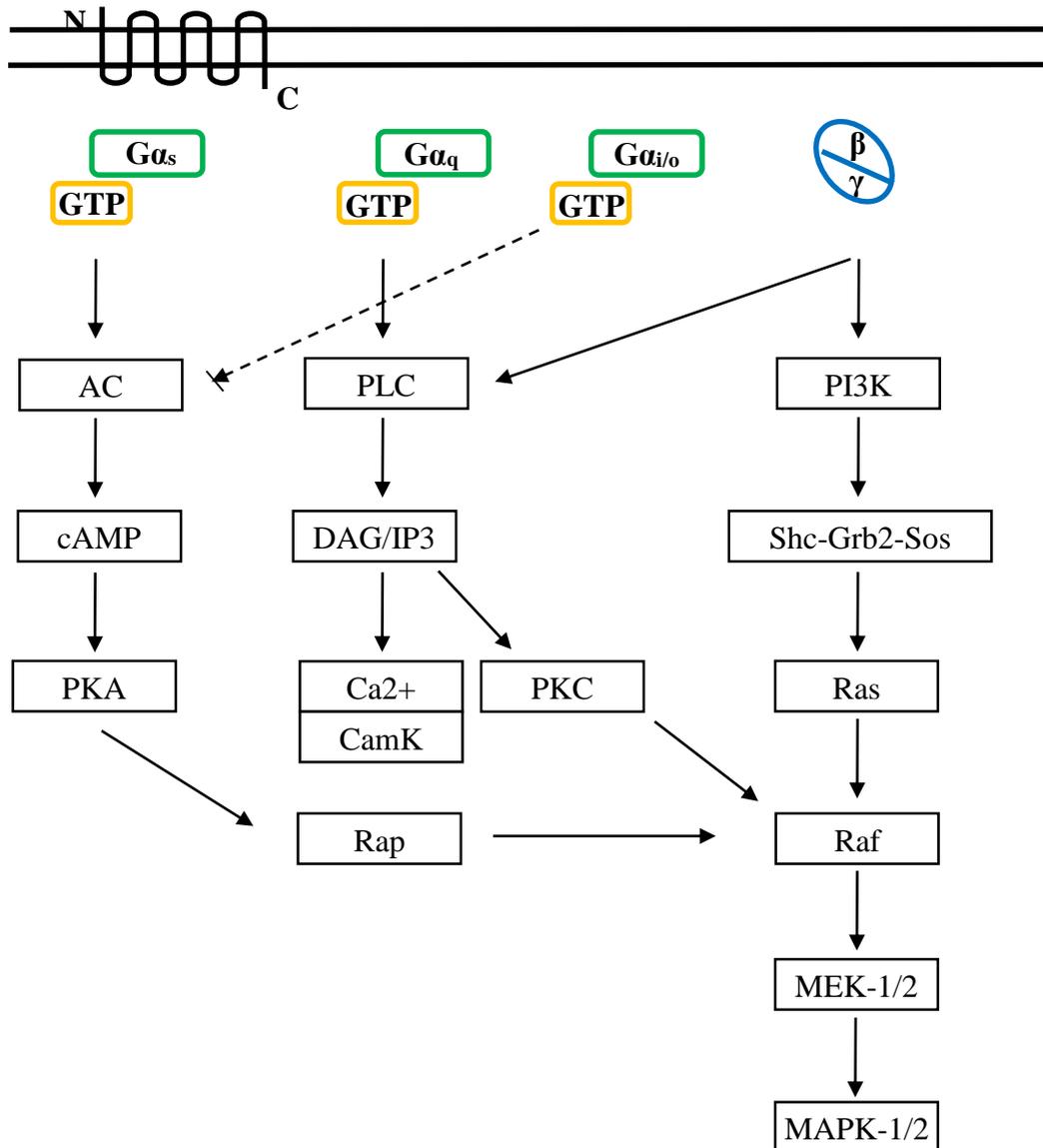


Abbildung 3.5: Aktivierung des ERK-1/2-Signalwegs durch GPCR

Über die Mechanismen der ERK-1/2-Aktivierung ist mehr bekannt, als über die der anderen Mitglieder der MAPK-Familie. Nach ihrer Aktivierung können MAPK Transkription regulieren und dadurch auf Genregulation Einfluss nehmen.

Die Transkriptionsregulation durch Liganden an GPCR kann über diverse *response elements* erfolgen, wobei die bekanntesten *serum response element* (SRE) oder CRE sind (Ho et al., 2009).

Der Transkriptionsfaktor CREB ist als Homodimer an die CRE-Sequenz (TGACGTCA) gebunden und wird durch eine Phosphorylierung an Serin 133 aktiviert. Durch das *CREB-*

binding protein (CBP) wird der aktivierte CREB/CRE-Komplex in räumliche Nähe zum Transkriptionsapparat gebracht (Andrisani, 1999). Eine Aktivierung von CREB durch Phosphorylierung ist durch PKA, PKC, CamK und ERK-1/2 möglich (Johannessen et al., 2004). CREB gehört durch seine basische Leucin-Zipper-Domäne zu der bZIP-Familie der Transkriptionsfaktoren. Über die Leucin-Zipper-Domäne wird die Bindung an die DNA und auch die Dimerisierung vermittelt, während über die *kinase-inducible-domain* (KID) die Transkriptionsaktivität reguliert wird. In dieser KID-Region befindet sich das Serin133. An die CRE-DNA-Sequenz kann außerdem *cAMP-responsive-element-modulator* (CREM) binden und dadurch CRE-abhängige Gentranskription inhibieren (Shaywitz und Greenberg, 1999). Jedoch sollte beachtet werden, dass nicht jede CREB-Phosphorylierung an Serin 133 zwangsläufig zu einer Transkriptionsaktivierung führt, bzw. dass das Ausmaß der CREB-Phosphorylierung nicht mit der Bindungsaffinität von CREB an CRE korreliert (Mayr und Montminy, 2001, Bonni et al., 1995).

Das SRE wird über *serum response factor* (SRF) und *ternary complex factors* (TCF) reguliert. Für die Bindung von SRF an SRE ist die CC[AT]6GG-Sequenz verantwortlich. Am 5'Ende befindet sich eine *E-twenty-six* (ETS)-Bindedomäne (CAGGAT), an die TCF binden können. SRF ist ein dimeres Protein das jeweils spezifische Domänen zur Dimerisierung, DNA-Bindung, Interaktion mit TCF und Phosphorylierung besitzt. Durch die Phosphorylierung wird die DNA-Bindung an SRE verstärkt und dadurch Transkription initiiert (Treisman, 1992). SRF wird durch ERK-1/2, PI3K, CamK und Rho-GTP aktiviert (Knoll und Nordheim, 2009).

TCF gehören zur Familie der *E-twenty-six* (ETS) Transkriptionsfaktoren. Sie werden über Phosphorylierung durch ERK-1/2, p38 und JNK aktiviert. Zur Subfamilie der TCF gehören *neuroepithelial transforming gene-1* (Net-1), *E-twenty-six-like transcription factor-1* (Elk-1) und *SRF accessory protein-1* (Sap-1). TCF bilden zusammen mit zwei SRF Molekülen einen ternären Komplex. Sie sind aus einer N-terminalen Ets-Domäne zur DNA Bindung, einer B-Box zur Interaktion mit SRF und einer C-Domäne aufgebaut. Die C-Domäne enthält Phosphorylierungsstellen und reguliert somit die Aktivität. Durch Phosphorylierung wird die Interaktion zwischen C -und Ets-Domäne inhibiert und somit die DNA-Bindungsfähigkeit verstärkt (Buchwalter et al., 2004, Besnard et al., 2011b).

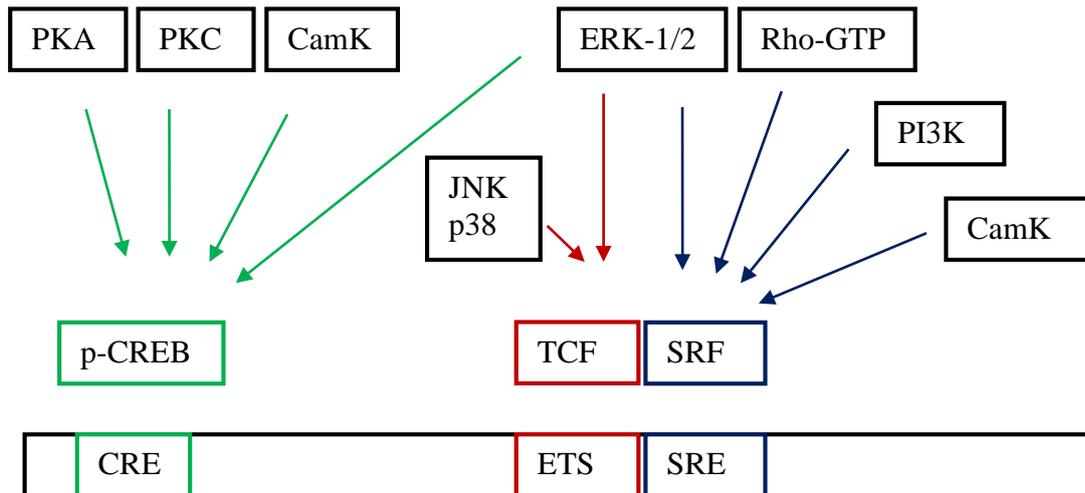


Abbildung 3.6: Genaktivitätsregulation über CRE und SRE durch GPCR-Liganden

Phosphoryliertes CREB aktiviert CRE-abhängige Transkription. TCF bilden mit zwei Molekülen SRF einen ternären Komplex und aktivieren Gene die unter der Regulation von SRE und ETS Domänen stehen. Diverse Signalwege konvergieren auf diese Transkriptionsfaktoren und aktivieren sie durch Phosphorylierung.

3.5 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren die mit PTX-sensitivem $G\alpha_{i/o}$ -Protein assoziiert sind. PTX ist das Toxin des Bakteriums *Bordetella Pertussis* und führt über eine ADP-Ribosylierung der α -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins zu dessen Inaktivierung (Parolaro et al., 1990). δ OR, κ OR und μ OR können mit der Familie der $G\alpha_{i/o}$ -Proteine interagieren. Dazu gehören $G\alpha_i$, $G\alpha_o$ und $G\alpha_z$ (Connor und Christie, 1999). Die Familie der $G\alpha_{i/o}$ -Rezeptoren kommt vor allem in neuronalem Gewebe vor. $G\alpha_z$ ist PTX-insensitiv, seine physiologische Funktion ist noch nicht vollständig geklärt (Ho und Wong, 1998). Morphinadministration führt im Tiermodell und im Menschen zu Analgesie (Yaksh und Rudy, 1976, Onofrio und Yaksh, 1990) und die synaptische Übertragung im Hinterhorn des Rückenmarks wird durch Opioide beeinflusst. Opioide vermindern die Neurotransmitterausschüttung aus primär-sensorischen Neuronen (Collin et al., 1991, Kangrga und Randic, 1991). Eine Aktivierung von Opioidrezeptoren führt zu Veränderungen an Ionenkanälen. So kommt es zu einer Inaktivierung von Kalziumkanälen und einer Aktivierung von Kaliumkanälen. (Parolaro et al., 1990, Law et al., 2000). (Abbildung 3.7)

Opioide blockieren präsynaptische N-Typ Kalziumkanäle und somit den Kalziumeinstrom, was die Transmitterausschüttung hemmt (Law et al., 2000, Lopez und Raingo, 2012, Glaum et al., 1994, Kohno et al., 1999). Außerdem werden postsynaptisch Kaliumkanäle geöffnet. Es handelt sich um *G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel* (GIRK)-Kanäle, welche über die $\beta\gamma$ -Einheit von GPCR aktiviert werden. (Williams et al., 2001, Yoshimura und North, 1983). Diese „einwärts gleichrichtenden“ Kaliumkanäle führen spannungsabhängig oder G-Protein-abhängig zu einem Kaliumeinstrom in die Zelle (Baronas und Kurata, 2014). Dadurch wird die Zellmembran hyperpolarisiert. Durch die geringere intrazelluläre Ladungsdichte entfernt sich das Potential vom Ruhemembranpotential und auch von der Schwellenspannung, die zum Auslösen einer Depolarisation und somit eines Aktionspotentials nötig ist. Somit wird die Zelle schwerer erregbar und die synaptische Schmerzweiterleitung durch Opioide inhibiert (Law et al., 2000).

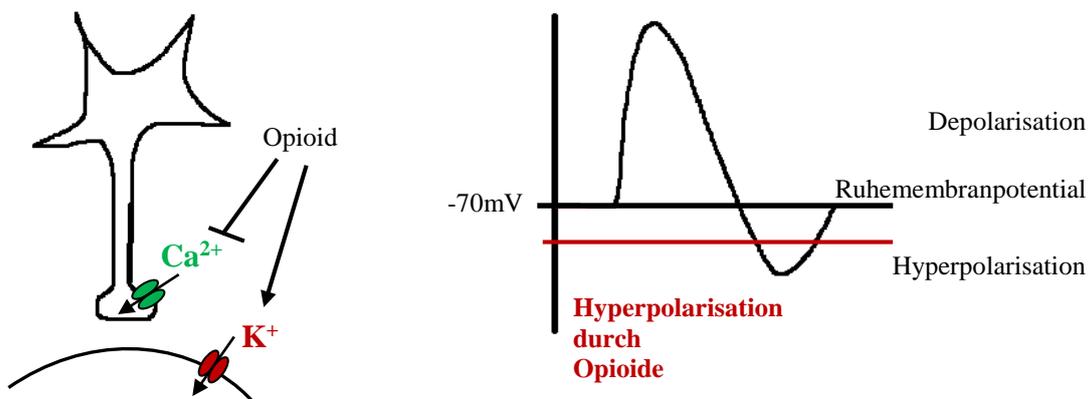


Abbildung 3.7: Beeinflussung von Ionenströmungen durch Opioide

Durch Inaktivierung von Kalziumkanälen und Aktivierung von Kaliumkanälen wird die intrazelluläre positive Ladungsdichte reduziert und die Zelle hyperpolarisiert. Der Zustand entfernt sich vom Ruhemembranpotential und von der zur Auslösung einer Depolarisation nötigen Schwellenspannung. Dadurch wird die Generierung eines Aktionspotentials unwahrscheinlicher und die Zelle schwerer erregbar.

3.5.1 Signalkaskaden nach Aktivierung von $G\alpha_{i/o}$ gekoppelten GPCR durch Opiode

3.5.1.1 Intrazelluläre Signaltransduktionsmechanismen

G-Protein gekoppelte Opioidrezeptoren können Ionenkanäle beeinflussen (North et al., 1987, Gross et al., 1990). Außerdem führt die Aktivierung von μ OR, κ OR und δ OR zur Inhibition der AC und somit zur Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels (Childers, 1991). Alle Opioidrezeptorsubtypen interagieren mit $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen (Standifer und Pasternak, 1997). Opioidrezeptoren können über den $\beta\gamma$ -Komplex von $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen auch PLC β aktivieren (Murthy und Makhlof, 1996) und beeinflussen die PI3K-Aktivität (Narita et al., 2002). Opioidrezeptoren erhöhen über ihre $\beta\gamma$ -Untereinheit die IP $_3$ -Konzentration und somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration. Außerdem aktivieren sie die PKC (Kramer und Simon, 1999, Smart und Lambert, 1996).

Bei einer höheren Rezeptordichte in überexprimierenden Systemen führt der Rezeptorüberschuss dazu, dass ein geringerer Anteil der Rezeptoren belegt sein muss, um den vollen Effekt zu erlangen. Dadurch könnte die Wirkstärke eines Liganden abhängig davon sein, ob es sich um ein endogenes oder ein überexprimierendes System handelt (Piros et al., 1996). Opioidrezeptoren können an verschiedene Untergruppen von G-Proteinen koppeln und bei Aktivierung unterschiedliche Signalkaskaden anstoßen. Auch der zellspezifisch vorherrschend exprimierte Ionenkanal-Subtyp hat einen Einfluss auf die Ligandenwirkung (Piros et al., 1996).

Für den δ OR ist in NG108-15 Zellen eine Assoziation mit $G\alpha_i$ und $G\alpha_o$ gezeigt (Offermanns et al., 1991). Der μ OR interagiert in SH-SY5Y Zellen mit $G\alpha_i$ und $G\alpha_o$ -Proteinen (Carter und Medzihradsky, 1993) und kann in HEK293 Zellen außerdem über die $\beta\gamma$ -Untereinheit des $G_{\alpha i}$ -Proteins die AC Typ II stimulieren (Chan et al., 1995). Für den κ OR ist eine Kopplung an $G_{\alpha i}$ -Protein gezeigt (Ueda et al., 1990).

Opioidrezeptorsubtypen scheinen spezifische Signalwege zu präferieren. So ist etwa die intrazelluläre Kalziumfreisetzung durch Opiode vor allem über den δ OR vermittelt, während die Aktivierung von Akt über PI3-Kinase vermehrt durch μ OR-Liganden induzierbar ist (Law et al., 2000).

Aktivierung von μ OR, δ OR und κ OR kann zu Aktivierung der MAPK-Kaskade führen (Schulz et al., 2004, Kramer und Simon, 2000). Dabei ist die ERK-1/2-Phosphorylierung durch Morphin und durch den μ OR-spezifischen Agonist DAMGO unabhängig von der Rezeptorinternalisierung, jedoch PKC und CamK abhängig (Bilecki et al., 2005). Die Erhöhung der intrazelluläre Kalziumkonzentration und die PKC-Aktivierung durch Opiode erfolgt über die $\beta\gamma$ -Untereinheit (Kramer und Simon, 1999, Smart und Lambert, 1996).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Opiode auch über β -Arrestin eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs erzielen können, was zu einer Translokation der ERK-1/2 in den Zellkern und zur Transkriptionsregulation führen kann (Zheng et al., 2008).

3.5.1.2 Genregulation durch Opiode

Es ist bekannt, dass schon kurzfristige akute Morphinadministration im Tiermodell Genexpressionsveränderungen induzieren kann. Die Expression der *immediate early genes* (IEG) *c-fos*, *junB* und *c-jun* wird in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte in unterschiedlicher Intensität durch Morphin induziert (Garcia et al., 1995). IEG sind Gene deren Expression nach Ligandenstimulation schnell und transient erfolgt. Bei den Genprodukten handelt es sich um Enzyme oder Transkriptionsfaktoren, die wiederum längerfristige Transkriptionsveränderungen induzieren können. Die IEG der *jun* und *fos* Familie bilden nach ihrer Expression Dimere, die als *activating protein-1* (AP-1) bezeichnet werden und als Transkriptionsaktivatoren verschiedenster Proteine dienen. Die Familie der AP-1 Transkriptionsaktivatoren induziert längerfristige Veränderungen, die im Rahmen der neuronalen Plastizität von Bedeutung sind. So werden Gedächtnisbildung und drogeninduzierte Verhaltensänderungen mit AP-1 in Zusammenhang gebracht (Perez-Cadahia et al., 2011). Im Promotorbereich von *c-fos* finden sich sowohl SRE als auch CRE Motive (Janknecht et al., 1995), sowie eine SIE- und ein AP-1 Sequenz (He und Ping, 2009). Morphin und DPDPE können über Aktivierung des endogenen δ OR in NG108-15 Zellen eine PKC- und CamK-abhängige CREB-Phosphorylierung induzieren (Bilecki et al., 2000). Über den μ OR konnte in μ OR-überexprimierenden Neuro2a Zellen eine CREB-Phosphorylierung durch Morphin

gezeigt werden, hier induzieren Morphin und DAMGO auch CRE-abhängige Genexpression (Bilecki et al., 2004). Die Rolle des ERK-1/2/TCF/SRF-Signalweges für die Genregulation durch Opioide ist weniger eindeutig. Einerseits konnte gezeigt werden, dass in einem μ OR-Überexpressionssystem eine Elk-1-Reporter-Aktivierung durch Morphin möglich ist. In diesen μ OR-CHO-Zellen wird auch eine morphinininduzierte Expression von c-fos und junB beschrieben (Shoda et al., 2001). Andererseits kann Morphin in μ OR-überexprimierenden HEK293 Zellen zwar ERK-1/2 phosphorylieren, nicht jedoch einen Elk-1-Reporter aktivieren. In diesem Zellsystem kann aber Etorphin eine β -arrestinvermittelte ERK-1/2-Aktivierung induzieren, die wiederum zur Elk1-Aktivierung führt. Die morphinininduzierte ERK-1/2-Aktivierung wird aber über PKC-vermittelt. Der Signalweg, der zur ERK-1/2-Phosphorylierung führt scheint hier darüber zu entscheiden ob eine Translokation in den Zellkern und somit Genregulation durch die ERK-1/2 erfolgen kann (Zheng et al., 2008).

Die Ergebnisse für die CRE-Aktivierung durch Morphin stammen aus einem endogenen Zellsystem, während die Informationen zu Morphin und Elk-1-Aktivität in Überexpressionssystemen gewonnen wurden. Bedenkt man, dass Signalkaskaden sich gewebsabhängig unterscheiden können und dass endogene Systeme sich wiederum von Überexpressionssystemen unterscheiden können, so lassen sich die beobachteten, scheinbar widersprüchlichen Signalkaskadenaktivierungen erklären. Ein Einfluss von Morphin auch auf den ERK-1/2/TCF/SRF-Signalweg ist denkbar.

3.6 Toleranzentwicklung

Die stärkste Analgesie wird durch den μ OR vermittelt, klinisch verwendeten Opioide sind daher in der Regel μ -Liganden. Jedoch werden durch den μ OR auch die stärksten unerwünschten Wirkungen in Hinblick auf Toleranz und Abhängigkeit vermittelt (Kieffer und Gaveriaux-Ruff, 2002). Abhängigkeit oder Sucht beschreibt das unkontrollierbare Verlangen nach einer Substanz (Rosenberg, 2009). Unter Toleranz versteht man einen verminderten Effekt eines Liganden nach dessen wiederholter Applikation. Alle Opioide, die als Analgetika eingesetzt werden, können Toleranz und Abhängigkeit induzieren

(Morgan und Christie, 2011). Dabei scheinen die Applikationsform und die Wirkstärke des Liganden am Rezeptor über die Stärke der Toleranzentwicklung zu entscheiden. So induzieren Liganden mit großer intrinsischer Aktivität im Tiermodell und im Zellsystem eine geringere Toleranzentwicklung. Als Grund dafür wird die größere Rezeptorreserve bei hochpotenten Liganden angeführt: Je potenter der Ligand, desto geringer ist der Anteil an Rezeptoren der besetzt werden muss, um einen Effekt zu erzielen. Somit bleibt auch die Anzahl der desensitisierten Rezeptoren zu einem Zeitpunkt kleiner (Christie, 2008, Stevens und Yaksh, 1989).

Bei Abhängigkeit unterscheidet man zwischen einer psychischen und einer physischen Form, wobei als psychisch das Verlangen nach der Droge und die ständige Beschäftigung damit bezeichnet wird. Physische Abhängigkeit ist durch das Vorhandensein von Entzugssymptomen bei Nichteinnehmen der Substanz definiert (Taylor und Fleming, 2001). Für die Entstehung von Toleranz und physischer Abhängigkeit macht man diverse zelluläre Adaptationsmechanismen verantwortlich, die in Folge chronischer Opioidgabe auftreten. So kommt es zu Veränderungen des Rezeptorzustandes, der G-Protein-Rezeptor-Interaktion, der Signalkaskaden und der Transkriptionsfaktoren (Taylor und Fleming, 2001).

3.6.1 Veränderungen an Rezeptoren und Signaltransduktionskaskaden

Der erste Schritt auf dem Weg zu Toleranzentwicklung ist die Rezeptordesensibilisierung (3.4.1). Über Phosphorylierung durch GRK oder andere Kinasen wie PKA und PKC wird der Rezeptor desensibilisiert und kann nicht mehr mit G-Proteinen interagieren. Phosphorylierung durch GRK ermöglicht die Bindung von Arrestin, wodurch es Clathrin-abhängig zur Rezeptorinternalisierung kommen kann (Pierce et al., 2002, Oakley et al., 1999). Nach seiner Internalisierung kann der Rezeptor lysosomal abgebaut werden (Shenoy et al., 2001) oder es folgen Resensibilisierung und die Rückkehr zur Plasmamembran (Zhang et al., 1997). Etwa 20 % der Rezeptoren werden abgebaut und

stehen der Zelle nicht mehr zur Verfügung, man spricht von Rezeptor-*downregulation* (Bailey und Connor, 2005).

Rezeptorphosphorylierung nach Morphinstimulation erfolgt vorrangig durch eine PKC-Aktivierung und zieht nur schwache Rezeptordesensibilisierung und kaum Rezeptorendozytose nach sich (Sternini et al., 1996, Yu et al., 1997, Kovoov et al., 1998). Dies wird als Erklärung für das starke Abhängigkeitspotential von Morphin genutzt, da auch die auf Endozytose folgende Resensibilisierung des Rezeptors ausbleibt (Ueda et al., 2003). Geringe Desensibilisierung führt zu kontinuierlicher Signaltransduktion, wodurch es intrazellulär zu adaptiven Mechanismen kommt, welche das molekulare Korrelat für Toleranzentwicklung und Entzugserscheinungen sind (Dang und Williams, 2005, Whistler et al., 1999). Diese langfristigen Veränderungen betreffen Enzyme, Botenstoffe und Transkriptionsfaktoren. So führt eine Superaktivierung der AC zu erhöhten cAMP-Spiegeln und einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB (Martini und Whistler, 2007, Bailey und Connor, 2005). Jedoch scheint die Fähigkeit von Morphin eine Rezeptorendozytose zu initiieren vom Zellsystem bzw. der zellulären Umgebung *in vivo* abhängig zu sein. So könnte die Expressionsstärke von β -Arrestin und GRK oder der vorherrschende β -Arrestin-Subtyp in verschiedenen Geweben zu Differenzen in der morphininduzierten Endozystosestärke führen (Haberstock-Debic et al., 2005) (**Abbildung 3.8**).

Langzeitmorphinbehandlung verändert den AC-Signalweg dahingehend, dass Morphin nun anstatt eines inhibitorischen Effektes auf die AC (über $G\alpha_{i/o}$ -Kopplung) einen stimulatorischen Effekt (über $G\alpha_s$ -Kopplung) ausübt. Es kommt im Zusammenhang mit chronischer Opioidgabe zu einer Superaktivierung der AC welche vor allem bei akutem Opioidentzug auffällt, wobei man aber davon ausgeht, dass diese Situation sich noch unter Opioidgabe einstellt (Gintzler und Chakrabarti, 2000). Außerdem kann chronische Opioidgabe auch direkt zu einer veränderten G-Protein-Kopplung des Rezeptors führen. Anstatt mit dem inhibitorischen $G\alpha_{i/o}$ zu interagieren, kommt es zu einer Interaktion des μ OR mit $G\alpha_s$, was zur Stimulation der AC führt (Gintzler und Chakrabarti, 2006). Darüber hinaus wird durch verstärkte Translokation der PKC γ an die Zellmembran in die Nähe des Rezeptors die Phosphorylierung von $\beta\gamma$ -Untereinheiten und der AC selbst verstärkt. Durch diese Phosphorylierungen ist die $\beta\gamma$ -Untereinheit in der Lage die AC zu stimulieren, während diese selbst sensitiver für den Stimulus wird (Shy et al., 2008).

Daneben werden auch die GRK-Isoformen 2 und 3 und β -Arrestin durch chronische Morphingabe phosphoryliert. Nach Phosphorylierung wird die GRK an die Membran transloziert, aber eine Phosphorylierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit vermindert die Interaktion zwischen GRK und dem $\beta\gamma$ -Komplex, wodurch dieser stattdessen stärker für Interaktionen mit der AC zur Verfügung steht (Chakrabarti et al., 2001).

Chronische Morphingabe hat Auswirkungen auf den MAPK-Signalweg, der wiederum über seine Effekte auf Genregulation langfristige Veränderungen in der Zelle induzieren kann (Ma et al., 2001). Es konnte eine durch chronische Morphinapplikation bedingte Aktivierung von ERK-1/2 in diversen Gehirnregionen von Ratte und Maus nachgewiesen werden, darunter auch in für Sucht bedeutsamen Regionen wie *Nucleus accumbens*, Tegmentum, Kortex und Hippocampus. Im Rückenmark und in primär-sensorischen Neuronen kommt es ebenfalls zu einer ERK-1/2 Phosphorylierung bei chronische Opioidgabe (Chen und Sommer, 2009). Auch für andere Mitglieder der MAPK-Familie wie p38 und JNK ist dies für DRG-Neurone gezeigt (Ma et al., 2001).

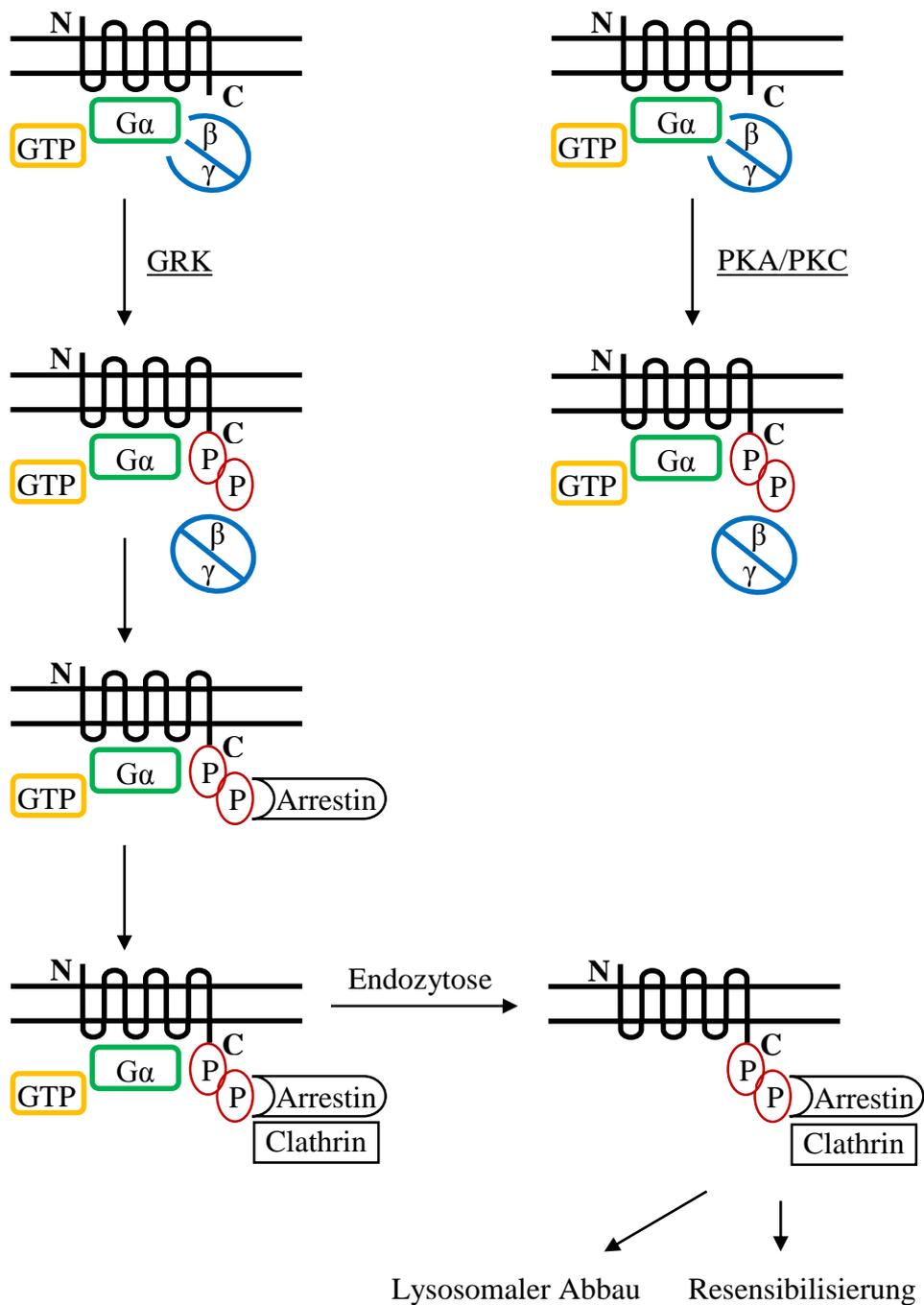


Abbildung 3.8: Endozytose und *downregulation* an GPCR nach Aktivierung durch Opioid

Linke Seite: Nach Rezeptorphosphorylierung durch GRK und Arrestinbindung kommt es Clathrin-abhängig zur Endozytose des Rezeptors. Ein Teil der Rezeptoren wird nun intrazellulär lysosomal abgebaut, während der Rest dephosphoryliert wird und resensibilisiert an die Plasmamembran zurückkehrt.

Rechte Seite: Nach Rezeptorphosphorylierung durch PKA/PKC wird der Rezeptor desensibilisiert und kann nicht mehr mit G-Proteinen interagieren. Eine Internalisierung bleibt in diesem Fall jedoch aus.

3.6.2 Veränderungen auf Genregulationsebene

Wiederholte Administration einer Substanz kann zu adaptativen Veränderungen auf zellulärer Ebene führen. Bei Opioidtoleranz scheinen besonders Adaptationsvorgänge im *Nucleus accumbens* zu Abhängigkeit zu führen, da die von hier ins Pallidum projizierenden Neurone eine wichtige Rolle bei psychostimulatorischen Verstärkungsprozessen spielen (Koob und Bloom, 1988). Längerfristige Veränderungen durch repetitive Drogenadministration betreffen meist Neurotransmission und neuronale Plastizität. So sind erhöhte Dopaminspiegel im mesolimbischen Belohnungssystem das molekulare Korrelat der euphorisierenden Wirkung von Drogen (Gupta und Kulhara, 2007). Langfristige Umbauvorgänge werden über Genexpression reguliert (Nestler, 1997). Die Expression von IEG, Dynamin und γ -Aminobuttersäure (GABA)-bzw. Glutamatrezeptoren verändert sich morphinabhängig (Ammon-Treiber und Höllt, 2005). IEG sind Gene deren Expression nach Ligandenstimulation schnell und transient erfolgt und deren Genprodukte, Enzyme oder Transkriptionsfaktoren, wiederum längerfristige Transkriptionsveränderungen induzieren können. (Perez-Cadahia et al., 2011). Chronische Morphingaben führen im *Nucleus accumbens* der Ratte zur verstärkter mRNA-Expression von Proteinen die eine Rolle für Neurotransmission, Energiehaushalt und Zytoskelett spielen (Li et al., 2006). Im Kortex der Ratte kommt es morphinabhängig zur vermehrten mRNA-Expression von G-Proteinen (Kaewsuk et al., 2001). In der *Nucleus caudatus*-Putamen-Region und im Mittelhirn der Ratte finden sich nach chronischer Morphinstimulation erhöhte mRNA-Spiegel des Dopamin D3 Rezeptors (Spangler et al., 2003). Im Kortex von Ratten induziert chronische Morphinadministration diverse Genveränderungen, die vor allem Hitzeschockproteine betreffen (Ammon et al., 2003). Im *Striatum* der Maus findet sich nach Morphinstimulation eine verstärkte Genexpression von Fos und Npas4 (Piechota et al., 2010). Außerdem führt Morphinadministration in der Ratte zu erhöhter Fos-Proteinexpression in *Striatum*, *Amygdala*, *Nucleus accumbens* und einigen Kortexarealen (Taracha et al., 2008). Im *Locus coeruleus* der Ratte induziert chronische Morphingabe erhöhte Proteinspiegel von GRK und β -Arrestin (Terwilliger et al., 1994). In SH-SY5Y Zellen, im Putamen der Maus und in synaptischen Membranen der Ratte führt chronische Morphingabe μ OR-vermittelt zu erhöhten Dynaminspiegeln (Noble et al., 2000).

Für die Transkriptionsfaktoren CREB, Fos B und Δ Fos B konnte bei Mäusen im Hinterhorn des Rückenmarks eine Induktion durch Morphin gezeigt werden (Li und Clark, 1999). Bei Δ Fos B handelt es sich um eine c-terminal verkürzte Splicevariante von Fos B, die extrem stabil ist und von der bekannt ist, dass sie nach wiederholter Morphingabe akkumuliert. Δ Fos B spielt auch bei der Sensibilisierung für Kokain eine Rolle. Es reguliert die Genexpression einer Unterform des Glutamaterezeptors wodurch die Zelle schlechter erregbar, aber sensitiver für inhibitorische Drogen wird. Wegen seiner starken Akkumulation im *Nucleus accumbens* und *Striatum* wird Δ Fos B als molekulares Korrelat für Sucht diskutiert (Nestler et al., 2001). Für DRG-Neurone konnte in morphinabhängigen Ratten eine Induktion von Proteinen des Energiehaushalts, des Zytoskeletts, der Signaltransduktion, des Proteinabbaus und von Hitzeschockproteinen nachgewiesen werden (Li et al., 2009).

Auch kurzfristige Morphinstimulation kann Genexpressionsveränderungen bewirken. So induziert Morphin akut eine c-Fos Expression im Gehirn der Ratte, die mRNA ist schon 45 min nach Morphingabe messbar, c-Fos-Protein ist nach 3 h erhöht (Chang et al., 1988). Eine mRNA-Expressionsinduktion der IEG c-Fos und Jun B ist auch auf zellulärer Ebene 20 min nach Morphinadministration gezeigt worden (Shoda et al., 2001).

Gewebe	Veränderung	Quelle
Kortex (Ratte) Nach 10 d Morphin	Genexpressionsveränderungen: Hitzeschockproteine	(Ammon et al., 2003)
<i>Striatum</i> (Maus) Nach 4 h Morphin	Genexpressionsveränderungen: Monomer G-Proteine Enzyminhibitoraktivität Entwicklungsprozessregulation	(Piechota et al., 2010)
Präfrontaler Kortex (Ratte) Nach 14 d Morphin	mRNA-Expressionsinduktion: G-Proteine	(Kaewsuk et al., 2001)
<i>Nucleus caudatus</i> -Putamen, Mittelhirn (Ratte) Nach 7 d Morphin	mRNA-Expressionsinduktion: Dopamin D3 Rezeptor	(Spangler et al., 2003)
<i>Striatum, Amygdala</i> (Ratte) Nach 14 d Morphin	Fos-Proteinexpression Proteine für Neurotransmission, Energiehaushalt, Zytoskelett	(Taracha et al., 2008) (Li et al., 2006)
<i>Locus coeruleus</i> (Ratte) Nach 5 d Morphin	Proteinexpression β ARK, β -Arrestin	(Terwilliger et al., 1994)
SH-SY5Y-Zellen Putamen (Maus) Synaptische Membran (Ratte) Nach 6 d Morphin	Dynamin-Proteinexpression	(Noble et al., 2000)
Hinterhorn des Rückenmarks (Maus) Nach 5 d Morphin	Proteinexpression CREB, Fos B, Δ Fos B	(Li und Clark, 1999)
DRG-Neurone (Ratte) Nach 28 d Morphin	Proteine für Energiehaushalt, Zytoskelett, Signaltransduktion, Proteinabbau, Hitzeschockproteine	(Li et al., 2009)

Tabelle 3.3: Expressionsveränderungen durch chronische Morphinadministration

Die Zeitangaben beziehen sich jeweils auf die Dauer der Morphinadministration bevor die Experimente durchgeführt wurden.

Die morphininduzierten Genveränderungen werden hauptsächlich dem CREB-CRE-Signalweg zugeschrieben. Der Transkriptionsfaktor CREB spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Morphinabhängigkeit. So resultiert aus einer inaktivierenden CREB-Mutation im Mausmodell geringere Toleranzentwicklung und abgeschwächte Entzugssymptomatik (Maldonado et al., 1996). CREB beeinflusst über die CRE-Aktivierung die Opioidabhängigkeit, jedoch ist nicht klar, wie es dann zu synaptischen Veränderungen und resultierenden Verhaltensänderungen kommt (Zhou und Zhu, 2006). CREB-Aktivierung erfolgt durch Phosphorylierung durch PKA, PKC, CamK II oder ERK-1/2 (Shaywitz und Greenberg, 1999). Opioidrezeptoren sind mit G-Proteinen vom Typ $G\alpha_{i/o}$ gekoppelt (Connor und Christie, 1999). Ihre Aktivierung führt zu Inhibition der PKA und zur Aktivierung von PKC, ERK-1/2 und CamK (Taylor und Fleming, 2001). Opioidinduzierte Signalwege haben einen aktivierenden (ERK-1/2, PKC, CamK) aber auch einen hemmenden (PKA) Einfluss auf die CREB-Aktivität. Daher können die Effekte von Opioiden auf die CRE-abhängige Genexpression möglicherweise in verschiedenen Zell- oder Gewebearten abhängig vom jeweilig dominierenden Signalweg unterschiedlich ausfallen.

Für adaptive neuronalen Veränderungen scheinen IEG eine wichtige Rolle zu spielen, da sie durch ihre Expression weitere Transkriptionsfaktoren induzieren und somit langfristig die Genregulation beeinflussen (3.5.1.2). Im Promotorbereich vieler IEG finden sich jedoch neben CRE auch SRE-Sequenzen, so dass SRF und CREB in Neuronen beide eine wichtige Rolle für Zellmigration, Neuritenwachstum und Axonaussprossung spielen. SRF ist besonders wichtig für synaptische Plastizität, Lernvorgänge und Gedächtnis (Knoll und Nordheim, 2009). Gerade die synaptische Plastizität ist auch für die Entstehung von Abhängigkeit relevant (Nestler, 1997). Daher könnte der ERK-1/2/TCF/SRF-Signalweg bei Entstehung von Morphintoleranz wichtig sein. Jedoch sind über diesen im Kontext mit Morphin bislang nur wenige und zudem widersprüchliche Informationen vorhanden (3.5.1.2).

3.7 Ziele der Arbeit

Primär-sensorische Neurone nehmen sensorische Informationen auf und leiten sie an ein ZNS-Neuron weiter, wobei der überwiegende Teil dieser Informationen über das Hinterhorn des Rückenmarks und ein kleiner Teil über Hirnnerven zum Gehirn geleitet wird (Silverthorn, 2009, pp 481-483). Die Zellkörper dieser peripheren primär-sensorischen Neurone bilden Spinalganglien, englisch *dorsal root ganglion* (DRG). DRG-Neurone exprimieren Opioidrezeptoren (Hassan et al., 1993), sind der periphere Angriffspunkt für Opioide im nozizeptiven System und der periphere Ort für die Entstehung von Opioidtoleranz, denn auch hier findet nach repetitiver Opioidadministration eine Toleranzentwicklung statt (Hong et al., 2010, Belanger et al., 2002, Crain et al., 1988).

Eine wichtige Rolle für die Entstehung von Opioidtoleranz und Abnahme der Opioidwirkung spielen Veränderungen auf Protein- und Transkriptionsebene (Li und Clark, 1999, Chakrabarti et al., 2001, Ammon-Treiber und Höllt, 2005, Gintzler und Chakrabarti, 2000). Genregulation durch Morphin ist jedoch hauptsächlich im Gehirn untersucht worden (Taylor und Fleming, 2001), während über DRG-Neurone in diesem Kontext wenig bekannt ist. Kenntnisse über die Effekte von Morphin auf die Genexpression in DRG-Neuronen könnten von großer Relevanz für das Verständnis für Genregulation durch Morphin allgemein sein und zusätzlich Informationen darüber liefern, ob es eventuelle Unterschiede in der opioidinduzierten Genregulation zwischen DRG-Neuronen und zerebralen Neuronen gibt.

Genregulation durch Opioide wird hauptsächlich dem Transkriptionsfaktor CREB zugeschrieben (Widnell et al., 1996, Zhou und Zhu, 2006). $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren führen nach ihrer Aktivierung zu verringerter PKA-Aktivität (Connor und Christie, 1999, Childers, 1991). Da PKA einen wichtigen CREB-Aktivator darstellt können Opioide über diesen Signalweg theoretisch auch zu einer CRE-Inhibition führen. Daher stellt sich die Frage nach anderen, bislang in diesem Zusammenhang weniger beachteten Signalwegen, über die Opioide auf Genexpression Einfluss nehmen können. Morphininduzierte Expression von IEG (Ammon-Treiber und Höllt, 2005) stellt ein wichtiges Korrelat für Opioidabhängigkeit dar. IEG-Expression ist neben CREB auch TCF/SRF-vermittelt. Für den TCF Elk-1 ist bekannt, dass er für Genregulation in DRG-

Neuronen wichtig ist (Kerr et al., 2010) und dass eine Elk1-Phosphorylierung im Gehirn zu molekularen Mechanismen der Kokain-Abhängigkeit beiträgt (Besnard et al., 2011a).

Im Rahmen dieser Arbeit sollten opioidabhängige, zu Genregulation führende Signalwege in DRG-Neuronen untersucht werden, um

- A) Transkriptionsregulation durch Opioide genauer zu verstehen und
- B) Einblicke in eventuell DRG-spezifische Mechanismen zu erhalten.

Als Modellsystem dienten die F11 Zelllinie, die für die Untersuchung von Vorgängen in DRG-Neuronen als geeignet gilt (Francel et al., 1987, Puttfarcken et al., 1997, Boland et al., 1991, Jung und Miller, 2008, McIlvain et al., 2006) und kultivierte primäre embryonale DRG-Neurone der Ratte.

4 Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Methoden umfassen die Kultivierung eukaryotischer Zellen, Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien, Genexpressionsanalysen mit Hilfe von Reporterstudien und Proteinnachweis mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot. Kalziummessung erfolgte durch kalziumabhängige Fluorochrome, das endogene Rezeptorprofil von Zellen wurde in radioaktiven Ligandenbindungsstudien ermittelt. Der cAMP-Akkumulations-Assay diente der Analyse der Effekte von GPCR auf die AC. Mit quantitativer Real-Time-PCR wurden mRNA-Expressionsveränderungen detektiert, wobei zuvor RNA Isolierung und reverse Transkription durchgeführt wurden. PCR und Agarosegelelektrophorese kontrollierten den Erfolg der reversen Transkription und die Reinheit der isolierten RNA.

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Absaugflasche BVC Vario	Vacuubrand GmbH (Wertheim)
Agarosegelelektrophorese-System	PeqLab (Erlangen)
Dowex/Aluminiumoxid-Chromatographie-Säulen	BioRad (München)
Bakterien-Inkubator	Heraeus (Hanau)
Bakterienschüttler MaxQ 6000	Thermo (Dreieich)
Western-Blot-Apparatur	Walther-Straub-Institut, Werkstatt (München)
Cell-Harvester	Brandel (Gaithersburg, USA)
Chemilumineszenzsystem (ChemiSmart)	Pequlab (Erlangen)
Fluostar Omega	BMG Labtech GmbH (Offenburg)

4 Material und Methoden

Flüssigkeitsszintillationszähler Winspectral 1414	Perkin Elmer (Boston, USA)
Hamilton-Spritze	Hamilton (Höchst)
Lichtmikroskop	Olympus (Hamburg)
Multipette	Eppendorf (Hamburg)
Magnetrührer (Barnstead Thermolyne)	Thermo Fisher Scientific (Dreieich)
Mikrowelle	Severin (Sundern)
Neubauer-Zählkammer	Brand (Werthelm)
PCR-Maschine Primus 25 (96 Universal Gradient)	PeqLab (Erlangen)
pH-Meter	Mettler-Toledo (Gießen)
Photometer (Biophotometer Plus)	Eppendorf (Hamburg)
Pipetten	Gilson (Middelton, USA) PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Pipettierhilfen	Hirschman Laborgeräte (Herrenberg)
RT PCR Instrument	Light-Cycler, Roche (Mannheim)
Protein-Gelelektrophorese-System (Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis)	BioRad (München)
Spannungsquelle (Power Pack EV231)	Peq Lab (Erlangen)
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo (Dreieich)
Taumler (Polymax)	Heidolph (Schwabach)
Tiefkühlschrank -80°C	New Brunswick Scientific, Eppendorf (Hamburg)
Thermoblock (TS-100 ThermoShaker SC20)	Peq Lab (Erlangen)
Tray Cell	Hellma (Müllheim)
Ultraschall-Generator	MSE (London)
UV-Transluminator-Foto-Dokumentationssystem	Peq Lab (Erlangen)

4 Material und Methoden

Vortexer (MS3 basic)	IKA (Staufen)
Waage	Kern (Balingen)
Wasserbad	Memmert (Schwabach)
Zellkultur-Inkubator (HeraCell 240)	Heraeus (Hanau)
Zentrifugen	Thermo Scientific Pico 17 Heraeus (Hanau) Thermo Scientific Fresco 21 Heraeus (Hanau) Thermo Scientific Biofuge Stratos Heraeus (Hanau)

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Biospere Filter Tips	Sarstedt (Nümbrecht)
Cell harvester 96-Loch Messplatte	Brandel (Gaithersburg, USA)
Glasfaser-Filterpapier	Munktell (Bärenstein)
Folie für Western-Blot-Analyse (PE-Schlauchfolie)	Rische+Herfurth (Hamburg)
Messplatte 96-Loch	Greiner (Frickenhausen)
Midi-Säulen	Macherey-Nagel (Düren)
Mikroschraubröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Nitrocellulosemembran (Protran)	Whatmann (Dassel)
Pasteurpipetten	VWR (Darmstadt)
PCR Gefäße	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten 5ml/10ml/25ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettenspitzen 10µl/20µl/200µl/1000µl	Sarstedt (Nümbrecht)
Reagenz -und Zentrifugenröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)

4 Material und Methoden

Reaktionsgefäße 0,5ml/1,5ml/2ml	Sarstedt (Nümbrecht)
RT-PCR Folie	Roche (Mannheim)
RT-PCR Messplatte 96 Loch	Roche (Mannheim)
Szintillationsgefäße	Packard (Groningen, Niederlande)
Zellkultur 12-Loch-Platten	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Zellkultur 24-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkultur 6-Loch-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen 175cm ²	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen 100mm	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturschalen 200mm	Sarstedt (Nümbrecht)

4.1.3 Chemikalien

0,05% Trypsin/EDTA	Invitrogen (Darmstadt)
Acrylamid (Rotiphorese Gel 30)	Roth (Karlsruhe)
Agarose	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
bovines Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
RevertAid TM H Minus First Strand cDNA Synthese Kit	Fermentas (St. Leon-Rot)
DMEM	Invitrogen (Darmstadt)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
DNA Größenmarker (Gene Ruler 100bp)	Fermentas (St. Leon-Rot)
DNA Ladepuffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

4 Material und Methoden

DNA Purification-Kit	Macherey-Nagel (Düren)
dNTPs (Desoxyribonukleosidtriphosphat)	Fermantas (St. Leon-Rot)
EDTA (Ehylendiamintetraessigsäure)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
EGTA (Ethylenglykoltetraessigsäure)	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Fast Start SYBR Green Master	Roche (Mannheim)
Fetal Calf Serum (FCS)	Invitrogen (Darmstadt)
Forskolin (FSK)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
HAM's F-12 [+ Glutamin]	Invitrogen (Darmstadt)
HAT-Supplement	Invitrogen (Darmstadt)
Luminol (3-Aminophthalhydrazid)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Luciferase Assay Reagent	Promega (Madison, USA)
Neurobasal Medium	Invitrogen (Darmstadt)
NucleoBond®Xtra Midi Plasmid	Macherey-Nagel (Düren)
PBS (phosphate buffered saline)	Invitrogen (Darmstadt)
Pen/Strep/Neo-Solution	Invitrogen (Darmstadt)
Penicilin/Streptomycin (10.000U/ml; 10.000µg/ml)	Invitrogen (Darmstadt)
Poly-Lysin	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Poly-L-Ornithin 0,01%	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Pluronic F-127 (10% in H ₂ O)	Molecular Probes (Eugene, USA)
Ponceau S Lösung (in 3% TCA)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
PCR Primer	Metabion (Martinsried)
PromoFectin®	PromoKine GmbH (Heidelberg)
Proteinbestimmungs-Kit	BioRad (München)

4 Material und Methoden

Protein-Größenmarker (Page Ruler)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Quest Fluo-8 TM , AM	AAT Bioquest (Sunnyvale, USA)
RNAse freies Wasser	Fermentas (St. Leon-Rot)
Rotiblock	Roth (Karlsruhe)
Rotiszint eco plus	Roth (Karlsruhe)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
Taq Polymerase Dream Taq	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq Polymerase Puffer (10x)	Fermentas (St. Leon-Rot)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Roth (Karlsruhe)
Triton-x-100	Sigma-Aldrich (Deisenhofen)
TRIzol Reagent®	Invitrogen (Darmstadt)
β-Mercaptoethanol	Roth (Karlsruhe)

Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich (Deisenhofen) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

4.1.4 Liganden und Antikörper

Anti-ERK-1/2	Santa Cruz (CA, USA)
Anti-total ERK-2	Santa Cruz (CA, USA)
Anti-Phospo ELK-1 (Ser 383)	Cell Signalling (Danvers, USA)
Bradykinin	BioTrend, Zürich, Schweiz
Goat-anti-Mouse-IgG-HRP-Conjugate	BioRad (München)
Goat-anti-Rabbit-IgG-HRP-Conjugate	BioRad (München)
PD18-4352	Tocris bioscience (Bristol, UK)
Pertussis Toxin	Sigma Aldrich (Deisenhofen)

4.1.4.1 Opioidrezeptorliganden

nach (Dhawan et al., 1996, Itzhak und Pasternak, 1987)

CTAP D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Arg-Thr-Pen-Thr-NH ₂	Selektiver μ OR Antagonist	Tocris bioscience (Bristol, UK)
DAMGO [D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly-ol]-enkephalin	Selektiver μ OR Agonist	Tocris bioscience (Bristol, UK)
DPDPE D-Penicillamine(2,5)-enkephalin	Selektiver δ OR Agonist	Tocris bioscience (Bristol, UK)
DSLET [D-Ser ² , Leu ⁵ , Thr ⁶]-enkephalin	Gemischter μ OR/ δ OR Agonist	Tocris bioscience (Bristol, UK)
Morphinsulfat	Agonist an μ OR und δ OR mit 50fach höherer Affinität zum μ OR	Sigma Aldrich (St Louis, USA)
Naloxon-Hydrochlorid	Unselektiver inverser Agonist mit etwas stärkerer Affinität zum μ OR	Tocris bioscience (Bristol, UK)

4.1.5 Radioaktive Moleküle

2,8-[³ H]-Adenine	Perkin Elmer (Boston, USA)
N-Allyl-2,3-[³ H]-Naloxone	Perkin Elmer (Boston, USA)

4.1.6 Plasmide

Plasmide sind zirkuläre, extrachromosomal vorliegende, doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Moleküle die in Bakterien vorkommen. Sie enthalten Gene, die unabhängig von der genomischen DNA repliziert werden können, aber nicht essentiell für das Überleben des Organismus sind (Eitinger, 2007). Sie besitzen einen

Replikationsursprung, wodurch eine autonome Replikation möglich wird. Man kann Plasmide in Wirtsorganismen gezielt vermehren. Dafür enthalten sie ein Selektionsgen, z.B. eine Antibiotikaresistenz, wodurch Zellen die das Plasmid tragen von solchen ohne Plasmid unterschieden werden können (Watson et al., 2011). Außerdem findet sich mindestens eine Klonierungsstelle, um fremde DNA in das Plasmid einzubringen. Desweiteren können weitere Schnittstellen und Resistenzgene sowie Promotoren vorkommen. Plasmide dienen als Vektoren um DNA in eine Zelle einzuschleusen, sie sind in der Regel etwa zwei Kilobasen (kb) lang (Mülhardt, 2009, pp 152-154).

Hier wurden folgende Plasmide für Reporterstudien (4.2.2.1) verwendet:

ETS/SRE-SIE-AP-1-Luc

pFOS WT-GL3 Plasmid (für Details siehe:
<http://www.addgene.org/11983/>)

Der c-fos Promotor enthält spezifische *response elements*:

SIE Motiv (5'-TTCCCGTCAA-3')

ETS/SRE Motiv (5'-GGATGTCCATATTAGGACATC-3')

AP-1 Element (5'-TGAGTCA-3')

5xETS/SRE-Luc p5xSRE-Luciferase Reporter wurde dankenswerterweise
bereitgestellt von Susanne Muehlich (Muehlich et al., 2008)

fünf Wiederholungen des ETS/SRE-Motivs
(5'-GGATGTCCATATTAGGACATC-3')

CRE-Luc pAD-CRE-Fluc Plasmid mit sechs CRE Elementen (siehe 7.3)
(TGACGTCA) vor einem rabbit β -globin (BG) minimal Promotor

p0.2NxL Reporter wurde dankenswerterweise zur Verfügung gestellt von Dr.
Refugio Garcia-Villegas, Cinvestav-Pin, Mexico City, Mexico
(Garcia-Villegas et al., 2009)
Das Reportergenkonstrukt enthält eine Egr4-Bindestelle und ein
Ebox-Element. Dabei handelt es sich um ein regulatorisches
Element mit der Sequenz CACGTG (Boulende Sab et al., 2011)

4.1.7 Zellen und Nährmedien

Als Modellsystem dienten in dieser Arbeit F11 Zellen und NG108-15 Zellen. Es handelt sich um sekundäre immortalisierte Zelllinien. F11 Zellen sind aus der Fusion von embryonalen DRG-Neuronen der Ratte und NG18TG-2 Neuroblastomzellen der Maus entstanden (Platika et al., 1985a, Platika et al., 1985b, Fan et al., 1992). Sie wurden in Ham's F12 Medium mit 2 mM Glutamin, 15 % fetalem Kälberserum (FCS), Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin (HAT) Supplement und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Bei NG108-15 Zellen handelt es sich um eine Hybridzelllinie aus C6-BU-1 Gliomzellen der Ratte und NG18TG-2 Neuroblastomzellen der Maus (Augusti-Tocco und Sato, 1969). Diese wurden in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10 % FCS, HAT Supplement und Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert.

Außerdem wurden einige Experimente mit kultivierten primären embryonalen DRG-Neuronen durchgeführt. Es handelte sich um am 18. Tag der Embryonalentwicklung entnommene DRG-Neurone der Ratte. Diese wurden von einer Firma erworben (für Details siehe: http://www.innoprot.com/en_productos.asp?idsf=29&id=14&idp=122) und lagen bereits aufgereinigt und kryokonserviert in Suspension vor. Sie wurden in Neurobasal Medium mit 10 % FCS, B27-Supplement, 5 mM Glutamin und Penicillin/Streptomycin/Neomycin (Pen/Step/Neo-Solution) kultiviert.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die hier verwendeten sekundären immortalisierten Zelllinien wurden als adhärenente Monolage in Zellkulturflaschen bei 37 °C in wasserdampfgesättigter, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) enthaltender Atmosphäre kultiviert. Die Adhäsion zwischen

negativ geladener Zelloberfläche und Zellkulturflasche wird durch zweiwertige Kationen, vor allem Kalziumionen, und über Adhäsionsfaktoren der extrazellulären Matrix (EZM) vermittelt. Um Kontaktinhibition zu vermeiden und die Zellen ständig in der Proliferationsphase zu halten, wurden sie vereinzelt, wenn eine Konfluenz von etwa 80 % erreicht war. Dazu wurde das Medium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die Zellschicht vorsichtig mit 5 ml einer 37 °C warmen Phosphat gepufferter Salzlösung ohne Magnesium und Kalzium (*phosphate buffered saline*, PBS) gewaschen. Danach wurden 3 ml Trypsin/EDTA in die Flasche gegeben und die Flasche für 2-3 min bei 37 °C inkubiert, um optimale Proteaseaktivität des Trypsins zu erreichen. Trypsin katalysiert den Abbau der EZM, welche die Adhäsion der Zellen zum Boden der Zellkulturflasche vermittelt und der Komplexbildner Ethylendiamintetraacetat (EDTA) bindet Kalziumionen. Nach Abbau der EZM und Entfernung der für die Adhäsion wichtigen Kalziumionen lösen sich die Zellen ab. Die Zellen wurden nun in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen. Das im Medium enthaltene FCS wirkt als Trypsininhibitor, so dass der zytotoxische Effekt der Protease ausbleibt (Schmitz, 2009, pp 131-140). Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Röhrchen überführt und 3 min bei 1000 x g zentrifugiert. Danach konnte der Überstand abgesaugt und der Zellhaufen resuspendiert werden. Von dieser Zellsuspension konnten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt werden. Nun konnte die für den jeweiligen Versuch benötigte Zellzahl ausgesät werden. Um die Zellen weiter zu kultivieren, wurde ein Zehntel bis ein Fünftel der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturflasche ausgesät.

Primäre DRG-Neurone wurden nach dem Auftauen direkt auf die benötigte, mit Poly-Ornithin beschichtete (4.2.1.4) Zellkulturplatte ausgesät. Nach 4 h wurde ein erster Mediumwechsel durchgeführt, wobei drei Viertel des Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt wurden. Dann wurde das Medium alle 48 h gewechselt. Die Expression von Opioidrezeptoren nimmt bei DRG-Neuronen in Kultur stetig zu (Chen et al., 1997). Daher wurden diese erst nach etwa 5-7 Tagen in Kultur weiter verwendet.

4.2.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Zur Kryokonservierung der Zellen wurde diese abgelöst (4.2.1.1) und der durch Zentrifugation entstandene Zellhaufen in eisgekühltem Serum mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert. Die entstandene Suspension wurde sofort zu Aliquots à 1 ml in vorgekühlte Mikroschraubröhrchen überführt. Diese wurden 24 h bei -80 °C aufbewahrt, bevor sie zur Lagerung in flüssigen Stickstoff bei -196 °C überführt wurden. Beim Abkühlen der Zellen bilden sich zunächst extrazellulär Eiskristalle, wodurch die Konzentration zuvor gelöster Stoffe stark ansteigt und sich ein Gradient zwischen intra -und extrazellulärer Konzentration bildet. Daraufhin kommt es einerseits zur intrazellulären Eiskristallbildung, was zu einer mechanischen Schädigung der Zellstrukturen führt. Andererseits tritt Wasser entlang des Konzentrationsgradienten aus der Zelle aus, wodurch diese dehydriert. DMSO ist ein penetrierendes Gefrierschutzmittel, es dringt in die Zelle ein und verhindert die osmotische Dehydrierung der Zelle. Zusammen mit der stufenweisen Temperaturenniedrigung wird die Bildung von Eiskristallen verhindert (Schmitz, 2009, pp 193-199).

Zum Auftauen der Zellen wurde zunächst 20 ml 37 °C warmes Nährmedium in einer 200 mm Zellkulturschale vorgelegt. Dann wurde ein Mikroschraubröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz im 37 °C warmen Wasserbad angetaut, so dass die Zellsuspension noch nicht vollständig aufgetaut, aber in die Zellkulturschale dekantierbar wurde. Das Medium wurde, sobald die Zellen adhärent waren, meist innerhalb von 6 h, gewechselt um Reste des DMSO zu entfernen.

Zum Auftauen der primären DRG-Neurone wurden die in Mikroschraubröhrchen kommerziell erhältlichen Zellen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37 °C warmen Wasserbad vollständig aufgetaut. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Röhrchen überführt und das gewünschte Volumen des 37 °C warmen Nährmediums tropfenweise zugegeben. Die Zellen konnten dann auf die Poly-Ornithin beschichteten Zellkulturplatten ausgesät werden. Nach 4 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um toxisches DMSO zu entfernen, wobei drei Viertel des Mediums abgenommen und durch frisches ersetzt wurden.

4.2.1.3 Transfektion eukaryotischer Zellen

Transfektion bezeichnet das Einbringen von DNA in Zellen. Am Tag vor der Transfektion wurde pro Ansatz eine Millionen Zellen auf eine 100 mm Zellkulturschale ausgesät. Als Transfektionsreagenz wurde das kationisch-nicht-liposomale PromoFectin® verwendet und laut Herstellerangaben eingesetzt. Dazu wurden je 500 µl Serum -und antibiotikafreies Medium in zwei Reaktionsgefäßen vorgelegt. In einem Gefäß wurden 3-5 µg Plasmid-DNA verdünnt, in dem jeweils andere die dreifache Menge Transfektionsreagenz (9-15 µl). Dann wurden beide Lösungen vereinigt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, so dass sich Komplexe zwischen der negativ geladenen DNA und dem polykationischen Transfektionsreagenz bilden konnten. Die Lösung wurde nun langsam auf die Zellkulturschale getropft. Diese Transfektionsmethode beruht auf dem Prinzip der Lipofektion (Felgner et al., 1987), soll jedoch durch das Fehlen der Liposome weniger toxisch sein. Die Komplexe aus Plasmid-DNA und Transfektionsreagenz werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen und gelangen in das Endosom. Hier herrscht ein stark saures Milieu aber aufgrund der Protonenbindungskapazität des kationischen Komplexes führt dies nicht zu Hydrolyse der DNA. Durch diese Puffereigenschaft kommt es jedoch zu einem hohen osmotischen Druck im Endosom, wodurch dieses zerstört wird und die DNA-Promofectin®-Komplexe ins Zytosol gelangen. Über nicht genau bekannte Transportmechanismen gelangt die DNA in den Zellkern, und bewirkt transiente Proteinexpression der Plasmid-DNA (für Details siehe: <http://www.promokine.info/products/cell-transfection/promofectin-transfection-reagents/non-liposomal-transfection/#c402>). Die Zellen wurden 24 bis 48 h nach Transfektion für den entsprechenden Versuch eingesetzt.

4.2.1.4 Beschichtung von Zellkultur-Lochplatten

Um die Adhärenz von Zellen an Zellkultur-Lochplatten zu erhöhen werden diese mit dem polykationischen Poly-L-Lysin beschichtet. Dieses lagert sich an die Oberfläche der Zellkulturplatte an und ermöglicht durch seine positiv geladenen Aminogruppen eine elektrostatische Bindung mit anionischen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix und der Zelloberfläche (Mazia et al., 1975). Poly-L-Lysin wurde in steriltriertem Wasser gelöst

(100 µg/ml), bei -20 °C gelagert und vor Benutzung auf 37 °C erwärmt. Zum Beschichten wurde die gewünschte Menge pro Kavität auf die Zellkultur-Lochplatte gegeben. Nach 30 min Inkubation bei 37 °C wurde das Poly-L-Lysin abgesaugt und die Platten konnten zur Kultivierung von Zellen eingesetzt werden

Um primäre DRG-Neurone auf Zellkultur-Lochplatten zu kultivieren, mussten diese mit Poly-Ornithin beschichtet werden. Dazu erwärmte man die Lösung auf Raumtemperatur und tropfte dann die gewünschte Menge pro Kavität in die Vertiefungen der Lochplatte. Nach 60 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Poly-Ornithin wieder abgenommen, die Oberfläche mit sterilfiltriertem Wasser gespült und die Platte mit offenem Deckel getrocknet. Dann konnte die Zellkultur-Lochplatte für die Kultivierung von DRG-Neuronen benutzt werden.

4.2.2 Zellbiologische Methoden

4.2.2.1 Reporterstudien

Mit Hilfe einer Reporterstudie kann man Genexpression qualitativ und quantitativ messen und Effekte einer Signalkaskade auf Transkriptionsregulation untersuchen. Reportergene kodieren für Proteine, die direkt oder über ihre enzymatische Aktivität leicht nachweisbar sind, wenn es zur Transkriptionsinduktion am Promotor kommt (Alam und Cook, 1990). In Promotornähe des Reportergens findet sich ein *response element*. Dadurch ist die Expression des Reportergens induzierbar, wenn Transkriptionsfaktoren dieses *response element* binden (Jiang et al., 2008). Nahe dem Promotor liegen Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen. Das *response element* interagiert über seine Transkriptions-Aktivierungs-Domäne mit dem Transkriptionsapparat. Zur Transkriptionsinitiation kommt es, wenn aktivierte Transkriptionsfaktoren das *response element* binden und dieses den Transkriptionsapparat aktiviert (Nestler und Hyman, 2002). In dieser Arbeit wurde die *firefly luciferase luc2* (aus *Photinus pyralis*) als Reporter gen verwendet. Das Genprodukt katalysiert in Gegenwart von ATP • Mg²⁺ die Oxidation von D(-)Luziferin zu Oxyluziferin und Licht. Der Einsatz der Firefly Luziferase ist weit verbreitet, da die Lichtausbeute extrem hoch ist während die Hintergrund-Lumineszenz in Zellen sehr niedrig ist (Gould und Subramani, 1988).

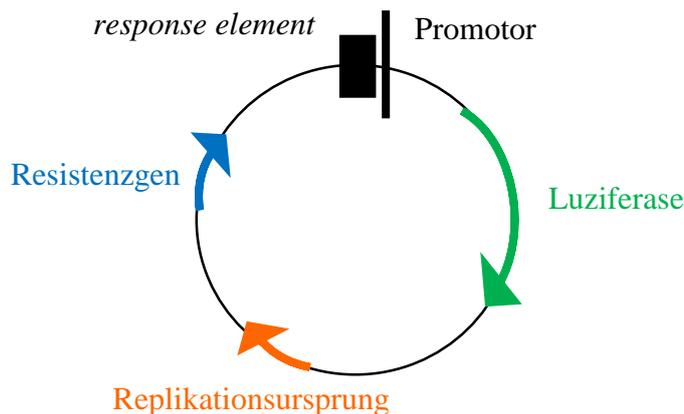


Abbildung 4.1: Luziferase-Reportergenkonstrukt

Die *firefly luciferase* wird nach Bindung eines Transkriptionsaktivators an das *response element* exprimiert und das Vorhandensein des Enzyms durch Lichtemission gemessen. Das Plasmid enthält außerdem noch einen Selektionsmarker und einen Replikationsursprung.

Für den Versuch wurden eine Millionen Zellen auf eine 100 mm Zellkulturschale ausgesät und am nächsten Tag mit 5 µg Plasmid-DNA transfiziert. Wiederum einen Tag später wurden die Zellen abgelöst (4.2.1.1) und auf eine Poly-L-Lysin beschichtete Zellkultur-24-Lochplatte ausgesät. Am folgenden Tag wurden in den ETS/SRE und ETS/SRE-SIE-AP-1 Reporterassays je 1 ml Serum -und antibiotikafreies Medium auf die Zellen gegeben und zuvor vorsichtig mit PBS gewaschen um Serumreste zu entfernen. Serum enthält Wachstumsfaktoren, welche die Genexpression beeinflussen können (Rollins und Stiles, 1989). Daher wurde den Zellen für mindestens 16 h Serum entzogen, bevor sie auf der Zellkultur-24-Lochplatte in 400 µl pro Kavität für 4 h stimuliert wurden. Im CRE Reporterassay wurden die Zellen für den 4 h Wert genauso behandelt. Für den 16 h Stimulus wurde direkt nach dem Absaugen die Ligandenlösung in Serum - und antibiotikafreiem Medium à 500 µl auf die Zellen gegeben.

Nach abgelaufener Stimulationszeit wurde nach Absaugen der Ligandenlösung 100 µl Luc-2-Lysispuffer pro Kavität auf die Zellen gegeben und 10 min inkubiert. Davon wurden dann 80 µl auf eine Kavität einer 96-Loch Luc2-Messplatte überführt. Die Messung der *Photinus pyralis* Luziferase Aktivität über die Lumineszenz erfolgte vollautomatisch im Spektrometer (FluoStar Omega). Die Reaktion wurde durch Zugabe

von 20 μl *luciferase assay reagent* über die FluoStar-Pumpe gestartet. Gemessen wurde 8 s pro Probe und die Zugabe des Substrates erfolgte nach 2 s.

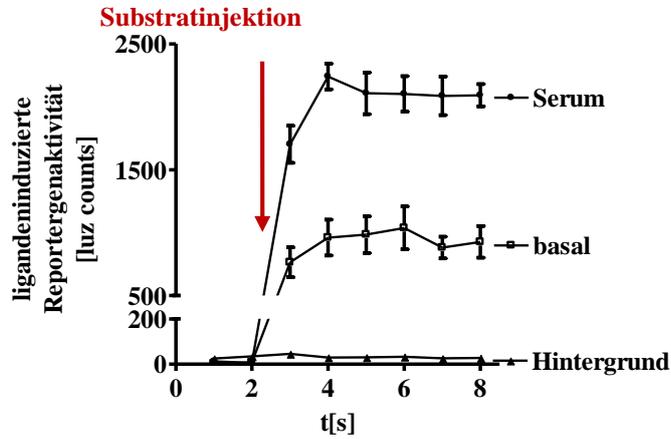


Abbildung 4.2: Messung der Luziferaseaktivität durch Lumineszenzmessung nach Substrat-zugabe
 In diesem Fall wird durch Serumstimulation die ETS/SRE-abhängige Transkription aktiviert und somit das Enzym *firefly luciferase* gebildet. Dieses katalysiert die Oxidation von D(-)Luziferin zu Oxyluziferin und Licht. Die Substratinjektion erfolgte zum Zeitpunkt $t = 2\text{ s}$. Als Hintergrund wurden nicht-transfizierte Zellen definiert.

Für die Auswertung wurden die absoluten Werte zum Zeitpunkt 8 s verwendet. Basalwerte wurden als 100 % gesetzt und die durch Serum oder Liganden induzierte Luziferaseaktivität als % über basal angegeben.

Luc-2-Lysispuffer	25 mM Tris/HCl pH7,4
	4 mM EGTA
	8 mM MgCl ₂
	1 mM DTT
	1 % Triton-x-100

4.2.2.2 Western-Blot-Proteinlysate und Proteinbestimmung

Um Proben für die *sodium dodecyl sulfate* (SDS)-Gelelektrophorese (4.2.2.3) herzustellen wurden 200.000 Zellen pro Kavität auf Zellkultur-6-Lochplatten ausgesät. Einen Tag später wurden sie vorsichtig mit PBS gewaschen und dann je 2 ml Serum und antibiotikafreies Medium pro Kavität zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgesaugt und 900 µl Serum -und antibiotikafreies Medium auf die Zellen gegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde je 100 µl Ligand in Serum -und antibiotikafreiem Medium 10-fach konzentriert auf die Zellen gegeben. Nach abgelaufener Stimulationszeit wurde die Platte auf Eis abgesaugt und pro Loch 200 µl Laemmli-Puffer zugegeben und durch Schwenken verteilt. Das im Puffer im Überschuss zu den Proteinen enthaltene SDS bildet mit den Proteinen Komplexe, wobei 1 g Protein ca. 1,4 g SDS bindet (Rehm und Letzel, 2010, pp 8-11). Nun konnte jedes Proteinlysate in ein Reaktionsgefäß überführt, durch 10 s Ultraschall-Behandlung homogenisiert und dann bei -20 °C eingefroren werden.

Um die totale Proteinmenge für die SDS-Gelelektrophorese genau einstellen zu können und dadurch Proben vergleichbarer zu machen, wurde außerdem eine Proteinbestimmung durchgeführt. Dafür wurde ein Laemmli-Puffer mit Dithiothreitol (DTT) anstatt β-Mercaptoethanol und zunächst ohne Bromphenolblau verwendet. Zur Proteinbestimmung wurde nach dem Sonifizieren das DC Protein Assay Kit von BioRad nach Protokoll des Herstellers benutzt. Die Eichgerade wurde durch die Verdünnungsreihe einer Albumin-Lösung (bovines Serum Albumin, BSA) für jede Messung neu erstellt. Sie verhielt sich aber für n = 5 sehr konstant, so dass für die weitere Berechnung der Durchschnittswert der Steigung benutzt wurde.

Nach der Formel

$$OD_{[759\text{nm}]} \times \text{Steigung Standardkurve}_{[\mu\text{l}/\mu\text{g}]} = \text{Proteinmenge}_{[\mu\text{g}/\mu\text{l}]}$$

lässt sich bei bekannter Steigung aus der gemessenen Absorption die Proteinmenge berechnen. Die Proteinmengen wurden auf 45 µg pro 25 µl eingestellt. Die Verdünnung erfolgte mit vierfachem Bromphenolblau in Laemmli-Puffer mit DTT. Dann wurde das Proteinlysate bei -20 °C eingefroren.

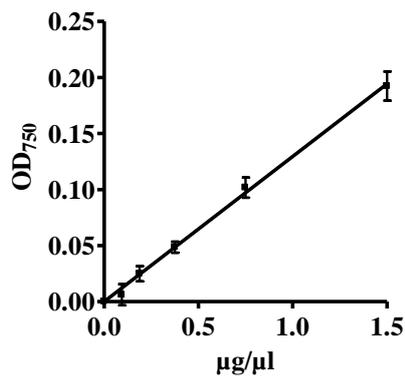


Abbildung 4.3: Eichgerade zur photometrischen Proteinbestimmung

Die Verdünnungsreihe einer BSA-Lösung diente zur Erstellung der Eichgerade. Steigung_[µl/µg] = 0,1295

Laemmli- Puffer (4fach)	250 mM Tris/HCl 20 % Glycerin 8 % SDS 10 % β-Mercaptoethanol 0,08 % Bromphenolblau pH 6,8
Laemmli-Puffer mit DTT (4 fach)	250 mM Tris/HCl 20 % Glycerin 8% SDS 4 mM DTT 0,08 % Bromphenolblau pH 6,8

4.2.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot

Mittels SDS-Gelelektrophorese werden Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Das anionische Tensid SDS denaturiert Proteine, verhindert Protein-Protein-Wechselwirkungen und überdeckt die Proteineigenladung, so dass alle Proteine negativ geladen sind. Dadurch erfolgt die Auftrennung abhängig von der Proteingröße. Das

acrylamidhaltige Gel bildet eine netzartige Struktur durch dessen Poren die Proteine größenabhängig unterschiedlich gut wandern und nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt werden. Bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese werden die Proteine im Sammelgel angereichert, um dann im Trenngel aufgetrennt zu werden (Rehm und Letzel, 2010, pp 8-11, Laemmli, 1970).

Zunächst wurde das Trenngel aus Trenngelpuffer, 10 % Acrylamid, APS und TMED hergestellt und mit Hilfe einer Gießvorrichtung zwischen zwei Glasplatten gegossen, wobei nach oben zur Kante des kleineren Glasplättchens mindestens 3 cm frei blieben. Dann wurde es mit Übersichtungspuffer bedeckt bis das Gel ausgehärtet war. Danach wurde der Übersichtungspuffer abgeschüttet und das Sammelgel, bestehend aus Sammelgelpuffer, Acrylamid, APS und TMED wurde in die verbleibenden oberen 3cm gegossen. Ein Kamm mit 10 Zacken wurde eingesetzt, so dass nach dem Aushärten und Ziehen des Kamms an dieser Stelle Taschen entstanden. Das fertige Gel wurde zwischen den Glasplatten in die Gelelektrophoresekammer eingespannt und die Kammer entsprechend der Herstellerangaben mit Laufpuffer gefüllt. Um das Proteinlysate besser auftragen zu können, wurden die Taschen mit Hilfe einer Hamilton-Spritze gespült. Das aufgetaute Proteinlysate wurde für 5 min auf 95 °C erhitzt, um die Sekundär -und Tertiärstruktur der Proteine zu zerstören und stabile Protein-SDS-Komplexe zu erhalten (Rehm und Letzel, 2010, pp 8-11). Nach 5 min Zentrifugation bei 17000 x g konnten die Proben auf das Gel aufgetragen werden. In dieser Arbeit wurden 45 µg Protein in 25 µl pro Gelspur aufgetragen. Zusätzlich zu den Proben wurde ein Protein-Größenmarker auf das Gel aufgetragen um die Größe der eigenen Proben bestimmen zu können. Es wurden nun 80 V Spannung angelegt die, sobald die Proteinfront aus dem Sammelgel heraus gewandert war, auf 120 V erhöht wurde. Dadurch wurden die Proteine entlang des elektrischen Gradienten aufgetrennt. Der SDS-Protein-Komplex wandert zum Pluspol. Nach etwa 2 h waren die Proteine ausreichend gut aufgetrennt.

Im Westernblot überträgt man die Proteine vom Gel auf eine Trägermembran. In dieser Arbeit wurde die Übertragung durch Elektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein senkrecht zum Gel gerichtetes elektrisches Feld angelegt und die Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Hier sind sie für Antikörper zugänglich, die spezifische Proteinepitope erkennen (Towbin et al., 1979).

Das Gel wurde zwischen den Elektroden so auf in Puffer getränkte Filterpapiere und die ebenfalls getränkte Membran gelegt, dass das Gel näher bei der Anode lag und die Trägermembran direkt auf dem Gel. Dadurch wurden die negativ geladenen Proteine in Richtung Kathode auf die Membran geblottet. Dieser Vorgang dauerte 3 h bei 40 mA/Gel. Danach konnten die auf der Nitrozellulosemembran enthaltenen Proteine durch eine Ponceau Färbung sichtbar gemacht werden, um den Erfolg zu kontrollieren. Dieser Farbstoff bindet reversibel Aminogruppen und ist mit Wasser auswaschbar. Nun wurde die Membran zweimal für 5 min mit *tris-buffered-saline* mit Tween 20 (TBST) gewaschen und anschließend für 30 min Blockierungslösung zugegeben. Dann wurde der Erstantikörper in gewünschter Verdünnung angesetzt, nach Abschütten der Blockierungslösung auf die Membran gegeben und bei 4 °C für mindestens 16 h inkubiert. Die verwendeten Antikörper waren Phosphorylierungs-spezifische Antikörper, die jeweils die phosphorylierte Form eines Proteins erkennen. So lässt sich die Aktivierung von Kinasen durch einen Stimulus sichtbar machen. Danach wurde dreimal für 10 min mit TBST gewaschen und dann für 1 h der Sekundärantikörper zugegeben. Dieser erkennt den Erstantikörper an seinem Fc-Teil und ist zudem an eine Peroxidase gekoppelt. Es folgten drei weitere 10 minütige Waschschrte mit TBST. Dann konnte die bei der durch die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) katalysierte Oxidation von Luminol auftretende Chemilumineszenz gemessen werden (Rehm und Letzel, 2010, p 30). Die zwei Einzelkomponenten des luminolhaltigen Substrats wurden direkt vor Gebrauch vereint und auf die Membran gegeben. Durch 30 s Schwenken wurde sichergestellt, dass die Membran vollständig bedeckt war. Die Lumineszenz konnte in einem Chemilumineszenzsystem (Chemismart) gemessen werden.

Zusätzlich zur Proteinbestimmung wurde eine Ladekontrolle durchgeführt, um die Proben hinsichtlich ihrer Proteinmenge vergleichen zu können. Dazu wurde die Membran für 3 Tage bei 37 °C in „Stripp“-Puffer gegeben um gebundene Antikörper zu denaturieren. Nach zweimaligem 5 min waschen mit TBST und 30 min Blockierung wurde über Nacht bei 4 °C ein Antikörper zugegeben, der die nicht phosphorylierte Form desselben Proteins erkennt.

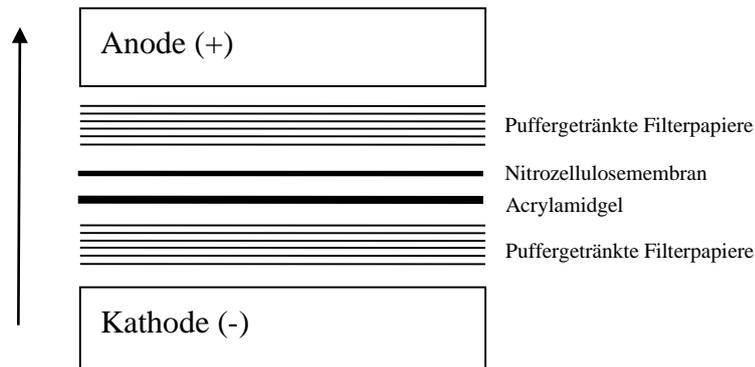


Abbildung 4.4: Western-Blot-Aufbau

Durch den gerichteten Stromfluss werden die negativ geladenen Proteine in Richtung Kathode vom Acrylamidgel auf die Nitrozellulosemembran transferiert. Die in Elektrolytpuffer getränkten Filterpapiere dienen der Stromweiterleitung und müssen möglichst lückenlos und konstant aufgelegt werden, um von jeder Stelle des Gels gleichermaßen auf die Membran zu übertragen.

Ponceau-S-Lösung	0,1 % Ponceau S 5 % Essigsäure pH 10,4
“Stripp”-Puffer	100 mM Glycin, pH 2
Anode I Puffer	0,3 M Tris 20 % Methanol pH 10,4
Anode II Puffer	25 mM Tris 20 % Methanol pH 10,4
Kathodenpuffer	40 mM 6-Aminohexansäure 20 % Methanol pH 7,6
TBST (Tris-Buffered-Saline, Tween20)	10 mM TRIS 150 mM NaCl 0,05 % Tween pH 7,4

4 Material und Methoden

Blockierungslösung	TBST mit 5 % BSA
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl 0,4 % SDS pH 6,8
Trenngelpuffer (4fach)	1,5 M Tris 0,4 % SDS pH 8,8
Überschichtungspuffer	1x H ₂ O 2x Isopropanol 1x Sammelgelpuffer
Luminolhaltiges Substrat Komponente 1	0,1 M TRIS 0,02 % H ₂ O ₂ pH 8,5
Luminolhaltiges Substrat Komponente 2	0,1 M TRIS 250 µM Luminol 400 µM 4-hydroxy-Zimtsäure pH 8,5

4.2.2.4 Densitometrische Quantifizierung von Proteinbanden

Die Western Blot Banden wurden mit Hilfe von ImageJ Software (National Institute of Health) densitometrisch quantifiziert. Das Programm erstellt ein Histogramm der Farbintensität einer Bande in einem vorgegebenen Rahmen. Durch Integration der entstandenen Kurven erhält man Absolutwerte für die Farbintensität.

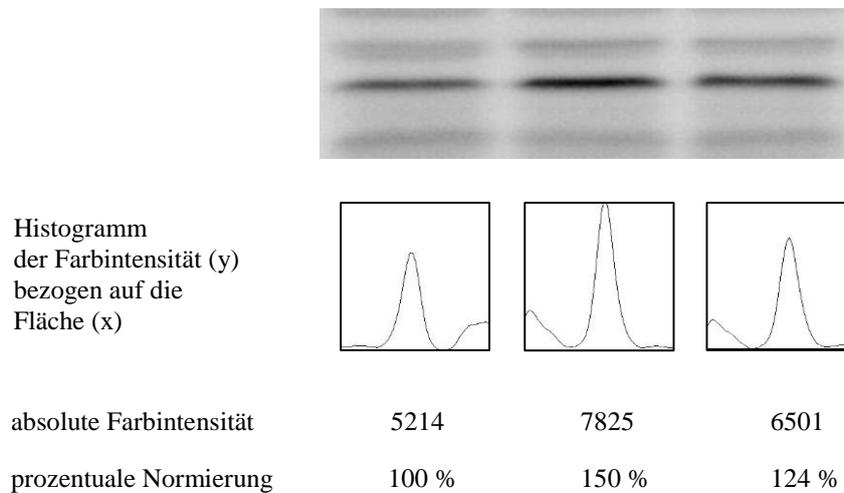


Abbildung 4.5: Densitometrische Quantifizierung von Western-Blot-Banden

Die Farbintensität einer Bande wird in einem manuell vorgegebenen Rahmen analysiert und die Fläche unter dem entstandenen Graphen wird rechnerisch ermittelt.

4.2.2.5 Messung der intrazellulären Kalziumkonzentration durch Fluo-8

Zur Messung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration wurde Fluo8 verwendet, ein Kalziumchelator und gleichzeitig kalziumabhängiges Fluorochrom (Grynkiewicz et al., 1985, Martin et al., 2004). Fluo8 absorbiert Licht der Wellenlänge 490 nm und diese Anregung bewirkt Emission von Licht der Wellenlänge 514 nm. Die emittierte Fluoreszenz ist proportional zur Kalziummenge. Es kommt durch Kalziumbindung zu einer 200-fach erhöhten Fluoreszenz. Da Fluo8 sehr hydrophil ist, ist es schlecht membrangängig. Zum Beladen der Zellen wird daher der Fluo8-Acetoxymethylester

(Fluo8-AM) verwendet, der jedoch sehr leicht hydrolysiert wird. Dies nutzt man aus, da die Hydrolyse der Esterbindungen durch zytoplasmatische Esterasen nach dem Prinzip der Ionenfalle Fluo8 Moleküle im Zytoplasma anreichert.

Am Tag vor dem Versuch wurden eine Millionen Zellen auf einer 100 mm Zellkulturschale ausgesät. Am Tag des Versuchs wurde das Medium abgesaugt und 3 ml HBS-Puffer mit 0,02 % Pluronic und 5 μ M Fluo8-AM auf die Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei 37 °C wurde der Beladungspuffer abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit PBS/2 mM EDTA abgelöst und in 10 ml HBS-Puffer in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Anschließend wurde für 3 min bei 850 x g zentrifugiert, der Überstand dekantiert und der Zellhaufen in einem geeigneten Volumen HBS-Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde à 80 μ l auf die Vertiefungen einer 96-Loch Fluo8-Messplatte verteilt. Die Messung der Veränderung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration erfolgte vollautomatisch durch ein Fluoreszenzspektrometer (FluoStar Omega), die Empfindlichkeit des Fluoreszenzdetektors musste für jede Probe voreingestellt werden (*gain adjustment*), um mit höchster Sensitivität messen zu können. Um durch Agonisten hervorgerufene Veränderungen in der Kalziumkonzentration möglichst in Echtzeit messen zu können, erfolgte die Zugabe des Liganden durch die FluoStar-Pumpen. Dazu wurden 20 μ l 5-fach Ligandenlösung auf 80 μ l Zellsuspension injiziert.

HBS Puffer	140 mM NaCl
	5 mM KCl
	1 mM MgCl ₂
	10 mM HEPES
	2 mM CaCl ₂
	0,1 % Glucose
	pH 7,4

4.2.2.6 cAMP-Akkumulations-Assay

Der cAMP-Akkumulations-Assay ist ein etabliertes Verfahren zum Nachweis des sekundären Botenstoffes cAMP (Dumuis et al., 1988, Breit et al., 2006). Es ist hierbei möglich die Regulation der AC durch GPCR zu untersuchen. Die Zellen werden in

Anwesenheit des unselektiven Phosphodiesterase (PDE)-Hemmers 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) stimuliert um eine Akkumulation des produzierten cAMPs zu erreichen.

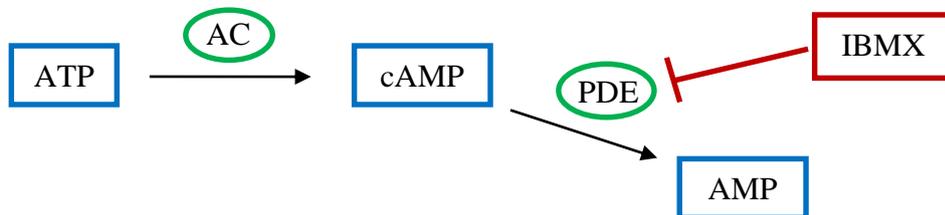


Abbildung 4.6: Bildung und Abbau von cAMP

Durch die AC entsteht aus Adenosintri-phosphat (ATP) unter Abspaltung von Pyrophosphat der Botenstoff cAMP. Dieser wird durch das Enzym Phosphodiesterase (PDE) zu Adenosinmonophosphat (AMP) abgebaut. Durch den PDE-Hemmer 3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX) wird der Abbau des cAMP inhibiert und es akkumuliert.

Zur Durchführung des Versuches wurden die Zellen in 1 ml Nährmedium auf Poly-L-Lysin beschichtete 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Falls zur Hemmung PTX-sensitiver G-Proteine *Pertussis Toxin* eingesetzt wurde, wurde dieses in der Konzentration 100 ng/ml dem Nährmedium zugegeben, sobald die Zellen adhären waren und für 16 h inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Medium abgesaugt und durch 500 µl Markierungslösung (2 µCi/ml 2,8-³H]-Adenin in Serum -und antibiotikafreiem Medium) ersetzt. In der folgenden vierstündigen Inkubationszeit bei 37 °C und 5 % CO₂ nahmen die Zellen das Tritium-markierte Adenin auf und verstoffwechselten es zu verschiedenen Adeninnukleotiden, von denen das häufigste ATP ist, welches der Ausgangsstoff für die cAMP Produktion durch die AC ist. Die AC wird durch den Naturstoff Forskolin (FSK) direkt aktiviert, während die Opioidrezeptoren eine Hemmung der AC bewirken. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde die Markierungslösung abgesaugt und durch 500 µl IBMX-haltige Stimulationslösung in serumfreiem Medium ersetzt. Während der Stimulationszeit wurden die Chromatographie Säulen vorbereitet. Dazu wurden die Aluminiumoxidsäulen mit 10 ml Imidazolpuffer gewaschen. Die Dowex-Harz-Säulen wurden zuerst mit 10 ml 1 M Salzsäure (HCl) und danach mit 10 ml Wasser gewaschen. Die Stimulationszeit betrug 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂. Dann wurde die Stimulationslösung abgesaugt, die Zellen mit 1 ml eiskalter 5 % Trichloressigsäure (TCA) lysiert und die ³H]-Adeninnukleotide extrahiert. Zur Trennung des ³H]-cAMP

von seinen Vorstufen wurde sequentielle Säulenchromatographie mit dem Ionenaustauscherharz Dowex und Aluminiumoxidsäulen genutzt. In der Ionenaustauschchromatographie konkurrieren geladene Proteine mit Ionen um eine Bindung am Ionenaustauscher. Das Gegenion der Dowex-Harz-Säule ist Chlorid. Das komplette TCA-Lysat einer Kavität wurde auf eine Dowex-Harz-Säule gegeben. Hier werden die protonierten kationischen cAMP-Moleküle besser zurückgehalten als ATP-Moleküle. Nach Waschen mit 4 ml Wasser um die unspezifische Radioaktivität zu verlieren wurden die Dowex-Harz-Säulen direkt auf die Aluminiumoxidsäulen positioniert und mit 10 ml Wasser eluiert. Dann wurden die Aluminiumoxidsäulen mit 1 ml Imidazolpuffer (0,1 M Imidazol, pH 7,4) gewaschen um andere Nukleotide abzutrennen. Die zyklischen Nukleotide bleiben dabei zunächst zurück und können dann durch ein größeres Imidazolvolumen von der Säule eluiert werden (Salomon et al., 1974, White und Zenser, 1971). Im letzten Schritt wurden die Aluminiumoxidsäulen mit 5 ml Imidazolpuffer direkt in die Szintillationsröhrchen eluiert und pro Röhrchen 12 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben. Nach Invertieren der Röhrchen wurde die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen.

4.2.2.7 Radioaktive Ligandenbindung

Mit Hilfe radioaktiver Ligandenbindungsstudien lässt sich das endogene Rezeptorprofil einer Zelle und deren pharmakologische Eigenschaften bestimmen. Dazu nutzt man einen radioaktiv markierten Liganden, der spezifisch an Rezeptoren an der Zelloberfläche, zu einem Teil jedoch auch unspezifisch an die Zellmembran bindet. Nun wird der gleiche Ligand ohne radioaktive Markierung im Überschuss zugegeben und kann den Liganden von seinen spezifischen Bindestellen verdrängen, während die unspezifische radioaktive Bindung erhalten bleibt. Die Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung entspricht der verdrängbaren spezifischen Bindung. Rechnerisch lässt sich, wenn man für aufsteigende Ligandenkonzentrationen jeweils die spezifische Bindung bestimmt, die Gesamtkonzentration der Bindungsstellen (B_{max}) und die Sättigbarkeit der Bindung (Dissoziationskonstante K_D) ermitteln (Rehm und Letzel, 2010, pp 55-57, pp 79-81) In dieser Arbeit wurde Tritium-markiertes Naloxon ($[^3H]$ -Naloxon), ein unselektiver inverser Agonist an Opioidrezeptoren, verwendet. Eine Millionen Zellen

wurden am vorhergehenden Tag auf 100 mm Zellkulturschalen ausgesät. Am Tag des Experiments wurden sie vorsichtiges mit 3 ml PBS gewaschen, mit 3 ml PBS/2 mM EDTA abgelöst und in Stimulationspuffer aufgenommen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen im gleichen Medium resuspendiert und gezählt. Die Zellzahl wurde auf 25.000 Zellen in 400 µl eingestellt (62.500/ ml). [³H]-Naloxon wurde in Stimulationspuffer verdünnt. Diese Lösung wurde à 100 µl in die Vertiefungen der 96-Loch *cell harvester*-Messplatte verteilt. Die finale Konzentration des [³H]-Naloxon betrug 10, 5, 2,5 und 1,25 nM und wurde durch eine 1:4 Verdünnung durch Zugabe der Zellsuspension à 400 µl pro Vertiefung erreicht. Nicht radioaktiv markiertes Naloxon wurde in der Konzentration 20 µM eingesetzt. Die Platte wurde für 1 h bei 4 °C auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde mit Hilfe einer Filtrationsvorrichtung (*cell harvester*) auf Glasfaser-Filterpapier überführt. Die Radioaktivität wurde mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen, nachdem das Filterpapier in ein mit Szintillationsflüssigkeit gefülltes Szintillationsröhrchen gegeben wurde.

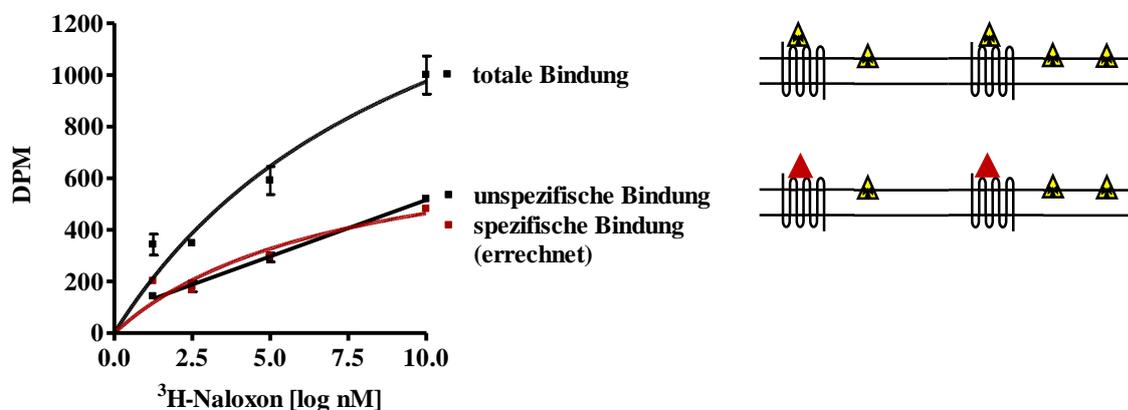


Abbildung 4-7: Prinzip Radioaktiver Ligandenbindungsstudien

Ein Radioaktiv-markierter Ligand (▲) wird zugegeben und bindet spezifisch an Rezeptoren sowie auch unspezifisch an die Zellmembran. Durch Zugaben des gleichen, aber nicht radioaktiv-markierten Liganden (▲) im Überschuss lässt sich die spezifische Bindung, nicht aber die unspezifische Bindung verdrängen. Durch Messung der jeweils gebundenen Radioaktivität kann man die spezifische Bindung als Differenz zwischen totaler und unspezifischer Bindung ermitteln.

Stimulationspuffer

F12 Medium mit 0,1 % BSA und 10 mM HEPES

4.2.2.8 Flüssigkeitsszintillation zur Messung von Radioaktivität

Die verwendeten radioaktiven Moleküle sind jeweils mit zwei [³H]-Atomen markiert. Bei [³H] handelt es sich um einen β-Strahler, der in der Szintillationsflüssigkeit eine zu Strahlung proportionale Lichtemission bewirkt. Diese Emission wird mittels eines Photomultipliers in *counts per minute* (CPM) gemessen und von dem Flüssigkeitsszintillationszähler (WinSpectral, Perkin Elmer) direkt in die Isotop-abhängige *disintegration per minute* (DPM) umgerechnet. Durch die Proportionalität von Lichtemission und Molekülzahl kann daraus auf Mengenveränderungen geschlossen werden.

4.2.3 Molekularbiologische Methoden

4.2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Escherichia coli-Bakterien, welche die benötigten Plasmide enthalten waren in Form von Glycerolstocks in der Arbeitsgruppe vorhanden. Um Plasmid-DNA zu präparieren wurden zunächst die Zellen lysiert und von Proteinen, Membranen und bakteriellem Genom gereinigt, während kleine freie Plasmid-Moleküle zurückgehalten wurden (Mülhardt, 2009, pp 16-17). Hier wurde ein kommerzielles Reinigungskit auf Grundlage des alkalischen Lyse Verfahrens verwendet (für Details siehe: http://webshop.mn-net.com/epages/de.sf/de_DE/?ObjectPath=/Shops/mnde/Products/740410.50).

Um Plasmid-DNA in größeren Mengen zu gewinnen, wurde aus dem Glycerolstock eine Vorkultur in 2 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angesetzt. Nach 12-16 h Inkubationszeit bei 37 °C im Bakterienschüttler wurden 200 µl in 200 ml frisches LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) gegeben, um die Hauptkultur zu erhalten. Auch diese wurde bei 37 °C für 12-16 h im Bakterienschüttler inkubiert. Dann konnte die Plasmid-DNA durch Anionenaustausch-Säulenchromatographie („NucleoBond Xtra Midi Plasmid DNA Purification“-Kit der Firma Macherey-Nagel) quantitativ isoliert werden. Dazu wurden die Bakterien zunächst für 15 min bei 4 °C und 4500 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde in 8 ml Puffer „RES“ resuspendiert, anschließend

durch 8 ml Puffer „LYS“, invertieren und 5 min Inkubation bei Raumtemperatur alkalisch lysiert. Nun musste das Lysat durch Zugabe von 8 ml Puffer „NEU“ neutralisiert und erneut invertiert werden. Um grobe Baktrientrümmen zurückzuhalten wurde in die Säule ein Filter gelegt und Säule samt Filter äquilibriert (12 ml Puffer „EQU“). Es folgten das Beladen der Säule und ein Waschschriff (5 ml Puffer „EQU“), dann konnte der Filter entfernt werden. Danach wurde ein weiteres Mal gewaschen (8 ml Puffer „WASH“) und die DNA mit 5 ml Puffer „ELU“ eluiert. Jetzt wurde die DNA durch Zugabe des 0,7 fachen Volumen von 100 % Isopropanol gefällt und 30 min bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die Plasmid-DNA lag nun als Niederschlag am Boden des Reaktionsgefäßes vor. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Pellet mit 100 µl 70 % Ethanol gewaschen und für 5 min bei 15.000 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nun wurde erneut der Überstand abgesaugt, die DNA bei offenem Deckel bei 37 °C getrocknet und in Wasser aufgenommen.

Um den Reinheitsgrad und die Konzentration der isolierten Plasmid-DNA zu ermitteln, wurde anschließend eine photometrische Messung durchgeführt. Nukleotide absorbieren aufgrund ihrer Ringstruktur ultraviolettes Licht, so dass aus der Absorption bei 260 nm mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration errechnet werden kann. Für Nukleinsäuren bei pH = 7 gilt: Optische Dichte (OD)₂₆₀ = 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Außerdem wird noch die Absorption bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren, gemessen, um eine Proteinverunreinigung zu erkennen. Die gebildete Ratio OD_{260nm}/OD_{280nm} sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen (Mülhardt, 2009, pp 42-44). Messung und Umrechnung erfolgten vollautomatisch durch das Eppendorf Biophotometer Plus. Die gewonnene DNA wurde auf die gewünschte Konzentration eingestellt und bei -20 °C gelagert.

LB- Lennox-Medium	0,1 % Trypton/Pepton
	0,05 % Hefeextrakt
	0,05 % NaCl
	pH 7, in dH ₂ O autoklaviert

4.2.3.2 RNA Isolierung

Die *messenger* Ribonukleinsäure (mRNA) aus den Zellen wurde benötigt, um sie durch reverse Transkription in *complementary* DNA (cDNA) umzuschreiben und damit eine qRT-PCR durchzuführen. mRNA ist die prozessierte Form der durch Transkription entstandenen prä-mRNA und zeichnet sich durch eine Polyadenylierung am 3'-Ende, ein 7-Methyl-Guanosin-*Capping* am 5'-Ende und das Fehlen von Introns aus. Sie wird durch Translation an den Ribosomen in eine Aminosäuresequenz übersetzt. Durch eine Geninduktion kommt es zu verstärkter Proteinexpression. Die Menge der mRNA ist schon vor der veränderten Proteinexpression verändert und kann daher benutzt werden, um Aussagen über veränderte Proteinexpression zu treffen. Die hier verwendete Methode der RNA-Extraktion basiert auf der *single step* Methode nach Chomczynski (Chomczynski und Sacchi, 1987, Chomczynski und Sacchi, 2006). Da RNA sehr anfällig für den Abbau durch RNAsen ist und diese ubiquitär vorhanden und sehr stabil sind, muss beim Umgang mit RNA sehr sorgfältig gearbeitet werden. Es wurden daher Filter Tips verwendet und ein separater Arbeitsplatz eingerichtet. In dem hier beschriebenen Verfahren wird totale RNA isoliert, ein Gemisch verschiedener in der Zelle vorkommender RNA-Formen, wovon mRNA nur etwa 2 % ausmacht (Mülhardt, 2009, pp 122-124).

Zur Gewinnung der RNA wurden 200.000 Zellen pro Kavität auf Poly-L-Lysin beschichtete 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag nach vorsichtigem Waschen mit PBS je 2 ml Serum -und antibiotikafreies Medium zugegeben. Nach 24 h Serumentzug wurde das Medium abgesaugt und 900 µl Serum -und antibiotikafreies Medium zugegeben. Nach 60 min wurde der Ligand 10-fach konzentriert à 100 µl in Serum -und antibiotikafreiem Medium zugegeben und für 60 min stimuliert. Falls die Zellen mit Inhibitoren behandelt wurden, wurde in den betreffenden Kavitäten nur 800 µl Serum -und antibiotikafreies Medium zugegeben und nach 60 min 100 µl 10-fach konzentrierte Stimulationslösung. Damit wurden die Zellen für 30 min vorinkubiert, bevor der Ligand zugegeben wurde. Nach abgelaufener Stimulationszeit wurden die Zellen mit 1 ml TRIzol Reagent® pro Kavität lysiert und nach 5 min Inkubationszeit in Reaktionsgefäße überführt. TRIzol enthält Guanidiniumthiocyanat zur Zelllyse und Enzyminhibition. Außerdem enthält das Reagenz Phenol, in dem sich Proteine lösen.

Durch dessen sauren pH-Wert werden auch kleine DNA-Fragmente gelöst. Dann wurden in jedes Reaktionsgefäß 200 µl Chloroform zugegeben und für 10 s gemischt wodurch eine zweiphasige Emulsion entstand. Diese wurde durch 15 min Zentrifugation bei 4 °C bei 15.000 x g in eine wässrige obere Phase, eine Interphase und eine untere Phenol Phase getrennt. In der Interphase finden sich größere DNA-Fragmente (Mülhardt, 2009, pp 122-124). Die wässrige RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von Isopropanol (laut Hersteller: 0,5 ml pro 1 ml TRIzol) und ein 10 min Inkubationsschritt zur Präzipitation der RNA. Anschließend wurde bei 21.000 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das RNA Präzipitat bildet nach Zentrifugation eine sichtbares gelartiges Pellet und sollte auf Eis gelagert werden. Der Überstand wurde verworfen und 1 ml kaltes 70 % Ethanol zugegeben und erneut für 5 min bei 4 °C und 21.000 x g zentrifugiert. Durch den Waschschrift mit Ethanol kann man das Isopropanol gründlicher entfernen. Dann wurde der Überstand abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in RNase freiem Wasser durch auf -und abpipetieren und einer 10 min Inkubation bei 55 °C geöst. Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bestimmt, indem die Extinktion bei 260 nm gemessen wurde (4.2.3.1). Um auch eine Aussage zur Reinheit treffen zu können, wurde außerdem die OD_{260nm}/OD_{280nm} -Ratio gebildet.

4.2.3.3 cDNA-Synthese mittels reverse Transkription

Als reverse Transkription bezeichnet man die Übersetzung von mRNA in cDNA. Der Vorgang wird vermittelt durch das Enzym Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase. Es handelt sich hierbei ursprünglich um ein virales Enzym, das erstmals im *Rous sarcoma virus* entdeckt wurde (Temin und Mizutani, 1970). Zur cDNA-Synthese wurde das „RevertAid™ H Minus First Strand cDNA Synthese Kit“ laut Herstellerangaben verwendet. Es benutzt eine H Minus *Moloney murine leukemia virus* (MMLV)-RT mit einer Punktmutation, welche die intrinsische RNase-Aktivität ausschaltet (für Details siehe: http://www.fermentas.de/product_info.php?info=p747&language=de).

Die verwendeten Oligo-(dT)-Primer binden durch komplementäre Basenpaarung an den 3' Poly-A-Schwanz der mRNA. Es wurden 2 µg mRNA und 0,5 µg Oligo(dT)₁₈ Primer

in nukleasefreiem Wasser eingesetzt. Um die Sekundärstruktur der mRNA zu zerstören und somit eine bessere Bindung der Primer zu ermöglichen, erfolgte ein 5 minütiger Inkubationsschritt bei 65 °C. Nun wurden Reaktionspuffer, RNase Inhibitor (20U), RT (200U) und Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (20 µmol) zugegeben und nach kurzem Mischen und Zentrifugieren die Reaktion bei 42 °C für 60 min gestartet. Durch einen 10 minütigen 70 °C Schritt wurde die Reaktion abgeschlossen (Mülhardt, 2009, pp 126-127).

Es besteht die Möglichkeit, dass die isolierte mRNA mit genomischer DNA verunreinigt ist. Also würde in der Probe auch schon unabhängig von der reversen Transkription DNA vorliegen. Dies würde die Aussage über die mRNA-Menge und somit die Proteinexpression verfälschen. Daher wurde für jede mRNA-Probe neben dem Reaktionsansatz auch ein Kontroll-Ansatz ohne das Enzym Reverse Transkriptase hergestellt und dann eine Polymerasekettenreaktion (PCR) und eine Agarosegelelektrophorese (4.2.3.4) durchgeführt, um Verunreinigung mit DNA nachzuweisen. Im Kontrollansatz ohne Reverse Transkriptase sollte nun keine DNA-Bande zu sehen sein.

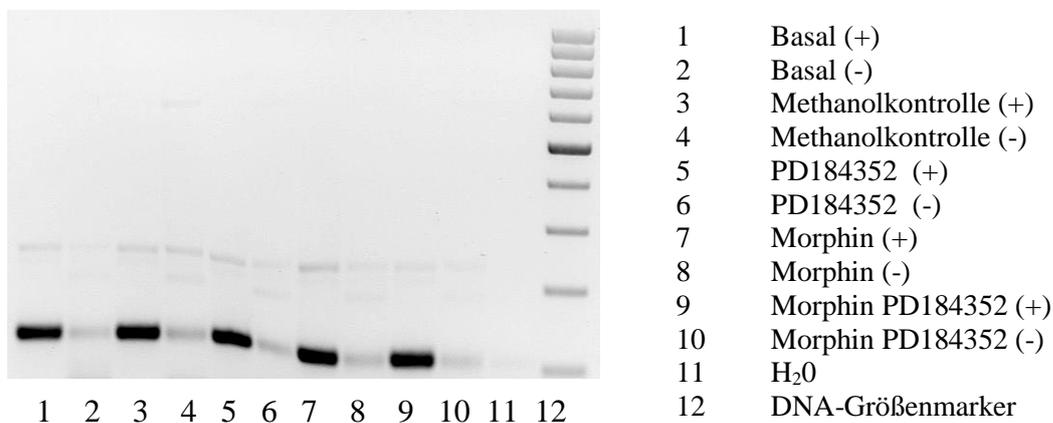


Abbildung 4.8: Kontroll-PCR zur Überprüfung einer eventuellen Verunreinigung mit genomischer DNA

Aus unterschiedlich stimulierten Zellpopulationen wurde mRNA extrahiert. Nur durch Zugabe des Enzyms Reverse Transkriptase (+) entsteht aus der gereinigten mRNA cDNA. Falls die mRNA mit genomischer DNA verunreinigt ist, erscheint auch in der Negativ-Kontrolle ohne Enzym (-) eine Bande. Die Stimulation scheint keinen Einfluss auf die cDNA-Ausbeute zu haben, alle Banden erscheinen gleich stark.

4.2.3.4 PCR und Agarosegelelektrophorese

Die PCR ist ein Verfahren zur selektiven DNA Amplifikation *in vitro* (Mullis und Faloona, 1987, Saiki et al., 1985). Dazu benutzt man DNA Polymerasen, die ausgehend von an die DNA-Matrize angelagerte Oligodesoxyribonukleotiden (Primer) mit freiem 3'OH-Ende den Matrizenstrang replizieren. Durch die sequenzspezifische Auswahl von zwei 20-30 Basenpaaren (bp) langen Primern erreicht man die spezifische Amplifikation des gewünschten Bereiches zwischen den beiden Primern. (Vorwärts -und Rückwärtsprimer, F-Primer und R-Primer). Der PCR Ansatz enthält neben den DNA-Primern, der zu amplifizierenden DNA-Matrize und dNTPs als Ausgangsmaterial für die DNA-Synthese auch eine geeignete Pufferlösung und $MgCl_2$ als Kofaktor der DNA-Polymerase. Bei der DNA-Polymerase handelt es sich um die thermostabilen taq DNA-Polymerase, die durch Inkubation bei 95 °C nicht zerstört wird (Saiki et al., 1988). Die Reaktion läuft in einem Thermocycler (PCR-Maschine 96 Universal Gradient) automatisch ab. Eine PCR umfasste 35 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus drei Schritten besteht. Zunächst erfolgte ein Denaturierungsschritt bei 94 °C, wodurch die Matrizen-DNA in Einzelstränge aufgetrennt wird. Es folgte ein Primeranlagerungsschritt (*annealing*), in dem die Oligonukleotid-Primer mittels Basenpaarung an die jeweils komplementäre Sequenz der Matrizen-DNA binden. Die für diese Hybridisierung optimale Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und diese wiederum vom CG-Gehalt. Dieser bestimmt die Anzahl der Wasserstoffbrücken und somit die Festigkeit der Bindung. Die Hybridisierungstemperatur liegt in der Regel zwischen 40 und 70 °C. Zuletzt erfolgt ein Amplifikationsschritt bei 72 °C, nahe dem Temperaturoptimum der taq DNA-Polymerase (Saiki et al., 1988). Hier wird die DNA-Matrize ausgehend vom 3'OH-Ende der Primer dupliziert. So verdoppelt sich unter optimalen Bedingungen in jedem Zyklus der zwischen den Primern liegende Teil der DNA-Matrize. Die exponentielle DNA Amplifikation endet gegen Ende der Reaktion durch störende Einflüsse von akkumulierenden Produkten. Wenn die Primer im Überschuss eingesetzt werden, kommt es zu einer Amplifikation um den Faktor 2^{35} ($\approx 10^{10}$) in einem PCR-Lauf (Mülhardt, 2009, pp 84-95).

Zum Nachweis der amplifizierten cDNA wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. cDNA ist wegen ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen ein Polyanion

und wandert im elektrischen Feld zur Anode. Ein Agarosegel (2 % Agarose in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer) bildet eine netzartige Struktur, durch dessen Poren die Nukleinsäuren größenabhängig unterschiedlich gut wandern, wobei größere Nukleinsäuren stärker zurückgehalten werden. Vor dem Auftragen auf das Gel wurde die cDNA mit Bromphenol-haltigem DNA-Ladepuffer vermischt um die Lauffront erkennbar zu machen. Außerdem enthält der Ladepuffer auch Glycerin, das die Dichte der Proben erhöht, so dass diese in die Tiefe der Geltasche sinken und nicht heraus gespült werden. Zur Sichtbarmachung der DNA wurde das interkalierende Fluorochrom Ethidiumbromid eingesetzt. Nach Einlagerung in doppelsträngige DNA verstärkt sich dessen Fluoreszenz, so dass DNA Moleküle nach Anregung des Ethidiumbromids mit UV Licht der Frequenz 590 nm in Form von Banden in einem UV-Transluminator-Foto-Dokumentationssystem nachgewiesen werden konnten. Zusätzlich zu den Proben wurde ein DNA-Größenmarker (GeneRuler 100bp) aufgetragen, um die Größe der Banden abschätzen zu können (Mülhardt, 2009, pp 58-66).

Tris-Acetat-EDTA (TAE) -Puffer (50fach)	2 M Tris-Base 17,5 % Essigsäure 100 mM EDTA pH 8,3
---	---

4.2.3.5 Quantitative Real Time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR ist ein Verfahren, welches, basierend auf dem Prinzip der PCR zusätzlich die Quantifizierung der entstehenden DNA in Echtzeit ermöglicht. Dafür werden Fluoreszenz-Messungen während jedem PCR-Zyklus durchgeführt, wobei die Fluoreszenz proportional zur Menge der PCR-Produkte ansteigt und diese damit quantifizierbar werden. Je mehr DNA-Matrize zu Anfang vorliegt, desto weniger Amplifikationszyklen sind nötig, um eine DNA-Menge zu erreichen, die groß genug ist um ein detektierbares Fluoreszenzlevel zu produzieren. Somit kann man auf die Menge der anfangs vorliegenden DNA-Matrize rückschließen (Bustin et al., 2005, Holzapfel und Wickert, 2007, Kubista et al., 2006). Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Fluoreszenzdetektion. Einige Formate nutzen *fluorescence resonance energy transfer*

(FRET) und benötigen dafür fluoreszenzmarkierte Primer. Jedes Fluorochrom wird durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt, und strahlt wiederum Licht einer bestimmten Wellenlänge ab. Wenn sich zwei Fluorochrome in räumlicher Nähe befinden und die Wellenlänge des vom ersten abgestrahlten Licht der Anregungswellenlänge des zweiten Fluorochroms entspricht, wird nach Anregung des ersten Licht emittiert, das der spezifischen Wellenlänge des zweiten entspricht. So kann man den räumlichen Abstand zwischen den fluoreszenzmarkierten Primern bestimmen. Eine andere Möglichkeit ist der Einsatz interkalierender Fluorochrome, wie zum Beispiel das hier verwendete SYBR GreenI. Die Fluoreszenz steigt hier in Abhängigkeit der Menge der doppelsträngigen DNA, in die der Fluoreszenzfarbstoff eingebaut werden kann (Mülhardt, 2009, pp 110-111). Da unterschiedliche cDNA Ausgangsmengen eine Geninduktion vortäuschen können, wird jeweils gleich viel mRNA zur cDNA Synthese eingesetzt und zur Normierung ein Referenzgen (*house keeping gene*, Haushaltsgen) als Kontrolle mit gemessen. Dieser externe Standard wird nicht induziert oder in irgendeiner Weise reguliert und kann somit als Anhaltspunkt dienen, wie viel cDNA sich in der Probe befand (Mülhardt, 2009, pp 108-109).

Außerdem kann man mit Hilfe der qRT-PCR eine Schmelzkurve erstellen um die PCR-Produkte zu verifizieren. Dazu wird am Ende der Reaktion die Temperatur bis auf 95°C erhöht, wodurch es zur Denaturierung kommt. Da das verwendete Fluorochrom nur in doppelsträngiger DNA fluoresziert, kommt es bei der primerspezifischen, sequenzabhängigen Schmelztemperatur zum Fluoreszenzabfall. Für die Quantifizierung der qRT-PCR ist die Bestimmung des *crossing points* (CP) relevant. Dieser ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die Fluoreszenz eines PCR Produktes die bloße Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt und liegt am Anfang der exponentiellen Phase der DNA-Vermehrung. Daraus erfolgt die Berechnung der Induktion durch einen Stimulus anhand der $\Delta\Delta\text{CP}$ Methode (Pfaffl, 2001). Hierfür wird eine Induktion gegenüber der unstimulierten Basalbedingung ermittelt und gleichzeitig das untersuchte Gen auf ein Kontroll-Haushaltsgen bezogen: $\text{CP}(\text{Basal}_{(\text{Gen-Kontrolle})}) - \text{CP}(\text{Stimulus}_{(\text{Gen-Kontrolle})})$.

Um eine Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, wurden Intron-überspannende Primerpaare verwendet. Introns sind nicht kodierende DNA-Abschnitte, die in mRNA nicht mehr vorkommen. Sie liegen zwischen den kodierenden Exonen.

4 Material und Methoden

Die gewonnene cDNA wurde im Verhältnis 1:100 für die Reaktion eingesetzt. Die Primer wurden in nukleasefreiem Wasser auf die Konzentration 10 µM verdünnt und jeweils der Vorwärts -und Rückwärtsprimer (F -und R-Primer) zusammen gegeben. Es wurde „Fast Start SYBR Green Master“ der Firma Roche verwendet, ein Gemisch, das neben dem Fluorochrom auch alle weiteren benötigten Reagenzien für die PCR-Reaktion (4.2.3.4) enthält. Für den RT-PCR-Ansatz wurden dann 8 µl der DNA-Matrize mit 10 µl SYBR Green Master und 2 µl Primer vermischt. Dadurch erreichte man die finale Konzentration von 1 µM Primer. Nach einem Zentrifugationsschritt für 3 min und 3000 x g bei 4 °C wurde die Reaktion in einem LightCycler480[®] gestartet. Sie bestand aus einem initialen Denaturierungsschritt für 15 min bei 95 °C und 55 Zyklen bestehend aus jeweils aufeinanderfolgend 10 s 94 °C, 10 s 55 °C und 10 s 72 °C. Die Crossing-Points und Schmelzkurven konnten mit der LightCycler480[®]Software bestimmt werden.

Primer	Sequenz	Referenznummer
AC1 (Adenylylcyase 1)	L 5'-catcgagaccttctttattgtgc-3' R 5'-ccgagagaatcaaacctgga-3'	NM_001107239.1
Arhgef5 (<i>Rho guanine-nucleotide exchange factor</i> (GEF) 5)	L 5'-gcatcacacgtctcaagctg-3' R 5'-cattgctattgcagctcga-3'	XM_001073085.1
BDNF (<i>brain derived neurotrophic factor</i>)	L 5'-agcgcgaatgtgtagtggt-3' R 5'-gcaattgttgctcttttct-3'	NM_012513.3 ^(x)
CDK5 (<i>cyclin-dependent kinase 5</i>)	L 5'-ctgcgatgcagaaatacagag-3' R 5'-R tggccttgaacacagttcc-3'	NM_080885.1
c-fos (<i>FBJ osteosarcoma oncogene</i>)	L 5'-gggacagccttctactacc-3' R 5'-gatctgcgcaaaagtcctgt-3'	NM_022197.2
Cltc (<i>clathrin, heavy chain</i>)	L 5'-aattcgcttcaggagcatc-3' R 5'-ccaatgttgctgggtgat-3'	NM_019299.1
CREB1 (<i>cAMP responsive element binding protein 1</i>)	L 5'-ctagtgccagcaaccaagt-3' R 5'-ggaggacgccataacaactc-3'	NM_031017.1

4 Material und Methoden

CREM2 (cAMP responsive element modulator transcript variant 2)	L 5'-ctgctttgccacaaggtgt-3' R 5'-cgacattctttagcagcttcc-3'	NM_001110860.1
CREM3 (cAMP responsive element modulator transcript variant 3)	L 5'-actagcacggggcaatacat-3' R 5'-accatcagatcctgggtagaa-3'	NM_001110860.1
Ctgf (connective tissue growth factor)	L 5'-gctgacctagaggaaaacattaaga-3' R 5'-ccggtaggtcttcacactgg-3'	NM_022266.2
Cyr61 (cysteine-rich, angiogenic inducer, 61)	L 5'-ggatctgtgaagtgcgtcct-3' R 5'-ctgcatttcttggccttttt-3'	NM_031327.2
Egr1 (early growth response 1)	L 5'-cgaacaacctacgagcac-3' R 5'-gcgccttctcgttattcaga-3'	NM_012551.2
Egr2 (early growth response 2)	L 5'-ctaccgggtggaagacctc-3' R 5'-aatgttgatcatgccatctcc-3'	NM_053633.1
Egr3 (early growth response 3)	L 5'-caatctgtacccccgaggaga-3' R 5'-ccgatgtccatcacattctct-3'	NM_017086.1
Egr4 (early growth response 4)	L 5'-gccctcttcaacctcatgtct-3' R 5'-ggggaaaggacatccag-3'	NM_019137.1
Epha 7 (Eph receptor A7)	L 5'-ttaaattgagcgtgtgattgg -3' R 5'-tcaaacgaccactgcaaact-3'	NM_134331.1
Epha4 (Eph receptor A4)	L 5'-gaggcaactcccaaatttaca-3' R 5'-gggcttatgtcatcaacagga-3'	NM_001162411.1
fosB (FBJ osteosarcoma oncogene B)	L 5'-acgccgagtctactccag-3' R 5'-tctcctctcttcgggagac-3'	NM_001013146.1 ^(x)
JunB (jun B proto-oncogene)	L 5'-gggactgggagctcatacc-3' R 5'-aaagggtggtgcatgtgg-3'	NM_021836.2 ^(x)
Ldb2 (LIM domain binding 2)	L 5'-cagtgtgggaacacaacc-3' R 5'-ttgctctcctaccaccatc-3'	NM_001106009.1
NF-1 (neurofilament, light polypeptide)	L 5'-gaggcaactcccaaatttaca-3' R 5'-gggcttatgtcatcaacagga-3'	NM_031783.1

4 Material und Methoden

NF-m (<i>neurofilament, medium polypeptide</i>)	L 5'-cgtcatttgcgagaatacca-3' R 5'-tcttcaccctccagtagttcc-3'	NM_017029.1
NGF (<i>nerve growth factor gene, last exon</i>)	L 5'-tgcagtctcccacctctga-3' R 5'-ccagggagttcccaatatcc-3'	M36589.1 ^(x)
Npas4 (<i>neuronal PAS domain protein 4</i>)	L 5'-agggtttgctgatgagttgc-3' R 5'-tcccctccacttccatctt-3'	NM_153626.1
Nur77 (<i>nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1 (Nr4a1)</i>)	L 5'-tggtgatgttctgcctttg-3' R 5'-ggaggccatgtcgatcag-3'	NM_024388.1
p53 (<i>cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1</i>)	L 5'-gaaatctcctaccgctcaa-3' R 5'-gtcccaaaaggcttccttg-3'	NM_053891.1 ^(x)
Psd95 (<i>Postsynaptic density 95</i>)	L 5'-gaacacatatgacgttggtacctaaa-3' R 5'-tccaggtgctgagaatacga-3'	NM_019621.1
Sema 3a (<i>sema immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, (semaphorin)</i>)	L 5'-cagaggcgaaatgaagatcg -3' R 5'-gccctgttctgtcctgat-3'	NM_017310.1
Sema 3c (<i>sema immunoglobulin domain, short basic domain, secreted, (semaphorin)</i>)	L 5'-gccctgtgtgcacctacc-3' R 5'-cgatcatgaaaacttggctct-3'	NM_001106578.1
Srf (<i>serum response factor</i>)	L 5'-gcacagacctcacgcaga-3' R 5'-atgtggccaccacagtt-3'	NM_001109302.1
βAktin	L 5'-ggctcctagcaccatgaaga-3' R 5'-atctgctggaaggtggacag-3'	NM_031144.2

Tabelle 4.1: Hier verwendete PT-PCR Primer für SRF-Zielgene

Alle verwendeten Primer sind Ratten-speziespezifisch und weitestgehend Intron-überspannend. Primerpaare, für die dies nicht möglich war sind als nicht-Intron-überspannend^(x) gekennzeichnet.

4.2.4 Auswertung und Statistik

Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Prism 4.0 Software der Firma GraphPad. Die Daten sind dargestellt als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM). Unterschiede wurden als signifikant angesehen, wenn der p-Wert $\leq 0,05$ betrug und in drei Signifikanzniveaus eingeteilt (**Tabelle 4.2**). Mittelwertvergleiche zwischen zwei Gruppen wurden mit dem *Two sample t-test* (Zweistichprobentest) durchgeführt. Um Mittelwerte einer Spalte gegen Null zu testen wurde der *One sample t-test* (Einstichprobentest) mit hypothetischem Mittelwert verwendet. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden Signifikanzniveaus beim Einstichprobentest mit Rauten (#), beim Zweistichprobentest mit Sternchen (*) markiert. Durch nicht lineare Regression ließ sich aus Messpunkten eine Sättigung-Bindungskurve mit der Funktion $y = (B_{\max} \cdot x) / (K_D + x)$ erstellen (**Abbildung 4.9**). Diese beschreibt die Ligandenbindung an einen Rezeptor als Funktion ansteigender Ligandenkonzentrationen. Bei bekannten ansteigenden Ligandenkonzentrationen (x) und der jeweiligen korrespondierenden spezifischen Bindung (y) können K_D (die Gleichgewichtsdissoziationskonstante) und B_{\max} (die maximale Anzahl der Bindungsstellen) bestimmt werden (Motulsky, 1999). Zur Beurteilung der Modellgüte wurde das Bestimmtheitsmaß R^2 verwendet. Dieser Parameter hat einen Wert zwischen 0 und 1, wobei ein höherer Wert für höhere Modellgüte spricht (Motulsky, 1999).

* / #	$p \leq 0,05$
** / ##	$p \leq 0,01$
*** / ###	$p < 0,001$

Tabelle 4.2: Signifikanzniveaus für p-Werte

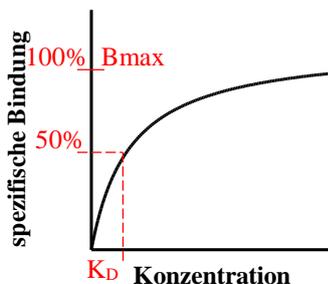


Abbildung 4.9: Sättigungs-Bindungskurve zur Bestimmung von K_D und B_{\max}

5 Ergebnisse

5.1 Nachweis endogener Opioidrezeptoren in F11 Zellen

5.1.1 Sättigungs-Bindungskurve von [³H]-Naloxon

Bei F11 Zellen handelt es sich um eine Hybridzelllinie aus DRG-Neuronen der Ratte und Neuroblastomzellen der Maus, die als gutes Modellsystem zur Analyse vom DRG-Neuronen angesehen wird (Francel et al., 1987, Puttfarcken et al., 1997, Boland et al., 1991, Jung und Miller, 2008, McIlvain et al., 2006). F11 Zellen exprimieren endogen μ OR und δ OR, jedoch keine κ OR (Fan et al., 1992, Fan et al., 1993).

Um den in dieser Arbeit verwendeten F11 Zellpool hinsichtlich seiner Opioidrezeptorexpression zu charakterisieren, wurden Sättigungskurven mit Naloxon erstellt. Naloxon ist ein subtypunselektiver inverser Agonist am Opioidrezeptor und bindet daher an alle vorhandenen Opioidrezeptoren der Zelle (Dhawan et al., 1996). Durch Bindungsstudien konnten 367 ± 92 fmol/mg spezifische Opioidbindestellen und eine Dissoziationskonstante von 9.0 ± 3.9 nM ermittelt werden (**Abbildung 5.1**). Diese Werte sind zu den Angaben über die Opioidbindestellen und deren Dissoziationskonstante in F11 Zellen in der Literatur sehr ähnlich (Fan et al., 1992). Um Ergebnisse aus F11 Zellen auf DRG-Neurone übertragen zu können, sollte die Opioidrezeptorexpression vergleichbar hoch sein. Betrachtet man die für DRG-Neurone beschriebene Werte in der Literatur, ist die Opioidrezeptorexpression dort mit 50 fmol/mg deutlich geringer (Shaqura et al., 2004). Bei der Interpretation dieser Daten muss aber beachtet werden, dass nur ein geringer Anteil von etwa 20 % der DRG-Neuronen Opioidrezeptoren exprimiert (Ji et al., 1995), während dieser Anteil durch gezielte Selektion in F11 Zellen deutlich höher ist. Berücksichtigt man dies, ist die Größenordnung der Opioidrezeptorexpression in F11 Zellen und DRG-Neuronen vergleichbar. Somit scheint der hier verwendete F11 Zellpool sich erwartungsgemäß zu

verhalten und stellt ein geeignetes Modellsystem dar, um Genregulation durch Opioide in DRG-Neuronen zu untersuchen.

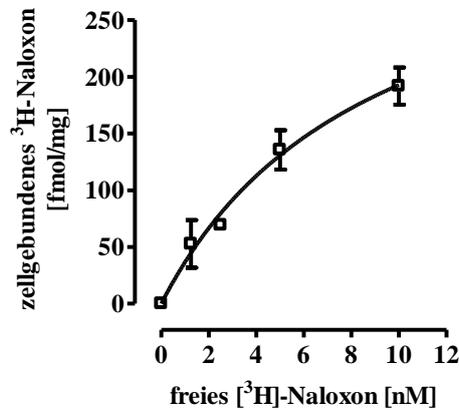


Abbildung 5.1: Sättigungskurve mit [³H]-Naloxon und F11 Zellen

Dargestellt ist die Ligandenbindung als Funktion ansteigender Ligandenkonzentrationen. Die spezifische Bindung errechnet sich als Differenz der totalen und der unspezifischen Bindung. Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,9$. Darstellung als MW \pm SEM. Es wurden 3 unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

5.1.2 Agonisteninduzierter Abbau der Opioidbindestellen

Nach Aktivierung eines GPCR kann es zu Rezeptordesensibilisierungs- und Internalisierungsvorgängen kommen. Nach seiner Internalisierung kann der Rezeptor intrazellulär abgebaut oder resensitisiert werden (Sibley et al., 1987). Endozytoseprozesse an Opioidrezeptoren finden schon nach kurzfristiger Stimulation (10 min) statt, während Proteinabbau eine Reaktion auf langfristige Rezeptoraktivierung ist. Morphinstimulation führt im Vergleich zu DAMGO zu geringerer Rezeptorinternalisierung und geringerem Proteinabbau. Diese Unterschiede werden mit der starken Toleranzentwicklung nach Morphingabe in Zusammenhang gebracht (Johnson et al., 2005).

Um einen durch DAMGO oder Morphin induzierten Rezeptorproteinabbau in F11 Zellen nachzuweisen und mögliche Unterschiede der beiden Liganden herauszuarbeiten, wurden Sättigungs-Bindungskurven mit [³H]-Naloxon an für 24 h vorstimulierten F11 Zellen durchgeführt. Dieser Zeitraum war so gewählt, dass langfristige Veränderungen der Opioidbindestellen beobachtet werden konnten. In F11 Zellen konnte eine Abnahme der Opioidbindestellen durch DAMGO gezeigt werden. Morphinstimulation scheint die

Rezeptorproteinmenge tendenziell auch zu verringern, aber nur DAMGO führt zu einem signifikanten Abbau des Rezeptorproteins (**Abbildung 5.2**). Die Opioidbindestellen in F11 Zellen verhalten sich bezüglich des Rezeptorproteinabbaus ligandenspezifisch, wobei Morphin eine deutlich geringere Degradation induziert. Dieses Verhalten ist für Morphin in der Literatur beschrieben (Ueda et al., 2003).

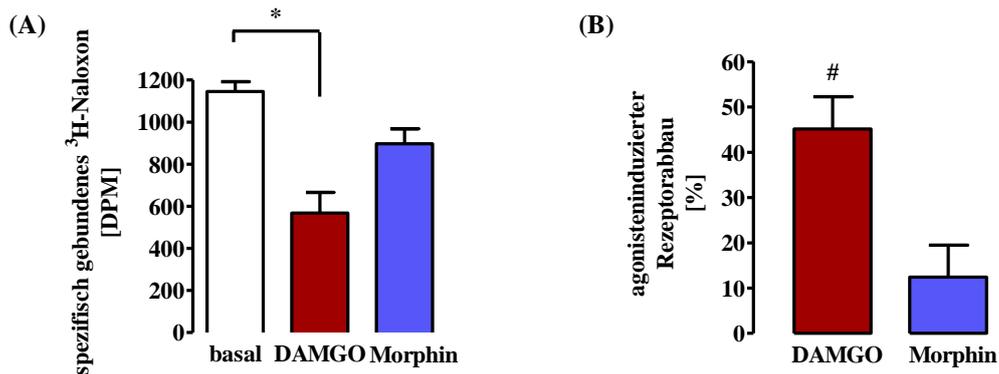


Abbildung 5.2: agonisteninduzierter Proteinabbau in F11 Zellen

Die Zellen wurden 24 h mit 1 μ M DAMGO oder Morphin vorstimuliert und Bmax ermittelt. Darstellung als MW \pm SEM. (A) Ein Beispielerperiment, durchgeführt in dreifacher Bestimmung zeigt eine Abnahme der spezifisch gebundenen Aktivität im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest. (B) Es wurde der agonisteninduzierte prozentuale Rezeptorabbau ermittelt. Signifikanztestung im Einstichprobentest. n = 3

5.1.3 Kalziumfreisetzung nach Opioidrezeptorstimulation

Opioidrezeptorstimulation erhöht die intrazelluläre Kalziumkonzentration. So erfolgt in SH-SY5Y Zellen μ OR-abhängig ein intrazellulärer Kalziumanstieg (Smart et al., 1995). Eine Aktivierung der μ OR und δ OR führt in der DRG-Neuroblastom-Hybridzelllinie ND8-47 zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration (Tang et al., 1994).

Um die zuvor an F11 Zellen nachgewiesenen Opioidbindestellen als funktionelle Opioidrezeptoren zu charakterisieren, wurden Messungen mit dem kalziumabhängigen Fluochrom Fluo8 durchgeführt. Der μ OR-spezifische Ligand DAMGO, der δ OR-spezifische Ligand DPDPE und Morphin induzierten jeweils einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in F11 Zellen (**Abbildung 5.3**). In der hier verwendeten Konzentration von 1 μ M ist die Morphinwirkung hauptsächlich μ OR-

spezifisch. Um den δ OR zu aktivieren, wären höhere Konzentrationen nötig (Raynor et al., 1994). Analog zu der DRG-Neuroblastom-Hybridzelllinie ND8-47 führt auch in F11 Zellen eine Stimulation von μ OR und δ OR zum intrazellulären Kalziumanstieg.

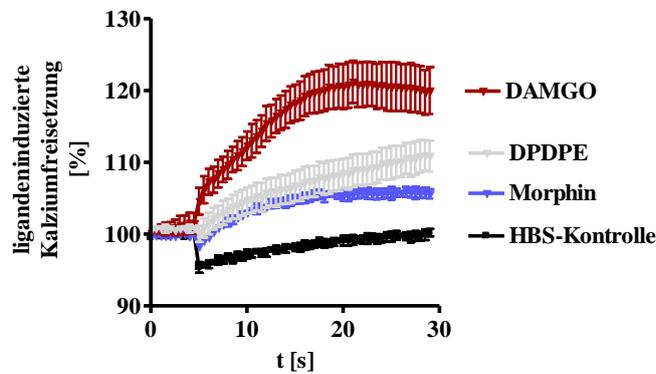


Abbildung 5.3: intrazelluläre Kalziumfreisetzung durch Opioidrezeptoren in F11 Zellen

Die Fluo8-Fluoreszenz wurde nach Injektion (bei $t = 5$ s) von Ligand oder Pufferlösung gemessen. Der erste gemessene Wert wurde als 100 % definiert, um die Werte zu standardisieren. Gezeigt sind beispielhafte Kurven für die jeweiligen Liganden aus 3 unabhängigen Experimenten in dreifacher Bestimmung. Die Opioidrezeptorliganden wurden jeweils $1 \mu\text{M}$ eingesetzt. Darstellung als $\text{MW} \pm \text{SEM}$.

5.1.4 Inhibition der AC durch Opioidrezeptoren

Die Aktivierung eines $G\alpha_{i/o}$ gekoppelten GPCR führt zur Inhibition der AC und somit zur Abnahme des intrazellulären cAMP-Spiegels. Opioidrezeptoren interagieren mit PTX-sensitiven $G\alpha_{i/o}$ -Proteinen (Connor und Christie, 1999). Sind die Opioidrezeptoren in F11 Zellen funktionell an $G\alpha_{i/o}$ -Proteine gekoppelt, so beeinflusst eine Ligandenstimulation über die Inhibition der AC den intrazellulären cAMP-Spiegel. Um dies nachzuweisen, wurde die Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opioiden in F11 Zellen untersucht. Der Naturstoff FSK ist ein direkter Aktivator der AC. Hemmende Einflüsse auf die AC lassen sich durch den zuvor erhöhten cAMP-Spiegel besser darstellen. Der μ OR-spezifische Agonist DAMGO sowie die beiden δ OR selektiven Agonisten DPDPE und DSLET inhibieren signifikant die AC-Aktivität in F11 Zellen und erniedrigen den durch FSK erhöhten cAMP Spiegel (**Abbildung 5.4**). Die durch Morphin induzierte Inhibition der AC in F11 Zellen scheint etwas geringer auszufallen, was dadurch erklärbar ist, dass Morphin eine geringere

Rezeptoraffinität zum μ OR besitzt als der selektive Ligand DAMGO (Raynor et al., 1994). Die Wirkung der Opioide auf die AC in F11 Zellen ist durch PTX blockierbar. Opioidrezeptoren in F11 Zellen sind somit funktionell an G-Proteine der PTX sensitiven Subfamilie $G\alpha_{i/o}$ gekoppelt.

5.1.5 Einflüsse von Opioiden auf CREB-abhängige Genexpression

Die Aktivierung eines GPCR kann über verschiedene Mechanismen Einfluss auf die Genregulation nehmen. Einer dieser Wege ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB und darauffolgend dessen spezifische Bindung an die CRE-Sequenz. Die durch cAMP aktivierte PKA stellt den wichtigsten CREB-Aktivator dar (3.4.2). Es ist bekannt, dass Opioide CREB-abhängige Genexpression beeinflussen können (3.5.1.2). Opioidrezeptoren sind in F11 Zellen an $G\alpha_{i/o}$ -Proteine gekoppelt und hemmen die AC-Aktivität, was wiederum zu einer Inhibition der PKA führt. PKA beeinflusst die Aktivierung des Transkriptionsfaktors CREB. Da Opioidrezeptorliganden die PKA-Aktivität beeinflussen, ist ein Effekt von Opioiden auf CREB in F11 Zellen denkbar.

Um CRE-abhängige Genexpression durch Opioide in F11 Zellen zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Reportergenkonstrukt mit sechs CRE Bindestellen verwendet. Die Expression eines Reportergens ist induzierbar durch Transkriptionsfaktorbindung an das *response element* (Jiang et al., 2008). FSK führt über einen erhöhten cAMP-Spiegel zu einer CREB-Aktivierung. Analog zur Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opioide in F11 Zellen konnte eine opioidvermittelte Inhibition der FSK-induzierten CRE Reporteraktivität in F11 Zellen gezeigt werden (**Abbildung 5.5**). Dies scheint dem hemmenden Einfluss eines $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptors auf PKA und CRE zu entsprechen und zeigt, dass funktionell $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Opioidrezeptoren in F11 Zellen Genregulationsvorgänge beeinflussen können.

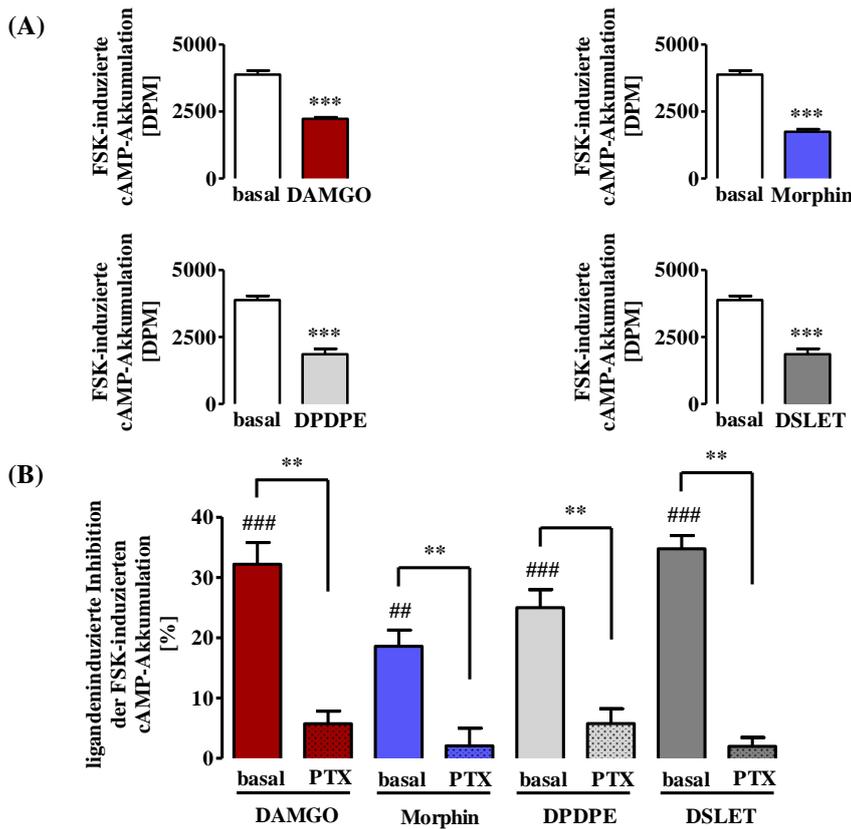


Abbildung 5.4: Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opiode in F11Zellen
 Darstellung als MW ± SEM. (A) Ein Beispielexperiment, durchgeführt in dreifacher Bestimmung. Die Zellen wurden mit je 1 µM Ligand für 30 min stimuliert. Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test. (B) Eine PTX Behandlung der Zellen erfolgte für 16 h mit 50 ng/ml. Die Zellen wurden dann für 30 min mit je 1 µM Ligand stimuliert. Eine ligandeninduzierte Inhibition der FSK (5 µM) abhängigen cAMP Akkumulation in % wurde errechnet. Signifikanztestung im Einstichproben-test (#) und Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test (*). n = 3-5

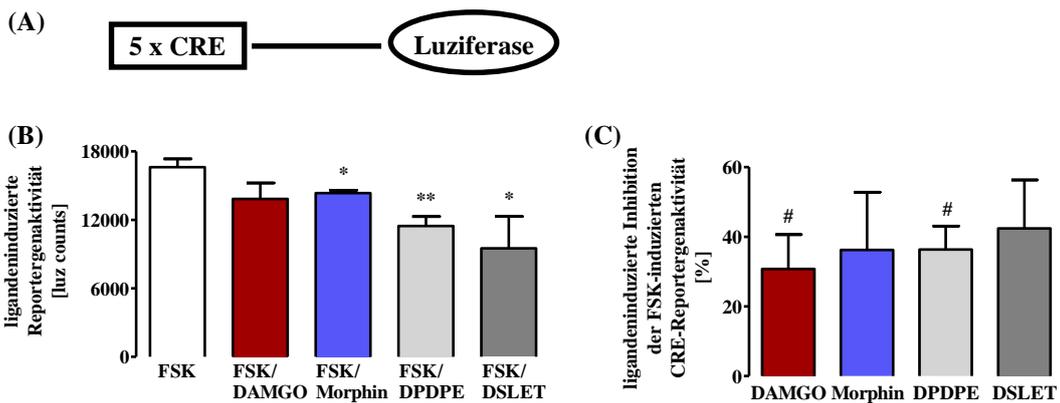


Abbildung 5.5: Opioidvermittelte Inhibition der FSK-induzierten CRE-Reporter-Aktivität
 (A) schematische Darstellung des 5 x CRE-Reportergenkonstruktes. Darstellung als MW ± SEM. (B) Veränderung der ligandeninduzierten Luziferaseaktivität bezogen auf FSK in einem Beispielexperiment, durchgeführt in vierfacher Bestimmung. FSK-Konzentration 10 µM, DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET jeweils 1 µM. Stimulationszeitraum 16 h. Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test. (C) Experimente wurden zusammengefasst und die prozentuale Inhibition des FSK-Signals ermittelt. Signifikanztestung im Einstichproben-test. n = 3-5

5.2 Genregulation durch Opioide in F11 Zellen

5.2.1 Opioidinduzierte CREB-abhängige Genexpression

Es ist bekannt, dass Morphin über die Phosphorylierung von CREB und die daraus resultierende Aktivierung von CRE Genexpressionsveränderungen induzieren kann, welche Folgen für die Opioidabhängigkeit haben können (Maldonado et al., 1996, Li und Clark, 1999). Während Opioide in F11 Zellen einen hemmenden Einfluss auf die FSK-induzierte CRE Reporteraktivität (**Abbildung 5.5**) haben, ist für NG108-15 Zellen eine CREB-Aktivierung durch Opioide gezeigt (Bilecki et al., 2004, Bilecki et al., 2000).

Um direkte Effekte von Opioiden auf CRE-abhängige Genexpression in F11 Zellen zu analysieren, wurde die opioidinduzierte CRE-Aktivität in Abwesenheit von FSK gemessen. FSK wurde als Positivkontrolle benutzt, da es über einen rezeptorunabhängig erhöhten cAMP-Spiegel CREB aktiviert. Eine vierstündige Stimulation mit DAMGO, Morphin, DPDPE und DSLET hatte keinen Einfluss auf die Aktivität des CRE Reportergenkonstruktes (**Abbildung 5.6**), während eine 16-stündige Stimulation zu einer signifikanten Inhibition der CRE Aktivität durch Morphin und DAMGO führte (**Abbildung 5.6**).

Morphin und DAMGO führen in F11 Zellen zu einer Inhibition der CRE-abhängigen Genexpression. Damit unterscheiden sich die Effekte von Opioiden auf CREB in F11 Zellen von anderen Zellsystemen, in welchen eine Aktivierung beschrieben ist (Bilecki et al., 2004, Bilecki et al., 2000). Eine Vielzahl von Signalwegen nimmt Einfluss auf die CREB-abhängige Genregulation (Johannessen et al., 2004). Zelltypspezifisch könnten jeweils unterschiedliche Signalwege mit bestimmter Wirkung auf CRE dominieren.

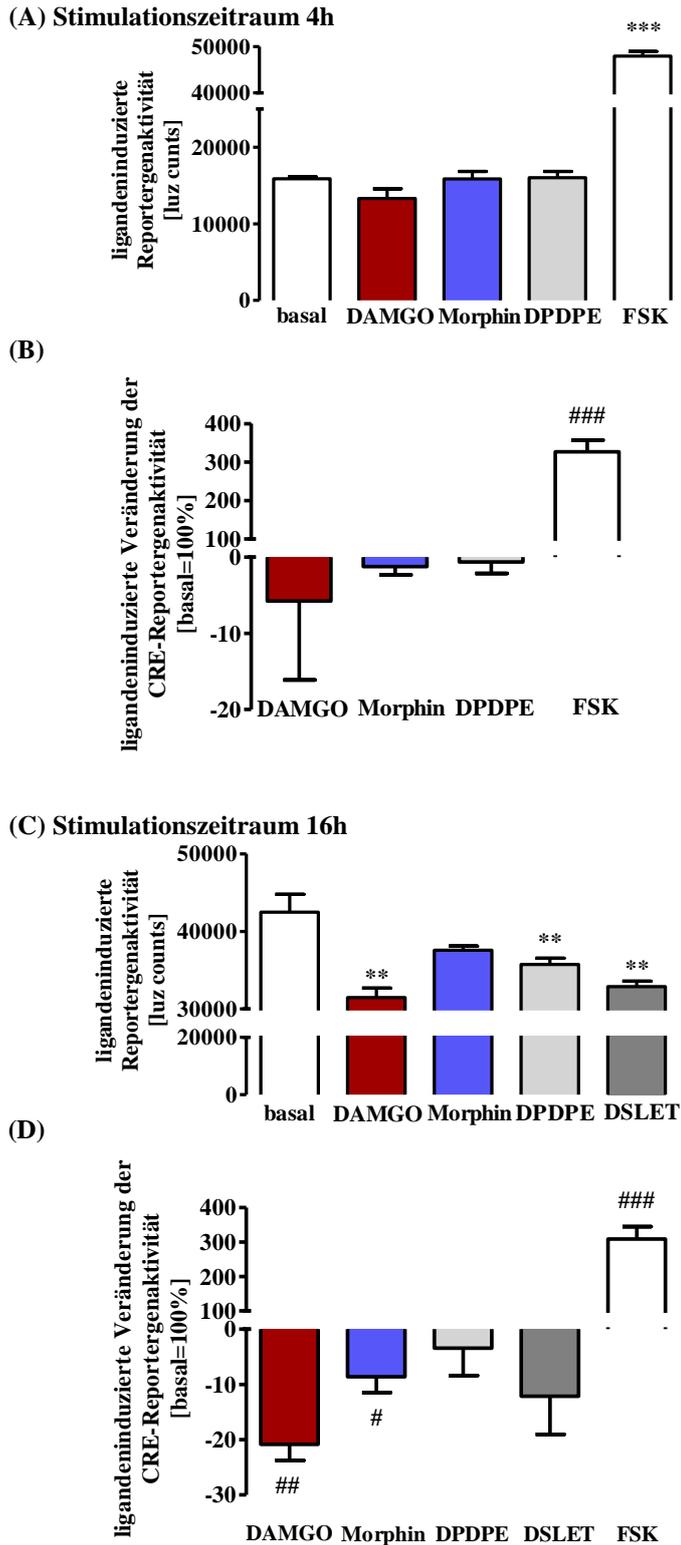


Abbildung 5.6: Einfluss von Opioiden auf die CRE-Aktivität nach 4 h und 16 h Stimulation

Darstellung als MW \pm SEM. (A&C) zeigen Veränderungen der Luziferaseaktivität nach Ligandenstimulation. Je ein Beispielexperiment, durchgeführt in sechsfacher Bestimmung. FSK 5 μ M, DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET jeweils 1 μ M. Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test. (B&D) Die prozentuelle Veränderung der Reporteragenaktivität wurde errechnet indem basale Werte als 100 % definiert wurden. Signifikanztestung im Einstichproben-test. (B) n = 2-5 (D) n = 4-6

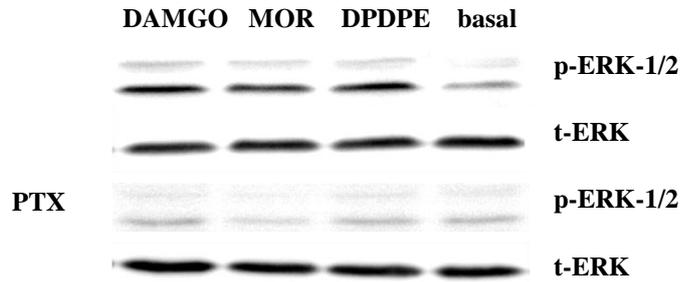
5.2.2 Opioidinduzierte SRF/TCF-abhängige Genexpression

5.2.2.1 ERK-1/2-Aktivierung durch Opioide

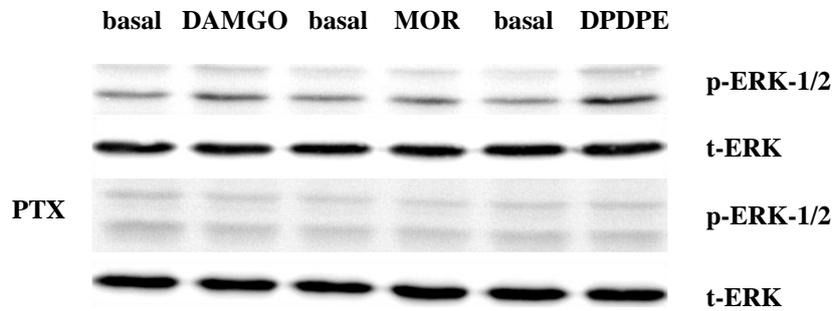
ERK-1/2 können durch Opioide aktiviert werden und diese Aktivierung kann zur Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit beitragen (Chen und Sommer, 2009). Aktivierte ERK-1/2 regulieren die Aktivität der Transkriptionsfaktoren CREB und Elk-1 aus der Familie der TCF-Transkriptionsfaktoren (Ligeza et al., 2008). Daher sollten nun die Folgen einer Opioidrezeptoraktivierung auf ERK-1/2 in F11 Zellen untersucht werden. Die ERK-1/2-Phosphorylierung durch Morphin läuft nach kurzfristiger Stimulation unabhängig von der Rezeptorinternalisierung ab (Bilecki et al., 2005). Opioide können bei längeren Stimulationszeiten eine Aktivierung von ERK-1/2 über β -Arrestin induzieren, was dann zur Translokation der ERK-1/2 in den Zellkern und zur Transkriptionsregulation führt (Zheng et al., 2008). Da der Stimulationszeitraum entscheidend für die Transkriptionsregulation zu sein scheint, wurde die ERK-1/2-Aktivierung in F11 Zellen für einen kurzfristigen und längeren Stimulationszeitraum bestimmt. Die Aktivierung der Serin/Threonin Kinase ERK-1/2 erfolgt durch Phosphorylierung von Tyrosyl -und Threonylresten (Anderson et al., 1990, Roskoski, 2012) und kann durch phosphospezifische Antikörper nachgewiesen werden.

In F11 Zellen konnte eine ERK-1/2-Phosphorylierung durch DAMGO, Morphin und DPDPE induziert werden. Diese war nach 5 minütiger und 20 minütiger (**Abbildung 5.7**) Stimulation signifikant. Eine Vorbehandlung der Zellen mit PTX konnte diesen Effekt vollständig blockieren, daher scheint die ERK-1/2-Phosphorylierung in F11 über PTX-sensitive $G\alpha_{i/o}$ -Proteine vermittelt zu sein, so wie dies für Opioide in anderen Geweben beschrieben ist (Parolaro et al., 1990).

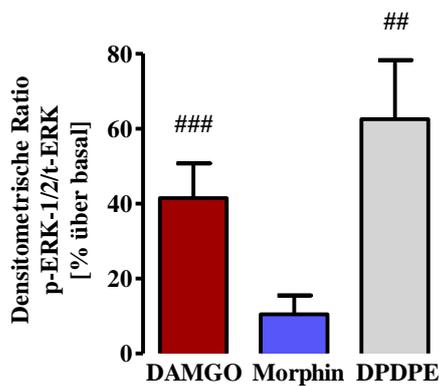
(A) 5 min Stimulation



(B) 20 min Stimulation



(C) 5 min Stimulation



(D) 20 min Stimulation

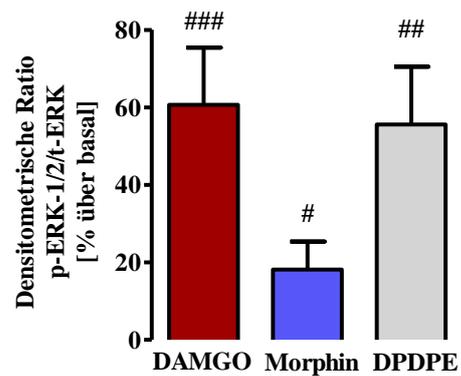


Abbildung 5.7: ERK-1/2-Phosphorylierung durch Opiode in F11 Zellen nach 5 min und 20 min Stimulation

Die Zellen wurden mit je 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE stimuliert. Eine PTX-Behandlung erfolgte für 16 h mit 50 ng/ml. Es wurden phospho-ERK-1/2-Antikörper (p-ERK) und ERK-2-Antikörper (t-ERK) verwendet. (A & B) zeigen repräsentative Immunoblots. In (C & D) wurden Experimente densitometrisch quantifiziert und die p-ERK-1/2/t-ERK- Ratio ermittelt. Diese wurde normiert indem Werte unstimulierter Zellen als 100 % definiert wurden. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichproben-test. n = 9-10

5.2.2.2 Opioidvermittelte Aktivierung eines TCF/SRF, AP-1, STAT-abhängigen Reporters

Neben CREB existieren weitere Transkriptionsfaktoren mit deren Hilfe GPCR Einfluss auf die Genregulation in der Zelle nehmen können. Da Genregulation durch Opioide in F11 Zellen nicht CREB-vermittelt zu sein scheint, stellt sich die Frage nach dem in diesen Zellen verantwortlichen Transkriptionsfaktor. Transkriptionsfaktoren binden an regulatorische Elemente und können somit Transkription initiieren (Blackwood und Kadonaga, 1998). Bekannte durch GPCR regulierte regulatorische Elemente sind *Sis-Inducible Element* (SIE), SRE, die ETS-Bindestelle und die AP-1-Domäne. SIE wird durch Bindung von *sis-inducible factor* (SIF), einem *signal transducer and activator of transcription* (STAT)-Dimer aktiviert. STAT-Proteine wiederum können durch *janus kinases* (JAK) phosphoryliert und dadurch aktiviert werden (Janknecht et al., 1995). Eine Aktivierung von STAT ist auch direkt durch PKC oder MAPK möglich (Weber-Nordt et al., 1998). SRE wird durch Bindung von SRF aktiviert. TCF wie Elk-1 binden nach Komplexbildung mit SRF an ETS-Motive (Janknecht et al., 1995). Das *activating protein-1* gehört zur Familie der basischen Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren und bindet an die AP-1-DNA-Sequenz. Das AP-1-Protein ist ein Heterodimer aus je einem Protein der Fos und der Jun-Transkriptionsfaktorfamilie (Nestler und Hyman, 2002). Hier wurde ein Reportergenkonstrukt benutzt, das im Promotor transkriptionsaktivierende regulatorische Elemente für die Transkriptionsfaktoren TCF/SRF, STAT und AP-1 besitzt. DAMGO, Morphin, DPDPE und DSLT induzierten in F11 Zellen über das ETS/SRE, SIE, AP-1-Reportergenkonstrukt eine signifikante Luziferaseexpression, die dem Effekt von 20 % Serum entsprach (**Abbildung 5.8**). Opioidrezeptorliganden können in F11 Zellen Genexpressionsveränderungen induzieren. Jedoch bleibt unklar, ob TCF/SRF, AP-1 oder STAT in diesem Fall die größte Rolle spielt.

5.2.2.3 Opioidabhängige Aktivierung eines reinen TCF/SRF-abhängigen Reporters

Um das für die Reporteragenaktivierung verantwortliche *response element* weiter einzugrenzen, wurde jetzt ein Reporteragenkonstrukt verwendet, das fünf Wiederholungen der SRF/TCF Bindestelle, aber keine weiteren *response elements* enthält. Morphin, DAMGO, DPDPE und DSLET konnten in F11 Zellen eine SRF/TCF-abhängige Luziferaseexpression induzieren (**Abbildung 5.9**). Die Liganden unterscheiden sich in der Stärke der Reporterageninduktion. Der μ OR-selektive Agonist DAMGO hatte die stärkste Wirkung auf das TCF/SRF Reporteragenkonstrukt und DPDPE führte zur geringsten Aktivierung. Morphin wirkt auf δ OR und μ OR, hat jedoch eine höhere Affinität zum μ OR. Bei der verwendeten Konzentration von 1 μ M ist davon auszugehen, dass der Effekt von Morphin auf die ETS/SRE-Reporteraktivität großteils μ OR-vermittelt ist. Der selektive δ OR-Ligand DSLET hat zusätzlich eine gewisse Affinität zum μ OR (Fukuda et al., 1995, Raynor et al., 1994). Eine Stimulation von δ OR und μ OR führt in F11 Zellen zur TCF/SRF Aktivierung, wobei μ OR Liganden eine etwas stärkere TCF/SRF Aktivierung erzielen. Die beobachtete morphininduzierte ETS/SRE-Aktivierung in F11 Zellen ist bislang in der Literatur nicht beschrieben. Um Artefakte auszuschließen, wurde die Trägersubstanz Methanol hinsichtlich ihrer Effekte auf die Reporterageninduktion untersucht. Hier war jedoch kein Einfluss auf die ETS/SRE-Reporteraktivität festzustellen.

Um die Hypothese zu testen, dass die morphininduzierte ETS/SRE-abhängige Genexpression in F11 Zellen durch eine Aktivierung des μ OR vermittelt wird, wurde der selektiven μ OR-Antagonist CTAP (Pelton et al., 1986) verwendet und dessen Einfluss auf die ETS/SRE-Reporteragenaktivität untersucht.

Durch den μ -Opioidrezeptorantagonist konnte die durch DAMGO und Morphin induzierte Reporteragenaktivität inhibiert werden, während die DPDPE-abhängige Luziferaseexpression sogar etwas verstärkt zu sein schien (**Abbildung 5.10**). Daher kann man davon ausgehen, dass die morphinvermittelte ETS/SRE-abhängige Genexpression in F11 Zellen über den μ OR vermittelt wird. Der verstärkte Effekt von DPDPE auf die Reporteragenaktivität in Anwesenheit von CTAP stellt einen interessanten Nebenbefund

da. Der Befund deckt sich mit Erkenntnissen, nach denen μ OR und δ OR in endogenen Expressionssystemen Heterodimere bilden können, in denen durch Rezeptorinteraktion die Bindestellen für δ OR-spezifische Liganden durch μ OR-selektive Liganden erhöht werden können (Gomes et al., 2000). Dieses Phänomen wurde jedoch auch nach 5 unabhängigen Einzelexperimenten statistisch nicht signifikant.

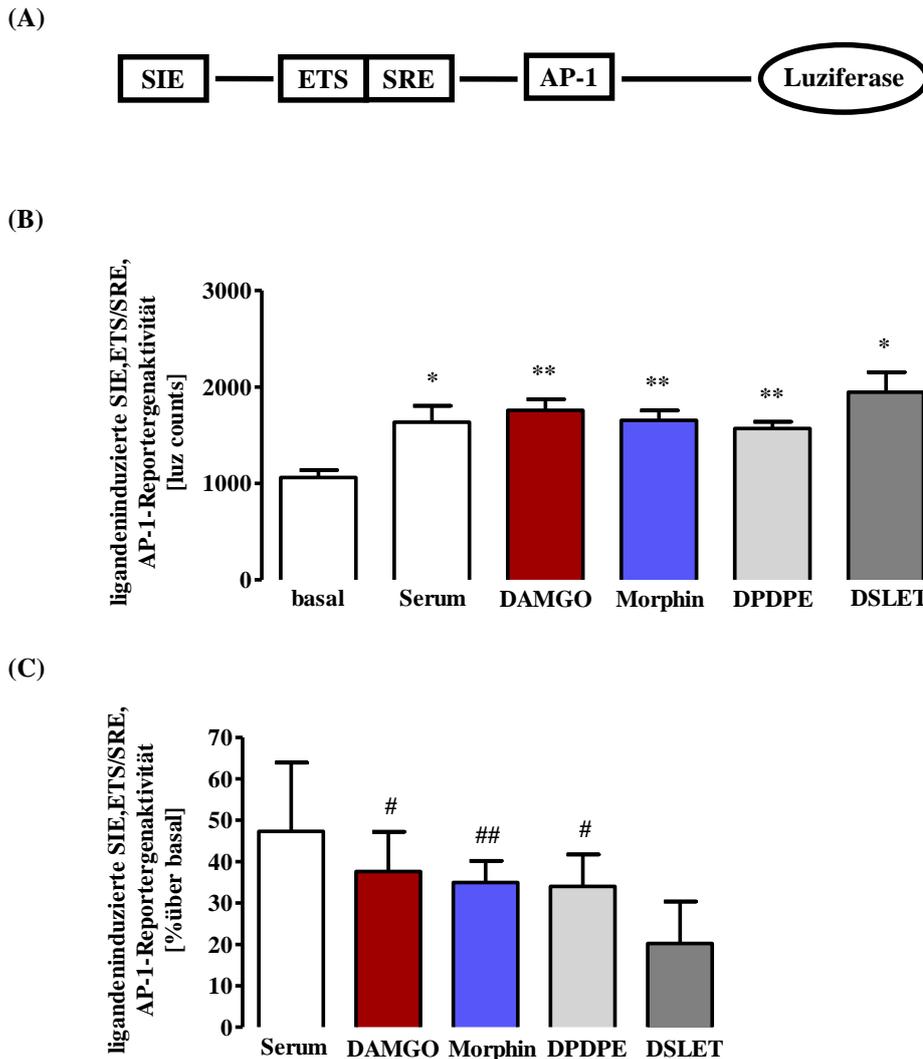
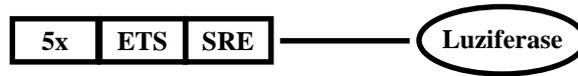


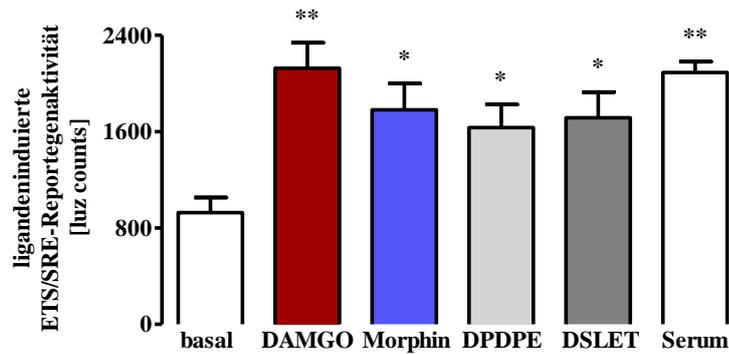
Abbildung 5.8: Opioidinduzierte SIE, ETS/SRE, AP-1-Reporteraktivität in F11 Zellen

(A) schematische Darstellung der *response elements* im SIE, ETS/SRE, AP-1- Reportergenkonstrukt Darstellung als MW \pm SEM. (B) Ein Beispielexperiment, durchgeführt in vierfacher Bestimmung. Die Zellen wurden mit 20 % Serum oder je 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET für 6 h stimuliert. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest. (C) Experimente wurden zusammengefasst indem basale Reporterexpression als 100 % definiert wurde. Signifikanztestung im Einstichprobentest. n = 4-5

(A)



(B)



(C)

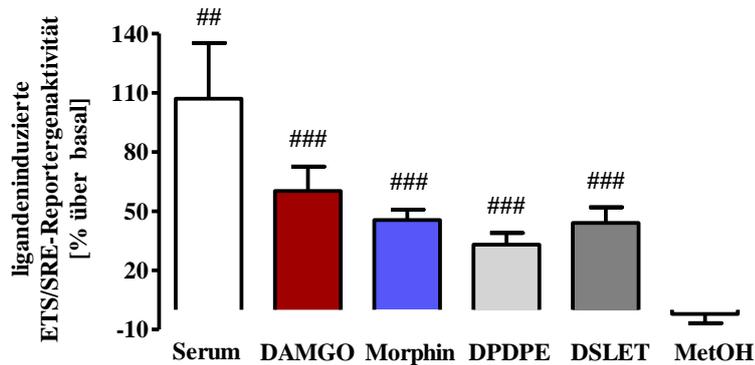


Abbildung 5.9: Opioidinduzierte 5 x ETS/SRE-Reporteraktivität in F11 Zellen

(A) schematische Darstellung des 5 x ETS/SRE-Reportergenkonstruktes. Darstellung als MW \pm SEM. (B) Ein Beispielexperiment, durchgeführt in dreifacher Bestimmung. Die Zellen wurden mit 20 % Serum oder jeweils 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET für 6 h stimuliert. 0,2 % Methanol (MetOH) dient als Kontrolle, da Morphin darin gelöst war. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest. (C) Experimente wurden zusammengefasst indem basale Reporteragenaktivität als 100 % definiert wurde. Signifikanztestung im Einstichprobentest. n = 8-12

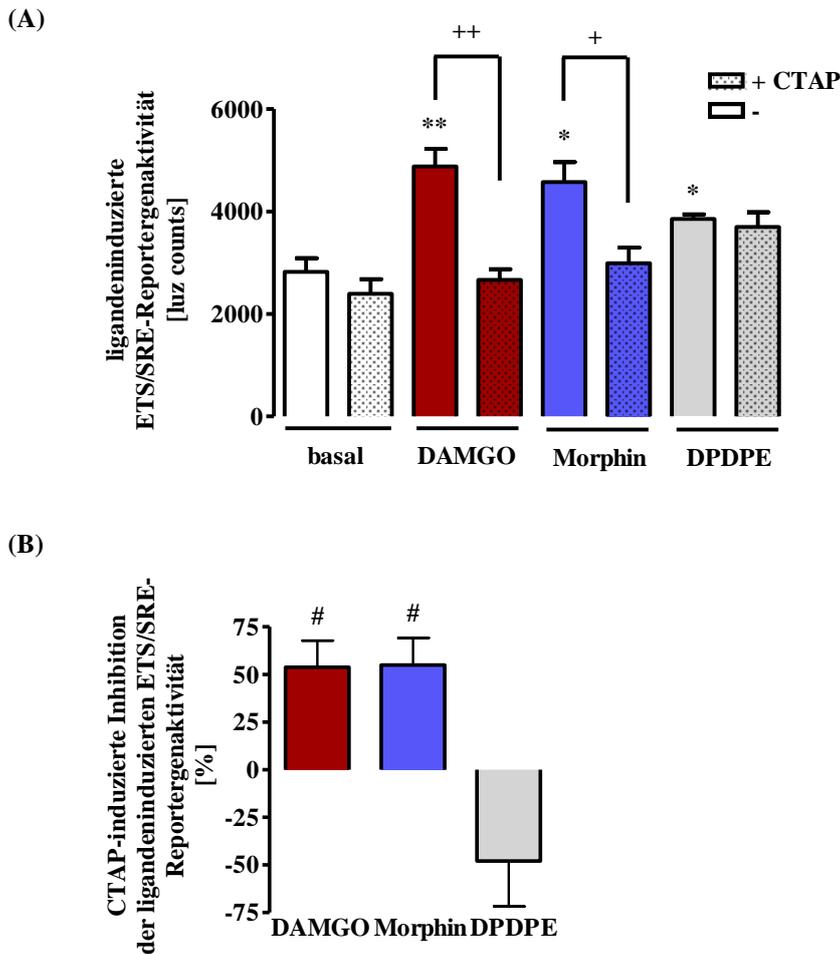


Abbildung 5.10: Einfluss des μ OR-Antagonist CTAP auf die ETS/SRE-Reporteraktivität

Darstellung als MW \pm SEM. (A) Ein Beispielerperiment, durchgeführt in Triplikaten. Stimulation erfolgte mit 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE jeweils mit/ohne 1 μ M CTAP. Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test (gekennzeichnet bezüglich basal (*), bezüglich CTAP (+)) (B) Die Ergebnisse wurden verwendet um die prozentuelle Inhibition der ligandeninduzierten Reporteraktivität durch CTAP zu ermitteln. Dafür wurde jeweils von ligandeninduzierter Reporteraktivität der dazugehörige Basalwert unstimulierter Zellen abgezogen. Dann wurde der prozentuelle Anteil der Reporteraktivität eines Liganden in Anwesenheit von CTAP an dessen Reporteraktivität ohne CTAP errechnet. Dadurch war die ligandeninduzierte Reporteraktivität als 100 % definiert. Der inhibitorische Effekt von CTAP ergab sich, in dem man den Anteil in Anwesenheit von CTAP von 100 abzog. Signifikanztestung im Einstichproben-test. n = 4-5

5.2.3 ERK-1/2 und Elk-1 Abhängigkeit der opioidinduzierten TCF/SRF-Aktivierung

5.2.3.1 Morphinvermittelte TCF/SRF-Aktivierung erfolgt ERK-1/2-abhängig

Neben ERK-1/2 sind eine Reihe anderer Kinasen bekannt, die TCF aktivieren können, darunter die p38 und JNK aus der Familie der MAPK, aber auch die PI3K (Yordy und Muise-Helmericks, 2000). Darüber hinaus kann SRE-abhängige Genexpression auch durch TCF-unabhängige SRF-Aktivierung induziert werden. Während die TCF-abhängige SRF-Aktivierung durch Mitglieder der MAPK-Familie vermittelt wird, ist die alleinige SRF-Aktivierung durch Rho-GTPasen (Hill et al., 1995) und durch *myocardin-related transcription factors* (MTRF) möglich. Einige Proteine der MTRF-Familie werden auch durch Rho-GTPasen reguliert (Posern und Treisman, 2006).

Um den Einfluss von ERK-1/2 auf die μ OR-vermittelte ETS/SRE-Aktivierung durch Morphin in F11 Zellen zu untersuchen, wurde der Inhibitor PD184352 benutzt. Dieser verhindert die Aktivierung von ERK-1/2, indem er die Aktivierung der *upstream*-Kinase MEK verhindert (Davies et al., 2000). Die DAMGO -und auch die morphinvermittelte Aktivierung des ETS/SRE-Reportergenkonstruktes lies sich durch PD184352 signifikant inhibieren. Durch die Inhibition der ERK-1/2 wurde auch die seruminduzierte TCF/SRF-Aktivierung etwas inhibiert, was darauf hinweist, dass ein Teil der Serumwirkung über ERK-1/2 vermittelt wird. Auch der Basalwert konnte durch den Inhibitor gesenkt werden (**Abbildung 5.11**). Dies spricht für eine basale ERK-1/2 und somit ETS/SRE Aktivität in der Zelle. Jedoch fällt die PD184352-vermittelte Inhibition für DAMGO und Morphin prozentuell über doppelt so groß aus, wie die des Basalwertes. Folglich ist die ETS/SRE Aktivität nicht durch eine basale ERK-1/2-Aktivität bedingt sondern durch eine spezifische μ OR-abhängige Komponente. Daher kann man schlussfolgern, dass ERK-1/2 eine wichtige Rolle bei den Effekten von Morphin auf den ETS/SRE-Reporter spielt.

5.2.3.2 Elk-1 Phosphorylierung durch Morphin

Die Familie der *ternary complex factor* Transkriptionsfaktoren besteht aus den Proteinen Elk-1, Sap-1 und Net-1 (Besnard et al., 2011b, Price et al., 1995), welche alle an das ETS-Motiv des hier verwendeten ETS/SRE-Reportergenkonstrukt binden können. Um den relevanten TCF für die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung zu ermitteln, wurde die μ OR-vermittelte Elk-1-Phosphorylierung durch DAMGO und Morphin in F11 Zellen betrachtet.

Eine Phosphorylierung an Serinresten von Elk-1 (Serin 383 und Serin 389) führt zu dessen Aktivierung (Besnard et al., 2011b). Daher lässt sich durch einen phosphospezifischen Antikörper eine Elk-1 Aktivierung feststellen. Neben ERK-1/2 können auch JNK und p38 aus der Familie der MAPK Elk-1 aktivieren (Besnard et al., 2011b). Deswegen wurde erneut der MEK-Inhibitor PD184352 verwendet um zu testen ob die Elk-1-Phosphorylierung ERK-1/2 vermittelt ist. (**Abbildung 5.12**).

Stimulationsmaxima wurden zusammengefasst, jeweils Werte der 2 min und 5 min Stimulation und Werte der 20 min und 30 min Stimulation wurden vereint (Frühphase und Spätphase). Für DAMGO wurde in F11 Zellen eine signifikante Elk-1-Phosphorylierung nach 20-30 min Stimulation festgestellt. Diese war durch Inhibition der ERK-1/2 verringert. Auch Morphinstimulation führte in F11 Zellen zu verstärkter Phosphorylierung von Elk-1. Diese Elk-1 Aktivierung zeigte einen zweiphasigen Verlauf. Eine signifikante Phosphorylierung konnte nach 2-5 min Stimulation, aber auch nach 20-30 min Stimulation mit Morphin induziert werden. Die Phosphorylierung konnte durch PD184352 inhibiert werden, wobei nur die Inhibition des späten Phosphorylierungsmaximums signifikant war. (**Abbildung 5.13**).

Folglich scheint die ERK-1/2-abhängige ETS/SRE-Aktivierung durch Morphin in F11 Zellen Elk-1 vermittelt zu sein. Dafür konnten in unserem Labor noch weitere Hinweise gefunden werden. Es wurde gezeigt, dass die Koexpression einer dominant-negativen Elk-1 Mutante (REST/ELK-1- δ C) mit dem ETS/SRE-Reportergenkonstrukt die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung in F11 Zellen abschwächt (Rothe et al., 2012). Somit scheint Elk-1 für die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung eine entscheidende Rolle zu spielen.

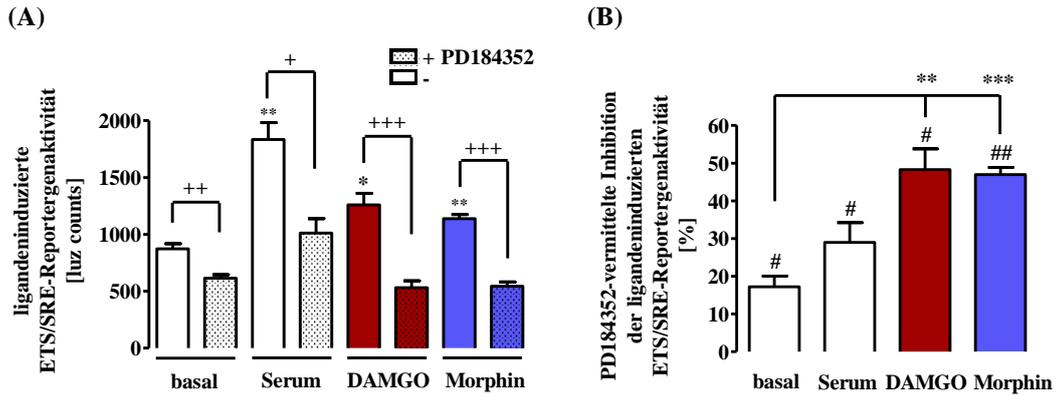


Abbildung 5.11: Einfluss von PD184352 auf die ETS/SRE-Reportergenaktivität

Darstellung als MW \pm SEM. (A) Ein Beispielexperiment, durchgeführt in drei- bis vierfacher Bestimmung. Stimulation mit DAMGO bzw. Morphin 1 μ M und Serum 20 %. Bei PD184352-Behandlung wurden die Zellen mit 10 μ M für 30 min vorstimuliert. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest (gekennzeichnet bezüglich basal (*), bezüglich PD184352 (+)). (B) Experimente wurden verwendet um die durch PD184352-vermittelte Inhibition der ligandeninduzierten ETS/SRE-Reportergenaktivität zu errechnen. Dazu wurde jeweils von der ligandeninduzierten Reportergenaktivität der Basalwert unstimulierter Zellen abgezogen. Die ligandeninduzierte Signale in Anwesenheit von PD184352 wurden in Prozent derer ohne den Inhibitor ausgedrückt, womit Signale ohne Inhibitor als 100 % definiert waren. Um die prozentuelle Inhibition zu erhalten wurde nun dieser Prozentwert von 100 subtrahiert. Signifikanztestung im Einstichprobentest (#) und Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest (*). n = 3-4

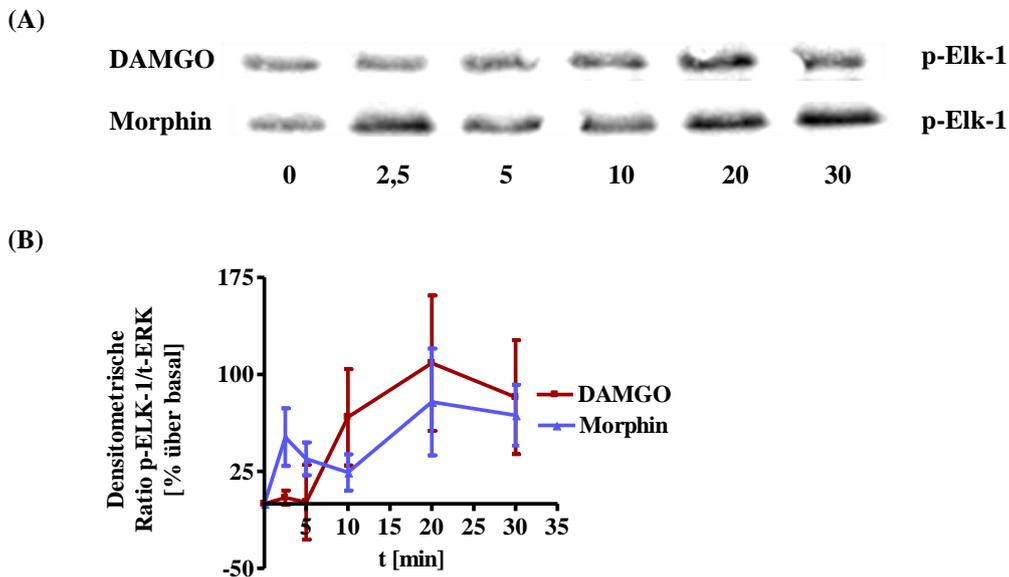


Abbildung 5.12: Elk-1 Phosphorylierung durch Opioidoide in F11 Zellen

(A) zeigt einen repräsentativen Immunoblot. Die Stimulation erfolgte mit 1 μ M DAMGO/ Morphine für den angegebenen Zeitraum. Es wurde ein phospho-Elk-1 (p-Elk-1) spezifischer Antikörper und ein ERK-2-Antikörper (t-ERK) als Ladekontrolle verwendet. (B) zeigt den zeitlichen Verlauf der Elk-1 Phosphorylierung. Darstellung als MW \pm SEM. Nach densitometrischer Quantifizierung wurde die Ratio p-Elk-1/t-ERK errechnet. Basalwerte wurden jeweils als 100 % definiert. n = 3

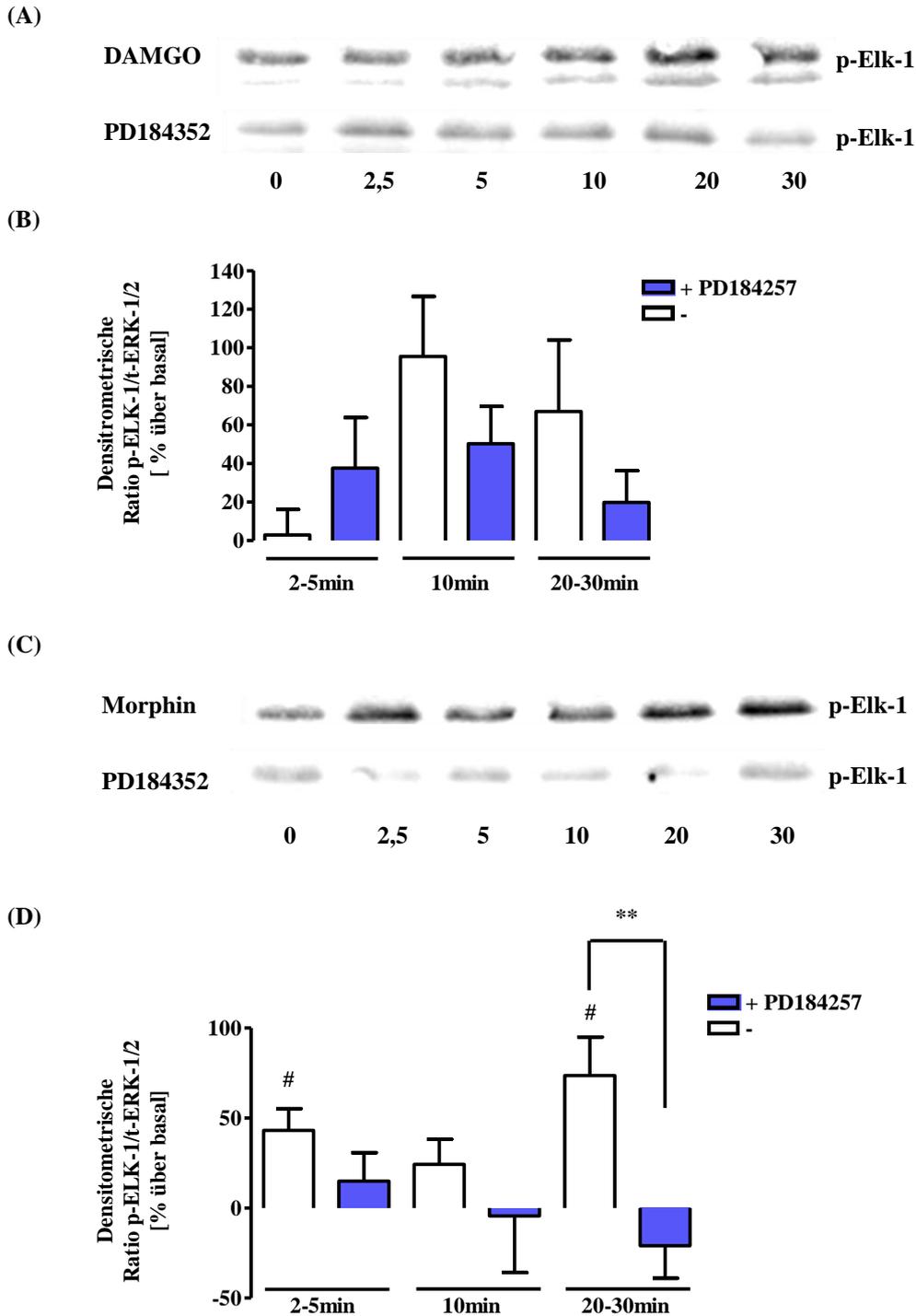


Abbildung 5.13: Aktivierung von Elk-1 durch Morphin in F11 Zellen

(A & C) zeigen einen repräsentativen Immunoblot. Bei Einsatz von 10 μ M PD184352 wurde für 30 min vorstimuliert. Stimulation mit 1 μ M Morphin/DAMGO für den angegebenen Zeitraum. Es wurden ein phospho-Elk-1 (p-Elk-1) spezifischer Antikörper und ein ERK-2-Antikörper (t-ERK) als Ladekontrolle verwendet. Nach densitometrischer Quantifizierung wurde die Ratio p-Elk-1/t-ERK errechnet und Basalwerte als 100 % definiert. (B & D) Darstellung der Elk-1-Phosphorylierung mit inhibitorischen Effekten von PD184352. Werte der 2- und 5 min Stimulation wurden als Frühphase, Werte der 20- und 30 min Stimulation als Spätphase definiert. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichprobenstest (#) und Mittelwertvergleich im Zweistichprobenstest (*). n = 3

5.3 Opioidabhängige Signalwege in NG108-15 Zellen

5.3.1 Nachweis einer funktionellen $G\alpha_{i/o}$ -Kopplung der endogenen Opioidrezeptoren

NG108-15 Zellen exprimieren endogen Opioidrezeptoren und sind ein etabliertes Modellsystem um opioidinduzierte Signalwege zu untersuchen (Blume, 1978). Für NG108-15 Zellen ist eine DPDPE -und Morphin-vermittelte CRE Aktivierung gezeigt (Bilecki et al., 2004, Bilecki et al., 2000). In unserem Labor konnte zusätzlich auch eine CRE Aktivierung durch DAMGO in NG108-15 Zellen gezeigt werden (Rothe et al., 2012). Die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung in F11 Zellen stellt einen bislang unbekanntem Signalweg dar. Es wäre denkbar, dass der ETS/SRE Signalweg auch in anderen Zellsystemen eine Rolle bei der morphinvermittelten Genregulation spielt. Daher wurden NG108-15 Zellen hinsichtlich opioidvermittelter ETS/SRE-Reporteraktivität untersucht.

Zunächst wurde die funktionelle Kopplung der Opioidrezeptoren in NG108-15 Zellen an $G\alpha_{i/o}$ -Proteine untersucht. Dies erfolgte durch Bestimmung der opioidvermittelten Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation. Durch den Einsatz subtypspezifischer Liganden sollten gleichzeitig auch eventuelle ligandenspezifische Unterschiede der AC-Inhibition zwischen F11 Zellen und NG108-15 Zellen detektiert werden. In NG108-15 Zellen wurde eine signifikante Inhibition der AC-Aktivität durch DAMGO, DPDPE, DSLET und Morphin festgestellt, welche durch PTX blockierbar war (**Abbildung 5.14**). Somit sind in NG108-15 Zellen Opioidrezeptoren funktionell an $G\alpha_{i/o}$ -Proteine gekoppelt. Auffällig war jedoch die im Vergleich zu F11 Zellen deutlich stärkere Inhibition der FSK-vermittelten cAMP Akkumulation durch δ OR-spezifische Liganden, insbesondere den selektivsten Liganden DPDPE. Dieser Befund deckt sich mit einer vorbeschriebenen, vermehrten δ OR Expression im Vergleich zu μ OR in NG108-15 Zellen (Gomes et al., 2000).

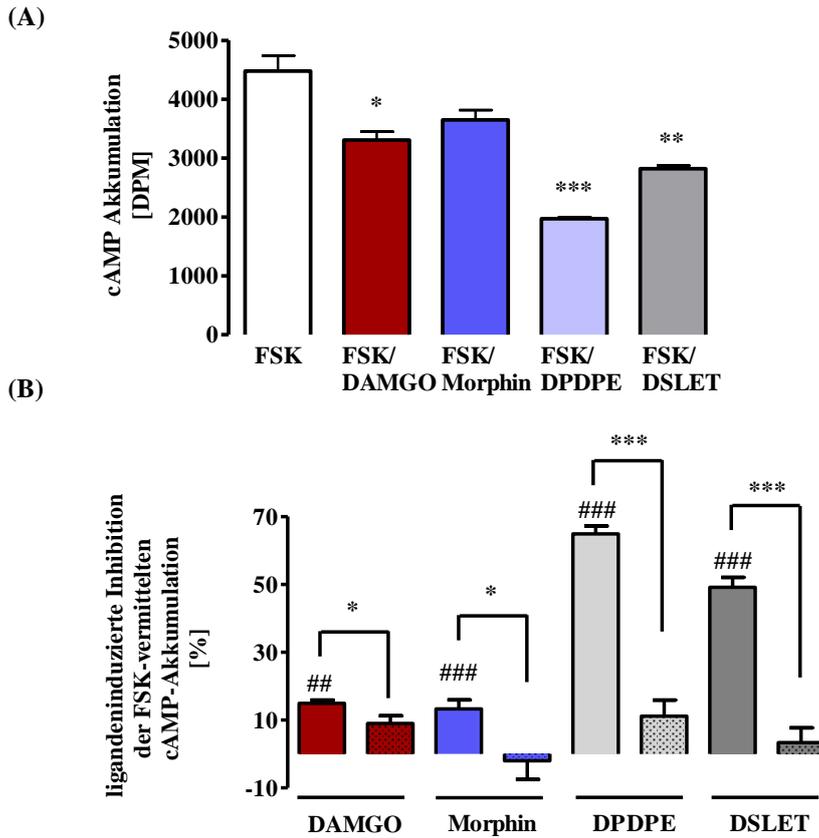


Abbildung 5.14: Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opiode in NG108-15 Zellen

Darstellung als MW \pm SEM. (A) Ein Beispielexperiment, durchgeführt in dreifacher Bestimmung zeigt eine Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation bezogen auf basal. Die Zellen wurden mit 10 μ M FSK und je 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET für 30 min stimuliert. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest. (B) Eine PTX-Behandlung der Zellen erfolgte für 16 h mit 50 ng/ml. Stimulation für 30 min mit je 1 μ M DAMGO, Morphin, DPDPE, DSLET. Experimente wurden verwendet um eine ligandeninduzierte Inhibition der FSK-abhängigen cAMP Akkumulation in % zu errechnen. Signifikanztestung im Einstichprobentest (#) und Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest (*). n = 2-7

5.3.2 Aktivierung TCF/SRF-abhängiger Genexpression durch Opiode

Um zu überprüfen, ob die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung F11 zellspezifisch ist, wurden NG108-15 Zellen verwendet und eine Aktivierung des ETS/SRE-Reportergenkonstruktes durch Opiode untersucht. Eine Stimulation von NG108-15 Zellen mit Serum und DPDPE führte zur signifikanten Aktivierung der TCF/SRF-abhängigen Genexpression. Morphin jedoch konnte in diesem Zellsystem keine TCF/SRF-Reporteraktivierung induzieren. Morphin hat eine geringere Affinität für den

δ OR verglichen mit dem μ OR (Fukuda et al., 1995, Raynor et al., 1994). NG108-15 Zellen exprimieren jedoch mehr δ OR im Vergleich zu F11 Zellen (Gomes et al., 2000). Um auszuschließen, dass affinitätsbedingte, Rezeptorsubtypspezifische Unterschiede die fehlende ETS/SRE-Aktivierung bedingen wurde nun eine deutlich höhere Morphinkonzentration (10 μ M) verwendet. Für diese war bekannt, dass sie in NG108-15 Zellen zu einer Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation führt, die in ihrem Ausmaß der durch 1 μ M DPDPE-induzierten Inhibition entspricht (Rothe et al., 2012). Auch diese hohe Morphinkonzentration führte nicht zu einer Aktivierung des TCF/SRF-Reportergenkonstruktes (**Abbildung 5.15**). Daher kann nicht die geringere Affinität des Morphins für den δ OR für die fehlende TCF/SRF-Aktivierung verantwortlich gemacht werden. Vielmehr scheinen zelltypspezifische Mechanismen zu diesem Unterschied zu führen.

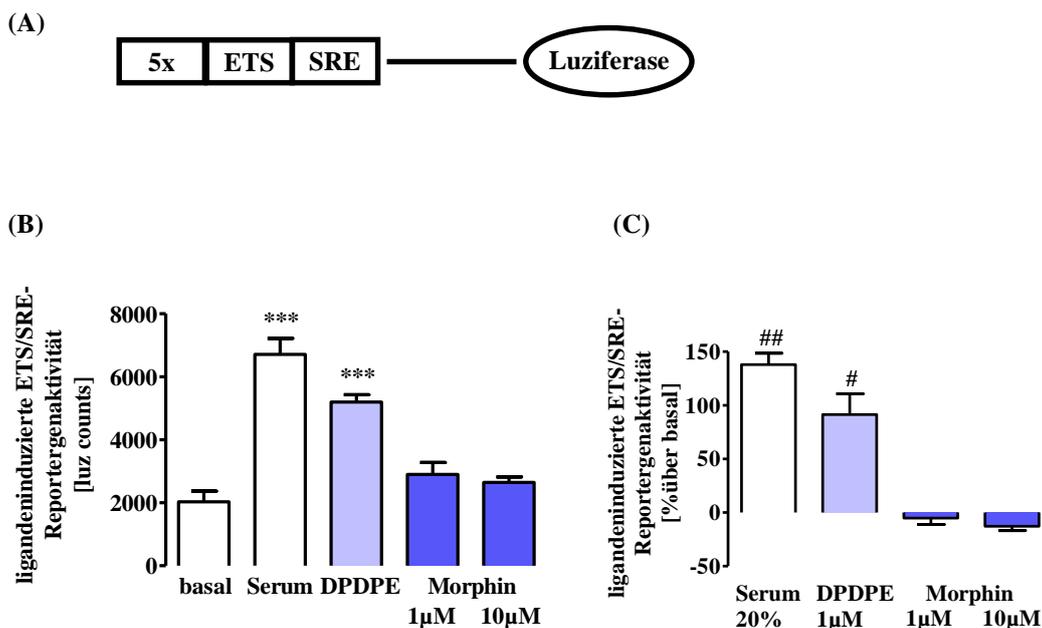


Abbildung 5.15: Opioidinduzierte 5 x ETS/SRE-Reporteraktivität in NG108-15 Zellen

(A) schematische Darstellung des 5 x ETS/SRE-Reportergenkonstruktes Darstellung als MW \pm SEM. (B) Ein Beispielerperiment, durchgeführt in vierfacher Bestimmung zeigt Veränderungen der ligandeninduzierten Reporteraktivität bezogen auf Basalbedingungen. Die Zellen wurden mit 20 % Serum oder jeweils 1 μ M DPDPE, Morphine bzw. 10 μ M Morphine für 6 h stimuliert. Mittelwertvergleich im Zweistichproben-test. (C) Experimente wurden zusammengefasst, indem basale Reporteraktivität als 100 % definiert wurde. Signifikanztestung im Einstichproben-test. n = 2-4

5.4 ETS/SRE-abhängige Genregulation durch Morphin

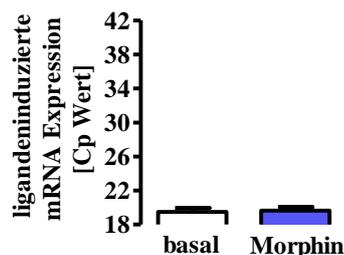
5.4.1 mRNA-Induktion durch Morphin in F11 Zellen

Um mögliche Folgen einer morphinvermittelten ERK-1/2-abhängigen TCF/SRF-Aktivierung in F11 Zellen zu untersuchen sollten nun Zielgene identifiziert werden, welche Morphin ETS/SRE-abhängig reguliert. Dazu wurde der Einfluss von Morphin auf die Expression von Genen untersucht, die bekanntermaßen in Neuronen durch SRF reguliert werden (Knoll und Nordheim, 2009). Die zu untersuchenden Gene wurden in zwei Gruppen eingeteilt, von denen eine IEG beinhaltete, die nach kurzzeitiger Ligandenstimulation schnell und transient induziert werden. Die andere Gruppe bestand aus Proteinen, deren Expression erst nach längerer Stimulationszeit induziert wird.

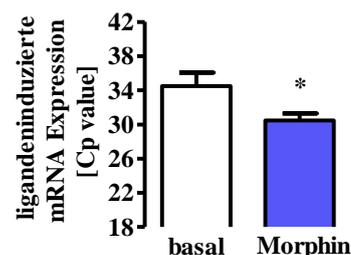
Eine qRT-PCR wird mit cDNA durchgeführt, die aus zuvor gewonnener mRNA durch reverse Transkription gewonnen wird. Dadurch können indirekt Aussagen zur Menge der mRNA gemacht werden. Der CP-Wert in der qRT-PCR ist definiert als der Zeitpunkt, an dem die durch interkalierende Fluorochrome erzeugte Fluoreszenz eines PCR Produktes die bloße Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Der CP-Wert beschreibt die Anzahl der nötigen Amplifikationszyklen um ein bestimmtes Fluoreszenzniveau zu überschreiten und ist umso geringer je mehr Matrize anfangs vorlag. Ist die Ausgangsmenge durch einen Stimulus erhöht so wird der CP-Wert im Vergleich mit der unstimulierten Kontrolle verringert.

Eine Darstellung der Rohwerte für die mRNA Expression 15 verschiedener IEG nach einstündiger Morphinstimulation ergibt eine signifikante Induktion der mRNA Expression von FosB, SRF, JunB und Egr3, Egr4 und CREM2 (**Abbildung 5.16**).

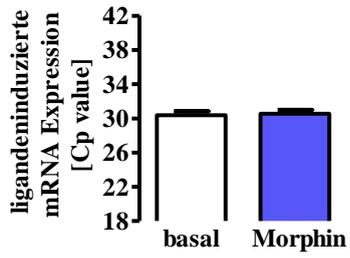
(A) Aktin



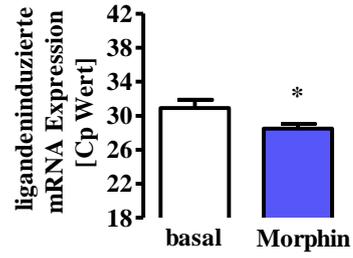
(B) Fos B



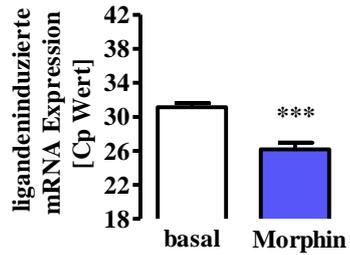
(C) Fos c



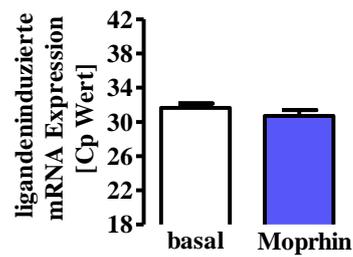
(D) SRF



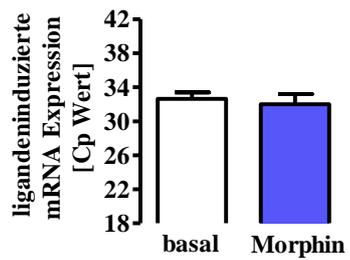
(E) Jun B



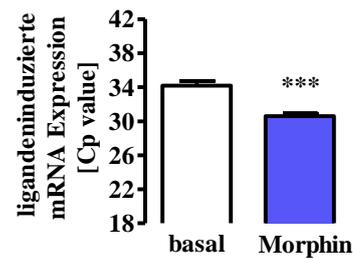
(F) Egr1



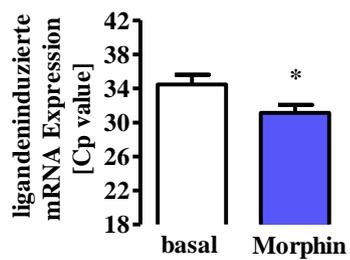
(G) Egr2



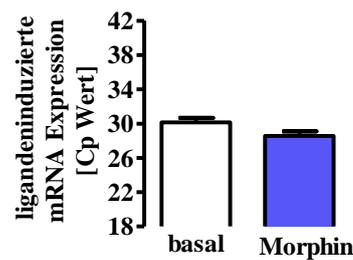
(H) Egr3



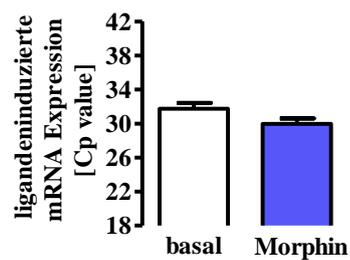
(I) Egr4



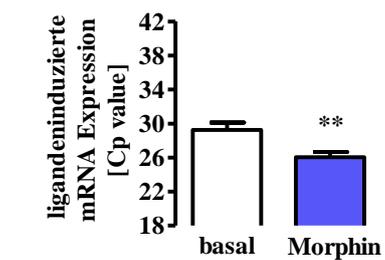
(J) Nur77



(K) Ldb2



(L) CREM2



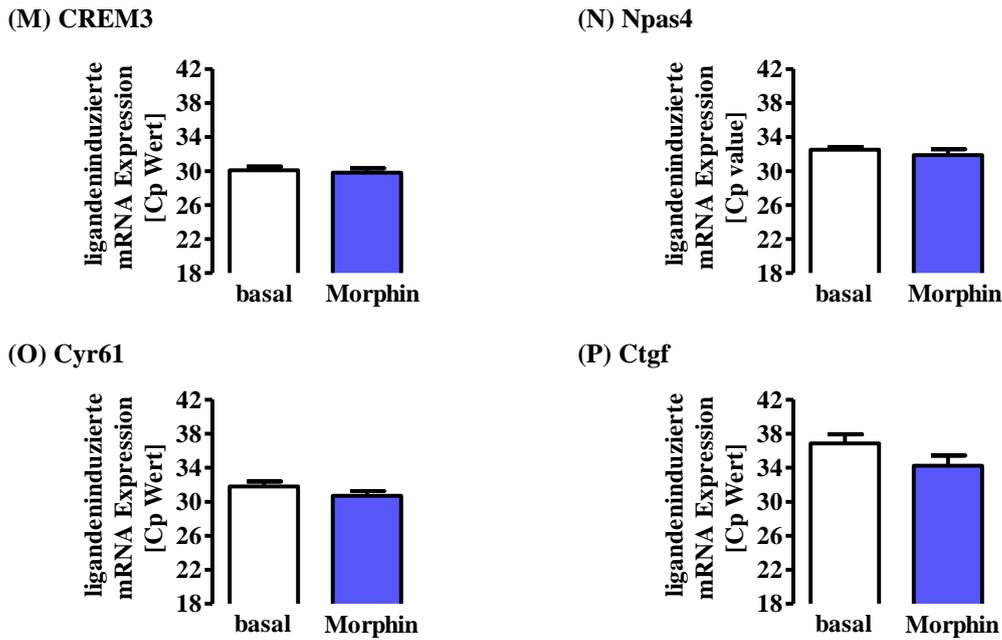


Abbildung 5.16: Morphininduzierte Veränderungen SRE-regulierter Gene in F11 Zellen

Die qRT-PCR wurde mit 3 unabhängigen cDNAs jeweils mit/ohne Morphinstimulation (1 h 1 μ M) in dreifach Bestimmung mit spezifischen Primern für 15 verschiedene Gene und dem Haushaltsgen Aktin durchgeführt. (A-P) bezeichnet das jeweilige Gen. Dargestellt sind CP-Werte unter basalen und stimulierten Bedingungen. Darstellung als MW \pm SEM. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest.

Zur Normierung wurde das Haushaltsgen Aktin verwendet, das durch Morphin nicht induziert wird. Die CP-Werte wurden normiert, indem für stimulierte und nicht stimulierte Zellen jeweils der CP-Wert für Aktin vom CP-Wert des entsprechenden Gens abgezogen wurde. Dadurch werden verschiedene DNA -Ausgangsmengen in einer Probe berücksichtigt und eine Aussage möglich, um welches Ausmaß die Expression durch Morphin induziert wurde.

Bei dieser Darstellung zeigt sich eine signifikante morphininduzierte mRNA Expressionsinduktion von FosB, Egr2, Egr4 und CREM2, wobei Egr4 das am stärksten induzierte Gen war (**Abbildung 5.17**). Bei der *early growth response* (Egr)-Familie der Transkriptionsfaktoren handelt es sich um Zinkfinger-Proteine. Von Egr1, Egr2 und Egr3 ist bekannt, dass sie durch Wachstumsfaktoren induziert werden. Sie gehören zu den IEG, die nach ihrer Induktion die Expression anderer Gene regulieren (Sukhatme, 1990).

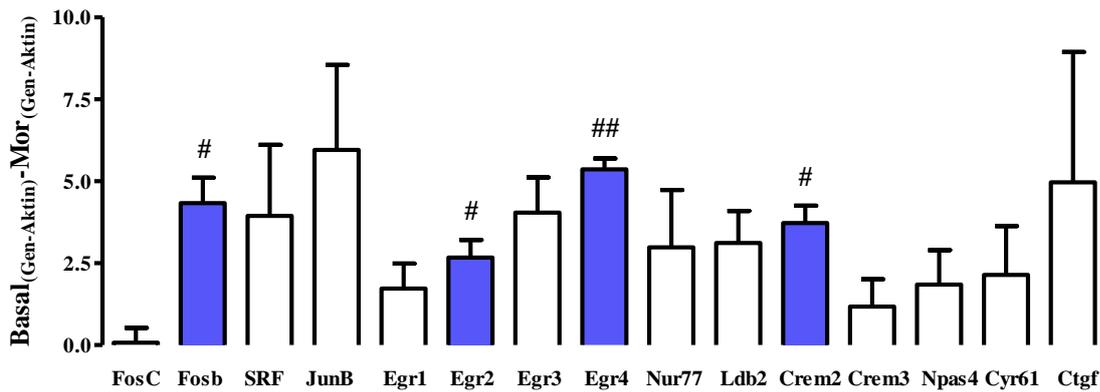


Abbildung 5.17: Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter IEG in F11 Zellen

Die qRT-PCR wurde mit 3 unabhängigen cDNAs jeweils mit/ohne Morphinstimulation (1 h 1 μ M) in dreifach Bestimmung mit spezifischen Primern für 15 verschiedene Gene und einem Haushaltsgen durchgeführt. Die CP-Werte aus Abbildung 5.16 wurden normiert, indem für stimulierte und nicht stimulierte Zellen jeweils der CP-Wert für Aktin vom CP-Wert des entsprechenden Gens abgezogen wurde. Die so erhaltenen Werte wurden nun verwendet, um die nach Morphinstimulierten von den Basalbedingungen abzuziehen. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichproben-test.

Nun wurde die mRNA Expression 15 weiterer neuronaler SRF-regulierter Proteine untersucht, nachdem eine 16 h Stimulation mit Morphin durchgeführt worden war. In diesem Fall konnte keine signifikante Induktion eines Gens nachwiesen werden. Es fiel jedoch eine signifikante Repression von Semaphorin 3a auf (**Tabelle 5.1**) Dieses spielt eine Rolle beim Axonwachstum (Messersmith et al., 1995).

Name		basal _(Gen-Aktin) - MOR _(Gen-Aktin)	p-Wert
AC1	Adenylylcyase 1	-0,08	0,9311
Arhgef5	Rho-GEF 5	-0,79	0,7347
BNDF	<i>brain derived neurotropic factor</i>	1,26	0,699
CDK5	<i>cyclin-dependent-Kinase 5</i>	-0,62	0,755
Cltc	<i>clathrin, heavy chain</i>	1,19	0,6003

5 Ergebnisse

CREB1	<i>cAMP responsive element binding Protein 1</i>	-0,7	0,3757
Epha 7	Eph receptor A7	1,13	04962
Epha4	Eph receptor A4	0	0,9869
NF-l	<i>neurofilament-light polypeptide</i>	-0,67	0,1541
NF-m	<i>neurofilament -medium polypeptide</i>	-1,46	0,1074
NGF	<i>nerve growth factor</i>	1,51	0,6313
p53	<i>cyclin-dependent kinase 5</i>	0,64	0,7631
Psd95	<i>postsynaptic density 95</i>	0,05	0,9784
Sema 3a	Semaphorin 3a	-1,12	0,0008
Sema 3c	Semaphorin 3c	-0,96	0,4382

Tabelle 5.1: Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter Gene in F11 Zellen nach 16 h
 Die qRT-PCR wurde mit 3 unabhängigen cDNAs jeweils mit/ohne Morphinstimulation (16 h 1 μ M) in Duplikaten mit spezifischen Primern für 15 verschiedene Gene und einem Haushaltsgen durchgeführt. CP-Werte wurden normiert, indem für stimulierte und nicht stimulierte Zellen jeweils der CP-Wert für Aktin vom CP-Wert des entsprechenden Gens abgezogen wurde. Die so erhaltenen Werte wurden nun verwendet um die nach Morphinstimulierten von den Basalbedingungen abzuziehen. p-Werte geben eine Signifikanz gegenüber Null an. Ein signifikanter Wert erscheint **fettgedruckt**.

5.4.2 Die morphininduzierte IEG-mRNA-Induktion erfolgt ERK-1/2-abhängig

Um einen eventuellen Einfluss von ERK-1/2 auf die Geninduktion durch Morphin in F11 Zellen herauszuarbeiten, wurde der Effekt des MEK-Inhibitor PD184352 auf die morphininduzierte mRNA Induktion untersucht. Die morphininduzierte signifikante mRNA Expression von FosB, CREM2, Egr3 und Egr4 wurde durch PD184352

vollständig blockiert (**Abbildung 5.18**). Daraus lässt sich auf eine wichtige Rolle von ERK-1/2 in der morphininduzierten TCF/SRF-abhängigen Genexpression schließen.

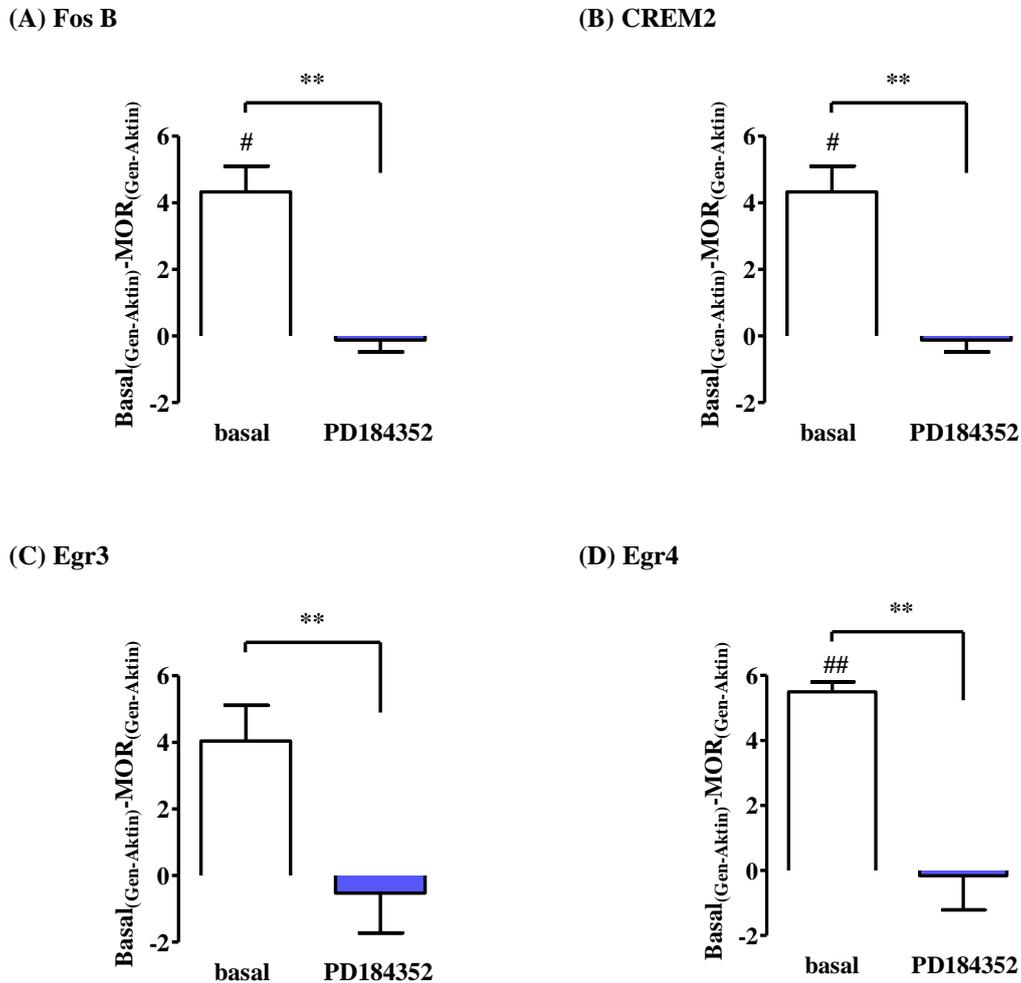


Abbildung 5.18: Inhibition der morphininduzierten Veränderungen SRE-abhängiger IEG durch PD184352 in F11 Zellen

Für einige in Abbildung 1.20 signifikant induzierte Gene wurde eine ERK-1/2- Abhängigkeit überprüft. qRT-PCR mit unabhängigen cDNAs morphinstimulierten Zellen jeweils mit/ohne PD184352-Vorbehandlung in dreifacher Bestimmung mit spezifischen Primern für 4 verschiedene Gene und dem Haushaltsgen Aktin. CP-Werte wurden normiert, indem für stimulierte und nicht stimulierte Zellen jeweils der CP-Wert für Aktin vom CP-Wert des entsprechenden Gens abgezogen wurde. Die so erhaltenen Werte wurden nun verwendet, um Werte nach Morphinstimulation von den Basalbedingungen abzuziehen. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichprobenstest (#), Mittelwertvergleich im Zweistichprobenstest (*). n=3

5.4.3 Aktivierung eines Egr4-abhängigen Reporters durch Morphin in F11 Zellen

Die stärkste Genexpressionsinduktion auf mRNA-Ebene durch Morphin fand sich für den Transkriptionsfaktor Egr4. Nun sollten Morphineffekte auf Egr4-abhängige Genexpression mithilfe eines Reportergenkonstruktes validiert werden. Hierzu wurde ein Reportergenkonstrukt (p0.2NxL) verwendet, das einen Promotor mit einer Egr4 Bindestelle enthält. Von diesem Minimalpromotor mit Egr4 Bindestelle ist bekannt, dass durch ihn die Expression des *sodium-activated sodium channel type VII α* (Scn7a) in DRG-Neuronen reguliert wird (Garcia-Villegas et al., 2009). Morphinstimulation führte in F11 Zellen zu einer transienten Aktivierung des Egr4-abhängigen Reporters mit einem Maximum nach 1-2 Stunden Stimulation (**Abbildung 5.19**). Somit kann Morphin in F11 Zellen die Expression eines biologisch-aktiven Egr4-Proteins induzieren, welches wiederum als Transkriptionsfaktor andere Gene reguliert.

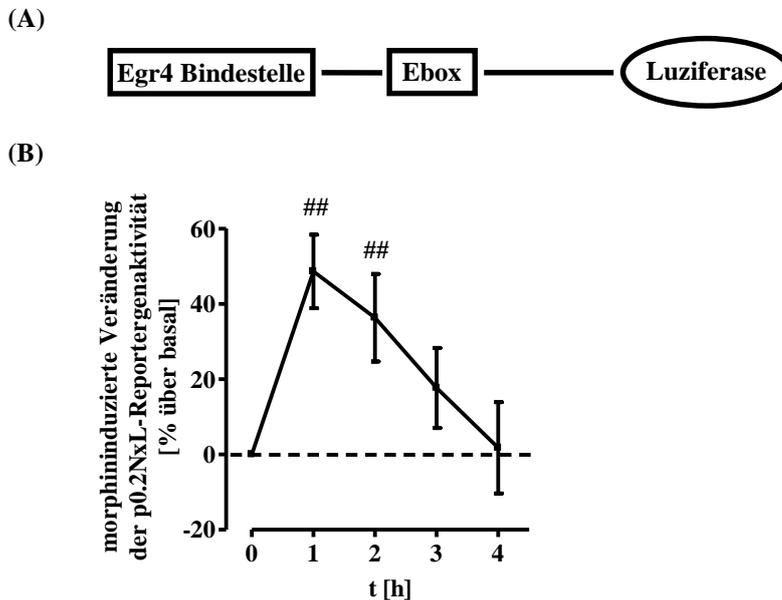


Abbildung 5.19: Morphininduzierte Egr4-abhängige Genexpression

(A) schematische Darstellung des p0.2NxL Reporterkonstruktes (B) Darstellung als MW \pm SEM. Stimulation erfolgte mit 1 μ M Morphin in vierfacher Bestimmung. Experimente wurden zusammengefasst und basale Bedingungen zum Zeitpunkt null als 100 % definiert. Signifikanztestung im Einstichproben-test. n = 6

5.5 Morphinabhängige Signalwege in kultivierten primären DRG-Neuronen

5.5.1 ERK-1/2-Aktivierung durch Morphin

Bei F11 Zellen handelt es sich um eine sekundäre immortalisierte Zelllinie (Francel et al., 1987). Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse aus F11 Zellen auch für primäre DRG-Neurone gültig sind, wurde zunächst die ERK-1/2-Phosphorylierung durch DAMGO und Morphin in kultivierten 18 Tage alten embryonalen DRG-Neuronen der Ratte untersucht. Eine Stimulation mit Morphin führte nach 20 und 30 Minuten zu einer signifikanten Phosphorylierung. DAMGO konnte nach 30 Minuten eine signifikante ERK-1/2-Aktivierung induzieren (**Abbildung 5.20**). Die frühe ERK-1/2-Aktivierung durch Opioide findet man nur in F11 Zellen, die opioidinduzierte Phosphorylierung nach 20-30 Minuten haben F11 Zellen (**Abbildung 5.7**) und primäre DRG-Neurone gemeinsam.

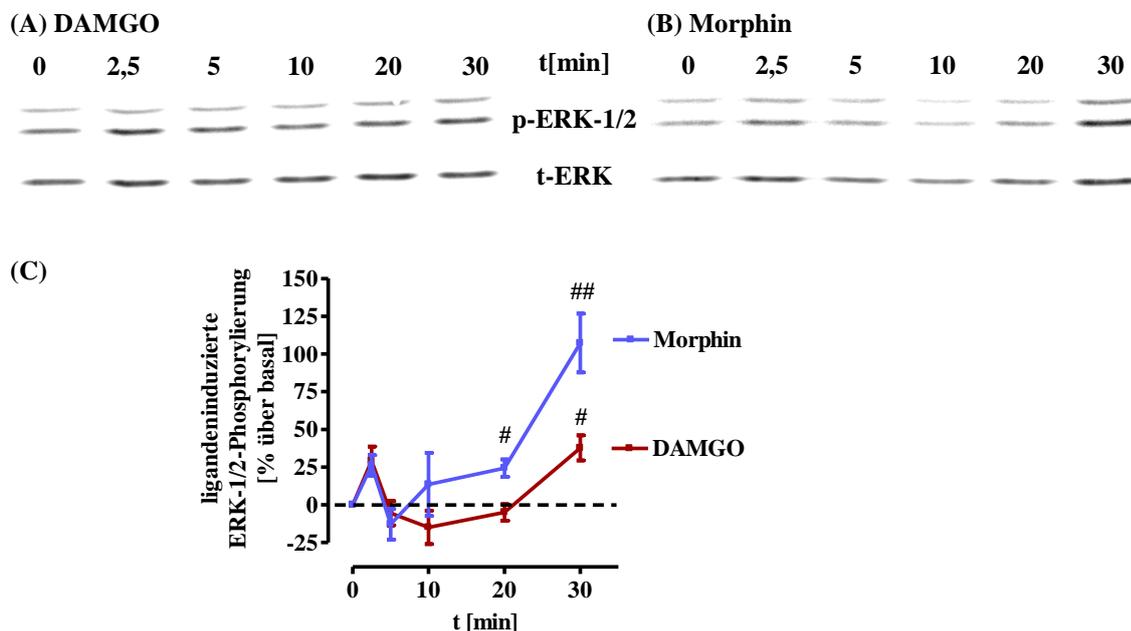


Abbildung 5.20: ERK-1/2-Phosphorylierung durch Opioide in primären DRG-Neuronen

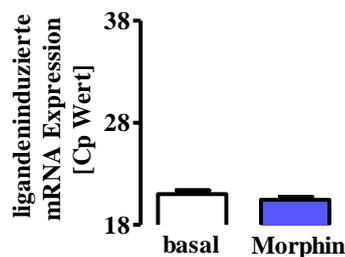
Die Zellen wurden mit 1 μ M DAMGO/Morphin für den angegebenen Zeitraum stimuliert. Es wurden phospho-ERK-1/2-Antikörper (p-ERK-1/2) und ERK-2-Antikörper (t-ERK) verwendet. (A) zeigt einen repräsentativen Immunoblot einer Stimulation mit DAMGO, (B) ein repräsentatives Experiment mit Morphin. (C) Zeitabhängiger Verlauf der ERK-Aktivierung nach densitometrischer Quantifizierung. Die p-ERK-1/2/t-ERK-Ratio wurde gebildet und normiert, indem Werte unstimulierter Zellen als 100 % definiert wurden. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichprobentest. n = 4-5

5.5.2 Induktion von mRNA-Expression durch Morphin

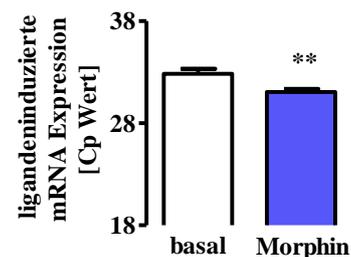
In F11 Zellen konnte eine morphinabhängige Geninduktion über ERK-1/2 und ETS/SRE festgestellt werden und Morphin konnte in primären DRG-Neuronen eine ERK-1/2-Phosphorylierung induzieren (**Abbildung 5.20**). Daher könnte dieser Signalweg in DRG-Neuronen eine physiologische Rolle spielen. Nun wurde in primären DRG-Neuronen die mRNA-Expression von Genen analysiert, die in Neuronen SRF-abhängig reguliert werden (Knoll und Nordheim, 2009).

Experimente mit spezifischen Primern für 15 IEG und cDNA aus kultivierten primären DRG-Neuronen ergaben bei Darstellung der Rohwerte (CP-Werte) eine signifikante Induktion der mRNA Expression von FosB, Fos C, SRF, JunB, Egr1, Egr2, Egr3, Egr4, Ldb 2, CREM3, und Npas4 durch einstündige Morphinstimulation (**Abbildung 5.21**). Die CP-Werte wurden nun wiederum auf das Haushaltsgen Aktin normiert, um Effekte auszuschließen, die durch unterschiedliche Mengen an DNA-Matrize entstanden sein könnten. Es zeigte sich eine signifikante Induktion der mRNA Expression durch Morphin für FosB, SRF und Egr4. (**Abbildung 5.22**). Diese Geninduktion ist der in F11 Zellen beobachteten sehr ähnlich. Auch in DRG-Neuronen ist Egr4 das am stärksten induzierte Gen. DRG-Neurone scheinen sich hinsichtlich der durch Morphin induzierten Genexpressionsveränderungen sehr ähnlich zu F11 Zellen zu verhalten.

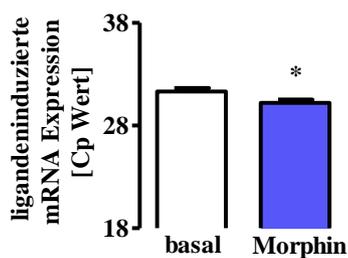
(A) Aktin



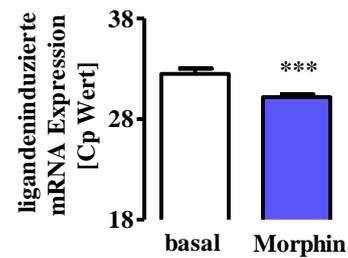
(B) Fos B



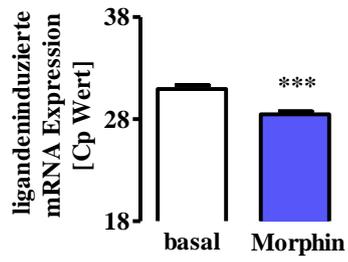
(C) Fos C



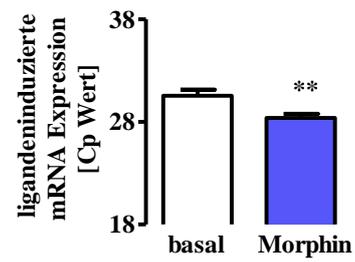
(D) SRF



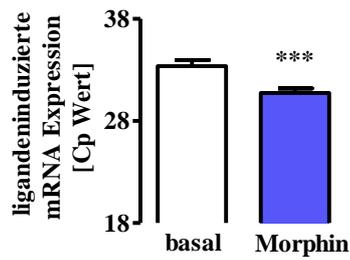
(E) Jun B



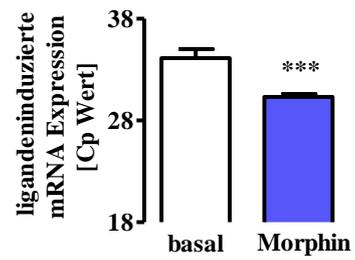
(F) Egr1



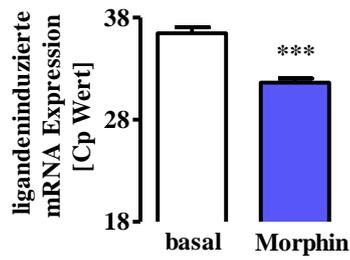
(G) Egr2



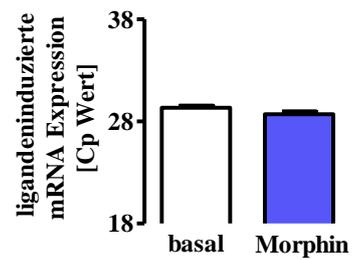
(H) Egr3



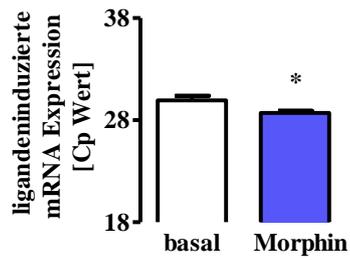
(I) Egr4



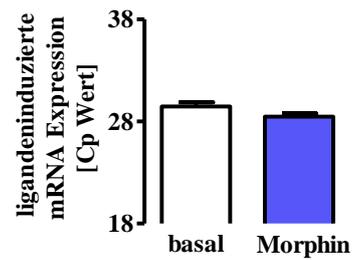
(J) Nur 77



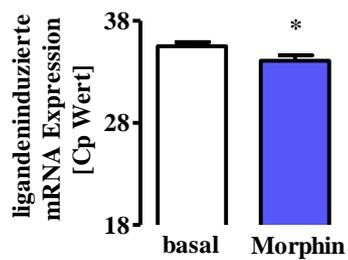
(K) Ldb 2



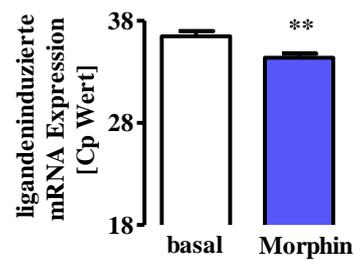
(L) CREM2



(M) CREM 3



(N) Npas 4



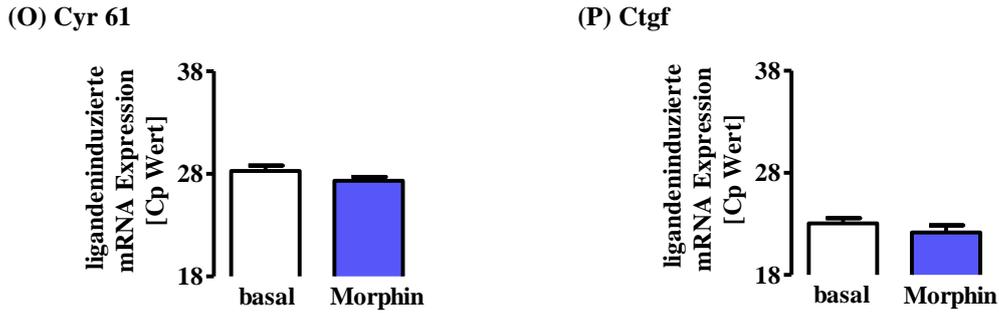


Abbildung 5.21: Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter Gene in DRG-Neuronen

Die qRT-PCR wurde mit 4 unabhängigen cDNAs jeweils mit/ohne Morphinstimulation (1 h, 1 μ M) in sechsfacher Bestimmung mit spezifischen Primern für 15 verschiedene Gene und dem Haushaltsgen Aktin durchgeführt. (A-P) bezeichnet das jeweilige Gen. Dargestellt sind CP-Werte unter basalen und stimulierten Bedingungen. Darstellung als MW \pm SEM. Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest.

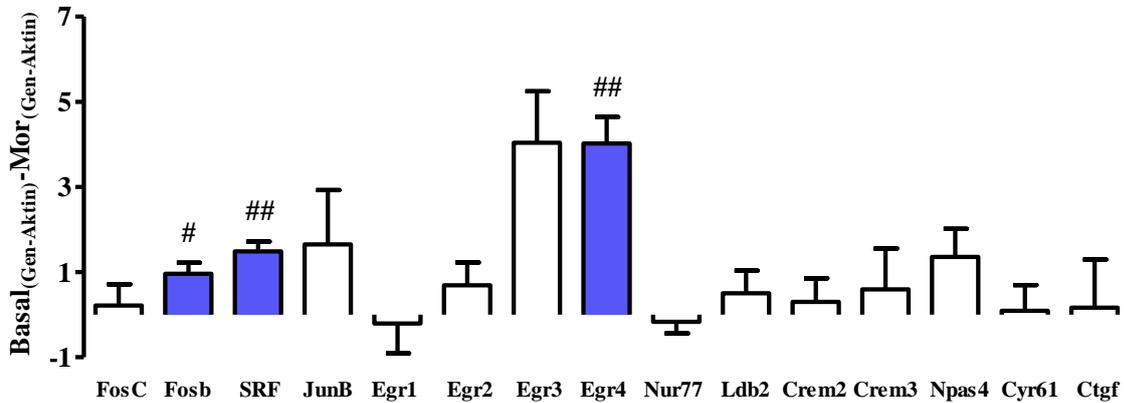


Abbildung 5.22: Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter IEG in kultivierten primären DRG-Neuronen

qRT-PCR wurde mit 4 unabhängigen cDNAs jeweils mit/ohne Morphin-Stimulation (1 h, 1 μ M) in sechsfacher Bestimmung mit spezifischen Primern für 15 verschiedene Gene und dem Haushaltsgen Aktin durchgeführt. CP-Werte aus Abb. 5.22 wurden normiert. Für stimulierte und nicht stimulierte Zellen wurde jeweils der CP-Wert für Aktin vom CP-Wert des entsprechenden Gens abgezogen wurde. Die so erhaltenen Werte wurden nun verwendet um Werte nach Morphinstimulation von Basalbedingungen abzuziehen. Darstellung als MW \pm SEM. Signifikanztestung im Einstichprobentest.

5.5.3 Morphinvermittelte Induktion der mRNA Expression erfolgt ERK-1/2-abhängig

Die morphininduzierte mRNA Induktion konnte in F11 Zellen durch PD184352 komplett inhibiert werden (**Abbildung 5.18**). Daher wurde die Rolle einer ERK-1/2-Inhibition auf die morphininduzierte mRNA-Induktion in primären DRG-Neuronen untersucht. Analog zu F11 Zellen führte PD184352 in primären DRG-Neuronen zu einer Inhibition der Geninduktion durch Morphin. Die mRNA Induktion von FosB, SRF und Egr4 konnte signifikant gehemmt werden (**Abbildung 5.23**). Die ERK-1/2-abhängige Expression von FosB und Egr4 durch Morphin scheint ein gemeinsamer Vorgang in F11 Zellen und primären DRG-Neuronen zu sein.

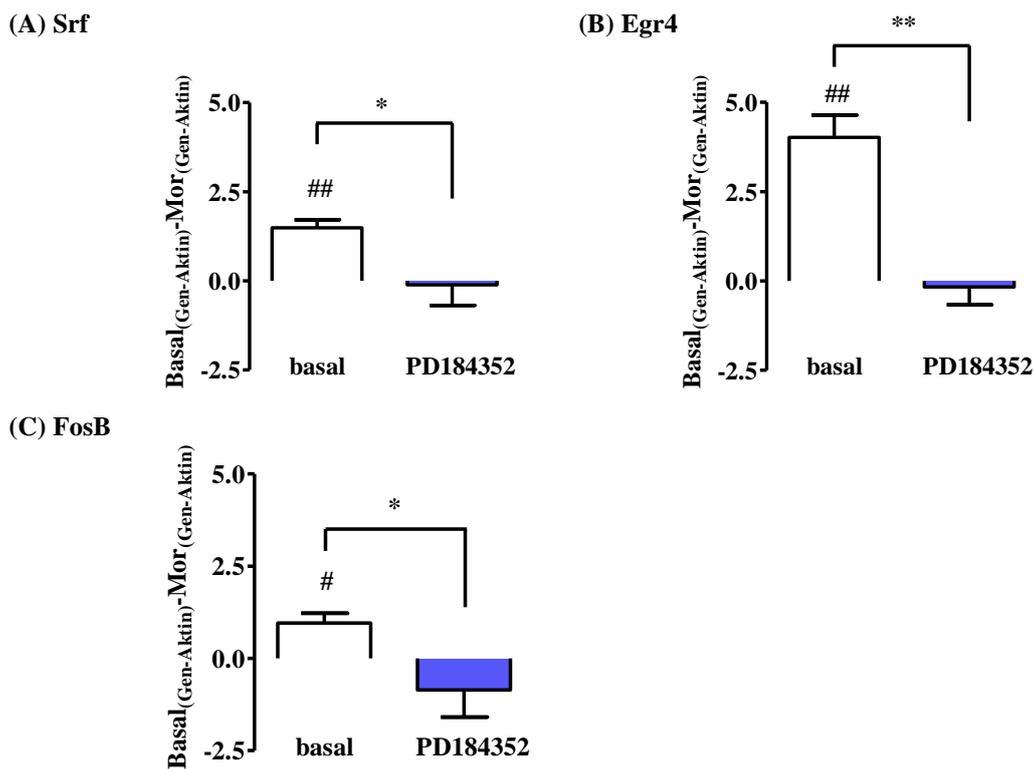


Abbildung 5.23: Inhibition morphininduzierten Veränderungen SRE-abhängiger IEG durch PD184352 in primären DRG-Neuronen

Für in Abbildung 1.24 signifikant induzierte Gene wurde ERK-1/2-Abhängigkeit geprüft. Darstellung als $MW \pm SEM$. qRT-PCR mit unabhängigen cDNAs morphinstimulierter Zellen in sechsfacher Bestimmung je \pm PD184352-Vorbehandlung mit spezifischen Primern und dem Haushaltsgen Aktin. Normierung, indem für stimulierte und nicht stimulierte Zellen je der CP-Wert (Aktin) vom CP-Wert (entsprechendes Gen) abgezogen und dieser Wert nach Morphinstimulation von Basalbedingungen abgezogen wurde. Signifikanztestung im Einstichprobentest (#), Mittelwertvergleich im Zweistichprobentest (*). $n = 4$

6 Diskussion

Morphinstimulation führt auf zellulärer Ebene zu Adaptationsmechanismen, die für Abhängigkeit und Toleranzentwicklung verantwortlich sind. Diese Veränderungen finden auf Proteinebene sowie auf Transkriptionsebene statt (Li und Clark, 1999, Chakrabarti et al., 2001, Ammon-Treiber und Höllt, 2005, Gintzler und Chakrabarti, 2000). Für GPCR, zu denen die Familie der Opioidrezeptoren gehört, ist ein Einfluss auf die Genregulation vor allem über CREB und TCF/SRF bekannt (Ho et al., 2009). Morphininduzierte Genveränderungen die zu Toleranzentwicklung führen werden vor allem dem CREB-Signalweg zugeschrieben (Widnell et al., 1996, Zhou und Zhu, 2006). Auch auf zellulärer Ebene konnte eine CREB-Aktivierung durch Morphin gezeigt werden (Bilecki et al., 2004).

Opioidrezeptoren sind $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelte Rezeptoren, deren Aktivierung über Inhibition der AC zu Verminderung der PKA-Aktivität führt (Connor und Christie, 1999, Childers, 1991). Da die PKA wiederum den wichtigsten CREB-Aktivator darstellt, ist über diesen Signalweg auch ein hemmender Einfluss von Opioiden auf CRE-abhängige Genexpression denkbar. Es existieren aber weitere opioidabhängige Signaltransduktionsmöglichkeiten über PKC, CamK und ERK-1/2 die zu einer CREB-Aktivierung führen können (Marinissen und Gutkind, 2001). Somit konvergieren opioidabhängige Signalwege mit aktivierendem, aber auch solche mit hemmendem Einfluss auf CREB. Daher könnten zellspezifisch vorherrschende Signalwege unterschiedliche Folgen für die CRE-abhängige Genexpression haben.

Über die Bedeutung von TCF/SRF bezüglich opioidinduzierter Genregulationsveränderungen ist bislang wenig bekannt, obwohl eine ERK-1/2-Aktivierung durch Opioide gezeigt ist (Schulz et al., 2004) und ERK-1/2 wichtige Aktivatoren von TCF/SRF darstellen (Knoll und Nordheim, 2009). Der TCF Elk-1 ist außerdem für Genregulation in DRG-Neuronen wichtig (Kerr et al., 2010) und spielt im Gehirn eine Rolle bei Kokain-Abhängigkeit (Besnard et al., 2011a). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage nach bislang unbeachteten opioidabhängigen Signalwegen mit Einfluss auf die Genregulation.

Es wäre theoretisch möglich, dass Opioide zellspezifisch unterschiedliche Signalwege benutzen, um Genexpression zu beeinflussen. In diesem Kontext ist auch relevant zu wissen, dass die Informationen über die morphinabhängige Genregulation überwiegend aus Untersuchungen im Kortex stammen (Taylor und Fleming, 2001). Diesbezüglich ist über DRG-Neurone wenig bekannt, obwohl diese der periphere Angriffspunkt für Opioide im ZNS sind und auch hier schon eine Toleranzentwicklung nach Opioidadministration zu beobachten ist (Hong et al., 2010, Belanger et al., 2002, Crain et al., 1988).

Es ist bekannt, dass sich die Regulation von Signalwegen je nach Zellsystem und Opioidrezeptorsubtyp unterscheiden kann. Beispielsweise wird die Kalzium-Freisetzung durch Opioide vermehrt durch Stimulation des δ OR vermittelt (Law et al., 2000). Obwohl die Morphinwirkung hauptsächlich über den μ OR vermittelt ist (Matthes et al., 1996), spielt der δ OR eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Morphintoleranz. Dies wurde anhand von δ OR-knockout Mäusen die keine Morphintoleranz entwickeln gezeigt. Außerdem schwächen δ OR Antagonisten eine Toleranzentwicklung ab (Kest et al., 1996, Fundytus et al., 1995, Zhu et al., 1999, Abdelhamid et al., 1991). Ein anderer Einfluss von δ OR-Liganden auf die Genexpression könnte diese Beobachtungen theoretisch erklären. CRE könnte also unterschiedlich reguliert werden, je nachdem welcher Signalweg dominiert, was wiederum von Zellsystem und Rezeptoraustattung abhängt (**Abbildung 6.1**).

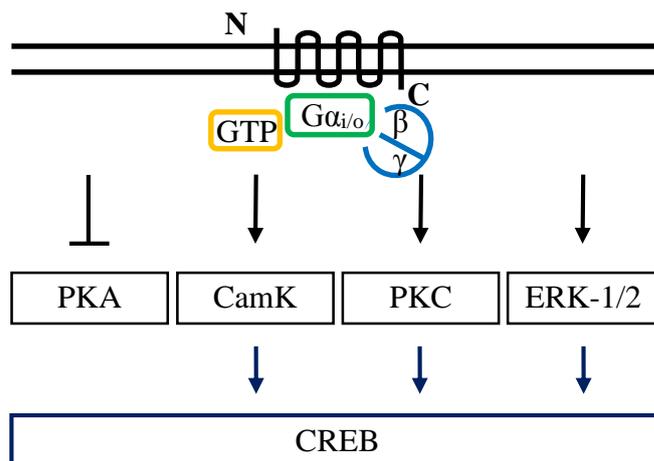


Abbildung 6.1: Opioidvermittelte Signalwege mit Einfluss auf CREB

CREB kann durch PKA, CamK, PKC und ERK-1/2 aktiviert werden. PKA wird durch Aktivierung $G\alpha_{i/o}$ -gekoppelter Opioidrezeptoren inhibiert und vermindert somit die CRE-Aktivität. Diesem CRE-inhibierenden Signalweg sind drei aktivierende Signalwege gegenüber gestellt, so dass der Effekt von Opioiden auf CRE von der Dominanz bestimmter Signalwege abhängt.

Die TCF/SRF-abhängige Transkriptionsregulation spielt für GPCR eine wichtige Rolle (Ho et al., 2009). Eine TCF/SRF-vermittelte Transkriptionsveränderungen nach Opioidrezeptoraktivierung durch Morphin ist jedoch nicht bekannt, obwohl ERK-1/2, Elk-1 und SRF bekanntermaßen für Nozizeption und neuronale Umbauvorgänge eine Rolle spielen (Besnard et al., 2011a, Knoll und Nordheim, 2009, Klinger et al., 2011, Yu und Yezierski, 2005).

Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt von Morphin auf die Genregulation in einer neuronalen DRG-ähnlichen Zelllinie mit endogener Opioidrezeptorexpression und in kultivierten primären embryonalen DRG-Neuronen analysiert.

Es konnte eine ERK-1/2-abhängige Aktivierung des Elk-1/SRE-Signalweges durch Morphin in zwei endogenen Zellsystemen gezeigt werden. Dieser bislang unentdeckte Signalweg scheint für Genregulation in F11 Zellen besonders wichtig zu sein, da in diesem Zellsystem keine CREB-Aktivierung durch Morphin feststellbar war. Dagegen scheint der Transkriptionsfaktor Elk-1 bei morphininduzierter Genexpression in F11 Zellen eine große Rolle zu spielen, da hier wiederum eine ERK-1/2-abhängige Elk-1-Phosphorylierung durch Morphin gezeigt werden konnte. Die Elk-1-Phosphorylierung führt zu vermehrter Bildung ternärer Komplexe und initiiert eine ETS/SRE-abhängige Genexpression (Gille et al., 1992).

In F11 Zellen und in kultivierten embryonalen DRG-Neuronen kam es morphinvermittelt zu einer Induktion der mRNA Expression von FosB und Egr4. FosB und insbesondere die stabilere Isoform Δ FosB akkumulieren in für Suchtentstehung wichtigen Gehirnregionen und werden als molekulares Korrelat für Sucht gesehen (Nestler et al., 1999, Nestler et al., 2001). Im FosB -und Egr4-Promotor finden sich allerdings neben CRE-Elementen auch SRE-Elemente bzw. seruminduzierbare Elemente (Lazo et al., 1992, Crosby et al., 1992, Holst et al., 1993), sodass mehrere *response elements* für die morphininduzierte Genexpression verantwortlich sein könnten.

Da in dieser Arbeit Morphin nicht zur Aktivierung eines CRE-Reporters in F11 Zellen führte und Morphin in diesen Zellen eine Elk-1-Phosphorylierung induzieren konnte, kann man vermuten, dass die FosB-Expression über eine ETS/SRE-Aktivierung durch Morphin zustande kommt. Auch die ERK-1/2-Abhängigkeit der FosB und Egr4-Expression in F11 Zellen und DRG-Neuronen Zellen deutet auf einen SRF/TCF-

vermittelten Mechanismus hin. Außerdem konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass bei Koexpression einer dominant-negativen Elk-1 Mutante (REST/ELK-1- δ C) und einem Egr4-Reportergenkonstrukt (p0.2NxL-Reporter) die morphinabhängige Egr4-vermittelte Reporteraktivität ausblieb. Eine Elk-1 Aktivierung ist also für die morphinabhängige Egr4-Induktion in F11 Zellen nötig (Rothe et al., 2012). Daher scheint der ERK-1/2/Elk-1/SRF-Signalweg für die morphininduzierte Egr4 Expression in F11 Zellen und DRG-Neuronen relevant zu sein.

6.1 Mögliche Mechanismen der ERK-1/2-Aktivierung durch Morphin in F11 Zellen

Für eine morphininduzierte Elk-1/SRF-Aktivierung über ERK-1/2 können verschiedene Signalwege verantwortlich sein. In μ OR-überexprimierenden HEK293 Zellen ist eine opioidvermittelte ERK-1/2-Aktivierung über PKC und β -Arrestin gezeigt (Zheng et al., 2008). Hier fand man eine schnelle (nach 2-5 min) PKC-abhängige ERK-1/2-Phosphorylierung durch Morphin und eine später einsetzende (nach 20-30 min) β -Arrestin-vermittelte ERK-1/2-Aktivierung durch Etorphin. Nur die späte arrestinvermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung durch Etorphin konnte in HEK293 Zellen einen Elk-1-Reporter aktivieren, während Morphin keine Elk-1-Aktivierung induzieren konnte (Zheng et al., 2008). Arrestine können neben ihrer Funktion als Adapterproteine auch G-Protein-unabhängig den MAPK-Signalweg aktivieren und somit Einfluss auf die Genexpressionsregulation nehmen (Shukla et al., 2011, Ma und Pei, 2007). Eine Aktivierung des μ OR durch Morphin führte in HEK293 Zellen weder zu Rezeptorinternalisierung noch zu Bindung von β -Arrestin an den Rezeptor (Keith et al., 1996, Molinari et al., 2010). Daher führt Morphin in diesem Zellsystem nicht zur Aktivierung des Elk-1-Reporters.

ERK-1/2 und dadurch Elk-1/SRF werden anscheinend in F11 Zellen und HEK293 Zellen unterschiedlich reguliert. Da Morphin in F11 Zellen nach 5 min Stimulation eine signifikante ERK-1/2-Phosphorylierung induzieren konnten, kann man spekulieren, dass β -Arrestin hieran nicht beteiligt ist. Es ist bekannt, dass Opioidrezeptoren unabhängig von Rezeptorinternalisierungsvorgängen die MAPK aktivieren können (Kramer und

Simon, 2000). Eine endozytoseunabhängige, jedoch PKC und CamK vermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung durch Morphin und den μ -spezifischen Liganden DAMGO ist gezeigt (Bilecki et al., 2005). Eine ERK-1/2-Aktivierung ist über diverse Signalwege möglich. So führt eine PLC-Aktivierung über PKC oder Kalzium/CamK zur ERK-1/2-Stimulation. Opioidrezeptoren können über den $\beta\gamma$ -Komplex von $G\alpha_{i/o}$ -Protein PLC β aktivieren (Murthy und Makhlof, 1996), die IP₃-Konzentration und somit die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöhen und PKC aktivieren (Kramer und Simon, 1999, Smart und Lambert, 1996). Opioide beeinflussen die PI3K-Aktivität (Narita et al., 2002), wobei diese wiederum ERK-1/2 regulieren kann. Die in dieser Arbeit gezeigte morphinvermittelte ERK-1/2-Phosphorylierung und die darauffolgenden Elk-1/SRF-Aktivierung nach kurzfristiger Stimulation könnte unabhängig von Endozytose und β -Arrestin über PKC und CamK vermittelt sein. Außerdem könnte man vermuten, dass in diesem Fall bislang unbekannte PTX-sensible ERK-1/2-aktivierenden Signalwege verantwortlich sind. Die genaue Rolle von β -Arrestin im Kontext der Elk-1/SRF-Aktivierung durch Morphin in F11 Zellen bleibt ungewiss.

6.2 Zellsystemspezifische Regulation von CREB und TCF/SRF

Für andere etablierte Zellsysteme, wie NG108-15 Zellen ist eine CRE-Aktivierung durch Morphin bekannt (Bilecki et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit konnte in NG108-15 Zellen keine morphinvermittelte TCF/SRF-Aktivierung nachgewiesen werden. Damit unterscheiden sich F11 Zellen hinsichtlich Genregulation durch Morphin deutlich von NG108-15 Zellen. Es scheint möglich, dass es sich bei der morphinvermittelten Elk-1/SRF-Aktivierung um einen zelltypspezifischen, vielleicht DRG-spezifischen Mechanismus handelt. F11 Zellen entstanden aus der Fusion von DRG-Neuronen und der Neuroblastomzelllinie NG18TG-2 (Fan et al., 1992), während NG108-15 Zellen eine Hybridzelllinie aus Gliomzellen (C6-BU-1) und der gleichen Neuroblastomzelllinie sind (Augusti-Tocco und Sato, 1969). Dieser unterschiedliche Ursprung der Zellen scheint eine Auswirkung auf die jeweiligen Mechanismen der Genregulation zu haben.

Die Effekte auf die CREB-Aktivität können unterschiedlich ausfallen, wenn man bedenkt, dass mehrere intrazelluläre opioidinduzierte Signalwege auf CREB konvergieren. ERK-1/2, CamK oder PKC-Aktivierung führt zu CREB-Aktivierung, während die über $G\alpha_{i/o}$ -vermittelte Inhibition der PKA zu verminderter CREB-Aktivität führt. Zellspezifische Unterschiede ließen sich dann durch die jeweilig vorherrschenden Signalwege erklären. In F11 Zellen führt Morphinstimulation zu einer stärkeren Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation als in NG108-15 Zellen. Dieser Effekt von Morphin auf cAMP-Akkumulation und somit PKA-Aktivität in F11 Zellen scheint stark genug zu sein, um CREB zu inhibieren. Eventuelle CREB-Aktivierungsmechanismen werden in F11 Zellen durch CREB-inhibierende Signalwege dominiert. Die morphinvermittelte CREB-Aktivierung in NG108-15 Zellen wird PKC oder CamK II zugeschrieben (Maldonado et al., 1996, Widnell et al., 1996, Li und Clark, 1999, Zhou und Zhu, 2006). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die morphinvermittelte CRE-Aktivierung in NG108-15 Zellen PKC-abhängig ist, da ein PKC-Inhibitor die Effekte von Morphin auf CRE signifikant inhibieren konnte (Rothe et al., 2012). In NG108-15 Zellen sind die inhibitorischen Effekte von Morphin auf cAMP-Akkumulation und PKA schwächer. Hier überwiegt die CREB-Aktivierung (**Abbildung 6.2**).

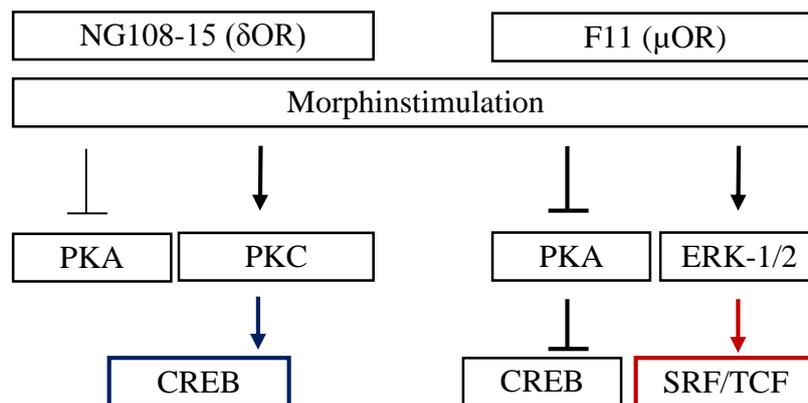


Abbildung 6.2: zelltypspezifische Unterschiede der morphinabhängigen Genregulation

Morphinadministration führt in beiden Zellsystemen zur Inhibition der PKA. Diese Inhibition fällt jedoch in F11 Zellen stärker aus, so dass hier die CREB-Aktivität verringert wird. In NG108-15 Zellen dominiert der CREB-aktivierende Signalweg über PKC/CamK, sodass netto eine CREB-Aktivierung resultiert. In F11 Zellen kann Morphin μ OR-vermittelt über eine ERK-1/2-Phosphorylierung SRF/TCF aktivieren und Genregulationsveränderungen induzieren.

Für diese Beobachtungen könnte ein zelltypspezifisches Rezeptorprofil verantwortlich sein. Daher ist es wichtig zu erwähnen, dass F11 Zellen μ - und δ -Opioidrezeptorsubtypen, jedoch keine κ OR exprimieren (Fan et al., 1992). NG108-15 Zellen hingegen exprimieren fast nur δ OR (Gomes et al., 1999, Gomathi und Sharma, 1993). Dies spiegelt sich auch in der inhibitorischen Wirkung von DAMGO auf die cAMP-Produktion wieder, die in F11 Zellen deutlich stärker als in NG108-15 Zellen ausfiel. Daher könnte man unterschiedliche Effekte von Morphin auf die Elk-1/SRF-Aktivierung der stärkeren Affinität von Morphin zum μ OR und dessen geringeres Vorkommen in NG108-15 Zellen zuschreiben. Dazu passend wurde der δ OR als der verantwortliche Rezeptor für morphininduzierte CREB-Phosphorylierung in NG108-15 Zellen identifiziert (Bilecki et al., 2000). Jedoch ist in Neuro2A Zellen der μ OR verantwortlich für eine CREB-Aktivierung durch Morphin (Bilecki et al., 2004). Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die morphinvermittelte ETS/SRE-Aktivierung in F11 Zellen durch einen μ OR-spezifischen Antagonisten blockiert werden konnte, was für einen Einfluss dieses Rezeptorsubtyps spricht. Jedoch konnte in NG108-15 Zellen der δ OR-spezifische Agonist DPDPE im Gegensatz zu Morphin den ETS/SRE-Reporter aktivieren, was eine Verbindung auch des δ OR zu diesem Signalweg belegt.

In NG108-15 Zellen hatte auch eine höhere Morphinkonzentration, deren Effekt mit der des DPDPE vergleichbar sein sollte, keinen Einfluss auf den ETS/SRE-Reporter. Verschiedene Agonisten können anscheinend in NG108-15 Zellen die δ OR-vermittelte Elk-1/SRF-Aktivierung unterschiedlich beeinflussen. Rezeptorsubtypspezifische Unterschiede alleine scheinen nicht der Grund für die zellspezifische Regulation des Elk-1/SRF-Signalwegs durch Morphin zu sein. Vielmehr stößt Morphin nach Aktivierung des δ OR andere Signalkaskaden an als bei μ OR Aktivierung, woraus eine CREB-vermittelte Genregulation resultiert, aber die TCF/SRF-Aktivität unbeeinflusst bleibt (**Abbildung 6.2**). Einem GPCR stehen multiple zytosolische Adapterproteine zur Verfügung, deren Aktivität er beeinflussen kann. So können durch einen Rezeptor eine Vielzahl verschiedener Signalkaskaden aktiviert werden. Manche Agonist-Rezeptor-Komplexe beeinflussen nur einen Teil der möglichen intrazellulären Signalwege. Zeigt ein Agonist eine solche Präferenz für bestimmte Signalwege, spricht man von *biased agonism* (Kenakin, 2009, Schulte und Levy, 2007). Die Unfähigkeit von Morphin δ OR-vermittelt ETS/SRE-abhängige Genregulation zu beeinflussen könnte ein Fall von *biased agonism*

sein. Die selektive Aktivierung bestimmter Signalwege durch einen Agonisten könnte auch für die Entstehung unerwünschter Medikamenteneffekte eine Rolle spielen. Unterschiedliche β -Arrestin-Rekrutierung verschiedener Liganden könnte zu Differenzen bei Rezeptorinternalisierung und Rezeptorproteinabbau führen und Konsequenzen für Toleranzentstehung haben (Kenakin, 2009, Schulte und Levy, 2007). Außerdem können β -Arrestine G-Protein-unabhängig Signalkaskaden, wie beispielsweise den ERK-1/2-Signalweg, aktivieren (Wei et al., 2003). Dies könnte Abweichungen beim Einfluss auf Genregulation erklären, eröffnet jedoch auch wieder neue Möglichkeiten, da nach GPCR-Aktivierung diverse Signalwege beeinflusst werden können. Denkbar wäre, dass die morphinvermittelte TCF/SRF-Aktivierung eine Form von *biased agonism* darstellt, aber der hier relevante präferierte Signalweg noch unbekannt ist.

Die vermeintliche jeweilige Signalweg-Präferenz des Morphins an δ OR und μ OR könnte zu unterschiedlichem Verhalten der Substanz hinsichtlich Genexpressionsregulation führen, woraus Unterschiede in der Toleranzentwicklung resultieren können. Ein anderer Hinweis darauf, dass Morphin einen *biased agonism* zeigen kann ist das Endozytoseverhalten der Substanz. Eine μ OR-Aktivierung durch Morphin führt im Gegensatz zur Stimulation mit endogenen Opioiden oder DAMGO nicht zu Rezeptorendozytose (Zhang et al., 2009, Koch et al., 2005). Jedoch konnte *in vivo* im *Nucleus accumbens* der Ratte 30 min nach Morphinstimulation eine Internalisierung der μ OR beobachtet werden (Haberstock-Debic et al., 2003). Auch in striatalen Neuronen mit endogener μ OR-Expression lies sich eine morphininduzierte Endozytose nachweisen. Eine hier angeführte Erklärung für dieses Endozytoseverhalten ist das Expressionsniveau von GRK und β -Arrestinen in diesem Zellsystem (Haberstock-Debic et al., 2005). Theoretisch könnte man aber auch eine Signalwegpräferenz als Erklärung für diese Beobachtungen annehmen. Daher wäre es interessant, den morphinabhängigen *biased agonism* genauer zu analysieren. Tritt das Phänomen Zell -oder gewebespezifisch auf, oder führt eine δ OR-Stimulation durch Morphin generell zur Aktivierung anderer Signalwege?

Die Genexpressionsveränderungen durch Morphin werden vorrangig als CREB-vermittelt angesehen (Widnell et al., 1996, Zhou und Zhu, 2006). Es wäre relevant zu wissen, welche Konzentrationen in diesen Arbeiten am Wirkort direkt vorlagen, und ob diese den δ OR zu aktivieren vermochten, oder ob die Wirkung μ OR vermittelt ist.

Außerdem entstehen im Organismus aus einer Substanz diverse Metaboliten, die in ihren pharmakologischen Eigenschaften durchaus unterschiedlich sein können. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die nach exogener Zufuhr von Morphin im Körper entstehenden Metaboliten mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften teilweise eine gewisse Selektivität gegenüber bestimmten Signalwegen haben. So initiiert u.a. das in größeren Mengen anfallende Morphin-6-Glucuronid bevorzugt β -Arrestin-abhängige Signalkaskaden und kaum $G_{\alpha i/o}$ -Protein-abhängige Signalwege. Der *biased agonism* verschiedener Metabolite könnte relevant für Wirkung und Nebenwirkung einer Morphintherapie sein (Frolich et al., 2011).

6.3 Mögliche physiologische Bedeutung der ERK-1/2, Elk-1-regulierten Gene in DRG-Neuronen

Bei der Frage nach einer physiologischen Relevanz der morphinvermittelten ETS/SRE-Aktivierung in F11 Zellen ist zu bedenken, dass Toleranzentwicklung und Abhängigkeit sehr komplexe Phänomene sind, die nicht durch einzelne molekulare Mechanismen erklärt werden können. Jedoch werden für morphininduzierte Abhängigkeit und Toleranzentwicklung zelluläre Adaptationsmechanismen verantwortlich gemacht (Li und Clark, 1999, Chakrabarti et al., 2001, Ammon-Treiber und Höllt, 2005, Gintzler und Chakrabarti, 2000). Langfristige zelluläre Veränderungen werden auf Ebene der Genregulation reguliert (Nestler, 1997). Allerdings ist das ganze Nervensystem an solchen Prozessen beteiligt. Genexpressionsveränderungen nach Opioidadministration finden sich im *Nucleus accumbens* (Li et al., 2006), im gesamten Kortex (Ammon et al., 2003), im Hinterhorn des Rückenmarks (Li und Clark, 1999) aber auch in DRG-Neuronen (Li et al., 2009). Ein Zusammenspiel von Adaptationsmechanismen auf verschiedenen Ebenen des Nervensystems bildet die Grundlage für Toleranz -und Suchtphänomene. Es gelingt daher nicht, Wirkungsverlust oder Suchtverhalten räumlich oder mechanistisch genau zuzuordnen. Primär-sensorische DRG-Neurone sind der peripherste Ort, an dem kompensatorische Veränderungen durch chronische Opioidadministration auftreten (Li et al., 2009). Die in dieser Arbeit beschriebene morphinvermittelte Elk-1/SRF-abhängige Genexpressionsinduktion in primären kultivierten DRG-Neuronen und in dem DRG-

ähnlichen F11 Zellmodell deckt einen für die Vermittlung dieser kompensatorischen Veränderungen potenziell relevanten Mechanismus auf. Ob dieser Signalweg jedoch *in vivo* Einfluss auf Toleranzentwicklung hat, muss weiter untersucht werden.

6.3.1 Limitationen der verwendeten Modellsysteme

Ein zelluläres Modellsystem bietet eine Möglichkeit, molekulare und intrazelluläre Mechanismen nozizeptiver Stimuli zu untersuchen. Jedoch ist generell unklar, inwiefern die Kultivierung bzw. der Zusatz von Serum und anderen Zusätzen die Eigenschaften von Neuronen und insbesondere ihre Gen- und Proteinexpression beeinflusst. Zudem werden neben primären Zelllinien auch immortalisierte Zelllinien verwendet, welche in größerer Zahl und als homogene Kultur verfügbar sind. Im Fall geeigneter Zelllinien ähneln diese aufgrund ihrer Eigenschaften und ihres Rezeptorbesatzes den primär-sensorischen Neuronen (Wang und Wang, 2003).

Jedoch enthält beispielweise die F11-Hybridzelllinien neben DRG-typischen Proteinen, Ionenkanälen, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren auch gewisse Eigenschaften welche auf die Neuroblastomzelle rückschließen lassen und somit die Vergleichbarkeit mit DRG-Neuronen abschwächen (Raymon et al., 1999).

Die Beobachtung, dass sich die Anzahl der Opioidbindestellen (gemessen als B_{\max}) in kultivierten primär-sensorischen Neuronen in Abhängigkeit der Kultivierungsdauer verändert, zeigt einerseits, wie fragil ein solches System ist und wirft andererseits die Frage nach der physiologischen Wirklichkeit auf (Chen et al., 1997).

Darüber hinaus handelt es sich bei den kultivierten DRG-Neuronen und auch den F11 Zellen um die jeweiligen Zellkörper der Neurone. Kultivierte DRG-Neurone spiegeln jedoch die Eigenschaften nozizeptiver Nervenendigungen wieder (Ristoiu et al., 2002, Cesare und McNaughton, 1997). Letztendlich bleibt unklar, inwieweit die Rezeptorausstattung der neuronalen Fortsätze *in vivo* mit derjenigen der kultivierten DRG-Neurone korreliert.

Trotz all der Limitationen sind F11 Zellen ein etabliertes Modellsystem für DRG-Neurone (Francel et al., 1987, Puttfarcken et al., 1997, Boland et al., 1991, Jung und

Miller, 2008, McIlvain et al., 2006). Des Weiteren werden Erkenntnisse, welche parallel in F11 Zellen und einem Überexpressionssystem gewonnen wurden von den Autoren hypothetisch auf weitere neuronale Gewebe übertragen (Chakrabarti und Gintzler, 2007). Auch eine Veröffentlichung über neuronale Differenzierung und Neuroprotektion durch Opioide in F11 Zellen weist auf die Möglichkeit hin, dass die Erkenntnisse ggf. auch auf andere neuronale Zelltypen zu übertragen sind (Sen et al., 2013).

Die Folgenden gemachten Interpretationen und die hypothetische Übertragbarkeit der Ergebnisse auf weitere ZNS-Regionen und neuronale Plastizität sind als spekulativ anzusehen. Ob diese theoretischen Effekte tatsächlich auftreten bleibt ungewiss und muss zukünftig weiter untersucht werden.

6.3.2 Morphinabhängige SRE-vermittelte Genregulation in weiteren ZNS-Regionen

Morphin reguliert die Expression von FosC und JunB, wobei diese durch Promotoren reguliert werden, die SRE -und CRE-Elemente enthalten (Ammon-Treiber und Höllt, 2005, He und Ping, 2009, Perez-Albuerne et al., 1993). Daher könnten zellspezifische Unterschiede auftreten, je nachdem, ob es sich um ein CREB oder TCF/SRF-aktivierendes Zellsystem handelt. Die Erkenntnis, dass Morphin in einem endogenen Zellsystem Elk-1/SRF-abhängig Gene reguliert, könnte dazu führen, dass bisher bekannte Formen von morphininduzierter Genexpression besser verstanden werden. So ist eine Induktion von Aldolase C durch akute Morphingabe in DRG-Neuronen der Ratte und im Hippocampus der Maus gezeigt (Li et al., 2009, Yang und Pu, 2009). Im Hippocampus der Maus konnte jedoch zeitgleich eine Abnahme der CREB-Phosphorylierung gezeigt werden, so dass die Geninduktion höchstwahrscheinlich nicht CREB-vermittelt ist, stattdessen könnte der Elk-1/SRF-Signalweg beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist auch ein *microarray-screening* zu nennen, durch das nach chronischer Morphinadministration im Frontalkortex der Ratte eine Induktion von Hitzeschockproteinen (hsp), insbesondere hsp70, nachgewiesen werden konnte (Ammon et al., 2003). Im *Nucleus accumbens* der Maus wurde auch eine hsp70 Expression durch Morphin beobachtet und mit den morphininduzierten Verhaltensänderungen in Zusammenhang gebracht (Luo et al., 2011). Jedoch findet sich im hsp70-Promotor kein

CRE-Element, während ein SRE-Element und ein *heat shock element* (HSE) vorhanden sind (Wu et al., 1987a, Wu et al., 1987b). HSE wird durch *heat shock factor-1* (HSF-1) aktiviert, welcher wiederum durch ERK-1/2 inhibiert wird. Somit führt eine Aktivierung von ERK-1/2 zu einer Repression der HSE-1-abhängigen Transkription. Da Morphin jedoch zu einer ERK-1/2-Phosphorylierung führt (Ligeza et al., 2008) ist dieser Weg unwahrscheinlich. Man könnte spekulieren, dass der ERK-1/2, Elk-1/SRF-Signalweg für die morphinvermittelte hsp70-Expression verantwortlich ist. Jedoch kann HSF-1 auch durch PKC aktiviert werden (Holmberg et al., 1998). Der exakte molekulare Mechanismus dieser Geninduktion bleibt also offen.

6.3.3 Transkriptionsfaktorexpression und neuronale Plastizität - die Rolle von CREM, SRF, FosB und Egr4

In F11 Zellen konnte im Rahmen dieser Arbeit eine morphinvermittelte mRNA-Induktion von FosB, Egr4, CREM2 und Egr2, in primären DRG-Neuronen von FosB, Egr4 und SRF festgestellt werden. Diese Geninduktion war in allen Fällen ERK-1/2-sensibel.

Neuronale Plastizität wird über das Gleichgewicht zwischen Elk-1 und CREB reguliert. CREB Aktivierung und gleichzeitige Elk-1-Inhibition führt in F11 Zellen zu Zelldifferenzierung und Neuritenwachstum (McIlvain et al., 2006, Ghil et al., 2000). Das in F11 Zellen morphinabhängig induzierte CREM2 inhibiert nach seiner Expression die CREB-abhängige CRE-Aktivierung (Foulkes et al., 1991). Durch die morphininduzierte CREB-Inhibition über PKA und die CREM-Induktion über Elk-1/SRF könnte Morphin in diesem Zellsystem das Gleichgewicht hin zu Proliferation verschieben und Differenzierungsvorgänge hemmen. In F11 Zellen wurde auch eine mRNA-Induktion von Egr2 alias Krox20 beobachtet. Dabei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit Zink-Finger-Struktur (Joseph et al., 1988), der mit neuronaler Plastizität assoziiert wird. Ihm wird eine wichtige Rolle bei der Stabilisierung von *long-term-potentiation* (LTP), einem molekularen Korrelat von Lernvorgängen, zugeschrieben (Williams et al., 1995). Eine Egr2-Aktivierung durch Opiatentzug ist beschrieben (Bhat et al., 1992). Daher scheint auch dieser Transkriptionsfaktor nach seiner Induktion in neuronale Umbauvorgänge einzugreifen und könnte eine zelluläre Komponente der Suchtentstehung darstellen.

In kultivierten embryonalen DRG-Neuronen wurde eine morphininduzierte ERK-1/2-abhängige mRNA-Induktion von SRF festgestellt. SRF kontrolliert die Expression von IEG. IEG sind Transkriptionsfaktoren, die wiederum mit synaptischer Plastizität und Lernvorgängen assoziiert werden. Außerdem reguliert SRF direkt Aktin-Zytoskelett-Gene, welche für Neuritenwachstum und neuronale Migration eine Rolle spielen (Knoll und Nordheim, 2009). SRF vermittelt in DRG-Neuronen die NGF-abhängige Aussprossung und das Wachstum von Axonen in die Peripherie (Wickramasinghe et al., 2008). SRF ist außerdem nötig für die hippocampale Speicherung von Langzeitgedächtnisinhalten (Dash et al., 2005), für die Speicherung neuer expliziter räumlicher Gedächtnisinhalte durch *long-term-depression* (LTD) (Etkin et al., 2006) und wird mit der synaptischen Plastizität im Rahmen der LTP assoziiert (Ramanan et al., 2005). Neuroadaptive Veränderungen tragen zur Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit bei. Synaptische Plastizität gilt als das zelluläre Korrelat für Lernvorgänge. Sucht kann molekular als Form des Lernens gesehen werden, da Opioid-induzierte synaptische Veränderungen induzieren können (Dacher und Nugent, 2011). Somit ist SRF mit seinem Einfluss auf synaptische Plastizität relevant für die Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit.

Eine Opioidtherapie kann zur Entstehung von Hyperalgesie führen. Dabei handelt es sich um eine anormal erhöhte Schmerzsensibilität (Devulder, 1997). Opioidentzug führt an der Synapse zwischen nozizeptiven C-Fasern und dem zweiten Neuron im Hinterhorn des Rückenmarks zu postsynaptischer LTP. Dies könnte ein Grund für die Entstehung von Hyperalgesie sein, da bei dieser typischerweise die Sensibilität für C-Faser-Stimuli erhöht ist (Drdla et al., 2009).

Für die Nozizeption ist die *transient receptor potential* (TRP)-Ionenkanal-Familie von großer Relevanz. Der unselektive Kationenkanal *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) wird in sensorischen Neuronen, so auch in DRG-Neuronen, exprimiert und wird u.a. durch Hitze, Protonen und Capsaicin aktiviert. Der TRPV1 kann durch proinflammatorische Stimuli sensibilisiert werden, was die Aktivierungsschwelle erniedrigt. Eine verstärkte TRPV1-Aktivierung wird mit chronischen Schmerzzuständen, wie Neuralgien, Clusterkopfschmerz, Migräne und Tumor-Schmerz in Verbindung gebracht (Premkumar und Abooj, 2012). Eine Studie zeigt, dass Opioidgabe zu präsynaptischer LTP in TRPV1-exprimierenden primär-sensorischen Neuronen führt

(Zhou et al., 2010). Außerdem kann eine Inhibition des TRPV1 die opioidinduzierte Hyperalgesie reduzieren und sogar eine Toleranzentwicklung abschwächen. In der gleichen Arbeit wurde gezeigt, dass auch eine Inhibition der MAPK in DRG-Neuronen Hyperalgesie und Toleranz abschwächen konnte. Eine Inhibition der MAPK reduzierte hier außerdem die durch chronische Opioidgabe erhöhte TRPV1-Expression (Chen et al., 2008). Geht man von einer ERK-1/2, ETS/SRE-vermittelten SRF-Geninduktion in DRG-Neuronen aus, wie sie in dieser Arbeit gezeigt wurde und bedenkt man den Einfluss von SRF auf synaptische Plastizität und LTP, so könnte dies der zu Grunde liegende Mechanismus für die präsynaptische LTP durch Opioidgabe in primär-sensorischen Neuronen sein. Eine Inhibition der MAPK führte zur Abschwächung von Hyperalgesie und Toleranz. Nimmt man LTP als zellulären Mechanismus von Hyperalgesie und Toleranz an, lässt sich auch dieser Effekt erklären. Die Hemmung von MAPK führt durch die Inhibition der für LTP verantwortlichen SRF-Expression zu der beobachteten Abschwächung von Hyperalgesie und Toleranz.

Sowohl in F11 Zellen als auch in kultivierten embryonalen DRG-Neuronen konnte durch Morphin eine Induktion der mRNA-Expression von FosB und Egr4 festgestellt werden. F11 Zellen gelten als Modellsystem für DRG-Neurone (Francel et al., 1987, Puttfarcken et al., 1997). Jedoch sind Phänomene, die man nicht nur im Modellsystem sondern auch in kultivierten primären DRG-Neuronen finden kann der physiologischen Realität wahrscheinlich am nächsten.

Der Transkriptionsfaktor FosB und seine stabile Isoform, die verkürzte Splicevariante Δ FosB werden auf molekularer Ebene mit Sucht in Verbindung gebracht (Nestler et al., 2001, Nestler et al., 1999). Nach chronischer Morphinadministration findet man eine Akkumulation von Δ FosB im *Nucleus accumbens* und in der *Nucleus caudatus*-Putamen-Region (Gago et al., 2011, Kaplan et al., 2011).

Des Weiteren wurde eine mRNA-Induktion von Egr4 (alias NGFI-C/AT133) festgestellt. Hierbei handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor mit Zink-Finger-Domäne, der dosisabhängig autoinhibitorisch seine eigene Expression kontrolliert (Zipfel et al., 1997). Es ist bekannt, dass Egr4 die Expression des Scn7a in DRG-Neuronen reguliert. Dieser gehört zur Familie der spannungsabhängigen Natriumkanäle und wird durch hohe extrazelluläre Natriumkonzentrationen aktiviert (Garcia-Villegas et al., 2009). Außerdem

ist der neuronenspezifische K^+/Cl^- -Kotransporter-2 (KCC-2) in Hippocampus und Kleinhirn durch Egr4 reguliert (Uvarov et al., 2006). Die Expression des KCC-2 wird durch *brain derived neurotropic factor* (BDNF)-Stimulation ERK-1/2-abhängig über Egr4 induziert (Ludwig et al., 2011). Der KCC-2-Transporter führt postsynaptisch zu einer Hyperpolarisation. Er verstärkt so die synaptische Wirkung der inhibitorischen Transmitter GABA und Glycin. Diese führen nach ihrer Ausschüttung zur Öffnung postsynaptischer Anionenkanäle. Wenn im Normalfall die Chloridkonzentration intrazellulär geringer als extrazellulär ist, erfolgt ein Cl^- -Einstrom in die Zelle was einer Hyperpolarisation und somit einer hemmenden Wirkung entspricht. Durch den Chloridionenausstrom über den KCC-2 wird der nötige Cl^- -Konzentrationsgradient aufrechterhalten (Rivera et al., 1999, Hubner et al., 2001).

Daher ist als eventuelle physiologische Konsequenz einer morphininduzierten Elk-1/SRF-vermittelten Egr4-Expression in DRG-Neuronen eine vermehrte Expression von Scn7a und KCC-2 denkbar. Dadurch würden sich die synaptische Transmission und der Konzentrationsgradient über der Plasmamembran verändern, woraus eine veränderte Erregbarkeit der Zelle resultieren würde. Man könnte spekulieren, dass durch vermehrte Scn7a Expression mehr Natrium in die Zelle einströmen kann, wodurch es intrazellulär zu einer Hyperpolarisation und somit zu einer verstärkten Erregbarkeit kommen würde. Eine vermehrte Expression von KCC-2 würde die synaptische Transmission dahingehend verändern, dass inhibitorische Transmitter verstärkt wirksam sind. Wie stark und ob diese Effekte tatsächlich auftreten bleibt ungewiss, jedoch sind physiologischen Folgen für zelluläre Erregbarkeit und synaptische Übertragung denkbar, was zukünftig weiter untersucht werden sollte. Somit schaffen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse über morphinvermittelte Signalwege neue Ansätze für die Erforschung von Wirkungen und Nebenwirkungen einer Opioidtherapie.

6.4 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein bislang unentdeckter Signalweg aufgezeigt werden, welcher Morphin ermöglicht ERK-1/2/SRF/TCF-abhängig Genexpression in einer DRG-ähnlichen Zelllinie zu induzieren.

Die μ OR-abhängige ERK-1/2-vermittelte Aktivierung von Elk-1/SRF durch Morphin in F11 Zellen führt zur Expression von FosB und Egr4, in primären DRG-Neuronen auch zur verstärkten Expression von SRF. Falls sich dies tatsächlich auf die Proteinexpression auswirkt, könnte es zu daraus resultierenden zellulären Veränderungen der synaptischen Plastizität sowie der zellulären Erregbarkeit und neuronalen Übertragung kommen, was wiederum für die Entstehung von Abhängigkeit und Toleranz eine Rolle spielt. Somit werfen die erzielten Erkenntnisse bezüglich morphinvermittelter Genexpressionsregulation neue Fragen auf.

So bleibt unklar, ob es sich bei der Elk-1-abhängigen morphininduzierten Genexpression um ein für DRG-Neurone spezifisches Phänomen handelt oder ob sich dieses auch in zerebralen Neuronen reproduzieren lässt. Es stellt sich die Frage, inwiefern die Aktivierung des ERK-1/2/SRF/TCF-Signalwegs durch Morphin im Sinne eines *biased agonism* von der Aktivierung des Opioidrezeptorsubtyps abhängt. In diesem Falle würde die individuelle Ausstattung der Zelle mit δ OR, μ OR und κ OR darüber entscheiden, welche Signalwege morphinabhängig angestoßen werden. Die Rezeptorpopulation könnte wiederum gewebsspezifisch determiniert sein. Außerdem ist in diesem Zusammenhang die am Wirkort erreichte Konzentration des Morphins von Bedeutung, da Morphin eine höhere Affinität zum μ OR hat und diesen bereits bei niedrigeren Konzentrationen aktivieren kann. Außerdem entstehen im Organismus durch den Morphinabbau Metabolite, welche wiederum selbst als *biased agonists* funktionieren können.

Darüber hinaus stellt sich in diesem Kontext die Frage nach der Rolle von β -Arrestin. Es könnten arrestinunabhängige Mechanismen zu einer ERK-1/2-Aktivierung führen, theoretisch ist aber auch eine morphinvermittelte Arrestinrekrutierung und Rezeptorendozytose in DRG-Neuronen denkbar. Weitere Forschungen sind nötig um zu klären, ob es sich bei der Fähigkeit von Morphin, Endozytoseprozesse zu initiieren um

einen Zell -oder gewebespezifischen Mechanismus handelt, welcher Unterschiede in der Expression von Genen erklären könnte. Außerdem bleibt die physiologische Relevanz der entdeckten Genexpressionsveränderungen offen. Hierfür wäre es zunächst wichtig zu wissen, ob sich die Induktion der Expression von FosB und Egr4 auch in anderen Zellsystemen bestätigen ließe. Interessant wäre zu sehen, ob eine ETS/SRE-regulierte Veränderung der Expression von FosB und dessen für Suchtentstehung wichtige Splicevariante Δ FosB auch in Gehirnarealen wie dem *Nucleus accumbens* auftritt, denen für Abhängigkeitsentstehung eine wichtige Rolle zugesprochen wird. Die in dieser Arbeit untersuchten neuronalen SRF-Zielgene decken bei weitem nicht alle beteiligten Gene ab, die in diesem Zusammenhang von Bedeutung sind. Da die IEG selbst als Transkriptionsfaktoren fungieren und die Expression wieder anderer Gene regulieren wird noch viel Arbeit nötig sein, um die morphinregulierte Genexpression in ihrer ganzen Komplexität zu verstehen. Mögliche Auswirkungen der Elk-1 vermittelten morphininduzierten Induktion der Egr4-Expression in DRG-Neuronen sind Veränderungen auf Ionenkanalebene, welche zu einer veränderten Erregbarkeit der Zellen führen. Diese theoretische physiologische Relevanz könnte durch Messungen von morphininduzierten Ionenkonzentrationsveränderungen und Spannungsänderungen überprüft werden. Damit es nach Genexpressionsveränderungen zu relevanten Folgen für einzelne Zellen und Gewebe kommt, müssen auch auf Proteinebene Veränderungen auftreten. Die morphinvermittelte ERK-1/2/TCF/SRF-anhängige Regulation von IEG in DRG-Neuronen stellt einen bislang unbekanntem Signalweg dar, der Veränderungen auf Proteinebene kontrollieren könnte. Die eventuell veränderte Proteinexpression und deren zelluläre Konsequenzen müssen noch ergründet werden, jedoch bietet der in dieser Arbeit aufgezeigte morphininduzierte ERK-1/2/TCF/SRF-Signalweg einen neuen Ausgangspunkt für weitere Forschung mit dem Ziel einer zukünftigen verbesserten opioidbasierten Schmerztherapie.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

- ABDELHAMID, E. E., SULTANA, M., PORTOGHESE, P. S. & TAKEMORI, A. E. 1991. Selective blockage of delta opioid receptors prevents the development of morphine tolerance and dependence in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 258, 299-303.
- ALAM, J. & COOK, J. L. 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, 188, 245-54.
- ALLEGRI, M., CLARK, M. R., DE ANDRES, J. & JENSEN, T. S. 2012. Acute and chronic pain: where we are and where we have to go. *Minerva Anesthesiol*, 78, 222-35.
- AMMON-TREIBER, S. & HÖLLT, V. 2005. Morphine-induced changes of gene expression in the brain. *Addict Biol*, 10, 81-9.
- AMMON, S., MAYER, P., RIECHERT, U., TISCHMEYER, H. & HÖLLT, V. 2003. Microarray analysis of genes expressed in the frontal cortex of rats chronically treated with morphine and after naloxone precipitated withdrawal. *Brain Res Mol Brain Res*, 112, 113-25.
- ANDERSON, N. G., MALLER, J. L., TONKS, N. K. & STURGILL, T. W. 1990. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature*, 343, 651-3.
- ANDRISANI, O. M. 1999. CREB-mediated transcriptional control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 9, 19-32.
- APKARIAN, A. V. 2008. Pain perception in relation to emotional learning. *Curr Opin Neurobiol*, 18, 464-8.
- ARZNEIMITTELBRIEF, D. 2011, 45, 65. Schmerztherapie mit Opioiden. In: D. VON HERRATH, W.-D. LUDWIG & THIMME, W. (eds.). Berlin: Westkreuz-Verlag GmbH Berlin/Bonn.
- AUGUSTI-TOCCO, G. & SATO, G. 1969. Establishment of functional clonal lines of neurons from mouse neuroblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 64, 311-5.
- BAILEY, C. P. & CONNOR, M. 2005. Opioids: cellular mechanisms of tolerance and physical dependence. *Curr Opin Pharmacol*, 5, 60-8.
- BALLANTYNE, J. C. & SHIN, N. S. 2008. Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence. *Clin J Pain*, 24, 469-78.
- BARONAS, V. A. & KURATA, H. T. 2014. Inward rectifiers and their regulation by endogenous polyamines. *Front. Physiol*, 5:325.
- BELANGER, S., MA, W., CHABOT, J. G. & QUIRION, R. 2002. Expression of calcitonin gene-related peptide, substance P and protein kinase C in cultured dorsal root ganglion neurons following chronic exposure to mu, delta and kappa opiates. *Neuroscience*, 115, 441-53.
- BELCHEVA, M. M. & COSCIA, C. J. 2002. Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase. *Neurosignals*, 11, 34-44.

- BESNARD, A., BOUVEYRON, N., KAPPES, V., PASCOLI, V., PAGES, C., HECK, N., VANHOUTTE, P. & CABOCHE, J. 2011a. Alterations of molecular and behavioral responses to cocaine by selective inhibition of Elk-1 phosphorylation. *J Neurosci*, 31, 14296-307.
- BESNARD, A., GALAN-RODRIGUEZ, B., VANHOUTTE, P. & CABOCHE, J. 2011b. Elk-1 a transcription factor with multiple facets in the brain. *Front Neurosci*, 5, 35.
- BHAT, R. V., WORLEY, P. F., COLE, A. J. & BARABAN, J. M. 1992. Activation of the zinc finger encoding gene krox-20 in adult rat brain: comparison with zif268. *Brain Res Mol Brain Res*, 13, 263-6.
- BILECKI, W., HÖLLT, V. & PRZEWLOCKI, R. 2000. Acute delta-opioid receptor activation induces CREB phosphorylation in NG108-15 cells. *Eur J Pharmacol*, 390, 1-6.
- BILECKI, W., WAWRZCZAK-BARGIELA, A. & PRZEWLOCKI, R. 2004. Activation of AP-1 and CRE-dependent gene expression via mu-opioid receptor. *J Neurochem*, 90, 874-82.
- BILECKI, W., ZAPART, G., LIGEZA, A., WAWRZCZAK-BARGIELA, A., URBANSKI, M. J. & PRZEWLOCKI, R. 2005. Regulation of the extracellular signal-regulated kinases following acute and chronic opioid treatment. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2369-75.
- BIRNBAUMER, L. 2007. Expansion of signal transduction by G proteins. The second 15 years or so: from 3 to 16 alpha subunits plus betagamma dimers. *Biochim Biophys Acta*, 1768, 772-93.
- BIRNBAUMER, L., ABRAMOWITZ, J. & BROWN, A. M. 1990. Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1031, 163-224.
- BLACKWOOD, E. M. & KADONAGA, J. T. 1998. Going the distance: a current view of enhancer action. *Science*, 281, 60-3.
- BLUME, A. J. 1978. Opiate binding to membrane preparations of neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15: effects of ions and nucleotides. *Life Sci*, 22, 1843-52.
- BOLAND, L. M., ALLEN, A. C. & DINGLEDINE, R. 1991. Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C. *J Neurosci*, 11, 1140-9.
- BONNI, A., GINTY, D. D., DUDEK, H. & GREENBERG, M. E. 1995. Serine 133-phosphorylated CREB induces transcription via a cooperative mechanism that may confer specificity to neurotrophin signals. *Mol Cell Neurosci*, 6, 168-83.
- BOULENDE SAB, A., BOUCHARD, M. F., BELAND, M., PRUD'HOMME, B., SOUCHKOVA, O., VIGER, R. S. & PILON, N. 2011. An Ebox element in the proximal Gata4 promoter is required for Gata4 expression in vivo. *PLoS One*, 6, e29038.
- BOURNE, H. R., LANDIS, C. A. & MASTERS, S. B. 1989. Hydrolysis of GTP by the alpha-chain of Gs and other GTP binding proteins. *Proteins*, 6, 222-30.
- BREIT, A., GAGNIDZE, K., DEVI, L. A., LAGACE, M. & BOUVIER, M. 2006. Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol Pharmacol*, 70, 686-96.

- BUCHWALTER, G., GROSS, C. & WASYLYK, B. 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1-14.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., NOLAN, T. & PFAFFL, M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR--a perspective. *J Mol Endocrinol*, 34, 597-601.
- CARTER, B. D. & MEDZIHRADSKY, F. 1993. Go mediates the coupling of the mu opioid receptor to adenylyl cyclase in cloned neural cells and brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 4062-6.
- CESARE, P., MCNAUGHTON, P. 1997. Peripheral pain mechanisms. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 493-9
- CHAKRABARTI, S. & GINTZLER, A. R. 2007. Phosphorylation of Galphas influences its association with the micro-opioid receptor and is modulated by long-term morphine exposure. *Mol Pharmacol*, 72, 753-60.
- CHAKRABARTI, S., OPPERMANN, M. & GINTZLER, A. R. 2001. Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulating cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 4209-14.
- CHAN, J. S., CHIU, T. T. & WONG, Y. H. 1995. Activation of type II adenylyl cyclase by the cloned mu-opioid receptor: coupling to multiple G proteins. *J Neurochem*, 65, 2682-9.
- CHANG, G., CHEN, L. & MAO, J. 2007. Opioid tolerance and hyperalgesia. *Med Clin North Am*, 91, 199-211.
- CHANG, S. L., SQUINTO, S. P. & HARLAN, R. E. 1988. Morphine activation of c-fos expression in rat brain. *Biochem Biophys Res Commun*, 157, 698-704.
- CHEN, J. J., DYMSHITZ, J. & VASKO, M. R. 1997. Regulation of opioid receptors in rat sensory neurons in culture. *Mol Pharmacol*, 51, 666-73.
- CHEN, Y., GEIS, C. & SOMMER, C. 2008. Activation of TRPV1 contributes to morphine tolerance: involvement of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Neurosci*, 28, 5836-45.
- CHEN, Y. & SOMMER, C. 2009. The role of mitogen-activated protein kinase (MAPK) in morphine tolerance and dependence. *Mol Neurobiol*, 40, 101-7.
- CHILDERS, S. R. 1991. Opioid receptor-coupled second messenger systems. *Life Sci*, 48, 1991-2003.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 2006. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat Protoc*, 1, 581-5.
- CHRISTIE, M. J. 2008. Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction. *Br J Pharmacol*, 154, 384-96.
- COLLIN, E., MAUBORGNE, A., BOURGOIN, S., CHANTREL, D., HAMON, M. & CESSÉLIN, F. 1991. In vivo tonic inhibition of spinal substance P (-like material) release by endogenous opioid(s) acting at delta receptors. *Neuroscience*, 44, 725-31.
- CONKLIN, B. R. & BOURNE, H. R. 1993. Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors. *Cell*, 73, 631-41.
- CONNOR, M. & CHRISTIE, M. D. 1999. Opioid receptor signalling mechanisms. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 26, 493-9.

- COX, B. M. 1982. Endogenous opioid peptides: a guide to structures and terminology. *Life Sci*, 31, 1645-58.
- CRAIN, S. M., SHEN, K. F. & CHALAZONITIS, A. 1988. Opioids excite rather than inhibit sensory neurons after chronic opioid exposure of spinal cord-ganglion cultures. *Brain Res*, 455, 99-109.
- CROSBY, S. D., VEILE, R. A., DONIS-KELLER, H., BARABAN, J. M., BHAT, R. V., SIMBURGER, K. S. & MILBRANDT, J. 1992. Neural-specific expression, genomic structure, and chromosomal localization of the gene encoding the zinc-finger transcription factor NGFI-C. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4739-43.
- CRUZ, S. L., VILLARREAL, J. E. & VOLKOW, N. D. 1996. Further evidence that naloxone acts as an inverse opiate agonist: implications for drug dependence and withdrawal. *Life Sci*, 58, PL381-9.
- DACHER, M. & NUGENT, F. S. 2011. Opiates and plasticity. *Neuropharmacology*, 61, 1088-96.
- DANG, V. C. & WILLIAMS, J. T. 2005. Morphine-Induced mu-opioid receptor desensitization. *Mol Pharmacol*, 68, 1127-32.
- DASH, P. K., ORSI, S. A. & MOORE, A. N. 2005. Sequestration of serum response factor in the hippocampus impairs long-term spatial memory. *J Neurochem*, 93, 269-78.
- DAVIES, S. P., REDDY, H., CAIVANO, M. & COHEN, P. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J*, 351, 95-105.
- DAVIS, R. J. 1995. Transcriptional regulation by MAP kinases. *Mol Reprod Dev*, 42, 459-67.
- DE RIDDER, M. 2000. *Heroin: Vom Arzneimittel zur Droge*. 1 ed. Frankfurt: Campus Verlag GmbH, 142-76.
- DELLEMIJN, P. 1999. Are opioids effective in relieving neuropathic pain? *Pain*, 80, 453-62.
- DETJEEN, P., SPECKMANN, E.-J. & HESCHELER, J. 2009. Nozizeption und Schmerz. *Physiologie*, 4ed.: Elsevier GmbH, München, 77-81.
- DEVULDER, J. 1997. Hyperalgesia induced by high-dose intrathecal sufentanil in neuropathic pain. *J Neurosurg Anesthesiol*, 9, 146-8.
- DHAWAN, B. N., CESSSELIN, F., RAGHUBIR, R., REISINE, T., BRADLEY, P. B., PORTOGHESE, P. S. & HAMON, M. 1996. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. *Pharmacol Rev*, 48, 567-92.
- DRDLA, R., GASSNER, M., GINGL, E. & SANDKUHLER, J. 2009. Induction of synaptic long-term potentiation after opioid withdrawal. *Science*, 325, 207-10.
- DUMUIS, A., BOUHELAL, R., SEBBEN, M., CORY, R. & BOCKAERT, J. 1988. A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 34, 880-7.
- EIPPER, B. A. & MAINS, R. E. 1980. Structure and biosynthesis of pro-adrenocorticotropin/endorphin and related peptides. *Endocr Rev*, 1, 1-27.
- EITINGER, T. 2007. In: FUCHS, G. (ed.) *Allgemeine Mikrobiologie*, 8ed.: Thieme, Stuttgart, 443-4.
- ETKIN, A., ALARCON, J. M., WEISBERG, S. P., TOUZANI, K., HUANG, Y. Y., NORDHEIM, A. & KANDEL, E. R. 2006. A role in learning for SRF: deletion

- in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron*, 50, 127-43.
- FAN, S. F., SHEN, K. F. & CRAIN, S. M. 1993. mu and delta opioid agonists at low concentrations decrease voltage-dependent K⁺ currents in F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells via cholera toxin-sensitive receptors. *Brain Res*, 605, 214-20.
- FAN, S. F., SHEN, K. F., SCHEIDELER, M. A. & CRAIN, S. M. 1992. F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K⁺ currents upon activation. *Brain Res*, 590, 329-33.
- FELGNER, P. L., GADEK, T. R., HOLM, M., ROMAN, R., CHAN, H. W., WENZ, M., NORTHROP, J. P., RINGOLD, G. M. & DANIELSEN, M. 1987. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 7413-7.
- FERGUSON, S. S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53, 1-24.
- FONG, T. M. 1996. Mechanistic hypotheses for the activation of G-protein-coupled receptors. *Cell Signal*, 8, 217-24.
- FOULKES, N. S., LAOIDE, B. M., SCHLOTTER, F. & SASSONE-CORSI, P. 1991. Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5448-52.
- FRANCEL, P. C., HARRIS, K., SMITH, M., FISHMAN, M. C., DAWSON, G. & MILLER, R. J. 1987. Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem*, 48, 1624-31.
- FREISSMUTH, M., CASEY, P. J. & GILMAN, A. G. 1989. G proteins control diverse pathways of transmembrane signaling. *FASEB J*, 3, 2125-31.
- FREYE, E. 2010. *Opioide in der Medizin*. 8 ed: Springer Medizin Verlag, Heidelberg
- FROLICH, N., DEES, C., PAETZ, C., REN, X., LOHSE, M. J., NIKOLAEV, V. O. & ZENK, M. H. 2011. Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at G(i)-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor. *Biochem Pharmacol*, 81, 1248-54.
- FUKAMI, K. 2002. Structure, regulation, and function of phospholipase C isozymes. *J Biochem*, 131, 293-9.
- FUKAMI, K., INANOBE, S., KANEMARU, K. & NAKAMURA, Y. 2010. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. *Prog Lipid Res*, 49, 429-37.
- FUKUDA, K., KATO, S. & MORI, K. 1995. Location of regions of the opioid receptor involved in selective agonist binding. *J Biol Chem*, 270, 6702-9.
- FUNDYTUS, M. E., SCHILLER, P. W., SHAPIRO, M., WELTROWSKA, G. & CODERRE, T. J. 1995. Attenuation of morphine tolerance and dependence with the highly selective delta-opioid receptor antagonist TIPP[psi]. *Eur J Pharmacol*, 286, 105-8.
- GAGO, B., SUAREZ-BOOMGAARD, D., FUXE, K., BRENE, S., REINA-SANCHEZ, M. D., RODRIGUEZ-PEREZ, L. M., AGNATI, L. F., DE LA CALLE, A. & RIVERA, A. 2011. Effect of acute and continuous morphine treatment on transcription factor expression in subregions of the rat caudate putamen. Marked modulation by D4 receptor activation. *Brain Res*, 1407, 47-61.

- GARBE, E., JOBSKI, K. & SCHMID, U. 2012. Utilisation of transdermal fentanyl in Germany from 2004 to 2006. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 21, 191-8.
- GARCIA-VILLEGAS, R., LOPEZ-ALVAREZ, L. E., ARNI, S., ROSENBAUM, T. & MORALES, M. A. 2009. Identification and functional characterization of the promoter of the mouse sodium-activated sodium channel Na(x) gene (Scn7a). *J Neurosci Res*, 87, 2509-19.
- GARCIA, M. M., BROWN, H. E. & HARLAN, R. E. 1995. Alterations in immediate-early gene proteins in the rat forebrain induced by acute morphine injection. *Brain Res*, 692, 23-40.
- GEORGE, C. L., LIGHTMAN, S. L. & BIDDIE, S. C. 2011. Transcription factor interactions in genomic nuclear receptor function. *Epigenomics*, 3, 471-85.
- GETHER, U. & KOBILKA, B. K. 1998. G protein-coupled receptors. II. Mechanism of agonist activation. *J Biol Chem*, 273, 17979-82.
- GHIL, S. H., KIM, B. J., LEE, Y. D. & SUH-KIM, H. 2000. Neurite outgrowth induced by cyclic AMP can be modulated by the alpha subunit of Go. *J Neurochem*, 74, 151-8.
- GILLE, H., SHARROCKS, A. D. & SHAW, P. E. 1992. Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature*, 358, 414-7.
- GILMAN, A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-49.
- GINTZLER, A. R. & CHAKRABARTI, S. 2000. Opioid tolerance and the emergence of new opioid receptor-coupled signaling. *Mol Neurobiol*, 21, 21-33.
- GINTZLER, A. R. & CHAKRABARTI, S. 2006. Post-opioid receptor adaptations to chronic morphine; altered functionality and associations of signaling molecules. *Life Sci*, 79, 717-22.
- GLAUM, S. R., MILLER, R. J. & HAMMOND, D. L. 1994. Inhibitory actions of delta 1-, delta 2-, and mu-opioid receptor agonists on excitatory transmission in lamina II neurons of adult rat spinal cord. *J Neurosci*, 14, 4965-71.
- GOMATHI, K. G. & SHARMA, S. K. 1993. Purification and reconstitution of the delta opioid receptor. *FEBS Lett*, 330, 146-50.
- GOMES, I., GUPTA, A., SINGH, S. P. & SHARMA, S. K. 1999. Monoclonal antibody to the delta opioid receptor acts as an agonist in dual regulation of adenylate cyclase in NG108-15 cells. *FEBS Lett*, 456, 126-30.
- GOMES, I., JORDAN, B. A., GUPTA, A., TRAPAIDZE, N., NAGY, V. & DEVI, L. A. 2000. Heterodimerization of mu and delta opioid receptors: A role in opiate synergy. *J Neurosci*, 20, RC110.
- GOULD, S. & SUBRAMANI, S. 1988. Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology. *Analytical Biochemistry*, 175, 5-13.
- GROSS, R. A., MOISES, H. C., UHLER, M. D. & MACDONALD, R. L. 1990. Dynorphin A and cAMP-dependent protein kinase independently regulate neuronal calcium currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 7025-9.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
- GUPTA, S. & KULHARA, P. 2007. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence: An overview and update. *Indian J Psychiatry*, 49, 85-90.

- HABERSTOCK-DEBIC, H., KIM, K. A., YU, Y. J. & VON ZASTROW, M. 2005. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *J Neurosci*, 25, 7847-57.
- HABERSTOCK-DEBIC, H., WEIN, M., BARROT, M., COLAGO, E. E., RAHMAN, Z., NEVE, R. L., PICKEL, V. M., NESTLER, E. J., VON ZASTROW, M. & SVINGOS, A. L. 2003. Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *J Neurosci*, 23, 4324-32.
- HASSAN, A. H., ABLEITNER, A., STEIN, C. & HERZ, A. 1993. Inflammation of the rat paw enhances axonal transport of opioid receptors in the sciatic nerve and increases their density in the inflamed tissue. *Neuroscience*, 55, 185-95.
- HAWKINS, J. D. & PHILLIPS, I. R. 1996. Regulation of gene expression and gene amplification. *Principles of Medical Biology, Volume 5*. 163-99.
- HE, H. & PING, F. 2009. The SIE, SRE, CRE, and FAP-1 four intracellular signal pathways between stimulus and the expression of c-fos promoter. *J Cell Biochem*, 106, 764-8.
- HEDNER, T. & CASSUTO, J. 1987. Opioids and opioid receptors in peripheral tissues. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 130, 27-46.
- HILL, C. S., WYNNE, J. & TREISMAN, R. 1995. The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, 81, 1159-70.
- HILL, S. J. 2006. G-protein-coupled receptors: past, present and future. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1, S27-37.
- HO, M. K., SU, Y., YEUNG, W. W. & WONG, Y. H. 2009. Regulation of transcription factors by heterotrimeric G proteins. *Curr Mol Pharmacol*, 2, 19-31.
- HO, M. K. & WONG, Y. H. 1998. Structure and function of the pertussis-toxin-insensitive Gz protein. *Biol Signals Recept*, 7, 80-9.
- HOLMBERG, C. I., ROOS, P. M., LORD, J. M., ERIKSSON, J. E. & SISTONEN, L. 1998. Conventional and novel PKC isoenzymes modify the heat-induced stress response but are not activated by heat shock. *J Cell Sci*, 111 (Pt 22), 3357-65.
- HOLST, C., SKERKA, C., LICHTER, P., BIALONSKI, A. & ZIPFEL, P. F. 1993. Genomic organization, chromosomal localization and promoter function of the human zinc-finger gene pAT133. *Hum Mol Genet*, 2, 367-72.
- HOLZAPFEL, B. & WICKERT, L. 2007. Methoden und Anwendungsgebiete: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). *Biol. Unserer Zeit*, 37, 120-6.
- HONG, Y., WANG, D., CHABOT, J. G., MA, W., CHEN, P. & QUIRION, R. 2010. A role for protein kinase C-dependent upregulation of adrenomedullin in the development of morphine tolerance in male rats. *J Neurosci*, 30, 12508-16.
- HUBNER, C. A., STEIN, V., HERMANS-BORGMAYER, I., MEYER, T., BALLANYI, K. & JENTSCH, T. J. 2001. Disruption of KCC2 reveals an essential role of K-Cl cotransport already in early synaptic inhibition. *Neuron*, 30, 515-24.
- ITZHAK, Y. & PASTERNAK, G. W. 1987. Interaction of [D-Ser2,Leu5]enkephalin-Thr6 (DSLET), a relatively selective delta ligand, with mu1 opioid binding sites. *Life Sci*, 40, 307-11.
- JANKNECHT, R., CAHILL, M. A. & NORDHEIM, A. 1995. Signal integration at the c-fos promoter. *Carcinogenesis*, 16, 443-50.
- JI, R. R., ZHANG, Q., LAW, P. Y., LOW, H. H., ELDE, R. & HOKFELT, T. 1995. Expression of mu-, delta-, and kappa-opioid receptor-like immunoreactivities in rat dorsal root ganglia after carrageenan-induced inflammation. *J Neurosci*, 15, 8156-66.

- JIANG, T., XING, B. & RAO, J. 2008. Recent developments of biological reporter technology for detecting gene expression. *Biotechnol Genet Eng Rev*, 25, 41-75.
- JOHANNESSEN, M., DELGHANDI, M. P. & MOENS, U. 2004. What turns CREB on? *Cell Signal*, 16, 1211-27.
- JOHANSEN, F. E. & PRYWES, R. 1995. Serum response factor: transcriptional regulation of genes induced by growth factors and differentiation. *Biochim Biophys Acta*, 1242, 1-10.
- JOHNSON, E. E., CHRISTIE, M. J. & CONNOR, M. 2005. The role of opioid receptor phosphorylation and trafficking in adaptations to persistent opioid treatment. *Neurosignals*, 14, 290-302.
- JOHNSTONE, R. E. & SMITH, D. J. 1992. Complete tolerance to opioids. *Anesth Analg*, 75, 467.
- JOSEPH, L. J., LE BEAU, M. M., JAMIESON, G. A., JR., ACHARYA, S., SHOWS, T. B., ROWLEY, J. D. & SUKHATME, V. P. 1988. Molecular cloning, sequencing, and mapping of EGR2, a human early growth response gene encoding a protein with "zinc-binding finger" structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85, 7164-8.
- JULIUS, D. & BASBAUM, A. I. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413, 203-10.
- JUNG, H. & MILLER, R. J. 2008. Activation of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) mediates upregulation of CCR2 chemokine receptors in dorsal root ganglion (DRG) neurons: a possible mechanism for activity-dependent transcription in DRG neurons in association with neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci*, 37, 170-7.
- KAEWSUK, S., HUTAMEKALIN, P., KETTERMAN, A. J., KHOTCHABHAKDI, N., GOVITRAPONG, P. & CASALOTTI, S. O. 2001. Morphine induces short-lived changes in G-protein gene expression in rat prefrontal cortex. *Eur J Pharmacol*, 411, 11-6.
- KANGRGA, I. & RANDIC, M. 1991. Outflow of endogenous aspartate and glutamate from the rat spinal dorsal horn in vitro by activation of low- and high-threshold primary afferent fibers. Modulation by mu-opioids. *Brain Res*, 553, 347-52.
- KAPLAN, G. B., LEITE-MORRIS, K. A., FAN, W., YOUNG, A. J. & GUY, M. D. 2011. Opiate sensitization induces FosB/DeltaFosB expression in prefrontal cortical, striatal and amygdala brain regions. *PLoS One*, 6, e23574.
- KEITH, D. E., MURRAY, S. R., ZAKI, P. A., CHU, P. C., LISSIN, D. V., KANG, L., EVANS, C. J. & VON ZASTROW, M. 1996. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem*, 271, 19021-4.
- KENAKIN, T. 2009. Biased agonism. *F1000 Biol Rep*, 1, 87.
- KERR, N., PINTZAS, A., HOLMES, F., HOBSON, S. A., POPE, R., WALLACE, M., WASYLYK, C., WASYLYK, B. & WYNICK, D. 2010. The expression of ELK transcription factors in adult DRG: Novel isoforms, antisense transcripts and upregulation by nerve damage. *Mol Cell Neurosci*, 44, 165-77.
- KEST, B., LEE, C. E., MCLEMORE, G. L. & INTURRISI, C. E. 1996. An antisense oligodeoxynucleotide to the delta opioid receptor (DOR-1) inhibits morphine tolerance and acute dependence in mice. *Brain Res Bull*, 39, 185-8.
- KIEFFER, B. L. & GAVERIAUX-RUFF, C. 2002. Exploring the opioid system by gene knockout. *Prog Neurobiol*, 66, 285-306.

- KLINGER, M. B., SACKS, S. & CERVERO, F. 2011. A role for extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 in the maintenance of persistent mechanical hyperalgesia in ovariectomized mice. *Neuroscience*, 172, 483-93.
- KNOLL, B. & NORDHEIM, A. 2009. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci*, 32, 432-42.
- KOCH, T. & HÖLLT, V. 2008. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacol Ther*, 117, 199-206.
- KOCH, T., WIDERA, A., BARTZSCH, K., SCHULZ, S., BRANDENBURG, L. O., WUNDRACK, N., BEYER, A., GRECKSCH, G. & HÖLLT, V. 2005. Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol*, 67, 280-7.
- KOHNO, T., KUMAMOTO, E., HIGASHI, H., SHIMOJI, K. & YOSHIMURA, M. 1999. Actions of opioids on excitatory and inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord. *J Physiol*, 518 (Pt 3), 803-13.
- KOOB, G. F. & BLOOM, F. E. 1988. Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science*, 242, 715-23.
- KOVOOR, A., CELVER, J. P., 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. *Mol Pharmacol*, 54, 704-11.
- KRAMER, H. K. & SIMON, E. J. 1999. Role of protein kinase C (PKC) in agonist-induced mu-opioid receptor down-regulation: I. PKC translocation to the membrane of SH-SY5Y neuroblastoma cells is induced by mu-opioid agonists. *J Neurochem*, 72, 585-93.
- KRAMER, H. K. & SIMON, E. J. 2000. mu and delta-opioid receptor agonists induce mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation in the absence of receptor internalization. *Neuropharmacology*, 39, 1707-19.
- KUBISTA, M., ANDRADE, J. M., BENGTTSSON, M., FOROOTAN, A., JONAK, J., LIND, K., SINDELKA, R., SJOBACK, R., SJOGREEN, B., STROMBOM, L., STAHLBERG, A. & ZORIC, N. 2006. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med*, 27, 95-125.
- KUJUBU, D. A., LIM, R. W., VARNUM, B. C. & HERSCHMAN, H. R. 1987. Induction of transiently expressed genes in PC-12 pheochromocytoma cells. *Oncogene*, 1, 257-62.
- LABIANCA, R., SARZI-PUTTINI, P., ZUCCARO, S. M., CHERUBINO, P., VELLUCCI, R. & FORNASARI, D. 2012. Adverse effects associated with non-opioid and opioid treatment in patients with chronic pain. *Clin Drug Investig*, 32 Suppl 1, 53-63.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LARHAMMAR, D., BLOMQVIST, A. G. & WAHLESTEDT, C. 1993. The receptor revolution--multiplicity of G-protein-coupled receptors. *Drug Des Discov*, 9, 179-88.
- LAW, P. Y., WONG, Y. H. & LOH, H. H. 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40, 389-430.
- LAZO, P. S., DORFMAN, K., NOGUCHI, T., MATTEI, M. G. & BRAVO, R. 1992. Structure and mapping of the fosB gene. FosB downregulates the activity of the fosB promoter. *Nucleic Acids Res*, 20, 343-50.

- LEMMER, B. & FÜLGRAFF, G. 2010. Pharmakotherapie, klinische Pharmakologie. 14 ed. Heidelberg: Springer, 71.
- LEVI-MONTALCINI, R. & ANGELETTI, P. U. 1968. Nerve growth factor. *Physiol Rev*, 48, 534-69.
- LI, K. W., JIMENEZ, C. R., VAN DER SCHORS, R. C., HORNSHAW, M. P., SCHOFFELMEER, A. N. & SMIT, A. B. 2006. Intermittent administration of morphine alters protein expression in rat nucleus accumbens. *Proteomics*, 6, 2003-8.
- LI, Q., ZHAO, X., ZHONG, L. J., YANG, H. Y., WANG, Q. & PU, X. P. 2009. Effects of chronic morphine treatment on protein expression in rat dorsal root ganglia. *Eur J Pharmacol*, 612, 21-8.
- LI, X. & CLARK, J. D. 1999. Morphine tolerance and transcription factor expression in mouse spinal cord tissue. *Neurosci Lett*, 272, 79-82.
- LIGEZA, A., WAWRZCZAK-BARGIELA, A., KAMINSKA, D., KOROSTYNSKI, M. & PRZEWLOCKI, R. 2008. Regulation of ERK1/2 phosphorylation by acute and chronic morphine - implications for the role of cAMP-responsive element binding factor (CREB)-dependent and Ets-like protein-1 (Elk-1)-dependent transcription; small interfering RNA-based strategy. *FEBS J*, 275, 3836-49.
- LOPEZ, E. J. & RAINGO, J. 2012. A118G Mu Opioid Receptor polymorphism increases inhibitory effects on CaV2.2 channels. *Neurosci Lett*, 523, 190-94
- LUDWIG, A., UVAROV, P., SONI, S., THOMAS-CRUSELLS, J., AIRAKSINEN, M. S. & RIVERA, C. 2011. Early growth response 4 mediates BDNF induction of potassium chloride cotransporter 2 transcription. *J Neurosci*, 31, 644-9.
- LÜLLMANN, H., MOHR, K. & HEIN, L. 2010. Pharmakologie und Toxikologie. 17 ed. Thieme Verlag, Stuttgart
- LUO, J., JING, L., QIN, W. J., ZHANG, M., LAWRENCE, A. J., CHEN, F. & LIANG, J. H. 2011. Transcription and protein synthesis inhibitors reduce the induction of behavioural sensitization to a single morphine exposure and regulate Hsp70 expression in the mouse nucleus accumbens. *Int J Neuropsychopharmacol*, 14, 107-21.
- MA, L. & PEI, G. 2007. Beta-arrestin signaling and regulation of transcription. *J Cell Sci*, 120, 213-8.
- MA, W., ZHENG, W. H., POWELL, K., JHAMANDAS, K. & QUIRION, R. 2001. Chronic morphine exposure increases the phosphorylation of MAP kinases and the transcription factor CREB in dorsal root ganglion neurons: an in vitro and in vivo study. *Eur J Neurosci*, 14, 1091-104.
- MALDONADO, R., BLENDY, J. A., TZAVARA, E., GASS, P., ROQUES, B. P., HANOUNE, J. & SCHUTZ, G. 1996. Reduction of morphine abstinence in mice with a mutation in the gene encoding CREB. *Science*, 273, 657-9.
- MANSOUR, A., KHACHATURIAN, H., LEWIS, M. E., AKIL, H. & WATSON, S. J. 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci*, 11, 308-14.
- MAO, L. M., HAN, J. S. 1990. Peptide antagonist of delta-opioid receptor attenuates inhibition of spinal nociceptive reflex induced by stimulation of arcuate nucleus of the hypothalamus. *Peptides*, 11, 1045-7.
- MARINISSEN, M. J. & GUTKIND, J. S. 2001. G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms. *Trends Pharmacol Sci*, 22, 368-76.

- MARTIN, V. V., BEIERLEIN, M., MORGAN, J. L., ROTHE, A. & GEE, K. R. 2004. Novel fluo-4 analogs for fluorescent calcium measurements. *Cell Calcium*, 36, 509-14.
- MARTIN, W. R., EADES, C. G., THOMPSON, J. A., HUPPLER, R. E. & GILBERT, P. E. 1976. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther*, 197(3), 517-32.
- MARTINI, L. & WHISTLER, J. L. 2007. The role of mu opioid receptor desensitization and endocytosis in morphine tolerance and dependence. *Curr Opin Neurobiol*, 17, 556-64.
- MATTHES, H. W., MALDONADO, R., SIMONIN, F., VALVERDE, O., SLOWE, S., KITCHEN, I., BEFORT, K., DIERICH, A., LE MEUR, M., DOLLE, P., TZAVARA, E., HANOUNE, J., ROQUES, B. P. & KIEFFER, B. L. 1996. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene. *Nature*, 383, 819-23.
- MAYR, B. & MONTMINY, M. 2001. Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 599-609.
- MAZIA, D., SCHATTE, G. & SALE, W. 1975. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy. *J Cell Biol*, 66, 198-200.
- MCILVAIN, H. B., BAUDY, A., SULLIVAN, K., LIU, D., PONG, K., FENNELL, M. & DUNLOP, J. 2006. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces differentiation in the neuronal F11 cell line through a PKA-dependent pathway. *Brain Res*, 1077, 16-23.
- MERCADANTE, S. 2010. Management of cancer pain. *Intern Emerg Med*, 5 Suppl 1, S31-5.
- MESSERSMITH, E. K., LEONARDO, E. D., SHATZ, C. J., TESSIER-LAVIGNE, M., GOODMAN, C. S. & KOLODKIN, A. L. 1995. Semaphorin III can function as a selective chemorepellent to pattern sensory projections in the spinal cord. *Neuron*, 14, 949-59.
- MOLINARI, P., VEZZI, V., SBRACCIA, M., GRO, C., RIITANO, D., AMBROSIO, C., CASELLA, I. & COSTA, T. 2010. Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *J Biol Chem*, 285, 12522-35.
- MORGAN, M. M. & CHRISTIE, M. J. 2011. Analysis of opioid efficacy, tolerance, addiction and dependence from cell culture to human. *Br J Pharmacol*, 164, 1322-34.
- MOTULSKY, H. J. 1999. Analyzing Data with GraphPad Prism. GraphPad Software Inc., San Diego CA.
- MUEHLICH, S., WANG, R., LEE, S. M., LEWIS, T. C., DAI, C. & PRYWES, R. 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 28, 6302-13.
- MÜLHARDT, C. 2009. *Der Experimentator - Molekularbiologie/Genomics*. 6 ed.: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg,
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- MURTHY, K. S. & MAKHLOUF, G. M. 1996. Opioid mu, delta, and kappa receptor-induced activation of phospholipase C-beta 3 and inhibition of adenylyl cyclase is mediated by Gi2 and G(o) in smooth muscle. *Mol Pharmacol*, 50, 870-7.

- NARITA, M., OHNISHI, O., NEMOTO, M., YAJIMA, Y. & SUZUKI, T. 2002. Implications of phosphoinositide 3-kinase in the mu- and delta-opioid receptor-mediated supraspinal antinociception in the mouse. *Neuroscience*, 113, 647-52.
- NARUMIYA, S. 1996. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. *J Biochem*, 120, 215-28.
- NESTLER, E. J. 1997. Molecular mechanisms of opiate and cocaine addiction. *Curr Opin Neurobiol*, 7, 713-9.
- NESTLER, E. J. & AGHAJANIAN, G. K. 1997. Molecular and cellular basis of addiction. *Science*, 278, 58-63.
- NESTLER, E. J., BARROT, M. & SELF, D. W. 2001. DeltaFosB: a sustained molecular switch for addiction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 11042-6.
- NESTLER, E. J. & HYMAN, S. E. 2002. Regulation of Gene Expression. In: DAVIS, K. L., CHARNEY, D., COYLE, J. T. & NEMEROFF, C. (eds.) *Neuropsychopharmacology: The Fifth Edition of Progress*. Brentwood: American College of Neuropsychopharmacology, 217-28.
- NESTLER, E. J., KELZ, M. B. & CHEN, J. 1999. DeltaFosB: a molecular mediator of long-term neural and behavioral plasticity. *Brain Res*, 835, 10-7.
- NEVES, S. R., RAM, P. T. & IYENGAR, R. 2002. G protein pathways. *Science*, 296, 1636-9.
- NOBLE, F., SZUCS, M., KIEFFER, B. & ROQUES, B. P. 2000. Overexpression of dynamin is induced by chronic stimulation of mu- but not delta-opioid receptors: relationships with mu-related morphine dependence. *Mol Pharmacol*, 58, 159-66.
- NORTH, R. A., WILLIAMS, J. T., SURPRENANT, A. & CHRISTIE, M. J. 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, 5487-91.
- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., BARAK, L. S. & CARON, M. G. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*, 274, 32248-57.
- OFFERMANN, S., SCHULTZ, G. & ROSENTHAL, W. 1991. Evidence for opioid receptor-mediated activation of the G-proteins, Go and Gi2, in membranes of neuroblastoma x glioma (NG108-15) hybrid cells. *J Biol Chem*, 266, 3365-8.
- ONOFRIO, B. M. & YAKSH, T. L. 1990. Long-term pain relief produced by intrathecal morphine infusion in 53 patients. *J Neurosurg*, 72, 200-9.
- PAROLARO, D., PATRINI, G., MASSI, P., PARENTI, M., RUBINO, T., GIAGNONI, G. & GORI, E. 1990. Pertussis toxin modifies the effect of central morphine on rat intestinal motility. *Eur J Pharmacol*, 177, 75-80.
- PELTON, J. T., KAZMIERSKI, W., GULYA, K., YAMAMURA, H. I. & HRUBY, V. J. 1986. Design and synthesis of conformationally constrained somatostatin analogues with high potency and specificity for mu opioid receptors. *J Med Chem*, 29, 2370-5.
- PEREZ-ALBUERNE, E. D., SCHATTEMAN, G., SANDERS, L. K. & NATHANS, D. 1993. Transcriptional regulatory elements downstream of the JunB gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11960-4.
- PEREZ-CADAHIA, B., DROBIC, B. & DAVIE, J. R. 2011. Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem Cell Biol*, 89, 61-73.
- PERGOLIZZI, J., BOGER, R. H., BUDD, K., DAHAN, A., ERDINE, S., HANS, G., KRESS, H. G., LANGFORD, R., LIKAR, R., RAFFA, R. B. & SACERDOTE,

- P. 2008. Opioids and the management of chronic severe pain in the elderly: consensus statement of an International Expert Panel with focus on the six clinically most often used World Health Organization Step III opioids (buprenorphine, fentanyl, hydromorphone, methadone, morphine, oxycodone). *Pain Pract*, 8, 287-313.
- PFAFFL, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29, e45.
- PIECHOTA, M., KOROSTYNSKI, M., SOLECKI, W., GIERYK, A., SLEZAK, M., BILECKI, W., ZIOLKOWSKA, B., KOSTRZEWA, E., CYMERMAN, I., SWIECH, L., JAWORSKI, J. & PRZEWLOCKI, R. 2010. The dissection of transcriptional modules regulated by various drugs of abuse in the mouse striatum. *Genome Biol*, 11, R48.
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639-50.
- PINTO-RIBEIRO, F., ANSAH, O. B., ALMEIDA, A. & PERTOVAARA, A. 2007. Influence of arthritis on descending modulation of nociception from the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res*, 1197, 63-75.
- PIROS, E. T., HALES, T. G. & EVANS, C. J. 1996. Functional analysis of cloned opioid receptors in transfected cell lines. *Neurochem Res*, 21, 1277-85.
- PLATIKA, D., BAIZER, L. & FISHMAN, M. C. 1985a. Sensory neurons "immortalized" by fusion with neuroblastoma cells. *Trans Assoc Am Physicians*, 98, 301-4.
- PLATIKA, D., BOULOS, M. H., BAIZER, L. & FISHMAN, M. C. 1985b. Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 3499-503.
- POSERN, G. & TREISMAN, R. 2006. Actin' together: serum response factor, its cofactors and the link to signal transduction. *Trends Cell Biol*, 16, 588-96.
- PREMKUMAR, L. S. & ABOOJ, M. 2012. TRP channels and analgesia. *Life Sci*.
- PRICE, M. A., ROGERS, A. E. & TREISMAN, R. 1995. Comparative analysis of the ternary complex factors Elk-1, SAP-1a and SAP-2 (ERP/NET). *EMBO J*, 14, 2589-601.
- PUTTFARCKEN, P. S., MANELLI, A. M., ARNERIC, S. P. & DONNELLY-ROBERTS, D. L. 1997. Evidence for nicotinic receptors potentially modulating nociceptive transmission at the level of the primary sensory neuron: studies with F11 cells. *J Neurochem*, 69, 930-8.
- QUIGLEY, C. 2008. Opioids in people with cancer-related pain. *Clin Evid (Online)*, 2008.
- RAMANAN, N., SHEN, Y., SARSFIELD, S., LEMBERGER, T., SCHUTZ, G., LINDEN, D. J. & GINTY, D. D. 2005. SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci*, 8, 759-67.
- RASSOW, J. 2006. Biochemie. 1 ed. Stuttgart: Thieme, 548-54.
- RAYMON, H. K., THODE, S., Zhou, J., FRIEDMANN, G. C., PARDINAS, J. R., BARRERE, C., JOHNSON, R. M., SAH, D. W. 1999. Immortalized Human Dorsal Root Ganglion Cells Differentiate into Neurons with Nociceptive Properties. *J Neurosci*, 19, 5420-8.
- RAYNOR, K., KONG, H., CHEN, Y., YASUDA, K., YU, L., BELL, G. I. & REISINE, T. 1994. Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors. *Mol Pharmacol*, 45, 330-4.

- REHM, H. & LETZEL, T. 2010. *Der Experimentator - Proteinbiochemie/Proteomics*. 6 ed.: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- RISTOIU, V., PLUTEANU, F., FLONTA, M. L., REID, G. 2002. Few cultured rat primary sensory neurons express a tolbutamide-sensitive K⁺ current. *J Cell Mol Med*, 6, 271-4.
- RIVERA, C., VOIPIO, J., PAYNE, J. A., RUUSUVUORI, E., LAHTINEN, H., LAMSA, K., PIRVOLA, U., SAARMA, M. & KAILA, K. 1999. The K⁺/Cl⁻ co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature*, 397, 251-5.
- ROLLINS, B. J. & STILES, C. D. 1989. Serum-inducible genes. *Adv Cancer Res*, 53, 1-32.
- ROSENBERG, H. 2009. Clinical and laboratory assessment of the subjective experience of drug craving. *Clin Psychol Rev*, 29, 519-34.
- ROSKOSKI, R., JR. 2012. ERK1/2 MAP kinases: Structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*, 66, 105-43.
- ROTHER, K., SOLINSKI, H. J., BOEKHOFF, I., GUDERMANN, T. & BREIT, A. 2012. Morphine activates the ELK-1/SRF pathway via ERK-1/2 in F11 cells derived from dorsal root ganglia neurons. *J Pharmacol Exp Ther*.
- ROWBOTHAM, D. J. 2001. Endogenous opioids, placebo response, and pain. *Lancet*, 357, 1901-2.
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-91.
- SAIKI, R. K., SCHARF, S., FALOONA, F., MULLIS, K. B., HORN, G. T., ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350-4.
- SALOMON, Y., LONDOS, C. & RODBELL, M. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem*, 58, 541-8.
- SAMAMA, P., COTECCHIA, S., COSTA, T. & LEFKOWITZ, R. J. 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, 268, 4625-36.
- SCHMITZ, S. 2009. *Der Experimentator - Zellkultur*. 2 ed.: Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- SCHULTE, G. & LEVY, F. O. 2007. Novel aspects of G-protein-coupled receptor signalling--different ways to achieve specificity. *Acta Physiol (Oxf)*, 190, 33-8.
- SCHULZ, R., EISINGER, D. A. & WEHMEYER, A. 2004. Opioid control of MAP kinase cascade. *Eur J Pharmacol*, 500, 487-97.
- SELBIE, L. A. & HILL, S. J. 1998. G protein-coupled-receptor cross-talk: the fine-tuning of multiple receptor-signalling pathways. *Trends Pharmacol Sci*, 19, 87-93.
- SEN, D., HUCHITAL, M. & CHEN, Y. L., 2013. Crosstalk between delta opioid receptor and nerve growth factor signaling modulates neuroprotection and differentiation in rodent cell models. *Int J Mol Sci*, 14, 21114-39.
- SHAQURA, M. A., ZOLLNER, C., MOUSA, S. A., STEIN, C. & SCHAFFER, M. 2004. Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 712-8.

- SHAYWITZ, A. J. & GREENBERG, M. E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, 68, 821-61.
- SHEMAROVA, I. V. 2009. cAMP-dependent signal pathways in unicellular eukaryotes. *Crit Rev Microbiol*, 35, 23-42.
- SHENOY, S. K., MCDONALD, P. H., KOHOUT, T. A. & LEFKOWITZ, R. J. 2001. Regulation of receptor fate by ubiquitination of activated beta 2-adrenergic receptor and beta-arrestin. *Science*, 294, 1307-13.
- SHODA, T., FUKUDA, K., UGA, H., MIMA, H. & MORIKAWA, H. 2001. Activation of mu-opioid receptor induces expression of c-fos and junB via mitogen-activated protein kinase cascade. *Anesthesiology*, 95, 983-9.
- SHUKLA, A. K., XIAO, K. & LEFKOWITZ, R. J. 2011. Emerging paradigms of beta-arrestin-dependent seven transmembrane receptor signaling. *Trends Biochem Sci*, 36, 457-69.
- SHY, M., CHAKRABARTI, S. & GINTZLER, A. R. 2008. Plasticity of adenylyl cyclase-related signaling sequelae after long-term morphine treatment. *Mol Pharmacol*, 73, 868-79.
- SIBLEY, D. R., BENOVIC, J. L., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. 1987. Regulation of transmembrane signaling by receptor phosphorylation. *Cell*, 48, 913-22.
- SILVERTHORN, D. U. 2009. *Physiologie - die komplette Physiologie des Menschen in integrativer Darstellung* 4 ed. Pearson Studium, Pearson Education Deutschland GmbH
- SITTE, T. 2007. Die heutigen Möglichkeiten der Opioidtherapie nutzen. *MMW Fortschritte der Medizin, Springer Verlag*, 1-6.
- SMART, D. & LAMBERT, D. G. 1996. delta-Opioids stimulate inositol 1,4,5-trisphosphate formation, and so mobilize Ca²⁺ from intracellular stores, in undifferentiated NG108-15 cells. *J Neurochem*, 66, 1462-7.
- SMART, D., SMITH, G. & LAMBERT, D. G. 1995. Mu-opioids activate phospholipase C in SH-SY5Y human neuroblastoma cells via calcium-channel opening. *Biochem J*, 305 (Pt 2), 577-81.
- SPANGLER, R., GODDARD, N. L., AVENA, N. M., HOEBEL, B. G. & LEIBOWITZ, S. F. 2003. Elevated D3 dopamine receptor mRNA in dopaminergic and dopaminoceptive regions of the rat brain in response to morphine. *Brain Res Mol Brain Res*, 111, 74-83.
- STANDIFER, K. M. & PASTERNAK, G. W. 1997. G proteins and opioid receptor-mediated signalling. *Cell Signal*, 9, 237-48.
- STERNINI, C., SPANN, M., ANTON, B., KEITH, D. E., JR., BUNNETT, N. W., VON ZASTROW, M., EVANS, C. & BRECHA, N. C. 1996. Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 9241-6.
- STEVENS, C. W. & YAKSH, T. L. 1989. Potency of infused spinal antinociceptive agents is inversely related to magnitude of tolerance after continuous infusion. *J Pharmacol Exp Ther*, 250, 1-8.
- SUKHATME, V. P. 1990. Early transcriptional events in cell growth: the Egr family. *J Am Soc Nephrol*, 1, 859-66.
- TANG, T., KIANG, J. G. & COX, B. M. 1994. Opioids acting through delta receptors elicit a transient increase in the intracellular free calcium concentration in dorsal

- root ganglion-neuroblastoma hybrid ND8-47 cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 270, 40-6.
- TARACHA, E., CHRAPUSTA, S. J., LEHNER, M., SKORZEWSKA, A., MACIEJAK, P., SZYNDLER, J. & PLAZNIK, A. 2008. Morphine and methadone pre-exposures differently modify brain regional Fos protein expression and locomotor activity responses to morphine challenge in the rat. *Drug Alcohol Depend*, 97, 21-32.
- TAYLOR, D. A. & FLEMING, W. W. 2001. Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids. *J Pharmacol Exp Ther*, 297, 11-8.
- TEMIN, H. M. & MIZUTANI, S. 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226, 1211-3.
- TERWILLIGER, R. Z., ORTIZ, J., GUITART, X. & NESTLER, E. J. 1994. Chronic morphine administration increases beta-adrenergic receptor kinase (beta ARK) levels in the rat locus coeruleus. *J Neurochem*, 63, 1983-6.
- TOWBIN, H., STAHELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TRACEY, I. & MANTYH, P. W. 2007. The cerebral signature for pain perception and its modulation. *Neuron*, 55,
- TREISMAN, R. 1992. The serum response element. *Trends Biochem Sci*, 17, 423-6.
- UEDA, H., INOUE, M. & MIZUNO, K. 2003. New approaches to study the development of morphine tolerance and dependence. *Life Sci*, 74, 313-20.
- UEDA, H., UNO, S., HARADA, J., KOBAYASHI, I., KATADA, T., UI, M. & SATOH, M. 1990. Evidence for receptor-mediated inhibition of intrinsic activity of GTP-binding protein, Gi1 and Gi2, but not G0 in reconstitution experiments. *FEBS Lett*, 266, 178-82.
- UVAROV, P., LUDWIG, A., MARKKANEN, M., RIVERA, C. & AIRAKSINEN, M. S. 2006. Upregulation of the neuron-specific K⁺/Cl⁻ cotransporter expression by transcription factor early growth response 4. *J Neurosci*, 26, 13463-73.
- VAN BIESEN, T., LUTTRELL, L. M., HAWES, B. E. & LEFKOWITZ, R. J. 1996. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev*, 17, 698-714.
- WANG, H. & WESSENDORF, M. W. 2001. Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs. *J Comp Neurol*, 429, 590-600.
- WANG, L. X. & WANG, Z. J. 2003. Animal and cellular models of chronic pain. *Adv Drug Deliv Ref*. 55, 949-65.
- WANG, Q. P., NAKAI, Y. 1994. The dorsal raphe: an important nucleus in pain modulation. *Brain Res Bull*, 34, 575-85.
- WATSON, J. D., BAKER, T., BELL, S., GANN, A., LEVINE, M., LOSICK, R. & CSHLP, I. 2011. *Molekularbiologie*. 6 ed.: Pearson Studium München, 812.
- WEBER-NORDT, R. M., MERTELSMANN, R. & FINKE, J. 1998. The JAK-STAT pathway: signal transduction involved in proliferation, differentiation and transformation. *Leuk Lymphoma*, 28, 459-67.
- WEI, H., AHN, S., SHENOY, S. K., KARNIK, S. S., HUNYADY, L., LUTTRELL, L. M. & LEFKOWITZ, R. J. 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, 10782-7.

- WHISTLER, J. L., CHUANG, H. H., CHU, P., JAN, L. Y. & VON ZASTROW, M. 1999. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron*, 23, 737-46.
- WHITE, A. A. & ZENSER, T. V. 1971. Separation of cyclic 3',5'-nucleoside monophosphates from other nucleotides on aluminum oxide columns. Application to the assay of adenyl cyclase and guanyl cyclase. *Anal Biochem*, 41, 372-96.
- WHO 1990. Cancer pain relief and palliative care. Report of a WHO Expert Committee. *World Health Organ Tech Rep Ser*, 804, 1-75.
- WICKRAMASINGHE, S. R., ALVANIA, R. S., RAMANAN, N., WOOD, J. N., MANDAI, K. & GINTY, D. D. 2008. Serum response factor mediates NGF-dependent target innervation by embryonic DRG sensory neurons. *Neuron*, 58, 532-45.
- WIDNELL, K. L., SELF, D. W., LANE, S. B., RUSSELL, D. S., VAIDYA, V. A., MISERENDINO, M. J., RUBIN, C. S., DUMAN, R. S. & NESTLER, E. J. 1996. Regulation of CREB expression: in vivo evidence for a functional role in morphine action in the nucleus accumbens. *J Pharmacol Exp Ther*, 276, 306-15.
- WILLIAMS, J., DRAGUNOW, M., LAWLOR, P., MASON, S., ABRAHAM, W. C., LEAH, J., BRAVO, R., DEMMER, J. & TATE, W. 1995. Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res*, 28, 87-93.
- WILLIAMS, J. T., CHRISTIE, M. J. & MANZONI, O. 2001. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*, 81, 299-343.
- WU, B. J., WILLIAMS, G. T. & MORIMOTO, R. I. 1987a. Detection of three protein binding sites in the serum-regulated promoter of the human gene encoding the 70-kDa heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 2203-7.
- WU, C., WILSON, S., WALKER, B., DAWID, I., PAISLEY, T., ZIMARINO, V. & UEDA, H. 1987b. Purification and properties of Drosophila heat shock activator protein. *Science*, 238, 1247-53.
- YAKSH, T. L. 1997. Pharmacology and mechanisms of opioid analgesic activity. *Acta Anaesthesiol Scand*, 41, 94-111.
- YAKSH, T. L. & RUDY, T. A. 1976. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Science*, 192, 1357-8.
- YANG, H. Y. & PU, X. P. 2009. Chronic morphine administration induces over-expression of aldolase C with reduction of CREB phosphorylation in the mouse hippocampus. *Eur J Pharmacol*, 609, 51-7.
- YORDY, J. S. & MUISE-HELMERICKS, R. C. 2000. Signal transduction and the Ets family of transcription factors. *Oncogene*, 19, 6503-13.
- YOSHIMURA, M. & NORTH, R. A. 1983. Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized in vitro by enkephalin. *Nature*, 305, 529-30.
- YU, C. G. & YEZIERSKI, R. P. 2005. Activation of the ERK1/2 signaling cascade by excitotoxic spinal cord injury. *Brain Res Mol Brain Res*, 138, 244-55.
- YU, Y., ZHANG, L., YIN, X., SUN, H., UHL, G. R. & WANG, J. B. 1997. Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy. *J Biol Chem*, 272, 28869-74.
- ZENG, L., WEBSTER, S. V. & NEWTON, P. M. 2012. The biology of protein kinase C. *Adv Exp Med Biol*, 740, 639-61.

- ZHANG, J., FERGUSON, S. S., BARAK, L. S., ABER, M. J., GIROS, B., LEFKOWITZ, R. J. & CARON, M. G. 1997. Molecular mechanisms of G protein-coupled receptor signaling: role of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in receptor desensitization and resensitization. *Receptors Channels*, 5, 193-9.
- ZHANG, Y., XIONG, W., LIN, X., MA, X. & YU, L. C. 2009. Receptor trafficking induced by mu-opioid-receptor phosphorylation. *Neurosci Biobehav Rev*, 33, 1192-7.
- ZHENG, H., LOH, H. H. & LAW, P. Y. 2008. Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G protein-dependent ERK activation. *Mol Pharmacol*, 73, 178-90.
- ZHOU, H. Y., CHEN, S. R., CHEN, H. & PAN, H. L. 2010. Opioid-induced long-term potentiation in the spinal cord is a presynaptic event. *J Neurosci*, 30, 4460-6.
- ZHOU, L. F. & ZHU, Y. P. 2006. Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats. *J Zhejiang Univ Sci B*, 7, 107-13.
- ZHU, Y., KING, M. A., SCHULLER, A. G., NITSCHKE, J. F., REIDL, M., ELDE, R. P., UNTERWALD, E., PASTERNAK, G. W. & PINTAR, J. E. 1999. Retention of supraspinal delta-like analgesia and loss of morphine tolerance in delta opioid receptor knockout mice. *Neuron*, 24, 243-52.
- ZIEGLER, A. & PROKOPEK, M. 1992. Die Bedeutung von Morphin-6-glucuronid bei chronischer Anwendung von Morphin. *Der Schmerz, Springer Verlag*, 8-12.
- ZIPFEL, P. F., DECKER, E. L., HOLST, C. & SKERKA, C. 1997. The human zinc finger protein EGR-4 acts as autoregulatory transcriptional repressor. *Biochim Biophys Acta*, 1354, 134-44.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylylcyclase
μ OR	μ -Opioidrezeptor
AP-1	<i>activating protein-1</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	<i>brain derived neurotropic factor</i>
BSA	bovines Serum Albumin
CamK	Calmodulin-abhängige-Kinasen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CGRP	<i>calcitonin-gene-related peptide</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CP	<i>crossing points</i>
CRE	<i>cAMP-responsive-element</i>
CREB	<i>cAMP-responsive-element-binding-protein</i>
CREM	<i>cAMP-responsive-element-modulator</i>
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRG	<i>dorsal root ganglion</i>

7 Anhang

DTT	Dithiothreitol
E. Coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Elk-1	<i>E-twenty-six-like transcription factor-1</i>
ERK	<i>extracellular-regulated-kinases</i>
Ets	<i>E-twenty-six</i>
EZM	extrazellulären Matrix
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
FSK	Forskolin
GABA	γ -Aminobuttersäure
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guaninenucleotide exchange factor
GIRK	<i>G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel</i>
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinasen
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-Hydrolase
HSE	<i>heat shock element</i>
HSF-1	<i>heat shock factor-1</i>
Hsp	Hitzeschockproteinen

7 Anhang

IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
IEG	<i>immediate early genes</i>
IP ₃	Inositoltriphosphat
JAK	<i>janus kinases</i>
JNK	<i>Jun-N-terminal-kinase</i>
Kb	Kilobasen
KCC-2	K ⁺ /Cl ⁻ -Kotransporter-2
KID	<i>kinase-inducible-domain</i>
LTD	<i>long-term-depression</i>
LTP	<i>long-term-potential</i>
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinases</i>
MEK	MAPK-Kinase
mRNA	<i>messenger Ribonukleinsäure</i>
MTRF	<i>myocardin-related transcription factors</i>
Net-1	<i>neuroepithelial transforming gene-1</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung , <i>posphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositolbisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C

7 Anhang

PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PTX	<i>Pertussis Toxin</i>
qRT-PCR	Quantitative Real Time-PCR
RGS-Proteine	<i>regulators-of-G-protein-signalling-Proteine</i>
Rho-GEF	<i>Rho-guaninenucleotide exchange factor</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
Sap-1	<i>SRF accessory protein-1</i>
Scn7a	<i>sodium-activated sodium channel type VII α</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
Shc	<i>SH2-domain-containing $\alpha 2$ kollagen related proteins</i>
SIE	<i>Sis Iinducible Element</i>
SIF	<i>sis-inducible factor</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCF	<i>ternary complex factors</i>
TRP	<i>transient receptor potential</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential vanilloid 1</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

δ OR	δ -Opioidrezeptor
κ OR	κ -Opioidrezeptor

7.3 pAD-CRE-Fluc Plasmid

Plasmid: **pADneo2 C6-BGL** *Bender Wier.*

Size: 6578 bp Vector: pADneo2BGlucI

Selection: Ampicillin; Neomycin G-418 (eukaryot.)

Replication origin(s): pUC (E.coli), M13 (helper phage)

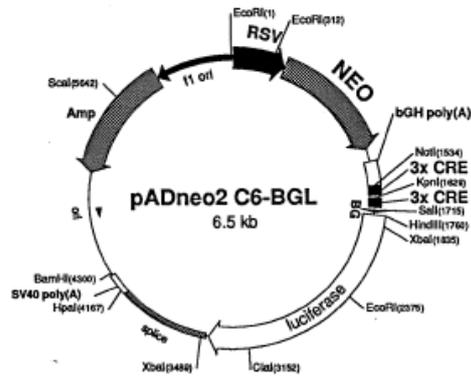
prokaryot. promoter: none

eukaryot. promoter: rabbit β -globin (BG) minimal, RSV LTR (drives neo gene)

Terminator: bovine growth hormone (bGH) poly(A) after neo gene

Insert: 6 cAMP regulatory elements (CRE) from BLV, VIP, CMV, Som, VIP, CMV In NotI - Sall

Map:



Construction scheme:

1. pADneo2 C3BVC-BGL cut with BamHI - Sall, isolate 3.8 kb vector part
2. pADneo2 C3SVC-BGL cut with BamHI - XhoI, isolate 2.7 kb insert
3. ligate 1. + 2.

Remarks:

mammalian reporter plasmid responsive for cAMP (luciferase expression), minimal β -globin promoter and 6 CRE [from bovine leukemia virus LTR (BLV), somatostatin (Som), vasoactive intestinal peptide (VIP), cytomegalo virus (CMV)]

unique Scal site in ampicillin gene to linearize for electroporation

NEO gene driven from RSV LTR and terminated with bGH poly(A)

single strand sequencing (sense orientation) possible with EBI-3287, binding upstream of β -globin

promoter, double strand sequencing: antisense with EBI-3520, binding at begin of luciferase

sequence of CRE and β -globin promoter verified

☛ CHO C6-13: stable reporter cell line

References:

- A. Himmler et al., J. Receptor Res. 13: 79-94, 1993. cAMP responsive reporter and test cell lines
 M.R. Montminy et al., Trends Neurosci. 13: 185, 1990. CRE sequences
 J.R. De Wet et al., PNAS 82: 7870-7873, 1985. Luciferase gene sequence

Constructed by: Adi Himmler

Bender + Co GmbH, Dr. Boehringer Gasse 5-11, A-1121 Vienna, Austria. Tel.: ++43 (1) 80105-471. FAX: ++43 (1) 80105-1

7.4 Tabellen - und Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Schmerzweiterleitung auf Rückenmarksebene und deszendierende Hemmsysteme.....	5
Abbildung 3.2:	Verteilungsmuster von Opioidrezeptoren im ZNS	7
Abbildung 3.3:	vereinfachte Darstellung der Vorgänge nach Aktivierung eines GPCR	16
Abbildung 3.4:	Intrazelluläre Signalkaskade nach Aktivierung von G-Proteinen verschiedener Subtypen.....	17
Abbildung 3.5:	Aktivierung des ERK-1/2-Signalwegs durch GPCR	21
Abbildung 3.6:	Genaktivitätsregulation über CRE und SRE durch GPCR-Liganden	23
Abbildung 3.7:	Beeinflussung von Ionenströmungen durch Opioide.....	24
Abbildung 3.8:	Endozytose und <i>downregulation</i> an GPCR nach Aktivierung durch Opioide.....	31
Abbildung 4.1:	Luziferase-Reportergenkonstrukt	51
Abbildung 4.2:	Messung der Luziferaseaktivität durch Lumineszenzmessung nach Substrat-zugabe.....	52
Abbildung 4.3:	Eichgerade zur photometrischen Proteinbestimmung	54
Abbildung 4.4:	Western-Blot-Aufbau.....	57
Abbildung 4.5:	Densitometrische Quantifizierung von Western-Blot-Banden	59
Abbildung 4.6:	Bildung und Abbau von cAMP.....	61
Abbildung 4-7:	Prinzip Radioaktiver Ligandenbindungsstudien	63
Abbildung 4.8:	Kontroll-PCR zur Überprüfung einer eventuellen Verunreinigung mit genomischer DNA	68
Abbildung 4.9:	Sättigungs-Bindungskurve zur Bestimmung von K_D und B_{max}	75
Abbildung 5.1:	Sättigungskurve mit [3H]-Naloxon und F11 Zellen.....	77
Abbildung 5.2:	agonisteninduzierter Proteinabbau in F11 Zellen	78
Abbildung 5.3:	intrazelluläre Kalziumfreisetzung durch Opioide in F11 Zellen	79
Abbildung 5.4:	Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opioide in F11Zellen	81
Abbildung 5.5:	Opioidvermittelte Inhibition der FSK-induzierten CRE-Reporter-Aktivität	81
Abbildung 5.6:	Einfluss von Opioiden auf die CRE-Aktivität nach 4 h und 16 h Stimulation.....	84
Abbildung 5.7:	ERK-1/2-Phosphorylierung durch Opioide in F11 Zellen nach 5 min und 20 min Stimulation.....	86
Abbildung 5.8:	Opioidinduzierte SIE, ETS/SRE, AP-1-Reportergenaktivität in F11 Zellen	89
Abbildung 5.9:	Opioidinduzierte 5 x ETS/SRE-Reporteraktivität in F11 Zellen.....	90
Abbildung 5.10:	Einfluss des μ OR-Antagonist CTAP auf die ETS/SRE-Reportergenaktivität	91

Abbildung 5.11:	Einfluss von PD184352 auf die ETS/SRE-Reporterogenaktivität	94
Abbildung 5.12:	Elk-1 Phosphorylierung durch Opioide in F11 Zellen	94
Abbildung 5.13:	Aktivierung von Elk-1 durch Morphin in F11 Zellen	95
Abbildung 5.14:	Inhibition der FSK-induzierten cAMP Akkumulation durch Opioide in NG108-15 Zellen	97
Abbildung 5.15:	Opioinduzierte 5 x ETS/SRE-Reporteraktivität in NG108-15 Zellen	98
Abbildung 5.16:	Morphininduzierte Veränderungen SRE-regulierter Gene in F11 Zellen	101
Abbildung 5.17:	Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter IEG in F11 Zellen...	102
Abbildung 5.18:	Inhibition der morphininduzierten Veränderungen SRE-abhängiger IEG durch PD184352 in F11 Zellen	104
Abbildung 5.19:	Morphininduzierte Egr4-abhängige Genexpression.....	105
Abbildung 5.20:	ERK-1/2-Phosphorylierung durch Opioide in primären DRG- Neuronen	107
Abbildung 5.21:	Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter Gene in DRG- Neuronen	109
Abbildung 5.22:	Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter IEG in kultivierten primären DRG-Neuronen	110
Abbildung 5.23:	Inhibition morphininduzierten Veränderungen SRE-abhängiger IEG durch PD184352 in primären DRG-Neuronen.....	111
Abbildung 6.1:	Opioinduzierte Signalwege mit Einfluss auf CREB	113
Abbildung 6.2:	zelltypspezifische Unterschiede der morphinabhängigen Genregulation.....	117
Tabelle 3.1:	Überblick über die Opioidrezeptorsubtypen, deren Liganden und Wirkungsprofil	8
Tabelle 3.2:	WHO-Stufenschema zur Therapie von Tumorschmerzen	10
Tabelle 3.3:	Expressionsveränderungen durch chronische Morphinadministration..	34
Tabelle 4.1:	Hier verwendete PT-PCR Primer für SRF-Zielgene	74
Tabelle 4.2:	Signifikanzniveaus für p-Werte	75
Tabelle 5.1:	Morphininduzierte Veränderung SRE-regulierter Gene in F11 Zellen nach 16 h	103

7.5 Danksagung

Vielen Dank an Prof. Dr. med Thomas Guderman für die Möglichkeit diese Arbeit am Walther-Straub-Institut anfertigen zu dürfen.

Danke an das Förderprogramm für Forschung und Lehre der LMU München unter Leitung von Prof. Heesemann für die Auswahl und Mitfinanzierung dieses Projektes und für die Gestaltung des Promotionsstudienganges.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Andreas Breit für die Bereitstellung und Betreuung des interessanten Projektes und ganz besonders für die spontane Anpassung des Themas als der erste Anlauf leider unerwartete Probleme aufwarf. Danke für die Geduld, alles was du mir inhaltlich und methodisch im Laufe der Zeit beigebracht hast und für eine tolle Zeit in der ich mit dir Wissenschaft mache durfte.

Ein großes Dankeschön auch an Ellen Damm und Jürgen Solinski dafür, dass ihr mir immer bei allem weitergeholfen habt. Danke, Ellen, dass Du so oft mein Medium warmgestellt hast und wir so nett quatschen konnten wenn ich auf irgendwas warten musste. Vielen Dank, Jürgen, dafür dass du mich eingearbeitet, mir so viel beigebracht hast und dass du immer gute Laune hast.

Ich bedanke mich bei Nele Zitranski, Heike Borth, Dorke Meyer und Stefanie Stohr dass ich so herzlich im Institut aufgenommen wurde und mich immer sehr wohl gefühlt habe. Vielen Dank an Ute Künzel-Mulas für die Hilfe, besonders bei den Western-Blots und für die gute Gesellschaft im Labor.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meiner Familie bedanken. Danke an meine Schwestern, für die vielen schönen und lustigen gemeinsamen Erinnerungen und besonders dass wir uns so gut verstehen. Ein besonders Dankeschön an meine Eltern für eure Unterstützung, euer Vertrauen eure Ratschläge und dass ihr mich zu dem gemacht hab was ich jetzt bin.

Schließlich bedanke ich mich bei meinem Freund Andreas Sauter. Danke für die schöne gemeinsame Zeit, dass du immer für mich da bist und immer auf meiner Seite stehst.

7.6 Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Analyse der morphininduzierten Genexpression in Zellmodellen primär sensorischer Neurone“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 21.05.2015

Kathrin Rothe