

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin  
der Universität zu Köln  
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. B. W. Böttiger

**Quantifizierung der Aktivität von Typ II Proteinkinase  
A unter Einfluss von Opioid- und Serotoninrezeptor-  
spezifischen Liganden mittels „*High Content  
Screening*“ (HCS)-Mikroskopie**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Universität zu Köln

vorgelegt von  
Tim Arkascha Fuchs  
aus Wuppertal

Promoviert am 02.05.2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln  
Druckjahr 2023

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink

1. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. T. B. F. Hucho

2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat. A. Wodarz

### **Erklärung:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Tim Hucho

Herrn Dr. rer. nat. Jörg Isensee

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Experimente sowie die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse sind, nach entsprechender Anleitung durch Herrn Dr. rer. nat. Jörg Isensee, Frau Maike Siobal und Frau Dr. rer. nat. Marianne Van-Cann, von mir selbst im Labor für translationale Schmerzforschung der Klinik für Anästhesiologie und Operative Intensivmedizin der Universität zu Köln, unter der Leitung von Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Tim Hucho, durchgeführt worden. Ebenso wurden die dieser Arbeit zugrunde liegenden Messergebnisse nach entsprechender Einweisung durch Herrn Dr. rer. nat. Jörg Isensee und Frau Dr. rer. nat. Andreea Belu, von mir selbst ermittelt und ausgewertet.

### **Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:**

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 20.09.2022

Unterschrift:

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'T. Fuchs'. The signature is written in a cursive style with a large initial 'T' and a long horizontal stroke.

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir mein Studium und die Vollendung meiner Promotion ermöglichten:

Herrn Universitätsprofessor Dr. rer. nat. Tim Hucho danke ich für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe diese Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen sowie für viele anregende Gespräche und schöne Erlebnisse inner- und außerhalb des Labors,

Herrn Dr. rer. nat. Jörg Isensee, ohne dessen Fachwissen, Hilfsbereitschaft und stetes Wohlwollen diese Arbeit niemals zu Stande gekommen wäre, für die wunderbare Betreuung und langjährige Unterstützung,

Frau Dr. rer. nat. Andreea Belu und Frau Dr. rer. nat. Marianne van Cann, für die Einweisung in diverse Labortechniken und unterhaltsame gemeinsame Pausen,

Frau Maike Siobal, für die unendliche Geduld mit langsam lernenden medizinischen Doktoranden,

Frau Ashley Storck, für ihre wunderbare Vorarbeit, dessen Ergebnisse die Grundlage meiner Arbeit waren,

der gesamten Arbeitsgruppe, die natürlich nicht vergessen werden darf, für die angenehme und hilfsbereite Arbeitsatmosphäre,

Frau Dr. rer. nat. Fanny Groll, für das gemeinsame Quälen durch den Dschungel der Statistik,

meinen Eltern, Ruth und Stefan, die mir das Studium ermöglichten, mich jederzeit unterstützten und immer guten Rat wussten, außerdem meinen Geschwistern Katharina, Lisa und Florian, die immer ein offenes Ohr hatten sowie dem „*Harten Kern*“, für tiefe Freundschaft. Besonders danken möchte ich an dieser Stelle meiner Mutter, für die Durchsicht dieser Arbeit sowie für kontinuierliches Krisenmanagement.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Lebensgefährtin Julia, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte, mich nach Leibeskräften unterstützte und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

*Für Julia, Ruth und Stefan sowie Katharina, Lisa und Florian*

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>12</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>13</b>
2.1 Klinischer Hintergrund	13
2.2 Allgemeine Schmerzphysiologie	15
2.3 Signaltransduktion der Opioidrezeptoren	19
2.4 Signaltransduktion der 5-HT <sub>4</sub> -Rezeptoren	21
2.5 Modulation der PKA-II-Aktivität durch G <sub>αs</sub> - und G <sub>αi</sub> -gekoppelte Rezeptorkaskaden	23
2.6 Darstellung der PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten mittels „High Content Screening“ (HCS)-Mikroskopie	24
2.7 Fragestellung und Zielsetzung	28
<b>3 Material und Methoden</b>	<b>29</b>
3.1 Versuchstiere	29
3.2 Material	29
3.2.1 Instrumentarium	29
3.2.2 Reagenzien	30
3.2.3 Antikörper	31
3.2.4 Software	32
3.3 Methoden	33
3.3.1 Isolation sensibler Neuronen aus murinen Spinalganglien	33
3.3.2 Primäre DRG-Neuronenkultur	34
3.3.3 Stimulation der DRG-Neuronen	35
3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung	35
3.3.5 Quantitative Mikroskopie	35
3.3.6 Statistische Analyse	37
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>38</b>
4.1 Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)	38
4.2 Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch isolierte sowie kombinierte Anwendung von Fentanyl (MOR) und dem 5-HT <sub>4</sub> -Rezeptorspezifischen Antagonisten GR113808	44
4.3 Reversion der Met-Enkephalin- (unspezifisch), DAMGO- (MOR), Deltorphin-II- (DOR), Dynorphin-A- (KOR) und Nozizeptin- (NOP) vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)	48
4.3.1 Effekt des unspezifischen OR-Antagonisten Naltrexon auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten	48
4.3.2 Effekt des DOR-Antagonisten Naltrindol auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten	55

4.3.3	Effekt des KOR-Antagonisten Norbinaltorphimin auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten	60
4.3.4	Effekt des NOP-Antagonisten JTC 801 auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten	66
4.3.5	Zusammengefasste Daten der getesteten OR-Liganden	72
4.4	Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) sowie Norbinaltorphimin (KOR) allein und in Kombination	73
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>79</b>
5.1	Allgemein	79
5.2	Partielle Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)	80
5.3	Nicht-synergistische Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch den 5-HT <sub>4</sub> -Antagonisten GR113808 und den MOR-Agonisten Fentanyl	84
5.4	Partielle Reversion der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)	86
5.5	Ausblick	97
5.6	Fazit	100
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>102</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>123</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis	123
7.2	Tabellenverzeichnis	123



---

## Abkürzungsverzeichnis

μM	mikromolar, μmol/l
5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
AC	Adenylylcyclase
AKAP	Proteinkinase-A-Ankerprotein 79/150
Aqua dest.	Aqua destillata
A.u.	arbitrary units
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
BWS	Brustwirbelsäule
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cAMP-GEF	cAMP-regulated Guanin Nukleotid exchange factor
CAP	Catabolite gene Activator Protein
cAPK	cAMP abhängige Proteinkinase
CGRP	Caltitonin Gene-Related Peptide
CMH	C-fibre mechano-heat nociceptor
CREB	cAMP response-element-binding
CRPS	komplexes regionales Schmerzsyndrom
CVLM	caudal ventrolateral medulla
DDD	defined Daily Dose
DelII	Deltorphin II
<i>DF</i>	Freiheitsgrade
DHS	deutsche Hauptstelle für Suchtanfragen
DOR	δ -Opioidrezeptor
DynA	Dynorphin A
EPAC	exchange protein directly activated by cAMP
FAD	Food and Drug Administration

---

Fent	Fentanyl
Fsk	Forskolin
GFP	grün fluoreszierendes Protein
G <sub>i</sub> -Protein	Guaninnukleotid bindendes inhibitorisches Protein
GIRK	G-protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels
GPCR	G-proteine coupled receptor
G-Protein	Guaninnukleotid bindendes Protein
G <sub>q/11</sub> -Protein	Guaninnukleotid bindendes synthetisches Protein q/11
Gr	GR113808
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
G <sub>s</sub> -Protein	Guaninnukleotid bindendes synthetisches Protein
HCI	high content imaging
HCN	hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-modulated channels
HCS	high content screening
HTM	high threshold mechanical nociceptor
HWS	Halswirbelsäule
IASP	International Association for the Study of PAIN
IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
JNK	c-Jun N-Terminal Kinasen
JTC	JTC 801
KOR	κ-Opioidrezeptor
LWS	Lendenwirbelsäule
<i>M</i>	arithmetisches Mittel
M	molar, mol/l
MAP	mitogen aktivierte Proteinkinase
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase Kinase
MD2	myeloides Differenzierungsprotein Typ 2

---

MetEnk	Met-Enkephalin
Min	Minuten
Mio.	Millionen
MOR	$\mu$ -Opioidrezeptor
MOUD	medication for opioid use disorders
NAL	Naltrindol
NBA	Neurobasal A
nM	nanomolar, nmol/l
NNH	number needed to harm
NNT	number needed to treat
Noc	Nozizeptin
NOP	Nozizeptin-Orphanin-FQ-Peptidrezeptor
norBNI	Norbinaltorphimin
NTX	Naltrexon
OR	Opioidrezeptor
$p$	$p$ -Wert
P.o.	per os
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PKA	Proteinkinase A
PKAC	Proteinkinase A catalytic
PKAR	Proteinkinase A regulatory
PKC	Proteinkinase C
PNS	peripheries Nervensystem
RKIP	Raf-Kinase-Inhibitor-Proteins
RVM	rostral ventromedial medulla
<i>SD</i>	Standardabweichung
<i>SEM</i>	Standardfehler

---

SP	Substanz P
<i>t</i>	<i>t</i> -Wert
TRP-channel	transient receptor potential channel
TRPV-channel	Transiente Rezeptor-Potential-Kationenkanal der Unterfamilie V (vanilloid)
UCHL1	Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase Typ 1
VGCC	voltage gated calcium channel
VGKC	voltage gated potassium channel
VPL	Nucleus ventralis posterolateralis thalami
VPM	Nucleus ventralis posteromedialis thalami
ZNS	Zentralnervensystem

---

## 1 Zusammenfassung

Annähernd 19 % aller erwachsenen Europäer leiden unter chronischen Schmerzen. Als potente Analgetika nehmen Opioide in der Schmerztherapie eine zentrale Rolle ein. Paradoxe Weise konnte die Wirksamkeit einer Langzeit-Opioidtherapie nicht mit ausreichender Evidenz belegt werden. Bei inadäquater Schmerzlinderung führt eine Dosissteigerung oder der Wechsel auf ein potenteres Opioid häufig zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie Obstipation, Atemdepression, Abhängigkeit, Entzugssymptomen bei Absetzen, Überdosierung und Tod.

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der endogenen Aktivität von Proteinkinase A II (PKA II), in murinen, primär sensorischen Neuronen, unter Einfluss von Opioidrezeptor (OR)- und Serotonin (5-HT)-Rezeptor-spezifischen Liganden. Dafür wurde die Inhibition und Induktion der PKA II durch 5-HT- und OR-spezifische Liganden in ca. 1.500.000 Einzelzellen analysiert. Verwendet wurde hierfür der von uns etablierte „pRII/RII $\beta$ -Assay“, in Kombination mit „*High Content Screening*“ (HCS)-Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse.

Die generierten Daten zeigen erstens, dass die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität mittels  $\kappa$ -Opioidrezeptor (KOR)- sowie Nozizeptin-Orphanin-FQ-Peptidrezeptor (NOP)-spezifischer und unspezifischer OR-Agonisten partiell, jedoch nicht vollständig, inhibiert werden kann. Zweitens konnten keine synergistischen Effekte des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten GR113808 auf die Fentanyl (MOR)-vermittelte PKA-II-Inhibition beobachtet werden. Drittens konnte die These, dass die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition hauptsächlich durch  $\mu$ -Opioidrezeptoren (MOR) vermittelt wird, die in höherer Dosierung unspezifisch auch durch OR-Agonisten anderer OR-Isoformen aktiviert werden, unter Verwendung von OR-isoformspezifischen Antagonisten, nicht belegt werden. Zwar konnte die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition partiell revertiert werden, eine vollständige Reversion konnte jedoch auch durch Kombination der getesteten OR-Antagonisten nicht erzielt werden.

Die vorgelegte Arbeit trägt zum besseren Verständnis des funktionellen Antagonismus zwischen Opioid- und serotonerem System bei. Dieser ist Bestandteil der Regulationsmechanismen grundlegender Prozesse wie Atmung, Verdauung, Stimmung und Nozizeption. Die präsentierten Daten könnten zur Identifikation neuer Mechanismen beitragen, welche die OR-vermittelte Inhibition von PKA II potenzieren. Diese Mechanismen könnten genutzt werden, um eine Steigerung der Opioid-induzierten Analgesie, ohne vermehrtes Auftreten unerwünschter Arzneimittelwirkungen, zu erreichen. Schlussendlich könnte dadurch die Anwendung von Opioiden in der Therapie akuter sowie möglicherweise auch chronischer Schmerzen effektiver und sicherer gestaltet werden.

---

## 2 Einleitung

### 2.1 Klinischer Hintergrund

Opioide bilden nicht nur eine der weltweit am häufigsten rezeptierten Klassen analgetisch wirksamer Medikamente, sondern auch die potenteste Wirkstoffklasse ihrer Art. Demzufolge nehmen Opioide in der Schmerztherapie von Patientinnen und Patienten aller klinischer Fachrichtungen der Medizin eine zentrale Rolle ein (39,10). Die Wirksamkeit einer kurzfristigen Opioidtherapie (vier bis zwölf Wochen) ist in der Pharmakotherapie nicht-tumor-assoziiertes Schmerzen, wie beispielsweise bei Rücken- oder Arthroseschmerzen sowie bei diabetischen Polyneuropathien und Postzosterneuralgien mit ausreichender Evidenz belegt (66). Obwohl Opioide als potenteste Analgetika gelten, ist auch mit ihnen eine suffiziente Analgesie nicht immer möglich. Die „*Number Needed to Treat*“ (engl. Anzahl der notwendigen Behandlungen, NNT) bezeichnet in diesem Kontext die Anzahl der Personen, die behandelt werden müssen, um eine Schmerzlinderung bei einer weiteren Person zu erreichen (93). Bei moderaten bis starken Schmerzen beträgt die NNT für intramuskulär appliziertes Morphin (10 mg) für eine Schmerzreduktion von 50 % über vier bis sechs Stunden, gegenüber einem Placebo 2,9. Dementsprechend erreicht unter den genannten Konditionen nur etwa jeder dritte Patient eine adäquate Symptomkontrolle. Für oral appliziertes Oxycodon (15 mg) beträgt die NNT unter den gleichen Konditionen 2,3, für Tramadol (150 mg) 2,9 und für Kodein (60 mg) 16,7 (160). Insgesamt erreichen ca. 20 % der Schmerzpatientinnen und -patienten unter einer Opioidtherapie keine ausreichende Schmerzkontrolle (58,190).

In Europa leiden ca. 19 % der Erwachsenen unter chronischen Schmerzen und den damit einhergehenden negativen Auswirkungen auf ihr Berufs- und Sozialleben (23). Im Gegensatz zur kurzfristigen Anwendung konnte die Wirksamkeit einer Langzeitanwendung von Opioiden (> 26 Wochen) bisher nicht hinreichend belegt werden (66). Petzke et al. zeigten mit Hilfe eines systematischen Reviews, dass nur 41 % des untersuchten Patientenkollektivs mit chronischen unteren Rückenschmerzen unter einer Langzeitanwendung von Opioiden eine Schmerzreduktion um 50 % erreichen. Die NNT lag bei 12,0. Die „*Number Needed to Harm*“ (NNH), welche ein statistisches Maß für die Wahrscheinlichkeit unerwünschter Arzneimittelwirkungen darstellt, lag bei 10,0 (144). Gerade eine Langzeittherapie mit Opioiden birgt viele Risiken. Patientinnen und Patienten, die über einen längeren Zeitraum mit Opioiden therapiert werden, entwickeln häufig eine Toleranz gegenüber diesen Substanzen. Dieser Prozess basiert auf zellulären Neuroadaptionen. Um einen ähnlichen analgetischen Effekt zu erzielen, wird dementsprechend eine Steigerung der Dosis oder der Wechsel auf ein potenteres Opioid erforderlich (36). Schmerzpatientinnen und -patienten unter

---

Langzeitopioiddtherapie benötigen häufig eine Eskalation der Opioiddtherapie mit einer zehnfachen Steigerung der Ursprungsdosis. Dies führt zu vermehrten Nebenwirkungen wie Obstipation, Atemdepression, Entwicklung von Abhängigkeit, Entzugssymptomen bei Absetzen, Überdosierung und Tod. Nichtsdestotrotz stiegen die jährlichen Verschreibungsraten seit den 1990er Jahren kontinuierlich an, bis sie 2012 mit 80,0 Verschreibungen pro 100 Einwohner in den USA einen Maximalwert erreichten. 2016 war die Verschreibungsrate mit 66,5 noch immer hoch, sank 2017 jedoch weiter auf 58,5 (31). Von diesen Opioiddverschreibungen sind im Jahr 2013 44,5 % in der primären Gesundheitsversorgung der USA erfolgt. Dabei waren die Verschreibungsraten in den Fachrichtungen Schmerzmedizin (48,6 %), Chirurgie (36,5 %) und physikalische Medizin/Rehabilitation (35,5 %) am höchsten. 11,2 % der Verschreibungen gingen auf nichtärztliche Verschreibungen zurück. Diese umfassen Verschreibungen, die in den USA nach spezieller Schulung auch von Apothekern, Krankenpflegern oder medizinischen Fachangestellten ausgestellt werden dürfen (104,40,184). In Deutschland liegen die Verschreibungsraten opioiddhaltiger Analgetika weit unterhalb von denen in den USA, jedoch stiegen sie auch in Deutschland innerhalb der letzten Jahre an. Dies zeigte unter anderem eine Studie, die auf Krankenkassendaten der AOK Hessen basierte. Demzufolge erhöhte sich die Verschreibungsrate in dieser Versichertenstichprobe von 3,31 % auf 4,53 %, im Zeitraum von 2000 bis 2010, was einem Zuwachs von 37 % entspricht. 77 % der Verschreibungen wurden aufgrund von Nichttumorschmerzen getätigt (172). Diese Beobachtung deckt sich mit den Berichten der Deutschen Hauptstelle für Suchtanfragen (DHS). Diese stellte im Jahrbuch Sucht 2017 die jährliche Zunahme der Verschreibungen opioiddhaltiger Analgetika in Deutschland dar und warnte vor ihren Folgen. Im Zeitraum von 2006 bis 2015 stiegen die Tagesdosierungen von 318 Mio. „Defined Daily Doses“ (DDD) im Jahr 2006 auf 410 Mio. DDD im Jahr 2015, was einem Zuwachs von ca. 30 % entspricht (63). 2018 wurden in Deutschland, nach den USA, die weltweit zweithöchsten Verschreibungsraten, bezogen auf DDD verzeichnet. 2019 bildete Deutschland mit 18,9 % der weltweiten Konsumverteilung den Hauptkonsumenten von Fentanyl, einem synthetischen Opioid, dessen Potenz im Vergleich zu der von Morphin ca. 100-mal höher ist (143,81). Die stark zunehmende Nutzung verschriebener und illegal erworbener Opioide innerhalb der letzten 20 Jahre führte in den USA zu einer hohen Anzahl von Überdosierungen sowie drogeninduzierter Todesfälle. 2020 starben 56.516 US-Bürger an einer Überdosierung synthetischer Opioide, vorrangig mit Fentanyl. Diese Fälle machten den Großteil aller drogeninduzierter Todesfälle in den USA aus und vermehrten sich im Zeitraum von 2015 bis 2020 um das Sechsfache (129). Diese Entwicklungen resultierten in einer Krise der öffentlichen Gesundheit von nationaler Tragweite.

---

In diesem Zusammenhang wird im angloamerikanischen Sprachraum von der „Opioid Overdose Crisis“ gesprochen. Diese Krise belastet nicht nur das amerikanische Gesundheitswesen, sondern auch das soziale und ökonomische Wohl der Gesellschaft (128,70).

Trotz der Gefahren, die gerade eine Langzeitopioidthherapie birgt, kann häufig eine hinreichende Analgesie nur unter Anwendung von Opioiden erzielt werden, weshalb sie ein wichtiger Bestandteil der analgetischen Therapie vieler Krankheitsbilder sind. Während die Wirksamkeit einer kurzfristigen Opioidthherapie für viele Indikationen mit ausreichend Evidenz belegt werden konnte, führt eine Langzeittherapie mit Opioiden häufig nicht zu einer ausreichenden Schmerzkontrolle. Das Verschreiben opioidhaltiger Analgetika über einen langfristigen Zeitraum (> 26 Wochen) ist trotz mangelnder Evidenz oft klinische Praxis (66). Hinsichtlich dieser Umstände ist es nötig, die Wirkweise der Opioidrezeptoren auf zellulärer Ebene zu verstehen und ihre Signalkaskade weiter zu entschlüsseln. Des Weiteren wäre eine gesteigerte Effektivität, im Sinne einer Potenzierung der Opioidrezeptor-Signalkaskade, ohne Steigerung der unerwünschten Arzneimittelwirkungen, ein weiterer Schritt hin zu einer sicheren und indikationsgeprüften Anwendung von Opioiden in der Therapie akuter und möglicherweise auch chronischer Schmerzpatientinnen und Schmerzpatienten.

## 2.2 Allgemeine Schmerzphysiologie

Die 2020 durch die „*International Association for the Study of PAIN*“ (IASP) aktualisierte Definition von Schmerz lautet: „[Schmerz ist, Anm. d. Verf.] ein unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung einhergeht oder einer solchen ähnelt.“ (157). Ergänzt wird diese um die folgenden sechs Aspekte:

- Schmerz ist immer eine persönliche Erfahrung, die in unterschiedlichem Ausmaß durch biologische, psychologische und soziale Faktoren beeinflusst wird.
- Schmerz und Nozizeption sind unterschiedliche Phänomene. Schmerz kann nicht einzig aus der Aktivität sensorischer Neuronen geschlossen werden.
- Durch ihre Lebenserfahrungen lernen Individuen das Konzept von Schmerz.
- Der Bericht einer Person über eine Schmerzerfahrung sollte respektiert werden.
- Obgleich Schmerz üblicherweise eine adaptive Funktion innehat, kann er Funktion sowie soziales und psychologisches Wohlbefinden beeinträchtigen.
- Verbale Beschreibung ist nur eine von vielen Verhaltensweisen Schmerz auszudrücken. Die Unfähigkeit zu kommunizieren negatiert nicht die Möglichkeit, dass ein humanes oder nicht humanes Lebewesen Schmerz erfährt (157,68).



---

Schmerz dient als Überbegriff für eine Vielzahl von Schmerzformen. Man unterscheidet zwischen akutem und chronischem Schmerz. Letzterer ist gegenüber akutem Schmerz durch ein Persistieren über einen Zeitraum von drei Monaten definiert und kann nach Treede et al. weiter in einen primären und einen sekundären chronischen Schmerz klassifiziert werden (189). Als primäre chronische Schmerzen werden solche definiert, die in einer oder mehr anatomischen Regionen über mindestens drei Monate bestehen, mit erheblichem emotionalem Leid oder funktionaler Behinderung einhergehen und nicht besser durch andere chronische Schmerzarten erklärt werden können. Hierzu zählen chronische Schmerzsyndrome, wie beispielsweise das komplexe regionale Schmerzsyndrom (CRPS), chronische primäre Kopfschmerzen und chronische primäre viszerale Schmerzen. Sekundäre chronische Schmerzen sind hingegen durch andere Erkrankungen bedingt und können als Symptom derer betrachtet werden. Hierzu werden beispielsweise chronische tumorassoziierte, chronische posttraumatische oder -operative sowie chronische neuropathische Schmerzen gezählt (44,189). Nach dem Ort ihrer Entstehung können Schmerzen darüber hinaus in viszerale, somatische und neuropathische Schmerzen unterteilt werden. Viszerale Schmerzen gehen von den inneren Organen des Rumpfes aus und werden meist als dumpf empfunden (54). Somatische Schmerzen gehen von Muskeln, Bindegewebe, Gelenken und Knochen (Tiefenschmerz) aus oder entstehen durch Reizung der Haut und Schleimhäute (Oberflächenschmerz). Beim Oberflächenschmerz wird ein erster heller oder spitzer Schmerz von einem zweiten, meist als dumpf beschriebenen, Schmerz unterschieden (153). Neuropathische Schmerzen werden durch Läsionen oder Erkrankungen des somatosensorischen Nervensystems verursacht und chronifizieren in der Regel. Die Ausstrahlung und Verteilung neuropathischer Schmerzen korrespondiert neuroanatomisch mit zugrunde liegenden Erkrankungen oder Läsionen des somatosensorischen Nervensystems. Zusätzlich bestehen objektivierbare Anzeichen einer sensorischen Störung, wie beispielsweise Hypästhesien, Allodynien oder Anästhesien. Neuropathische Schmerzen, ausgelöst durch Schädigungen oder Erkrankungen des ZNS, wie beispielsweise nach Rückenmarks- oder Hirnverletzung, werden als zentrale neuropathische Schmerzen subklassifiziert. Trigeminusneuralgien, periphere Polyneuropathien oder Postzosterneuralgien, deren zugrundeliegende Erkrankungen das PNS betreffen, werden als periphere neuropathische Schmerzen bezeichnet (171).

Die Physiologie des Schmerzes als Sinneswahrnehmung ist hochkomplex und Gegenstand aktueller Forschung. Primäre sensorische Neuronen, die schädliche oder potenziell schädliche Stimuli (Noxen) wahrnehmen, werden Nozizeptoren genannt (199). Dieser Begriff wurde zu Beginn des 20. Jahrhunderts durch Sir Charles Scott Sherrington eingeführt (175,176).

---

Alternativ werden Sinnesrezeptoren des peripheren somatosensorischen Nervensystems, die in der Lage sind Noxen zu übertragen, zu kodieren und sich durch eine hohe Erregungsschwelle auszeichnen, als Nozizeptoren bezeichnet. Zentrale oder periphere Neuronen des somatosensorischen Nervensystems, die zur Kodierung von Noxen fähig sind, werden demgegenüber nozizeptive Neuronen genannt (80). Nozizeptoren werden durch intensive thermische, mechanische oder chemische Stimuli angeregt. Geschädigte Zellen setzen algogene Substanzen, wie beispielsweise Kalium-Ionen, Protonen oder ATP frei, welche ebenfalls zur Aktivierung der Nozizeptoren führen (11). Die Gesamtheit der neuronalen, durch noxische Stimuli ausgelösten, Aktivität in ZNS und PNS wird Nozizeption genannt (157). Bei allen Nozizeptoren handelt es sich um pseudounipolare Neuronen, deren zentrale und periphere Fortsätze nahe des Perikaryons, zu einem Nervenzellfortsatz verbunden sind (32). Die Perikarya der Nozizeptoren des menschlichen Körperstamms und der Extremitäten befinden sich in den Spinalganglien des Rückenmarks und werden „*dorsal root ganglia*“ (engl. Spinalganglien, DRG)-Neuronen genannt. Die Perikarya der fazialen Nozizeptoren befinden sich im *Ganglion trigeminale* (11). Die Axone der Nozizeptoren enden peripher in freien, nicht myelinisierten, Nervenendigungen. In diesen werden die thermischen, mechanischen oder chemischen Stimuli in elektrische Signale übersetzt (52,123,205). Nozizeptoren werden häufig anhand des Myelinisierungsgrades ihrer Nervenfasern klassifiziert. Man unterscheidet zwei Hauptgruppen. Die erste umfasst Nozizeptoren, die über myelinisierte Fasern, sogenannten A $\delta$ -Fasern mit einem durchschnittlichen Durchmesser von 2,5  $\mu\text{m}$  verfügen (118). Sie vermitteln einen akuten, gut lokalisierbaren Schmerz, welcher auch als erster oder schneller Schmerz bezeichnet wird (29). Die zweite Hauptgruppe beinhaltet Nozizeptoren, deren Nervenfasern nicht myelinisiert sind. Diese sogenannten C-Fasern haben im Durchschnitt einen Durchmesser von 1  $\mu\text{m}$  und vermitteln einen schwach lokalisierbaren, zeitlich verzögerten Schmerz. Während die durchschnittliche Leitungsgeschwindigkeit der C-Fasern im Bereich von 0,5 bis 2,5 m/s liegt, liegt die der A $\delta$ -Fasern zwischen 4 und 30 m/s (14,108,118,136,178). Innerhalb der ersten Hauptgruppe wird weiterhin zwischen Typ I- und Typ II A $\delta$ -Faser-Nozizeptoren differenziert. Diese unterscheiden sich in ihrer Erregbarkeit durch mechanische und thermische Stimuli. Während die Typ I-Fasern, die auch „*high threshold mechanical*“ (HTM-) Nozizeptoren genannt werden, eine hohe Erregungsschwelle für thermische (> 53 °C) und eine geringe Erregungsschwelle für mechanische Stimuli (3,7 - 5 bar) besitzen, verhält es sich bei den Typ II-Fasern, den „*high threshold heat*“ (HTH-) Nozizeptoren, umgekehrt. Sie verfügen dementsprechend über eine hohe mechanische (11 - 15 bar) und eine niedrige thermische Erregungsschwelle (43 – 47 °C) (52). Auch die Nozizeptoren der zweiten Hauptgruppe werden anhand ihrer Erregbarkeit durch verschiedene

---

Stimuli unterteilt. C-fiber mechano heat (CMH-) Nozizeptoren sind polymodale Nozizeptoren, die sowohl durch mechanische als auch durch thermische Stimuli erregt werden (107). Demgegenüber sind sog. „*silent*“ Nozizeptoren ausschließlich durch thermische und chemische Stimuli erregbar (142).

Darüber hinaus gibt es noch weitere Klassifizierungen von Nozizeptoren, die sich u. a. an der Expression der unterschiedlichen Membranproteine, wie Ionenkanäle und Rezeptoren, orientieren. Am distalen Terminus des Nozizeptors befinden sich zahlreiche spezifische ionotrope und metabotrope Rezeptoren. Diese werden spezifisch durch chemische, mechanische oder thermische Noxen aktiviert. Die Transienten Rezeptor-Potential-Kationenkanäle der Unterfamilie V (vanilloid), Subtyp 1 (TRPV1) werden beispielsweise durch Stoffe wie Capsaicin, schwarzen Pfeffer oder Gingerol aktiviert. Hitze und Protonen haben ab einem pH-Wert von unter 5,9 ebenfalls eine agonistische Wirkung auf TRPV1. Wird ein TRPV1 durch einen der o. g. Stimuli aktiviert, kommt es zur Konformationsänderung des Kanals, einer erhöhten Permeabilität, hauptsächlich für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, und einer konsekutiven Zellmembrandepolarisation, die zum Auslösen von Aktionspotentialen führt (37).

Eine wichtige Eigenschaft der Nozizeptoren unterscheidet sie von anderen Sinneszellen. Sie sind durch eine hohe Erregungsschwelle charakterisiert und kaum zur Adaption fähig (52). Möglich ist jedoch die Habituation des Schmerzes. Dieser Begriff beschreibt die Fähigkeit eines Organismus, an einen kontinuierlichen oder wiederholten schmerzvollen Stimulus zu adaptieren (62). Habituation kann als Abnahme der Verhaltensantwort auf einen wiederholten Stimulus definiert werden (152). Dies kann eine Minderung des Schmerzempfindens zur Folge haben (98). In Abwesenheit eines adäquaten Stimulus sind Nozizeptoren „still“ und generieren keine Aktionspotentiale. Erst die Exposition eines adäquaten thermischen, mechanischen oder chemischen Reizes führt durch die Öffnung der jeweiligen Ionenkanäle zum Einstrom von  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen sowie weiterer Kationen in die Zelle, was zur Depolarisation des Membranpotentials führt. Wird die Erregungsschwelle des Nozizeptors überschritten, kommt es zur Ausbildung eines Aktionspotentials nach dem Alles-Oder-Nichts-Prinzip (199). Bei allen Nozizeptoren handelt es sich um exzitatorische Neuronen, die Glutamat als primären und darüber hinaus weitere Peptide wie Substanz P.(SP), „*Calcitonin-Gene Related Peptide*“ (CGRP) und Somatostatin als Neurotransmitter freisetzen (11).

Von den Spinalganglien verlaufen afferente Fasern der Nozizeptoren, über die *Radices posteriores* der Spinalnerven, zu den Hinterhörner des Rückenmarks, in denen die Aktionspotentiale der peripheren Nozizeptoren auf nachgeschaltete Neuronen des Zentralnervensystems (ZNS) übertragen werden. Die Topografie der Verschaltung ist abhängig von der Klasse des Nozizeptors bzw. seiner Nervenfasern. So projizieren die A $\delta$ -

---

Nozizeptoren zur Lamina I und V des Hinterhorns. Die zentralen Fortsätze der C-Nozizeptoren werden in Lamina I und II auf das zweite afferente Neuron verschaltet (2).

Diese zweiten Neuronen kreuzen auf Spinalganglienebene zur Gegenseite und projizieren über den *Tractus spinothalamicus* in den Hirnstamm und den *Nucleus ventralis posterolateralis thalami* (VPL), wo die Signale auf dritte Neuronen verschaltet werden. Diese projizieren in den *Gyrus postcentralis* der Großhirnrinde respektive in den somatosensorischen Kortex. Des Weiteren erreichen Projektionen den Hirnstamm, die kaudale ventrolaterale und die rostrale ventromediale *Medulla oblongata* (CVLM, RVM), die *Nuclei parabrachiales*, das periaquäduktale Grau und den *Nucleus tractus solitarii*. Diese Projektionen kodieren verschiedene Dimensionen des Schmerzes (197). Die Aktionspotentiale der Nozizeptoren der Gesichtsregionen werden im paarigen *Nucleus principalis nervi trigemini*, den Hirnnervenkernen des fünften Hirnnervens, auf die nachgeschalteten Neuronen des ZNS übertragen. Diese zweiten Neuronen projizieren über den *Lemniscus trigeminalis* in den *Nucleus ventralis posteromedialis thalami* (VPM). Dort werden sie auf dritte Neuronen verschaltet, welche zusammen mit den Afferenzen aus dem VPL zum *Gyrus postcentralis* und den weiteren schmerzassoziierten Arealen ziehen (12).

Zwischen wahrgenommenem Schmerz und dem Maß des nozizeptiven Inputs besteht keine lineare Korrelation. Schmerz, als bewusste Erfahrung, wird durch Faktoren wie Erinnerung, Emotion, Pathologie, Genetik und Kognition beeinflusst (188). Nozizeptoren stehen in Verbindung mit einem komplexen neuronalen Netzwerk von ZNS- und PNS-Neuronen, die u. a. im Hinterhorn der Spinalganglien pro- oder antinozizeptive Effekte auf eintreffende nozizeptive Signale haben. Ein wichtiges System der endogenen Schmerzhemmung stellt das endogene Opioidsystem dar, dessen intrazelluläre Signalkaskade und Wirkung auf zentrale Proteine der Nozizeption, wie beispielsweise der cAMP-abhängigen Proteinkinase A II (PKA II), noch einige offene Fragen aufwirft (72).

### **2.3 Signaltransduktion der Opioidrezeptoren**

Opioidrezeptoren (OR) sind in unterschiedliche funktionelle Systeme des menschlichen Körpers integriert. Sie befinden sich sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem. Das Opioidsystem ist ein wichtiger Bestandteil des endogenen Neurotransmittersystems und ist Teil der Kontrollsysteme für Schmerz, Motivation und Stimmung. Des Weiteren ist es in Körperfunktionen wie Respiration und gastrointestinale Motilität sowie in Immun- und endokrine Prozesse involviert (94).

---

Verschiedene Subtypen der Opioidrezeptoren sind bekannt. Die drei Hauptsubtypen sind  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren, die auch als MOR, DOR und KOR bezeichnet werden. Des Weiteren wird auch der Nozizeptin-Orphanin-FQ-Peptidrezeptor (NOP) zu den Opioidrezeptoren gezählt. Alle Opioidrezeptoren sind metabotrope, inhibitorische, G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), deren Aktivierung durch Bindung eines Liganden zur Dissoziation eines  $G_{i/o}$ -Proteins in eine  $\alpha_i$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit führt. Diese Untereinheiten verändern die Ionenkanalaktivität des Neurons und führen so zur Inhibition der Neurotransmission. Die  $\alpha_i$ -Untereinheiten binden an Adenylylcyclasen (AC) und inhibieren diese, wodurch die intrazelluläre Konzentration des zyklischen Adenosinmonophosphats (cAMP) der Neuronen sinkt (3). In Mammalia konnten neun verschiedene, transmembranöse AC-Isoformen (AC 1 - 9) sowie eine zehnte lösliche Isoform (sAC) identifiziert werden (92). Mit Hilfe von Knockout-Mausmodellen konnte belegt werden, dass die Isoformen AC 1 und AC 5, die beide u. a. im Rückenmark exprimiert werden, besonders wichtige Rollen in der Nozizeption einnehmen und AC5 einen essenziellen Mediator der Opioidrezeptor-Signalkaskade darstellt (96,97,191). cAMP bindet in eukaryotischen Zellen an verschiedene, ubiquitär exprimierte, cAMP-bindende Proteine. Hier sind zunächst cAMP-abhängige Proteinkinasen A (PKA) zu nennen, welche aus einem Tetramer aus zwei regulatorischen (PKAR) und zwei assoziierten katalytischen Untereinheiten (PKAC) bestehen. In Mammalia wurden vier verschiedene PKAR- ( $RI\alpha$ ,  $RI\beta$ ,  $RII\alpha$ ,  $RII\beta$ ) und vier verschiedene PKAC-Isoformen ( $C\alpha$ ,  $C\beta$ ,  $C\gamma$ , PrKX) identifiziert. Die Kombination der Isoformen resultiert in einer Vielzahl von Heterotetrameren, welche in zwei wesentliche Klassen, mit teils redundanter Funktionalität, eingeteilt werden. Typ I PKA (PKA I) beinhalten  $RI\alpha$  oder  $RI\beta$  und Typ II (PKA II) entsprechend  $RII\alpha$  oder  $RII\beta$ . Diese unterscheiden sich in ihren biochemischen Eigenschaften, der intrazellulären Lokalisation und Funktion (22,50,95,145). Solange PKA als Tetramer vorliegen, blockieren die regulatorischen Untereinheiten die aktiven Zentren der beiden katalytischen Untereinheiten. Die Bindung von cAMP an die regulatorischen Untereinheiten führt zu Konformationsänderungen der Holoenzyme und somit zur Dissoziation der Tetramere. Dies führt zur Aktivierung von PKA, da die katalytischen Zentren freigesetzt werden, welche dann Substrate phosphorylieren (71). Durch den gesenkten cAMP-Spiegel, in Gegenwart von Opioiden, ist auch die Phosphorylierung der PKA-Substrate reduziert. Dies führt z. B. zu einer verminderten Phosphorylierung spannungsabhängiger Calcium- und Natriumkanäle, was ihre Öffnungswahrscheinlichkeit verringert. Darüber hinaus gibt es noch weitere intrazelluläre durch cAMP regulierte Proteine, wie „*Exchange proteins directly activated by cAMP*“ (EPACs, cAMP-GEF) und die „*hyperpolarization-activated cyclic-nucleotide-modulated channels*“ (HCN), welche ebenfalls in sensorischen Neuronen

---

vorkommen (34, 24). Im Gegensatz zu  $\alpha_i$ -Untereinheiten der G-Proteine binden die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nicht an AC, sondern an verschiedene Ionenkanäle, rufen dort spezifische Effekte hervor und haben somit einen direkten Effekt auf die elektrischen Eigenschaften der Neuronen. Zum einen binden und inhibieren sie spannungsabhängige Calciumkanäle. Zum anderen werden spannungsabhängige Kaliumkanäle wie „*G Protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels*“ (GIRK) durch die  $\beta\gamma$ -Untereinheiten aktiviert. Dies führt zur Hyperpolarisation des Membranpotentials, wodurch das Auslösen von Aktionspotentialen erschwert wird (115).

Die Signaltransduktion der Opioidrezeptoren unterliegt komplexen Kontroll- und Regulationsmechanismen. Die Phosphorylierung intrazellulärer Domänen durch G-Proteingekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) führt zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin und nachfolgender Rezeptorinternalisierung (130). Im humanen Genom wurden bisher Gene für sieben verschiedene GRK-Isoformen identifiziert, welche in drei Familien unterteilt werden.  $\mu$ -Opioidrezeptoren werden hauptsächlich von ubiquitär exprimierten GRK2 phosphoryliert (56). GRK2 wiederum sind Substrate von PKA und werden durch diese phosphoryliert, was die Translokation von GRK2 an die Plasmamembran bewirkt. Dies verstärkt nicht die katalytische Aktivität der GRK2, sondern vereinfacht die Phosphorylierung der GPCRs durch GRK2 (21). An  $\beta$ -Arrestin 2 knockout Mausmodellen konnte belegt werden, dass die Abwesenheit von  $\beta$ -Arrestin 2 zu einer signifikanten Potenzierung der morphininduzierten Analgesie bei gleichzeitiger Abnahme morphininduzierter Obstipation und Atemdepression führt (17).

Ein eng mit dem Opioidsystem in Verbindung stehendes und in o. g. Kontrollmechanismen involviertes endogenes Neurotransmittersystem stellt das serotonerge System dar, welches häufig eine, dem Opioid effekt entgegengesetzte, Wirkung hervorruft (177). Die Interaktion dieser beiden Systeme in Bezug auf Nozizeption und Schmerz ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Forschung und Diskussion.

## 2.4 Signaltransduktion der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren

Serotonin (5-HT) ist als Neurotransmitter und Hormon im zentralen sowie im peripheren Nervensystem ebenfalls in viele verschiedene funktionelle Systeme integriert. 5-HT nimmt, gegenüber den Opioiden, häufig eine entgegengesetzte Rolle ein. Unter anderem ist hier die Regulation von Stimmung, Schlaf-Wach-Rhythmus, Appetit, Erinnerung, Emesis, Atmung und Schmerz zu nennen (138,158).

Bisher sind sieben 5-HT-Rezeptorfamilien (5-HT<sub>1</sub> - 5-HT<sub>7</sub>) und 15 verschiedene 5-HT-Rezeptoren bekannt (42). Abgesehen von 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren, bei denen es sich um

---

ligandenabhängige Kationenkanäle handelt, sind alle 5-HT-Rezeptoren metabotrope Rezeptoren. Unter diesen GPCRs gibt es sowohl  $G_i$ - als auch  $G_s$ - und  $G_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren. 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren gehören zusammen mit 5-HT<sub>6</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren zu den stimulatorischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (137). Bei diesen führt die Bindung eines Liganden an den Rezeptor zur Dissoziation des  $G_s$ -Proteins. Dieses dissoziiert in eine  $\alpha_s$ - und eine  $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die  $\alpha_s$ -Untereinheit bindet, wie die  $\alpha_i$ -Untereinheit der Opioidrezeptoren, an Adenylylcyclasen (AC). Im Gegensatz zu  $\alpha_i$ -Untereinheiten aktivieren die  $\alpha_s$ -Untereinheiten die AC (16). Durch die gesteigerte Aktivität der AC steigt der intrazelluläre cAMP-Spiegel an, was die Aktivität der PKA erhöht und zu einer gesteigerten Phosphorylierung der Substrate, wie beispielsweise intraneuronaler Ionenkanäle, führt. Wie für  $G_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, aktivieren die freien  $\beta\gamma$ -Untereinheiten der  $G_s$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren nach deren Aktivierung PKA-unabhängig Ionenkanäle und andere Zielstrukturen (38, 148,74,69). Die genauen Funktionen der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren sind Gegenstand aktueller Forschungen. Dabei erwägen Pindon et al., dass  $\beta\gamma$ -Untereinheiten nach Aktivierung der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktivieren (147). Bisher liegt jedoch keine ausreichende Evidenz zur Belegung dieser Vermutung vor.

Auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren unterliegen verschiedenen Regulationsprozessen. Die  $\beta$ -Arrestin-vermittelte Rezeptordesensitivierung nimmt dabei, ähnlich der Regulation der Opioidrezeptoren, eine entscheidende Rolle ein (46). Auch 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren werden durch GRK2 phosphoryliert, was zur Rekrutierung von  $\beta$ -Arrestin Molekülen führt. Die Dauer der Rezeptorantwort wird über drei Mechanismen reguliert. Erstens wird durch Bildung der  $\beta$ -Arrestin-5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Komplexe die Kopplung mit G-Proteinen sterisch verhindert, was direkt zu einer Rezeptordesensitivierung führt. Zweitens binden die entstandenen Komplexe an Clathrin-besetzten Abschnitten der Zellmembran, was die Internalisierung der Rezeptoren zur Folge hat. Drittens wird die intrazelluläre Signalkaskade des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptors durch die Aktivierung G-Protein unabhängiger Signalkaskaden, die durch den Komplex induziert werden, reguliert. (117).

5-HT ist ein wichtiger Neuromodulator mit pro- und antinozizeptiven Effekten. Der spezifische Effekt auf die Nozizeption wird durch den Rezeptortyp, die Substanzmenge und die anatomische Lokalisation des Rezeptors bestimmt (42,138). In vorangegangenen Arbeiten konnte durch unsere Arbeitsgruppe die Rolle der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren für die 5-HT-induzierte PKA-Aktivierung in DRG-Neuronen hervorgehoben und ein funktioneller Zusammenhang zwischen den  $G_i$ -Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren und den  $G_s$ -Protein-gekoppelten 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren auf die AC dargestellt werden (83). Dieser funktionelle Zusammenhang soll weiter untersucht werden und ist Gegenstand dieser Arbeit.

---

## 2.5 Modulation der PKA-II-Aktivität durch $G_{\alpha_s}$ - und $G_{\alpha_i}$ -gekoppelte Rezeptorkaskaden

$G_{\alpha_s}$ - und  $G_{\alpha_i}$ -gekoppelte Rezeptorkaskaden wirken gegensätzlich auf die Aktivität der AC sowie folglich auf den cAMP-Spiegel und die PKA-II-Aktivität. Dadurch, dass PKA II Ionenkanäle wie den spannungsabhängigen Natrium Kanal  $Na_v1.8$ , TRPV1 und den ATP-abhängigen Ionenkanal P2X3 phosphorylieren und sensitivieren, werden sie als zentrale Proteine der Schmerzphysiologie verstanden (55,57,15,193). Des Weiteren sind PKA II in Prozesse wie der Internalisierung von Kaliumkanälen, die zu Hyperexzitabilität führt und der Aktivierung von „cAMP Response-element-binding“ Proteinen (CREB) involviert (133). Letztere stellt einen entscheidenden Vorgang in der Langzeitschmerzsensitivierung dar (90). Zusammenfassend können PKA II als zentrale Kinasen der Nozizeptorsensitivierung verstanden werden (11). Diese Sensitivierungsmechanismen sind wichtige direkte und indirekte Ziele herkömmlicher analgetisch wirksamer Substanzen wie Opioide und NSARs (146).

In kürzlich veröffentlichten Studien von Stefan et al. wurde gezeigt, dass regulatorische Untereinheiten der PKA II cAMP-abhängig an  $G_{\alpha_i}$ -Proteine binden (182). Die Stimulation von  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelten Rezeptoren und der damit einhergehenden Bildung von cAMP-PKARII-Komplexen führt an  $G_{\alpha_i}$ -Proteinen zur Steigerung der Sensitivität, der Amplitude und der Dauer der  $G_{\alpha_i}$ - $\beta\gamma$ -Aktivität und des MAP Kinase Signaltransduktionswegs, welcher unabhängig von der PKA-II-Aktivität funktioniert (182). Diese Erkenntnisse legen den Schluss nahe, dass die adaptive Signalantwort aktivierter  $G_{\alpha_i}$ -gekoppelter Rezeptorkaskaden durch die Aktivierung von  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelten Rezeptoren kontrolliert und präzisiert wird.

Opioidrezeptoren und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren werden von stark überlappenden Nervenzellpopulationen exprimiert. Manzke et al. konnten beispielhaft die Koexpression von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren und MOR in respiratorischen Neuronen des Prä-Bötzing-Komplexes im Hirnstamm darstellen (113). Darüber hinaus stellten sie einen funktionellen Antagonismus zwischen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren und MOR dar, der eine wichtige Rolle für die Erholung opioidinduzierter Atemdepressionen spielt. Dieser funktionelle Antagonismus spiegelt makroskopisch die gegensätzliche Wirkung der G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelten Opioid- und der G<sub>s</sub>-Protein-gekoppelten 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren auf die AC wider.

In vorherigen Veröffentlichungen der Arbeitsgruppe konnte in diesem Kontext die These eines funktionellen Zusammenhangs zwischen pronozizeptiven  $G_{\alpha_s}$ -gekoppelten 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorkaskaden und antinozizeptiven  $G_{\alpha_i}$ -gekoppelten Opioidrezeptorkaskaden unterstützt werden (83). Beide Rezeptorkaskaden sind Bestandteile eines nozizeptiven Systems, das



---

unter anderem auch spannungsgesteuerte Natriumkanäle vom Typ  $\text{Na}_v1.7$  miteinschließt. Der Funktionsverlust dieses Rezeptors resultiert in lebenslanger Analgesie (61). In vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der Verlust von  $\text{Na}_v1.7$ -Kanälen sowohl zu reduzierter Aktivität pronozizeptiver  $5\text{-HT}_4$ -Rezeptor-Signalkaskaden als auch zur Reduktion der regulatorischen  $\text{RII}\beta$ - Untereinheiten von PKA II führt. Auf der anderen Seite wird die Effektivität antinozizeptiver OR-vermittelter Signalkaskaden gesteigert. Demzufolge nehmen  $\text{Na}_v1.7$ -Kanäle eine entscheidende Rolle in der Kontrolle von Wirksamkeit und Balance GPCR-vermittelter pro- und antinozizeptiver Signalkaskaden ein, wobei bei Ausschaltung dieses Kanals die Antinozizeption überwiegt (83). Dies ist ein weiteres Beispiel für den engen funktionellen Zusammenhang zwischen  $\text{G}\alpha_i$ -gekoppelten Opioid- und  $\text{G}\alpha_s$ -gekoppelten  $5\text{-HT}_4$ -Rezeptorkaskaden in Bezug auf die Nozizeption. Im Zuge dessen konnte gezeigt werden, dass die  $5\text{-HT}$ -induzierte PKA-II-Aktivität durch die simultane Stimulation mit dem MOR-spezifischen Agonisten Fentanyl partiell inhibiert werden kann. Letzteres findet als hochpotentes Opioid (WHO-Stufe 3) häufig Verwendung im klinischen Alltag und steht aufgrund seiner hohen Potenz oft in Zusammenhang mit Opioidabhängigkeit, Überdosierungen und opioidinduzierten Todesfällen (167,186). Die Rolle weiterer OR-Isoformen in Bezug auf die Inhibition der  $5\text{-HT}$ -induzierten PKA-II-Aktivität blieb bisher unklar. Auch konnte bisher nicht gezeigt werden, welche Auswirkung eine Blockade des  $5\text{-HT}_4$ -Rezeptors auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition zeigt.

## **2.6 Darstellung der PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten mittels „High Content Screening“ (HCS)-Mikroskopie**

In Vorarbeit wurde durch meine Kollegin Ashley Storck, ebenfalls medizinische Doktorandin, der Effekt verschiedener isoformspezifischer OR-Agonisten auf die, durch den direkten AC-Agonisten Forskolin (Fsk) induzierte, PKA-II-Aktivierung analysiert. Dazu nutzte sie den, auch von mir verwendeten, „pRII/RII $\beta$ -Assay“, in Kombination mit „High Content Screening“ (HCS)-Mikroskopie.

Unter HCS-, auch „High Content Imaging“ (HCI)-Mikroskopie genannt, wird eine automatisierte Mikroskopiemethode verstanden, welche mittels meist niedrigaufgelöster Epifluoreszenz-Aufnahmen enorme Datensätze generiert. Unter Verwendung intelligenter, softwarebasierter Bilderkennung bzw. -auswertung macht HCS-Mikroskopie die automatisierte Objektidentifikation und die Quantifizierung großer Zellpopulationen sowie verschiedener Merkmale in komplexen biologischen Systemen gleichzeitig möglich (91,82,27). In dem

---

vorgestellten Versuchsaufbau können aus einem Versuchstier bis zu 50.000 sensorische Neuronen isoliert und anschließend in 64-Well-Zellkulturplatten kultiviert werden. Nach Stimulation erfolgt die Färbung beispielsweise immunzytochemisch mit phosphospezifischen Antikörpern. Jedes Well wird in 64 Bildareale aufgeteilt. Bei vier Farbkanälen entstehen so pro Well 256 Bilder. Insgesamt entstehen so 16.384 Bilder pro analysierter 64-Well-Zellkulturplatte (64 Wells × 64 Bilderareale pro Well × vier Farbkanäle = 16.384 Bilder). Anhand der Expression der Ubiquitin-Carboxyl-Terminal-Hydrolase Typ 1 (UCHL1), einer Thiolprotease, die hochspezifisch für Neuronen ist, sowie weiterer spezifischer Selektionsparameter, wie beispielsweise Größe und Intensität, können die Objekte anschließend automatisiert identifiziert werden (82,47,198). Der o. g. „pRII/RIIβ-Assay“ basiert auf der Immunfluoreszenzfärbung muriner DRG-Neuronen mit Antikörpern gegen die regulatorischen RII-Untereinheiten der PKA II (112). In bereits veröffentlichten Studien konnte unsere Arbeitsgruppe PKA-RIIβ als nozizeptorspezifischen Marker identifizieren (84). Hiernach wird die Expression von RIIβ zur Identifikation der nozizeptiven DRG-Neuronen verwendet. Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe belegen, dass die RII-Untereinheiten bereits innerhalb des inaktiven RII<sub>2</sub>:C2<sub>2</sub>-Komplexes ATP-abhängig, durch die C-Untereinheiten phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung führt zu einer erhöhten konformativen Flexibilität, was die Wahrscheinlichkeit einer kurzen Dissoziation der RII<sub>2</sub>:C2<sub>2</sub>-Komplexe erhöht (84,85). Die Dissoziation von PKA II während der Aktivierung durch cAMP erhöht die Zugänglichkeit der inhibitorischen Domänen der RII-Untereinheiten. Diese freien inhibitorischen Domänen können dann mit phospho-spezifischen Antikörpern (pRII) detektiert werden (85). Dementsprechend dient die pRII-Signalintensität in dem vorgestellten Assay als spezifisches Korrelat der PKA-II-Aktivität. Durch Nutzung der HCS-Mikroskopie kann somit die Aktivität von PKA II in tausenden nozizeptiven Neuronen automatisiert vermessen werden.

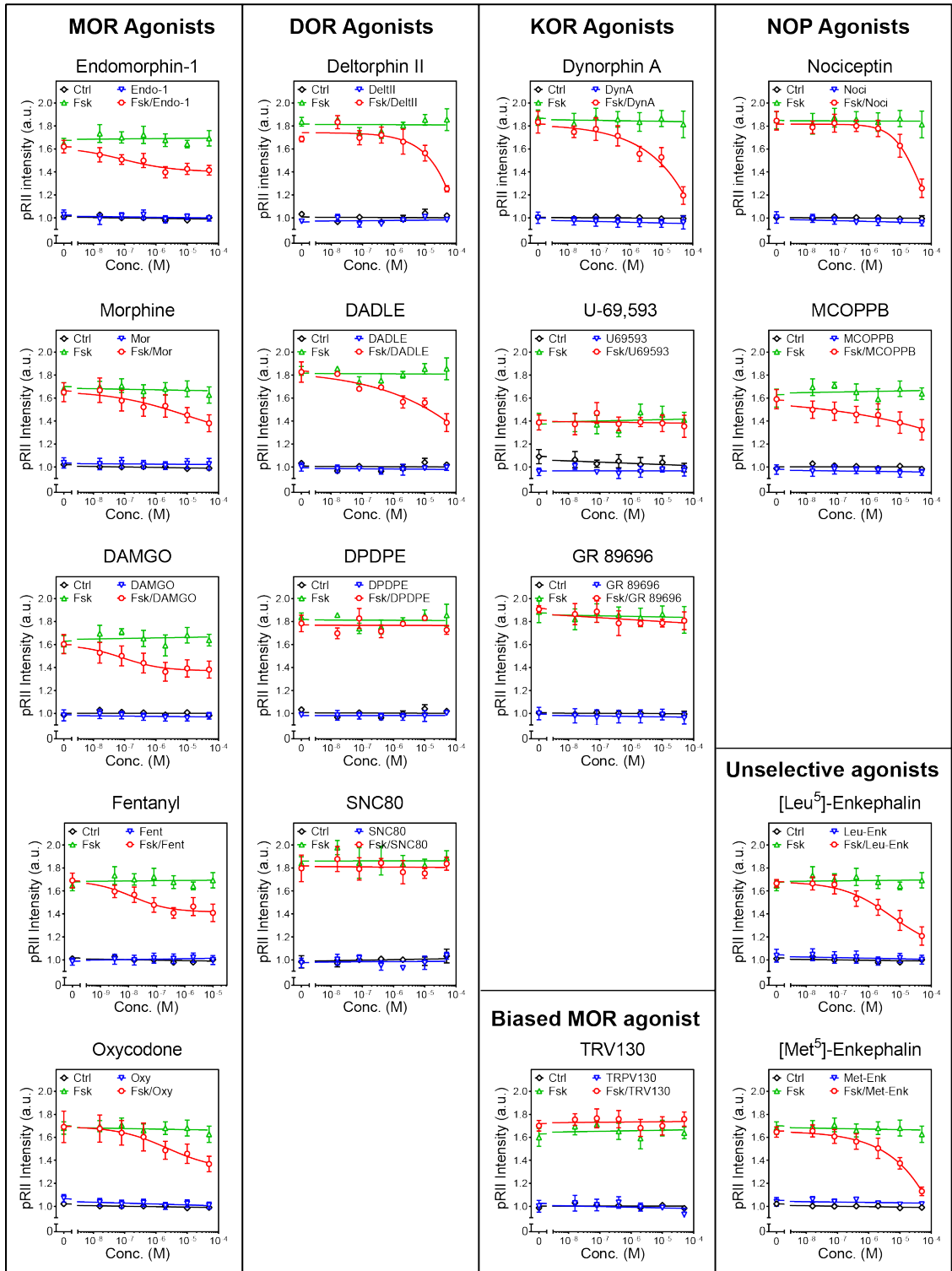
In den o. g. Vorexperimenten zeigten alle getesteten spezifischen MOR-Agonisten (Fentanyl, Endomorphin-1, Morphin, DAMGO) eine partielle Inhibition der Forskolin-induzierten PKA-II-Aktivität (Abb. 1, MOR Agonists). Die IC<sub>50</sub>-Werte lagen dabei im nanomolaren Bereich. Des Weiteren wurde beobachtet, dass mit Ausnahme des MOR-spezifischen Endomorphins 1, alle Opioidpeptide (Enkephaline, Deltorphin II, Dynorphin A, Nozizeptin) in einer Dosis von 50 µmol/l (50 µM) substantielle inhibitorische Effekte auf die PKA-II-Aktivität zeigten.

Das synthetische DOR-spezifische Opioidpeptid DADLE zeigte einen inhibitorische Effekt, wohingegen die beiden weiteren Vertreter dieser Substanzgruppe, DPDPE und SNC 80, keinen Effekt zeigten. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass DPDPE spezifischer auf den DOR wirkt als DADLE und die Dosis-Wirkungs-Kurve von DADLE stark der von Morphin ähnelt, kann in hohen Dosierungen (>10 µM) eine unspezifische Aktivierung der MOR durch

---

DADLE angenommen werden. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass DOR in den getesteten Kulturkonditionen als funktionell inkompetent angesehen werden können. Im Gegensatz zu U-69,593 und GR 89696 zeigte Dynorphin A als einziger KOR-Agonist einen inhibitorischen Effekt auf die PKA II. Zudem zeigte Nozizeptin im oberen getesteten Konzentrationspektrum 10  $\mu$ M sowie der NOP-spezifischen Agonist MCOPPB in diesem Assay inhibitorische Effekte auf die PKA-II-Antwort der DRG-Neuronen.

Zusammenfassend suggerieren diese Vorarbeiten, dass MOR-Agonisten zwar potente inhibitorische Effekte auf die Aktivität von PKA II in DRG-Neuronen haben, der Rezeptor aber nur von einer Subpopulation der Neuronen exprimiert wird und daher nur partielle Effekte zu beobachten sind. Im Gegensatz dazu zeigen unspezifische Opioidpeptide im oberen Konzentrationsbereich eine nahezu vollständige Inhibition der PKA II, was eventuell über weitere Rezeptoren (KOR, NOP) vermittelt wird.



**Abbildung 1:** Inhibition der Forskolinantwort durch spezifische und unspezifische OR-Agonisten. Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts verschiedener OR-Agonisten (0 - 50  $\mu$ M) auf die Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen.

---

## 2.7 Fragestellung und Zielsetzung

Wie in der Einleitung erwähnt, stellen Proteinkinasen vom Typ A II (PKA II) zentrale Kinasen der Nozizeptorsensitivierung dar (11). In diesem Kontext werden sie als Schlüsselproteine der Signaltransduktion von Opioid- und Serotoninrezeptoren verstanden. Hierbei wirken sich die Signalkaskaden der Opioid- und 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren gegensätzlich auf die PKA-II-Aktivität aus (3,16). Ziel dieser Arbeit ist die Quantifizierung der endogenen PKA-II-Aktivität, in murinen, primär sensorischen Neuronen, unter Einfluss von OR- und 5-HT-Rezeptor-spezifischen Liganden. Dafür soll der von uns etablierte „pRII/RIIβ-Assay“ in Kombination mit HCS-Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse angewendet werden, um die Induktion und Inhibition der PKA-II unter verschiedenen Konditionen zu analysieren.

Bereits veröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität durch die simultane Stimulation mit dem MOR-Agonisten Fentanyl partiell inhibiert werden kann (83). Außerdem wurde gezeigt, dass MOR-Agonisten partielle Effekte auf die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität in DRG-Neuronen zeigen, wohingegen unspezifische OR-Agonisten die Forskolin-Antwort beinahe vollständig inhibieren (Abb.1, [Unselective agonists vs. MOR Agonists](#)).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen soll erstens untersucht werden, ob die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivierung ebenfalls durch die Stimulation anderer OR-Isoformen (KOR und NOP) inhibiert werden kann.

Zweitens wird analysiert, ob sich die MOR-vermittelte PKA-II-Inhibition durch die Kombination mit einem 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten potenzieren lässt.

Drittens soll die Frage beantwortet werden, ob die Wirkung der OR-spezifischen Agonisten auf die PKA-II-Aktivität tatsächlich durch die selektive Aktivierung der jeweiligen OR-Isoformen vermittelt wird.

Die von mir erhobenen Daten können genutzt werden, um die Signalkaskade der OR besser zu verstehen und neue Mechanismen zu identifizieren, welche die OR-vermittelte Inhibition der PKA II potenzieren. Diese Mechanismen könnten eine Verstärkung der Opioidinduzierten Analgesie bewirken, ohne dabei vermehrt unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorzurufen. Die daraus hervorgehenden Erkenntnisse können zur sicheren und indikationsgeprüften Anwendung von Opioiden in der Therapie akuter und möglicherweise auch chronischer Schmerzen beitragen.

---

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Versuchstiere

Alle angegebenen Experimente wurden mit männlichen, acht bis zehn Wochen alten, mindestens 25 g schweren Mäusen, vom Wildtyp des Stammes C57BL/6N durchgeführt. Alle Tierexperimente wurden unter Berücksichtigung des deutschen Tierschutzgesetzes mit Zustimmung des Landesamtes für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV) Nordrhein-Westfalen realisiert [Anzeige nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz (TierSchG), Aktenzeichen 84-02.05.20.13.045]. Die Mäuse wurden zwischen neun und zwölf Uhr morgens, mittels langsamer CO<sub>2</sub>-Inflation eingeschläfert.

#### 3.2 Material

##### 3.2.1 Instrumentarium

Instrumentarium	Details
8-Kanal Multipipette Xplorer®	Eppendorf, Hamburg, DE, # 4861000104
96-Well V-Boden-Platten	Nerbe plus, Winsen, DE, # 10-111-000
96-Well-Mikroskopierplatten	Greiner Group AG, Kremsmünster, AUT, # 655896
Cellomics ArryScan V <sup>TI</sup>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Dumont # 55 Forceps	Fine Science Tools (F.S.T.), Heidelberg, DE, # 11295-51
Fine Scissor-Large Loops	Fine Science Tools (F.S.T.), Heidelberg, DE, # 14040-10
Microplate Sealing Tape	Corning, Corning, NY, USA # 6569
Multifuge X1	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
OPMI 1-FC-Mikroskop	Carl Zeiss Meditec AG, Jena, DE
Small Animal Decapitator	Ugo Basile, Germino, IT, # 51330
Student Surgical Scissor	Fine Science Tools (F.S.T.), Heidelberg, DE, # 91401-14
Vannas Spring Scissors-Straight	Fine Science Tools (F.S.T.), Heidelberg, DE, # 91500-09

Tabelle 1: Verwendetes Instrumentarium

### 3.2.2 Reagenzien

Reagenzien	Details
B-27 Supplement 50x	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # 17504044
Bovines Serumalbumin (BSA)	30 % in DPBS, Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # A2153-100G
DADLE	2 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 3790
[D-Ala2]-Deltorphin II (DeltII)	1 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 1180
DAMGO	10 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 1171
Dulbeccos Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (DPBS)	PAA Laboratories, GE Healthcare, Chicago, IL, USA, # H15-002
Dynorphin A (DynA)	1 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Tocris Bristol, UK, # 3195
Fentanyl (Fent)	10 mM in Aqua dest., Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # F3886-25MG
Forskolin (Fsk)	10 mM in DMSO, Tocris, Bristol, UK, # 1099
GR113808 (Gr)	100 mM in DMSO, Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # G5918
JTC 801 (JTC)	100 mM in DMSO, Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # J3955
Kollagenase P	10 U/ml, Roche, Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # 11213873001
Laminin Mouse Protein, Natural	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # 23017-015
L-Glutamin	Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # G6392
L-Glutaminsäure	Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE # G8415
[Met5]-Enkephalin (MetEnk)	1 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # M6638-
Naltrexon (NTX)	100 mM in Aqua dest., Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE # N3136-100MG
Naltrindol (NAL)	10 mM in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 0740
Neurobasal A Medium minus phenol red	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # 12349015
Norbinaltorphimin (norBNI)	10 mM in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 0347
Normalserum (Ziege), unkonjugiert	Dianova, Hamburg, DE, # 005-000-121

Nozizeptin (Noc)	1 mM in 0.1 % BSA in Aqua dest., Tocris, Bristol, UK, # 910
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE # 158127
Penicillin/Streptomycin	100 U/mL, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # 15140122
Poly-L-Ornithine Hydrochloride,	Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # P2533
Serotonin (5-HT)	10 mM in Aqua dest., Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # H9523-25MG
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, DE, # 3051.2
Tween 20	Sigma-Aldrich, MERCK, Darmstadt, DE, # P9416

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien

### 3.2.3 Antikörper

#### 3.2.3.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Details
Chicken polyclonal anti-UCHL1	1:2000, Novus, Cambridge, UK, # NB110-58872
Mouse monoclonal anti-PKA RII $\beta$	1:2000, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, # 610625
Rabbit monoclonal anti phospho RII $\alpha$	1:1000, Abcam, Cambridge, UK, # ab32390

Tabelle 3: Verwendete primäre Antikörper

#### 3.2.3.2 Sekundäre Antikörper

Antikörper	Details
Alexa plus 555 goat anti-rabbit IgG	1:1000, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # A32732
Alexa plus 647 goat anti-mouse IgG	1:1000, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # A32728
Highly cross adsorbed Alexa 488 goat anti chicken IgG	1:1000, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA, # A11039

Tabelle 4: Verwendete sekundäre Antikörper



---

### 3.2.4 Software

Softwareprodukt	Details
Microsoft Word für Microsoft 365 MSO 64 Bit	Version 2204 Build 16.0.15128.20158, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Thermo Scientific Cellomics Compartmental Analysis	Version 4, Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, CA, USA
Microsoft Excel für Microsoft 365 MSO 64 Bit	Version 2204 Build 16.0.15128.20158, Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Prism 8 für Windows 64 Bit	Version 8.0.0 (224), 11.10.2018, GraphPad Software, Inc, San Diego, CA, USA
GNU Image Manipulation Program (GIMP)	Version 2.10.6, The GIMP Team
Inkscape für Windows	Version 0.92.3 (2405546), 2018-03-11, Free Software Foundation, Inc, Boston, MA, USA

Tabelle 5: Verwendete Software-Produkte

---

### 3.3 Methoden

#### 3.3.1 Isolation sensibler Neuronen aus murinen Spinalganglien

Alle Instrumente wurden vor Beginn der Präparation für 30 Minuten in 70 % Ethanol sterilisiert und anschließend luftgetrocknet. Nach CO<sub>2</sub>-Intoxikation der Versuchstiere wurden diese dekapitiert („Small Animal Decapitator“, Ugo Basile, # 51330), anschließend mit 70 % Ethanol desinfiziert und mittels sterilisierter 20 G Kanülen in Bauchlage fixiert. Zur Präparation der Wirbelsäule erfolgte eine Hautinzision entlang der *Processus spinosi* in der *Linea mediana posterior* mit einer chirurgischen Standardschere („Student Surgical Scissor“, F.S.T.). Die dorsale Haut wurde unterminiert, nach lateral umgelegt und mittels steriler 20 G Kanülen fixiert. Mit zwei langen, paravertebral links und rechts geführten Inzisionen mit der chirurgischen Standardschere wurde die Wirbelsäule freigelegt. Die Halswirbelsäule (HWS) wurde mit einem transversal geführten Schnitt von der Brustwirbelsäule (BWS) getrennt und separat fixiert. Unter einem OPMI 1-FC-Mikroskop (Carl Zeiss Meditec AG) erfolgte zunächst die longitudinale Eröffnung des Spinalkanals der BWS und der Lendenwirbelsäule (LWS). Für die Laminektomie wurde eine feine Schere („Fine Scissor-Large Loops“, F.S.T.) verwendet. Eine Branche der Schere wurde zu diesem Zweck von kranial in den Spinalkanal eingeführt, die zweite Branche wurde auf der Dorsalebene der BWS paravertebral ventral der *Processus transversi* angesetzt. Durch vorsichtiges Durchtrennen der Wirbelbögen in einem Winkel von 45° auf der linken und rechten Seite wurde der Spinalkanal eröffnet. Mit Hilfe zweier feiner Pinzetten („Dumont # 55 Forceps“, F.S.T.) wurde das Rückenmark angehoben und aus dem Spinalkanal exstirpiert. Die Spinalganglien befinden sich nahe der *Radice posteriores* innerhalb der *Foramina intervertebralia*, zwischen zwei angrenzenden Wirbelbögen. Spinalganglien verfügen über einen proximalen und einen distalen Fortsatz (pseudounipolare Neuronen). Innerhalb der Spinalganglien befinden sich die Perikarya der sensorischen Neuronen des Rumpfes und der Extremitäten. Die feine Pinzette wurde genutzt, um die Spinalganglien vorsichtig zu exponieren und aus den Foramina zu isolieren. Anschließend wurden sie am proximalen Ansatz der Spinalnerven mit einer mikrochirurgischen Schere („Student Vannas Spring Scissors“, F.S.T.) abgesetzt. Die auf diese Weise gewonnenen Spinalganglien wurden in einer Petrischale mit supplementiertem Neurobasal-A-Medium [(NBA-Medium minus phenol red, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, # 12349015), versetzt mit 400 µl B27 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, # 17504044), 500 µm L-Glutamin (Sigma-Aldrich, Merck, # G6392-1VL), 25 µm L-Glutaminsäure (Sigma-Aldrich, MERCK, # G8415) und 100 U/mL Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, # 15140122)] aufgefangen. Anschließend wurden sie unter Zuhilfenahme zweier feiner Pinzetten von

---

überschüssigem Gewebe befreit. Auf die gleiche Art und Weise wurde der Spinalkanal der HWS eröffnet und die Spinalganglien der HWS exponiert und isoliert (67).

### **3.3.2 Primäre DRG-Neuronenkultur**

Nach Möglichkeit wurden alle Spinalganglien der Versuchstiere innerhalb von 60 Minuten nach der CO<sub>2</sub>-Intoxikation entnommen und anschließend in supplementiertem, mit Kollagenase P (10 U/ml, Roche, Sigma-Aldrich, MERCK, # 11213873001) versetztem NBA-Medium für eine Stunde, bei 37 °C und mit einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden die Spinalganglien zusammen mit 2,5 ml Medium unter Verwendung einer groben feuerbeschichteten und silikonierten Pasteurpipette, in ein 15 ml Falcon™ Zentrifugenröhrchen, das 2,5 ml supplementiertes NBA-Medium enthielt, transferiert (Gesamtmenge 5 ml). Im Anschluss daran wurde ca. 30 Sekunden gewartet, bis sich die Spinalganglien am Grund des Zentrifugenröhrchens absetzten. Anschließend wurden sie zusammen mit ca. 1,25 ml Medium in ein weiteres 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Durch zehnfaches Hoch- und Runterpipettieren mit der groben Pasteurpipette erfolgte eine erste Trituierung der Spinalganglien. Nach einer Wartezeit von ca. 30 Sekunden, in denen sich das ungelöste Gewebe am Boden des Zentrifugenröhrchens absetzen konnte, wurde der Überstand in ein separates, drittes Zentrifugenröhrchen transferiert. Das ungelöste Gewebe wurde mit 1,25 ml Medium versetzt, erneut trituiert und der Überstand in das dritte Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde die Trituierung zweimalig mit einer feinen feuerbeschichteten und silikonierten Pasteurpipette wiederholt sowie die Überstände im dritten Zentrifugenröhrchen gesammelt, welches frei von ungelöstem Gewebe bleiben sollte. Abschließend wurde der Inhalt des dritten Zentrifugenröhrchens durch zehnfaches langsames Hoch- und Runterpipettieren mit der feinen Pasteurpipette erneut trituiert. Durch BSA-(Bovines Serumalbumin, Sigma-Aldrich, MERCK, # A2153-100G) Gradientenzentrifugation wurden zerstörte Zellen und Axon-Stümpfe entfernt (14 % BSA, 120 g, 8 min, 20 °C). Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Medium mit der feinen Pasteurpipette resuspendiert und die Zellsuspension unter Hinzugabe von 6 ml Medium auf 7 ml verdünnt. Die so vereinzelt DRG-Neuronen wurden dann auf mit Poly-L-Ornithin (0.1 mg/ml, Sigma-Aldrich, MERCK, # P2533) und Laminin (5 µg/ml, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, # 23017-015) vorbeschichteten 96-Well-Mikroskopierplatten (Greiner, Kremsmünster, AUT, # 655896) ausgesät und über Nacht bei 37 °C, mit einer Atmosphäre von 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die durchschnittliche Neuronendichte sollte bei 64 Wells und 100 µl pro Well ca. 600 DRG-Neuronen pro Kondition betragen.

---

### 3.3.3 Stimulation der DRG-Neuronen

24 Stunden nach Isolation der DRG-Neuronen aus den Spinalganglien der Versuchstiere erfolgte die Stimulation der Zellen. Diese wurde auf 37 °C warmen Heizplatten unter Verwendung automatisierter 8-Kanal-Pipetten (Xplorer® 8-Kanal, Eppendorf, # 4861000104) durchgeführt. Die Stimulanzen wurden in 10-fach erhöhter Konzentration, in 12,5 µl phosphatgepufferter Salzlösung [(PBS) PAA Laboratories, GE Healthcare, # H15-002], in 96-Well V-Boden-Platten vorbereitet. Zu Beginn wurde die Hälfte des Mediums (50 µl) aus dem Kulturwell entnommen und mit 12,5 µl der jeweiligen Reagenz, in der 96-Well V-Boden-Platte gemischt. Anschließend wurden 50 µl in dasselbe Kulturwell zurück pipettiert, um eine zehnfache Verdünnung der Reagenzien zu erreichen. Bei den Negativkontrollen erfolgte die gleiche Mischprozedur, jedoch ausschließlich mit PBS. Anschließend wurden die DRG-Neuronen durch Zugabe von 100 µl achtprozentigem Paraformaldehyd (finale Konzentration 4 %, Sigma-Aldrich, MERCK, # 158127) für zehn Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Die DRG-Neuronen wurden mit den jeweiligen u. g. Reagenzien und Konzentrationen stimuliert.

### 3.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Nach der Fixierung wurden die Zellen zweimal mit PBS für jeweils zehn Minuten gewaschen und mit zwei Prozentiger normaler-Ziegen Serum-Blockierlösung [NGSB, normales Ziegen Serum (Dianova, # 005-000-121), 1 % BSA, 0.1 % Triton X-100 (Roth, # 3051.2), 0.05 % Tween 20 (Sigma-Aldrich, # P9416)] für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die DRG-Neuronen, respektive die durch PFA fixierten Fraktionen, über Nacht bei 4 °C mit den primären Antikörpern inkubiert. Nachdem die DRG-Neuronen dreimal mit PBS für jeweils zehn Minuten gewaschen wurden, wurden sie für eine Stunde mit den um den Faktor 1:1000 verdünnten, sekundären, fluoreszenzgebundenen Alexa Antikörpern bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert und erneut dreimal mit PBS für jeweils zehn Minuten gewaschen. Daraufhin wurden die Kulturwells mit PBS aufgefüllt, die Platten mit Aluminiumstreifen (Microplate Sealing Tape, Corning, # 6569) verschlossen und bei 4 °C bis zum Scanvorgang gelagert.

### 3.3.5 Quantitative Mikroskopie

Die immunfluoreszenzgefärbten Kulturen in den 96-Well-Platten wurden mittels eines Cellomics ArrayScan V<sup>TI</sup> (Thermo Fisher Scientific) gescannt. Dabei entstanden, unter Nutzung eines 10-fachen Objektivs, Bilder im Format 512 x 512 Pixel, die dann mit Hilfe des

---

Cellomics Softwarepakets weiterbearbeitet wurden. Die aus den entnommenen Spinalganglien kultivierten DRG-Neuronen wurden anhand ihrer UCHL1-Expression identifiziert und mit Alexa 488-konjugierten sekundären Antikörpern sichtbar gemacht. Im Folgenden wird kurz die weitere Prozessierung der entstandenen Bilder beschrieben.

Zur besseren Abgrenzung der abgebildeten Objekte wurde bei den entstandenen Rohbildern der UCHL1-gefärbten Kulturen der lokale Hintergrund korrigiert. Hierzu wurde der „Low-Pass“-Filtrations-Algorithmus verwendet. Bei dieser Methode wird der lokale Hintergrund eines Pixels bestimmt, indem die minimale Pixelintensität in einer durch den Radius spezifizierten Fläche (meist 50 – 100 Pixel), um diesen Pixel ermittelt wird. Je kleiner der Radius, desto aggressiver, je höher der Wert, desto konservativer die Filtration (64,110).

Anschließend wurden die Rohbilder anhand der Pixelintensität unter Verwendung eines fixen Schwellenwertes von 1000 „*arbitrary units*“ (engl. willkürliche Einheiten, a.u.) in binäre Bildmasken konvertiert. Die erhaltenen Objekte wurden dann weiter analysiert, wobei die folgenden Objektselektionsparameter zur Identifikation der Neurone verwendet wurden:

- Größe: 118 - 3612  $\mu\text{m}^2$
- Rundheit ( $\text{Perimeter}^2/4\pi\text{Fläche}$ ): 1 - 2
- Verhältnis Länge zu Breite: 1 - 2
- Durchschnittliche UCHL1-Intensität: 250 - 2000 a.u.
- Totale Intensität:  $6 \times 10^5 - 5 \times 10^7$  a.u.

Zur Quantifizierung der Signalintensitäten wurden die erzeugten Bildmasken mit Bildern überlagert, die unter Verwendung anderer Fluoreszenz-Wellenlängen aufgenommen wurden. Unter Verwendung unterschiedlicher fluoreszenzgebundener Antikörper und unterschiedlicher Farbkanäle ist ein Überlappen der Emissionsspektren sowie eine Detektion des Fluoreszenzsignals in mehreren, teilweise nicht dafür vorgesehenen, Fluoreszenzkanälen möglich. Dieser Effekt wird „Spillover“ (engl. spillover = Überschwappen, Überlauf) genannt (35,9). Zur Berechnung und Kompensation dieser „Spillover“-Effekte zwischen den einzelnen Fluoreszenz-Kanälen wurden jeweils drei Kontrollen pro dreifach gefärbter Kultur angelegt: Erstens UCHL1 allein, zweitens UCHL1 zusammen mit dem primären Antikörper und drittens UCHL1 mit dem sekundären Antikörper. Zur Kompensation der Spillover-Effekte wurden unter Verwendung der Rohdaten der für die Kontrollen gemessenen Fluoreszenzen, die Steigung einer Regressionsgeraden mittels linearer Regression berechnet. Dies wird an folgender Stelle genau beschrieben: <http://www.drmm.com/compensation/index.html> (161). Zum Ausgleich von Variabilität zwischen verschiedenen Replikaten einer Versuchsreihe wurden die kompensierten Daten so skaliert, dass die unstimulierten DRG-Neurone eine durchschnittliche Intensität von 1 a.u. aufwiesen. Unter Verwendung der R Pakete „grid“, „ggplot2“, „gridExtra“,

---

„MASS“, „knitr“ und „plyr“ wurden aus den Rohdaten ein- und zweidimensionale graphische Darstellungen der Wahrscheinlichkeitsdichten generiert und die durchschnittliche UCHL1-, pRII- und RII $\beta$ -Intensität pro Kondition berechnet, welche unter Verwendung von Microsoft Excel tabellarisch dargestellt wurden (156). Mögliche Subpopulationen wurden auf zwei verschiedene Weisen ausgeblendet. Zum einen durch das Setzen der Grenzwerte auf ein lokales Minimum der Wahrscheinlichkeitsdichten, zum anderen durch das Nutzen von „*threshold free mixture models*“ (engl. grenzwertfreier Mischverteilungsmodelle). Die durchschnittliche Anzahl der analysierten DRG-Neuronen aus LWS, BWS und HWS betrug 41992 ( $SD = 11203$ ) pro Versuchstier.

### 3.3.6 Statistische Analyse

Die kompensierten, normierten und gemittelten pRII-Fluoreszenz-Intensitäten wurden unter Verwendung von GraphPad PRISM weiterverarbeitet. Die Stoffmengenkonzentration wurden in molar (mol/l, M) umgerechnet und zur besseren Darstellung dekadisch logarithmiert. Unter Verwendung linearer Regressionen wurden Graphen erzeugt, um die pRII-Intensitäten unter verschiedenen Konditionen zu präsentieren. Dosis-Wirkungs-Beziehungen wurden mittels nicht-linearer Regressionen dargestellt und IC<sub>50</sub>-Werte ermittelt. Mit Hilfe von GIMP und Inkscape wurden letztere in graphische Darstellungen übersetzt. Die statistische Analyse wurde unter Verwendung von zweiseitigen T-Tests für abhängige Stichproben sowie Extra-Quadratsummen F-Tests mit GraphPad PRISM durchgeführt. Das gewählte Signifikanzniveau war  $\alpha = 0,05$ . Dementsprechend lag eine statistische Signifikanz zum Niveau  $\alpha$  vor, wenn  $p < 0,05$ .

---

## 4 Ergebnisse

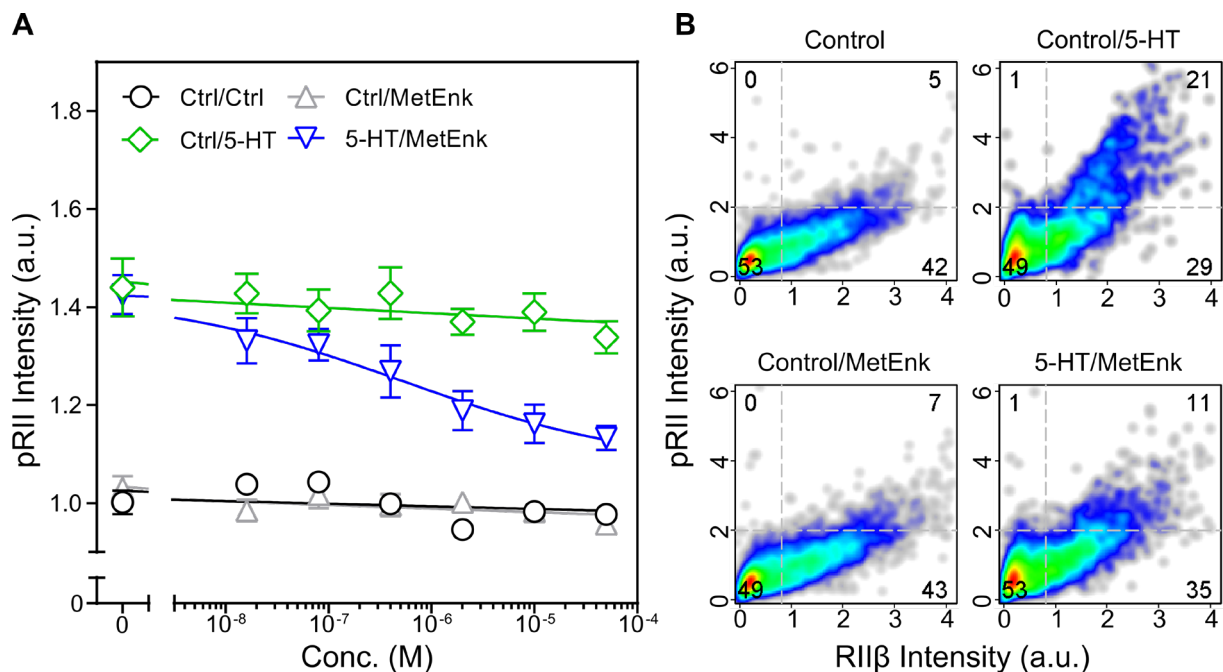
### 4.1 Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)

Wie in der Einleitung erläutert, wurden die Effekte isoformspezifischer und unspezifischer OR-Agonisten auf die PKA-II-Aktivierung in Vorarbeiten meiner Kollegin Ashley Storck umfangreich analysiert. Dabei zeigte sich, dass die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität unter Verwendung der getesteten OR-Agonisten partiell inhibiert werden kann ([Abb. 1, Unselective agonists, KOR Agonists, NOP Agonists](#)). Weitere Daten unserer Arbeitsgruppe weisen darauf hin, dass 5-HT ebenfalls ein potenter Aktivator der PKA-II-Aktivität ist und die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität durch die simultane Stimulation mit dem MOR-Agonisten Fentanyl (Fent) partiell inhibiert werden kann ([83](#)). In der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit untersuchte ich, ob die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität durch die Stimulation anderer OR-Rezeptorisoformen (KOR und NOP) inhibiert werden kann. Hierfür nutzte ich den, in der Einleitung erläuterten, „pRII/RII $\beta$ -Assay“ in Kombination mit HCS-Mikroskopie und führte Dosis-Wirkungs-Experimente durch. In diesen wurden die DRG-Neuronen mit 5-HT in fester Stoffmengenkonzentration (250 nM) und drei separaten OR-Agonisten in ansteigender Stoffmengenkonzentration (0  $\mu$ M, 0,016  $\mu$ M, 0,08  $\mu$ M, 0,4  $\mu$ M, 2  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M) drei Minuten lang stimuliert. Ich verwendete den endogenen unspezifischen Agonisten Met-Enkephalin (MetEnk), den KOR-spezifischen Agonisten Dynorphin A (Dyna) und den NOP-Rezeptor-spezifischen Agonisten Nozizeptin (Noc) und analysierte ihren dosisabhängigen Effekt auf die pRII-Intensität in An- und Abwesenheit von 5-HT.

Der Zugabe von 5-HT in einer Dosierung von 250 nM folgte ein Anstieg der PKA-II-Aktivität ([Abb. 2 - 4, A graue vs. grüne Linie](#)). Die durchschnittliche pRII-Intensität unstimulierter DRG-Neuronen betrug gemittelt über alle Replikate der Versuchsreihe 1,00 a.u. ( $SD = 0,034$ ). Die durchschnittliche pRII-Intensität der 5-HT-stimulierten DRG-Neuronen betrug gemittelt über alle Replikate der Versuchsreihe 1,40 a.u. ( $SD = 0,036$ ). Der Mittelwert der Änderung betrug dabei 0,40 a.u. ( $SD = 0,034$ ). Diese Änderung war statistisch signifikant [ $t(6) = 30,79, p < 0,0001$ ].

In Abwesenheit von 5-HT beeinflusste der unspezifische OR-Agonist Met-Enkephalin (0 - 50  $\mu$ M) die PKA-II-Aktivität nicht ([Abb.2, A schwarze vs. graue Linie](#)). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der durchschnittlichen pRII-Intensität unstimulierter ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,034$ ) und nur mit Met-Enkephalin behandelte DRG-Neuronen ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,024$ ) gemessen [ $t(6) = 0,1936, p = 0,8529$ ]. Bei simultaner Stimulation der DRG-Neuronen mit 5-HT (250 nM) und Met-Enkephalin (0 - 50  $\mu$ M) wurde eine dosisabhängige Inhibition der

5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität beobachtet. Dieser Effekt war jedoch auch unter der maximalen getesteten Met-Enkephalin-Konzentration (50  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Abb.2, A grüne vs. blaue Linie). Die durchschnittliche pRII-Intensität wurde von 1,43 a.u. ( $SD = 0,11$ ) in Abwesenheit von Met-Enkephalin auf 1,13 a.u. ( $SD = 0,065$ ) unter Verwendung von 50  $\mu\text{M}$  Met-Enkephalin reduziert (Abb.2, B Control/5-HT vs. 5-HT/MetEnk). Der Mittelwert der Änderung betrug -0.29 a.u. ( $SEM = 0,035$ ). Die Änderung war statistisch signifikant [ $t(6) = 8,312, p = 0,0002$ ]. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) lag bei 520 nM (Abb. 1, Unselective agonists, Met-Enkephalin).

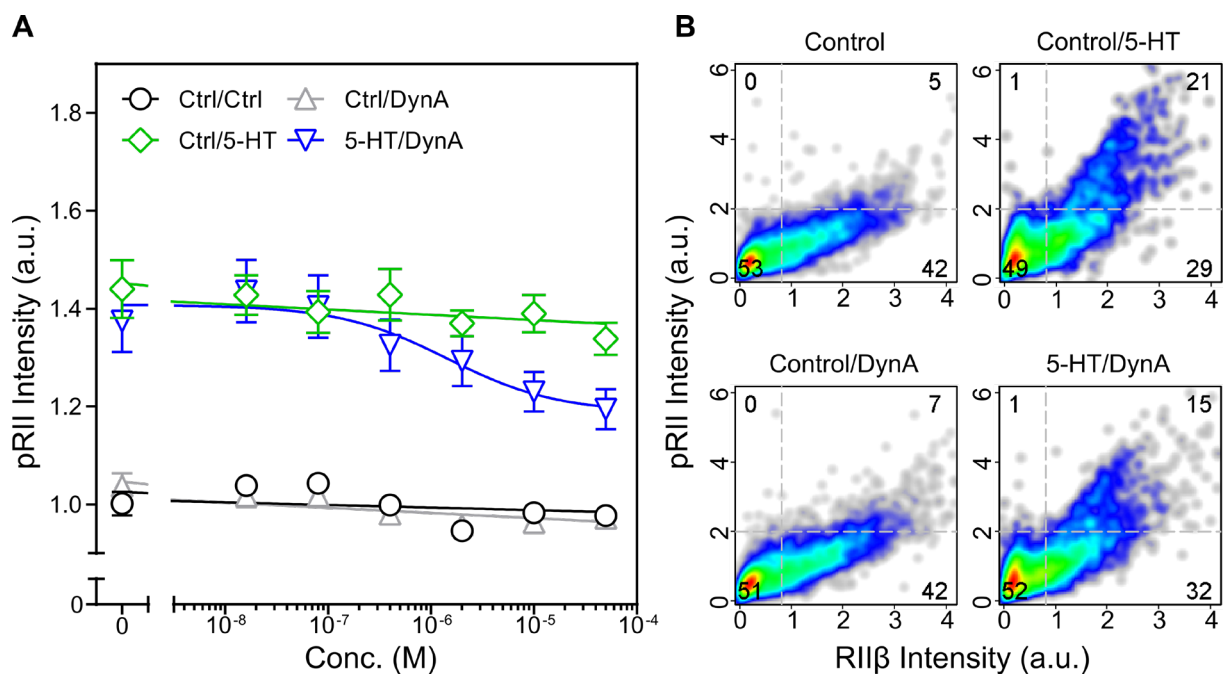


**Abbildung 2: Met-Enkephalin (unspezifisch) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts von Met-Enkephalin (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) auf die Serotoninantwort (250 nM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. 5-HT steigert die pRII-Intensität signifikant um durchschnittlich 0,40 a.u. [ $SD = 0,034, t(6) = 30,79, p < 0,0001$ ]. Met-Enkephalin zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Basalaktivität der PKA II [ $t(6) = 0,1936, p = 0,8529$ ]. Met-Enkephalin inhibiert dosisabhängig die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität ( $IC_{50} = 520$  nM). Der Effekt ist signifikant [ $t(6) = 8,312, p = 0,0002$ ], jedoch auch in hohen Dosierungen (50  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = -0,29$  a.u.  $\pm 0,035$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit 5-HT (250 nM) und nach Stimulation mit Met-Enkephalin (50  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von 5-HT. Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 7$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 585 ( $SD = 160$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Der KOR-Agonist Dynorphin A (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) zeigte keine Wirkung auf die PKA-II-Aktivität unstimulierter DRG-Neuronen (Abb. 3, A graue vs. schwarze Linie). Die durchschnittliche pRII-Intensität der unstimulierten DRG-Neuronen ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,034$ ) unterscheidet sich

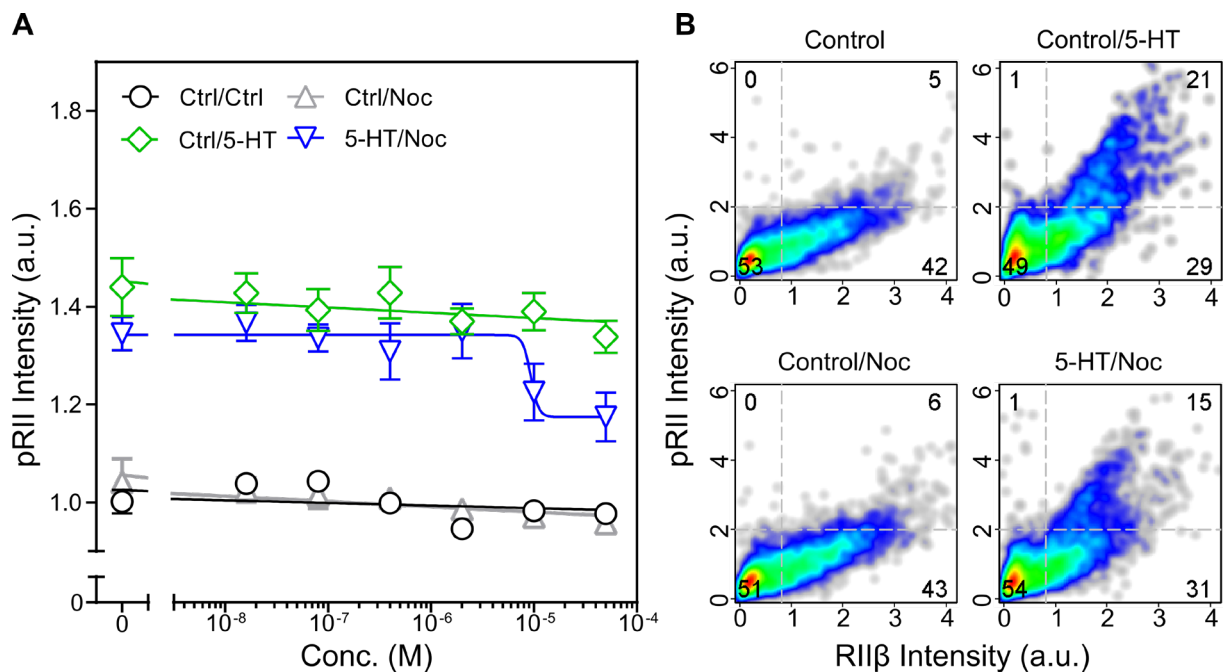


nicht signifikant von der Dynorphin-A-behandelter ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,031$ ) DRG-Neuronen [ $t(6) = 0,7456$ ,  $p = 0,4841$ ]. Wie oben für Met-Enkephalin beschrieben, konnte auch für Dynorphin A (0 – 50  $\mu\text{M}$ ) eine dosisabhängige Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität gemessen werden (Abb. 3, A grüne vs. blaue Linie). In hohen Stoffmengenkonzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) wurde letztere gemittelt über alle Replikate um 0,18 a.u. ( $SEM = 0,09$ ) reduziert (Abb. 3, B Control/5-HT vs. 5-HT/DynA). Die Inhibition der 5-HT-Antwort durch Dynorphin A war statistisch signifikant [ $t(6) = 5,281$ ,  $p = 0,0019$ ], jedoch nur partiell ausgeprägt. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 1,45  $\mu\text{M}$ . Der Effekt erwies sich, im Vergleich zur älteren Versuchsreihe, in der Forskolin anstelle von 5-HT genutzt wurde, als weniger stark ausgeprägt (Abb. 1, KOR Agonists Dynorphin A).



**Abbildung 3: Dynorphin A (KOR) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.** Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts von Dynorphin A (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) auf die Serotoninantwort (250 nM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. 5-HT steigert die pRII-Intensität signifikant um durchschnittlich 0,40 a.u. [ $SD = 0,034$ ,  $t(6) = 30,79$ ,  $p < 0,0001$ ]. Dynorphin A zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Basalaktivität der PKA II [ $t(6) = 0,7456$ ,  $p = 0,4841$ ]. Dynorphin A inhibiert dosisabhängig die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität ( $IC_{50} = 1,45$   $\mu\text{M}$ ). Der Effekt ist signifikant [ $t(6) = 5,281$ ,  $p = 0,0019$ ], jedoch auch in hohen Dosierungen (50  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = -0,18$  a.u.  $\pm 0,09$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit 5-HT (250 nM) und nach Stimulation mit Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von 5-HT. Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 7$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 585 ( $SD = 160$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Wie Met-Enkephalin und Dynorphin A zeigte Nozizeptin, als NOP-spezifischer Agonist, in dieser Versuchsreihe keinen Effekt auf die basale PKA-II-Aktivität (Abb. 4, B Control vs. Control/Noc). In Abwesenheit von 5-HT unterschieden sich die durchschnittlichen pRII-Intensitäten der Kontroll-DRG-Neuronen ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,034$ ) und der Nozizeptin-stimulierter DRG-Neuronen ( $M = 1,00$  a.u.,  $SD = 0,03$ ) nicht signifikant voneinander [ $t(6) = 0,2309$ ,  $p = 0,8251$ ]. Im oberen Konzentrationsbereich des getesteten Spektrums ( $50 \mu\text{M}$ ) reduzierte Nozizeptin die durch 5-HT gesteigerte pRII-Intensität um durchschnittlich  $0,18$  a.u. ( $SEM = 0,05$ ). Die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität wurde partiell inhibiert (Abb. 4, B Control/5-HT vs. 5-HT/Noc). Der dargestellte Effekt von Nozizeptin auf die 5-HT-Antwort war statistisch signifikant [ $t(5) = 3,579$ ,  $p = 0,01659$ ].



**Abbildung 4: Nozizeptin (NOP) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts von Nozizeptin (0 - 50  $\mu\text{M}$ ) auf die Serotoninantwort (250 nM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. 5-HT steigert die pRII-Intensität signifikant um durchschnittlich  $0,40$  a.u. [ $SD = 0,034$ ,  $t(6) = 30,79$ ,  $p < 0,0001$ ]. Nozizeptin zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Basalaktivität der PKA II [ $t(6) = 0,2309$ ,  $p = 0,8251$ ]. Nozizeptin inhibiert in hoher Dosierung (10  $\mu\text{M}$ ) die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität ( $IC_{50} = 9,31 \mu\text{M}$ ). Der Effekt ist signifikant [ $t(5) = 3,579$ ,  $p = 0,01659$ ], jedoch auch in hohen Dosierungen (50  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM =  $-0,18$  a.u.  $\pm$   $0,05$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit 5-HT (250 nM) und nach Stimulation mit Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) in Anwesenheit (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von 5-HT. Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 7$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 585 ( $SD = 160$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

---

Eine dosisabhängige Inhibition konnte in dem von uns dargestellten Konzentrationsspektrum nicht dargestellt werden (Abb. 4, A blaue vs. grüne Linie). Bei 10  $\mu\text{M}$  wurde bereits eine deutliche PKA-II-Inhibition gemessen. Die durchschnittliche Änderung betrug -0,12 ( $SD = 0,14$ ), welche sich unter Verwendung einer höheren Dosis (50  $\mu\text{M}$ , s. o.) nicht signifikant steigern ließ [ $t(6) = 1,235$   $p = 0,2632$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug 9,31  $\mu\text{M}$ . Der beschriebene Effekt stellte sich, im Vergleich zu Versuchsreihen, in denen Forskolin anstelle von 5-HT Verwendung fand, als weniger deutlich ausgeprägt dar (Abb. 1, NOP Agonists, Nociceptin).

Zusammenfassend zeigten die DRG-Neuronen, die in Abwesenheit von 5-HT mit OR-Agonisten behandelt wurden, keine Veränderung der RII-Phosphorylierung gegenüber der Kontrollkondition (Abb. 2-4, A graue vs. schwarze Linie). Dies deutet darauf hin, dass die basale Aktivität der PKA II nicht durch die Aktivierung der OR-Isoformen beeinflusst wird. Sämtliche getesteten OR-Agonisten zeigten in hohen Stoffmengenkonzentrationen (50  $\mu\text{M}$ ) einen signifikanten Effekt auf die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität. Dieser erwies sich in allen getesteten Konditionen als partiell ausgeprägt. So konnte die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität in hoher Dosierung der getesteten OR-Agonisten maximal um 0,29 a.u. reduziert werden. Hierbei erwies sich Met-Enkephalin als potentester Inhibitor der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität. Die dargestellte Dosis-Wirkungskurve von Nozizeptin unterschied sich in ihrem Verlauf deutlich von der von Met-Enkephalin und Dynorphin A. Während die Met-Enkephalin- und Dynorphin-A-vermittelte PKA-II-Inhibition in dem untersuchten Konzentrationsspektrum einen dosisabhängigen am ehesten sigmoidalen Kurvenverlauf aufwies, zeigte sich für Nozizeptin bei 10  $\mu\text{M}$  ein Sättigungseffekt, welcher sich unter Verwendung einer höheren Dosis (50  $\mu\text{M}$ ) nicht signifikant steigern ließ. Obwohl sich Met-Enkephalin in dieser Versuchsreihe als stärkster Inhibitor der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität hervortat, unterschied sich die Dosis-Wirkungskurve nicht signifikant von der, die unter Verwendung von Dynorphin A generiert wurde ( $F_{4, 88} = 1,933$ ,  $p = 0,1120$ ). Verglichen mit Versuchsreihen, in denen der direkte AC-Aktivator Forskolin genutzt wurde, wurden insgesamt weniger stark ausgeprägte Effekte beobachtet (Abb. 1, unselective agonists, KOR Agonists, NOP Agonists).

<b>OR-Agonist</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Mittelwertdifferenz ± SEM</b>	<b>t, df</b>	<b>p</b>
Met-Enkephalin	520 nM	-0,29 a.u. ± 0,035	<i>t</i> (6) = 8,312,	0,0002
Dynorphin A	1,45 μM	-0,18 a.u. ± 0,09	<i>t</i> (6) = 5,281	0,0019
Nozizeptin	9,31 μM	-0,18 a.u. ± 0,05	<i>t</i> (5) = 3,579	0,01659

**Tabelle 6: Zusammenfassung der statistischen Auswertung von 4.1 „Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)“.** Aufgelistet sind die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>), die Mittelwertdifferenz ± SEM sowie *t*-Wert, Freiheitsgrade (*df*) und *p*-Wert von Met-Enkephalin, Dynorphin A und Nozizeptin (0 - 50 μM) für die Inhibition der 5-HT-induzierten (250 nM) PKA-II-Aktivität.

---

## 4.2 Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch isolierte sowie kombinierte Anwendung von Fentanyl (MOR) und dem 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten GR113808

In älteren Arbeiten der Arbeitsgruppe konnte der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor als potenter und notwendiger Rezeptor der 5-HT-induzierten pRII-Antwort in DRG-Neuronen identifiziert werden. Hierfür gelang es durch Kostimulation mit dem 5-HT<sub>4</sub>-spezifischen Antagonisten GR113808 (Gr) den 5-HT-induzierten pRII-Anstieg zu blockieren (83). Beruhend auf diesen Daten, untersuchte ich im zweiten Teil dieser Arbeit, ob durch Koapplikation eines Opioids mit einem 5-HT<sub>4</sub>-Antagonisten synergistische inhibitorische Effekte auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort erzielt werden können.

Hierfür führte ich zwei Sets von Kombinationsexperimenten durch. Ich verwendete den oben genannten 5-HT<sub>4</sub>-spezifischen Antagonisten GR113808 und den MOR-Agonisten Fentanyl. Im ersten Set wurde der Effekt von GR113808 in ansteigender Stoffmengenkonzentration (0 µM, 0,0016 µM, 0,008 µM, 0,04 µM, 0,2 µM, 1 µM, 5 µM) auf eine niedrige stabile Fentanyldosis von 10 nM im Hinblick auf die Inhibition des 5-HT-Signals untersucht. Hierbei wurde anhand der Daten vorheriger Experimente die Fentanyldosis so gewählt, dass ohne Koapplikation keine signifikante pRII-Inhibition zu erwarten war. In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Effekt von Fentanyl in ansteigender Stoffmengenkonzentration (0 µM, 0,0032 µM, 0,016 µM, 0,08 µM, 0,4 µM, 2 µM, 10 µM) auf eine geringe stabile GR113808-Dosis von 5 nM im Hinblick auf die Inhibition des 5-HT-Signals analysiert. Ältere Daten ließen unter 5 nM GR113808 nur eine partielle Inhibition der 5-HT-induzierten pRII-Antwort erwarten (83). Die Stimulation der DRG-Neuronen erfolgte mit 5-HT in fester Dosierung (250 nM), die Stimulationszeit betrug in allen Versuchsreihen jeweils 3 Minuten.

Die Zugabe des 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten GR113808 in ansteigender Stoffmengenkonzentration zeigte keinen Effekt auf die pRII-Intensität unstimulierter DRG-Neuronen (Abb. 5, A graue vs. schwarze Linie). Die durchschnittliche pRII-Intensität der unstimulierten DRG-Neurone betrug gemittelt über alle Replikate der Versuchsreihe 1,00 a.u. ( $SD = 0,033$ ). In Abwesenheit von 5-HT wurde nach Stimulation der DRG-Neuronen mit GR113808 (0 - 10 µM) eine durchschnittliche pRII-Intensität von 0,99 a.u. ( $SD = 0,040$ ) gemessen. Die Differenz der durchschnittlichen pRII-Intensitäten war statistisch nicht signifikant [ $t(6) = 1,109, p = 0,3100$ ]. Die Behandlung der unstimulierten DRG-Neuronen mit einer ansteigenden Dosis Fentanyl verursachte in diesem Experiment eine Reduktion der pRII-Intensität unter die, auf 1 normierte, Kontrollbasislinie (Abb. 5, B graue vs. schwarze Linie). Die Differenz der durchschnittlichen pRII-Intensitäten unstimulierter DRG-Neuronen ( $M = 1,00$

---

a.u.,  $SD = 0,033$ ) und der, allein mit Fentanyl stimulierter, DRG-Neuronen ( $M = 0,94$  a.u.,  $SD = 0,020$ ) war statistisch signifikant [ $t(6) = 9,150, p < 0,0001$ ]. Dieser Effekt deckt sich jedoch nicht mit den Ergebnissen vorheriger Dosis-Wirkungs-Experimente (Abb. 1, MOR Agonists Fentanyl). Wie bereits in den vorherigen Experimenten gezeigt, gelang es in beiden Versuchsreihen mittels 5-HT die pRII-Intensität signifikant zu steigern (Abb. 5, A und B grüne Linie). Die durchschnittliche Änderung betrug dabei ca. 0,36 a.u. ( $SD = 0,029$ ) und war statistisch signifikant [ $t(6) = 32,84, p < 0,0001$ ].

GR113808 zeigte bereits in geringer Dosierung einen Effekt auf die Serotoninantwort. Die 5-HT-induzierte pRII-Antwort konnte durch die Applikation von 1,6 nM GR113808 partiell inhibiert werden. Ab einer Stoffmengenkonzentration von 1  $\mu$ M wurde eine vollständige Inhibition der PKA-II-Aktivität bis auf den Basalwert beobachtet. GR113808 erwies sich demzufolge als äußerst potenter Inhibitor der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 13,2 nM (Abb. 5, A blaue Linie). Dies deckt sich mit den zuvor erwähnten Ergebnissen älterer Studien unserer Arbeitsgruppe, in denen wir den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor als potenten und notwendigen Rezeptor der 5-HT-induzierten pRII-Antwort in DRG-Neuronen identifizieren konnten (83). Die Applikation einer Fentanyldosis von 10 nM zeigte in Abwesenheit von GR113808 keinen Effekt auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort (Abb. 5, C untere Reihe 0 nM). Wider Erwarten führte der oben beschriebene Effekt des 5-HT<sub>4</sub>-Antagonisten nicht zur Wirkungsverstärkung dieser Fentanylkonzentration auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort (Abb. 5, C obere vs. untere Reihe). Die Inhibition der PKA-II-Aktivität durch GR113808 allein zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber GR113808 in Kombination mit 10 nM Fentanyl [ $F_{4, 58} = 0,2893, p = 0,8838$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert für diese Kombination lag bei 17,6 nM.

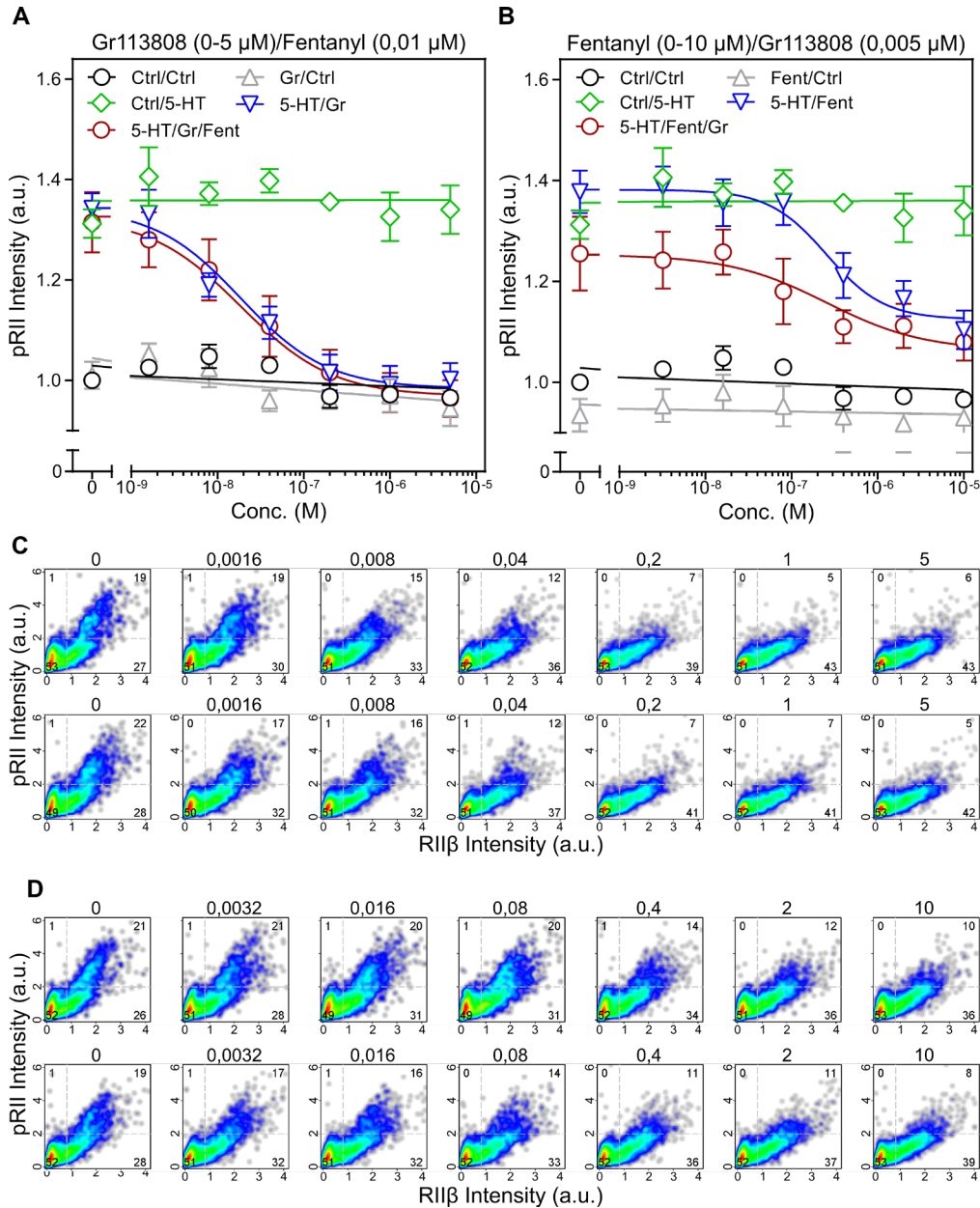
Die Stimulation mit Fentanyl in ansteigender Dosierung zeigte ab einer Stoffmengenkonzentration von 400 nM einen partiellen Effekt auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort der untersuchten DRG-Neuronen (Abb. 5, D obere Reihe). Auch in höherer Dosis (10  $\mu$ M) war der Effekt von Fentanyl auf die PKA-II-Aktivität nur partiell ausgeprägt. Eine vollständige Inhibition der pRII-Antwort bis auf den Basalwert wurde nicht erreicht (Abb. 5, B blaue Linie). Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 316 nM. Die dargestellten Ergebnisse ähneln denen, die in vorherigen Experimenten unter Verwendung von Forskolin anstelle von 5-HT generiert wurden (Abb. 1, MOR Agonists Fentanyl).

Die Koapplikation einer geringen GR113808-Dosis bewirkte einen statistisch signifikanten Effekt auf die Fentanyl-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $F_{4, 58} = 5,413, p = 0,0009$ ). Der signifikant unterschiedliche Kurvenverlauf wurde jedoch durch das Herabsetzen der Basis-pRII-Intensität, bereits in Abwesenheit von Fentanyl, hervorgerufen (Abb. 5, B blaue vs. rote Linie). Hier zeigte sich, in Abwesenheit von Fentanyl, wie nach Analyse der vorherigen Versuchsreihe

zu erwarten war, durch die Applikation einer GR113808-Dosis von 5 nM eine partielle Reduktion der 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität (Abb. 5, B rote Linie). Unter ansteigender Fentanyldosis konnte eine Verstärkung der GR113808-vermittelten PKA-II-Inhibition beobachtet werden (Abb. 5, D untere Reihe). Auch im oberen getesteten Konzentrationsspektrum (10 µM) war dieser Effekt nur partiell ausgeprägt. Eine vollständige Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität konnte durch Koapplikation von Fentanyl und einer stabilen GR113808-Dosis von 5 nM nicht erreicht werden. Der IC<sub>50</sub>-Wert betrug 83,2 nM. Im oberen getesteten Konzentrationsbereich (10 µM) wurde in Abwesenheit von GR113808 eine durchschnittliche pRII-Intensität von 1,10 a.u. (SD = 0,086) gemessen. In Anwesenheit von GR113808 betrug die pRII-Intensität durchschnittlich 1,08 a.u. (SD = 0,03). Die Differenz der gemessenen durchschnittlichen pRII-Intensitäten war statistisch nicht signifikant [ $t(4) = 1,967, p < 0,3461$ ].

Liganden	IC <sub>50</sub>
Fentanyl (0 - 10 µM)	316 nM
Fentanyl (0 - 10 µM) + GR113808 (5 nM)	83,2 nM
GR113808 (0 – 5 µM)	13,2 nM
GR113808 (0 – 5 µM) + Fentanyl (10 nM)	17,6 nM

**Tabelle 7: Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.2 „Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch isolierte sowie kombinierte Anwendung von Fentanyl (MOR) und dem 5-HT4-Rezeptor-spezifischen Antagonisten GR113808.** Aufgelistet sind die mittleren inhibitorischen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) von Fentanyl (0 - 10 µM), GR113808 (0 – 5 µM), Fentanyl (0 - 10 µM) in Kombination mit GR113808 (5 nM) und GR113808 (0 – 5 µM) in Kombination mit Fentanyl (10 nM) für die Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität.



**Abbildung 5: Fentanyl (10 nM) zeigt keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch GR113808. GR113808 (5 nM) reduziert bereits in Abwesenheit von Fentanyl die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.** (A - B) Dosis-Wirkungs-Kurve der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM in Relation zur GR113808- (0 - 5  $\mu$ M) bzw. Fentanylkonzentration (0 - 10  $\mu$ M). Stimulationszeit jew. 3 min. (A) GR113808 inhibiert dosisabhängig die 5-HT- (250 nM) induzierte PKA-II-Aktivität bis auf das Basalniveau ( $IC_{50} = 13,2$  nM). Fentanyl (10 nM) zeigt keinen Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch GR113808 [ $F_{4, 58} = 0,2893$ ,  $p = 0,8838$ ]. (B) Fentanyl inhibiert partiell, die 5-HT- (250 nM) induzierte PKA-II-Aktivität ( $IC_{50} = 316$  nM). Die maximale PKA-II-Inhibition durch Fentanyl (10  $\mu$ M) wird durch GR113808 nicht verstärkt [ $t(4) = 1,967$ ,  $p < 0,3461$ ], obwohl GR113808 die Dosis-Wirkungs-Kurve der PKA-II-Inhibition durch Fentanyl signifikant verändert ( $F_{4, 58} = 5,413$ ,  $p = 0,0009$ ). (C - D) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen nach (C) simultaner Stimulation mit 5-HT und steigender GR113808-Dosis in An- (unten) und Abwesenheit (oben) von Fentanyl und nach (D) simultaner Stimulation mit 5-HT und steigender Fentanyldosis in An- (unten) und Abwesenheit (oben) von GR113808. Die gestrichelten Linien zeigen gewählte Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 5$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 598 ( $SD = 79$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.



---

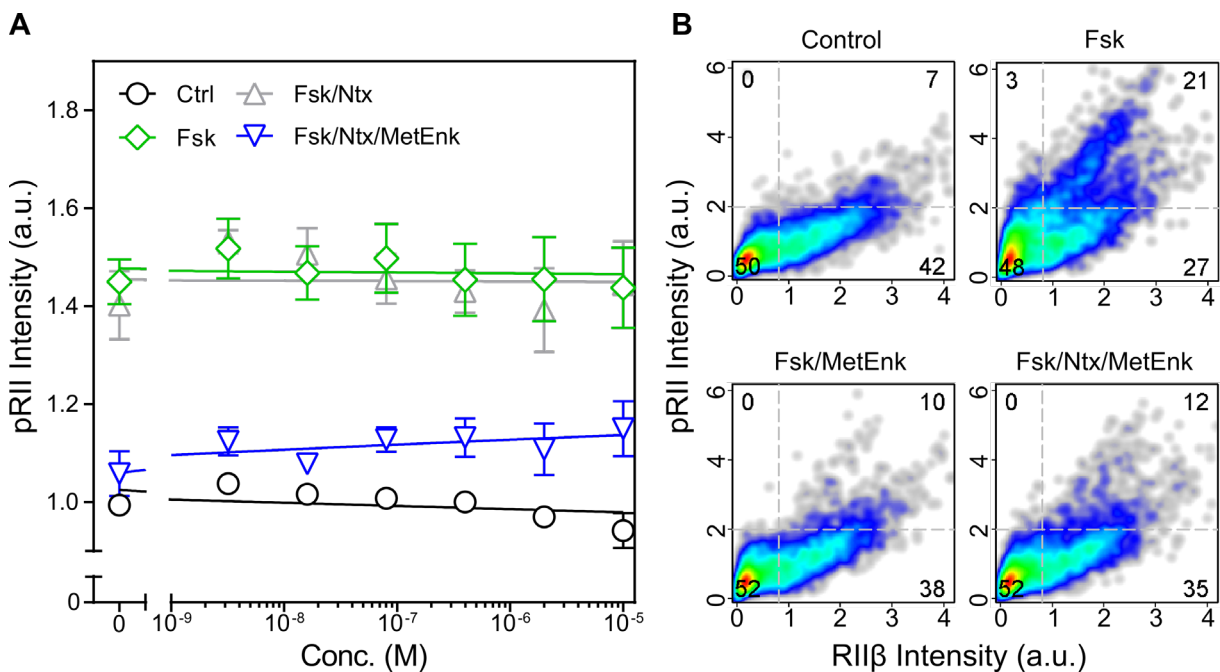
### **4.3 Reversion der Met-Enkephalin- (unspezifisch), DAMGO- (MOR), Deltorphin-II- (DOR), Dynorphin-A- (KOR) und Nozizeptin- (NOP) vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)**

Wie in der Einleitung erläutert, konnte in Vorarbeiten die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität mittels isoformspezifischer OR-Agonisten partiell inhibiert werden. Dabei zeigte sich, u. a. für KOR-Agonisten wie Dynorphin A, eine gegenüber MOR-Agonisten verminderte Potenz, trotz ähnlich ausgeprägter maximaler Wirksamkeit ([Abb. 1](#)). Dies ist möglicherweise mit dem Verlust der Selektivität von Dynorphin A in höherer Dosierung zu Gunsten des MOR zu erklären. Daher soll im folgenden Teil dieser Arbeit die dritte Frage bearbeitet werden, ob die beobachtete PKA-II-Inhibition tatsächlich durch die selektive Aktivierung der jeweiligen OR-Isoformen vermittelt wird. Dafür führte ich mehrere Kombinationsexperimente durch. In diesen wurden isoformspezifische OR-Agonisten mit den dazu passenden isoformspezifischen OR-Antagonisten kombiniert und die Effekte auf die Forskolin-induzierte pRII-Antwort untersucht. Ich nutzte die spezifischen OR-Agonisten DAMGO (MOR), Deltorphin II (DeltII, DOR), Dynorphin A (DynA, KOR), Nozizeptin (Noc, NOP) sowie den unspezifische OR-Agonisten Met-Enkephalin (MetEnk). Diese wurden jeweils mit den spezifischen OR-Antagonisten Naltrindol (NAL, DOR-selektiv), Norbinaltorphimin (norBNI, KOR-selektiv), JTC 801 (JTC, NOP-selektiv) und dem unspezifischen OR-Antagonisten Naltrexon (NTX) kombiniert. Nach fünfminütiger Prästimulation der Kulturen mit den jeweiligen Antagonisten (0 – 10 µM für NTX, 0 - 100 µM für NAL, JTC und norBNI) erfolgte eine dreiminütige Stimulation mit den jeweiligen OR-Agonisten (50 µM) und simultan mit dem direkten AC-Aktivator Forskolin (3 µM).

#### **4.3.1 Effekt des unspezifischen OR-Antagonisten Naltrexon auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten**

In diesem Experiment nutzte ich den unspezifischen OR-Antagonisten Naltrexon (NTX) und analysierte den Effekt auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition. Zu diesem Zweck führte ich mehrere Kombinationsexperimente durch, in denen die Kulturen nach fünfminütiger Prästimulation mit NTX in ansteigender Dosierung (0 µM, 0,0032 µM, 0,016 µM, 0,08 µM, 0,4 µM, 2 µM, 10 µM) mit Forskolin (3 µM) und den o. g. OR-Agonisten in fester Stoffmengenkonzentration (50 µM) stimuliert wurden. Die Stimulation mit Forskolin resultierte in allen Replikaten in einem Anstieg der PKA-II-Aktivität ([Abb. 6 - 9](#), [A schwarze vs. grüne Linie](#)). Die über alle Replikate gemittelte Differenz der pRII-Intensitäten betrug 0,47 a.u.

( $SD = 0,019$ ). Die Aktivierung der PKA II durch Forskolin war statistisch signifikant [ $t(6) = 67,26, p < 0,0001$ ]. NTX allein zeigte keine Wirkung auf die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität (Abb. 6 - 9, A grüne vs. graue Linie). Es wurde kein statistisch signifikanter Unterschied der Forskolin-Antwort in An- ( $M = 1,45$  a.u.,  $SD = 0,052$ ) und Abwesenheit von NTX ( $M = 1,47$  a.u.;  $SD = 0,029$ ) gemessen [ $t(6) = 1,205, p = 0,2736$ ]. In Abwesenheit von NTX konnte nach Stimulation mit allen getesteten OR-Agonisten eine partielle Inhibition der Forskolin-Antwort gemessen werden (Abb. 6 - 9, A blaue Linie  $0 \mu\text{M}$ ). Unter Verwendung von Met-Enkephalin wurde eine deutliche Reduktion der Forskolin-induzierten pRII-Intensität gemessen (Abb. 6, B Fsk vs. Fsk/MetEnk). Gemittelt über alle Replikate reduzierte Met-Enkephalin die pRII-Intensität auf  $1,06$  a.u. ( $SD = 0,10$ ).

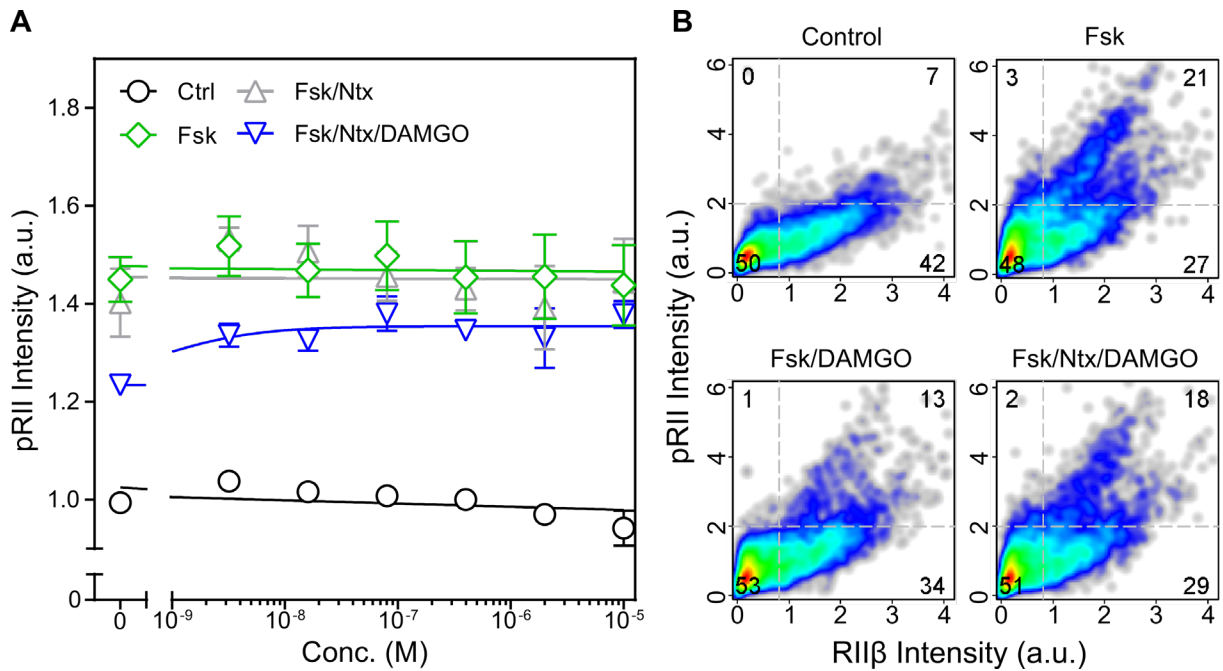


**Abbildung 6: Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten, Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX (0 -  $10 \mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort ( $3 \mu\text{M}$ ) durch Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,205, p = 0,2736$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf  $1,06$  a.u. ( $SD = 0,10$ ). NTX revertiert dosisabhängig die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  außerhalb des Konzentrationsbereichs). Der Effekt ist auch in hoher Dosierung ( $10 \mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM =  $0,092$  a.u.  $\pm$   $0,058$ ) und statistisch nicht signifikant [ $t(4) = 1,591, p = 1,868$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) und Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX ( $10 \mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 5$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $756$  ( $SD = 227$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

---

NTX revertiert dosisabhängig die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ([Abb. 6, A blaue Linie](#)). Der Effekt ließ sich nur begrenzt steigern, sodass bei höherer Dosierung (10  $\mu\text{M}$ ) nur eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition beobachtet wurde ([Abb. 6, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/MetEnk](#)). Im oberen getesteten Konzentrationspektrum (10  $\mu\text{M}$ ) wurde eine durchschnittliche Änderung der pRII-Intensität um 0,092 a.u. ( $SEM = 0,058$ ) gemessen. Die Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX war in dem von mir gewählten Konzentrationspektrum jedoch statistisch nicht signifikant [ $t(4) = 1,591, p = 0,1868$ ]. Es konnte weder eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung abgeleitet noch ein Sättigungseffekt beobachtet werden. Somit konnte der  $IC_{50}$ -Wert nicht sicher bestimmt werden und lag außerhalb des untersuchten Konzentrationsbereichs ([Tab. 8, NTX/Met-Enkephalin](#)).

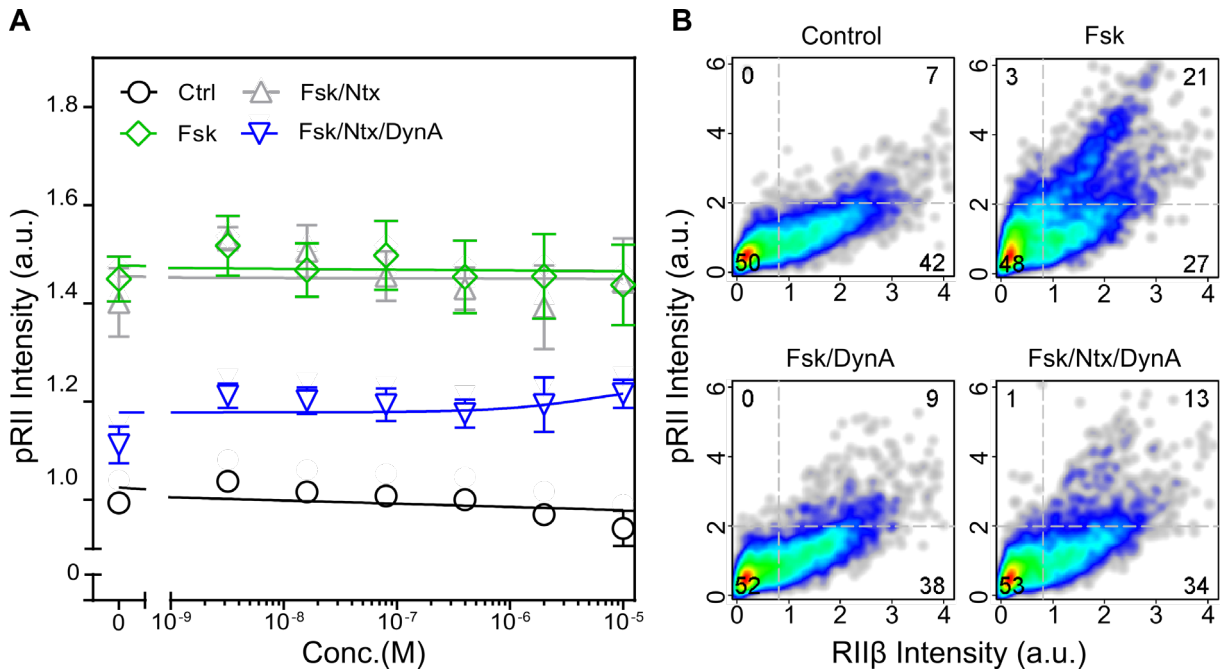
In Abwesenheit von NTX zeigte der MOR-Agonist DAMGO (50  $\mu\text{M}$ ) eine deutliche Inhibition der Forskolin-Antwort ([Abb. 7, B Fsk vs. Fsk/DAMGO](#)). Dies deckt sich mit den Ergebnissen vorheriger Arbeiten unserer Arbeitsgruppe ([Abb. 1, DAMGO](#)). Die über alle Replikate gemittelte pRII-Intensität der mit Fsk und DAMGO inkubierten DRG-Neuronen betrug in Abwesenheit von NTX 1,23 a.u. ( $SD = 0,043$ ). Die Prästimulation mit NTX führte zu einer Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO ([Abb. 7, B Fsk/DAMGO vs. Fsk/Ntx/DAMGO](#)). Bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich (3,2 nM) wurde eine Reduktion des DAMGO-Effekts auf die pRII-Antwort beobachtet. Der Effekt erwies sich, jedoch auch unter Verwendung höherer NTX-Dosierungen, nur als partiell ausgeprägt. Eine vollständige Reversion der DAMGO-vermittelten PKA-II-Inhibition wurde nicht erreicht. Der Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve lässt einen Sättigungseffekt vermuten ([Abb. 7, A blaue Linie](#)). Der Mittelwert der Differenzen betrug im oberen Konzentrationsbereich (100  $\mu\text{M}$ ) 0,14 a.u. ( $SEM = 0,04$ ). Die Reversion der DAMGO-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX war statistisch signifikant [ $t(4) = 3,549, p = 0,0238$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag außerhalb des von uns gewählten Konzentrationsbereichs, war jedoch sicher  $< 3.2$  nM ([Tab. 8, NTX/DAMGO](#)).



**Abbildung 7: Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX (0 - 10  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch DAMGO (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (6) = 1,205,  $p$  = 0,2736]. DAMGO inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,06 a.u. ( $SD$  = 0,10). NTX revertiert die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  < 3.2 nM). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t$  (4) = 3,549,  $p$  = 0,0238], jedoch auch in hoher Dosierung (10  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,14 a.u.  $\pm$  0,04). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und DAMGO (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX (10  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 5 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $756 \pm$  ( $SD$  = 227) DRG-Neuronen pro Kondition.

Der KOR-Agonist Dynorphin A (50  $\mu$ M) erwies sich ebenfalls als potenter Inhibitor der Forskolin-induzierten PKA-II-Aktivität (Abb. 8, B Fsk vs. Fsk/DynA). In Abwesenheit von NTX wurde die Forskolin-Antwort durch Dynorphin A durchschnittlich auf 1,11 a.u. reduziert ( $SD$  = 0,08). Wie auch für DAMGO beschrieben, konnte bereits unter Verwendung geringer NTX-Konzentration (3,2 nM) eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A gemessen werden. Im nanomolaren Bereich bildete sich keine Dosis-Wirkungs-Beziehung ab, sodass für Konzentrationen bis 400 nM ein Sättigungseffekt angenommen werden konnte. Ab Konzentrationen von 2  $\mu$ M konnte jedoch ein erneuter Anstieg der pRII-Intensität gemessen werden (Abb. 8, A blaue Linie). Auch unter Verwendung hoher NTX-Dosierungen (10  $\mu$ M) konnte keine vollständige Reversion der Dynorphin-A-induzierten PKA-II-Inhibition erzielt werden (Abb. 8, B Fsk/DynA vs. Fsk/Ntx/DynA). Der Mittelwert der Unterschiede betrug im

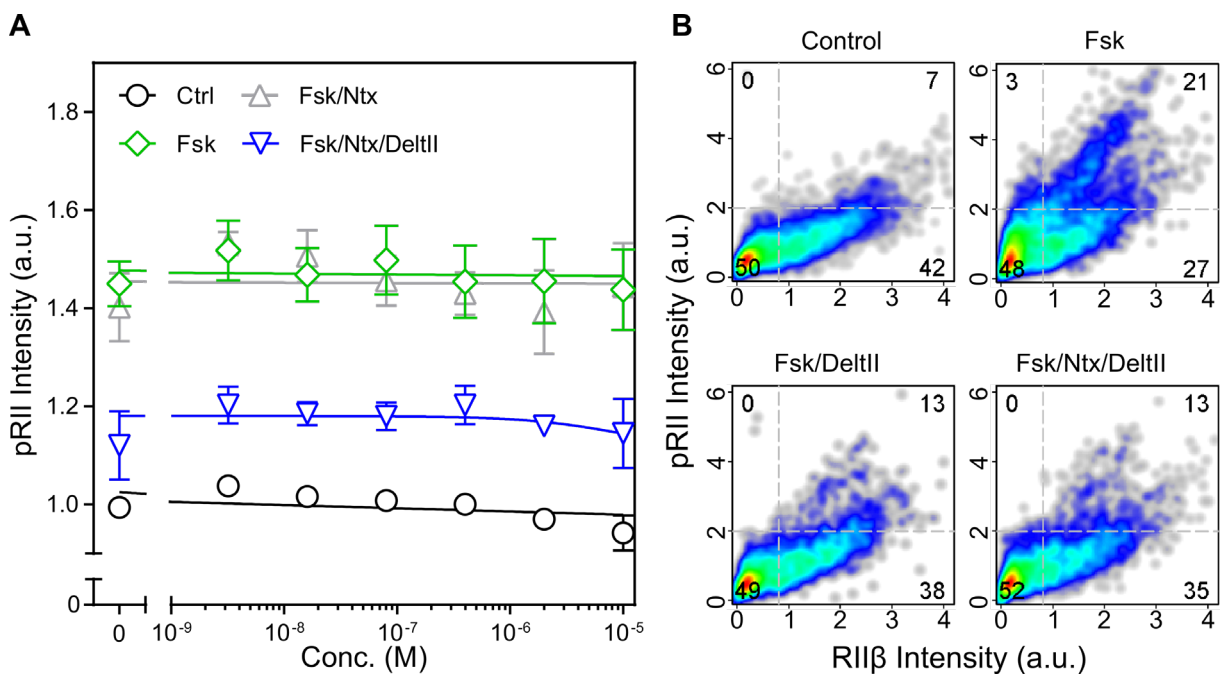
oberen Bereich des getesteten Konzentrationsspektrums (100  $\mu\text{M}$ ) 0,10 a.u. ( $SEM = 0,024$ )  
 Die Reversion der Dynorphin-II-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX war statistisch signifikant [ $t(4) = 4,296, p = 0,0127$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug 5.9  $\mu\text{M}$  (Tab. 8, NTX/Dynorphin A).



**Abbildung 8: Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).**  
 (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX (0 - 10  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,205, p = 0,2736$ ]. Dynorphin A inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,11 a.u. ( $SD = 0,08$ ). NTX revertiert die Dynorphin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} < 5,9 \mu\text{M}$ ). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(4) = 4,296, p = 0,0127$ ], jedoch auch in hoher Dosierung (10  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,10 \text{ a.u.} \pm 0,024$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX (10  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 5$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $756 \pm (SD = 227)$  DRG-Neuronen pro Kondition.

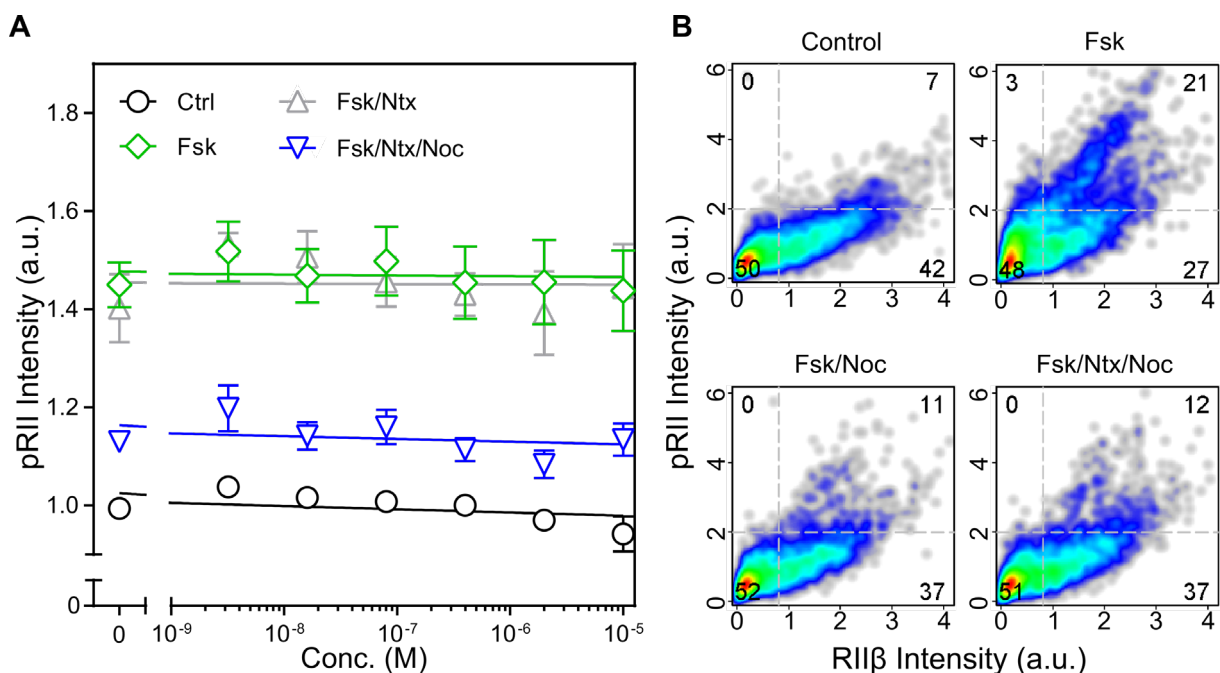
Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) reduziert als DOR-Agonist in Abwesenheit von NTX die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität durchschnittlich auf 1,12 a.u. ( $SD = 0,12$ ). Unter Verwendung von Met-Enkephalin, DAMGO und Dynorphin A zeigte NTX im unteren nanomolaren Bereich (3,2 nM) einen Effekt auf die opioidinduzierte PKA-II-Inhibition. Dieser Effekt wurde ebenfalls unter Stimulation mit Deltorphin II beobachtet. Im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (3,2 nM) führte die Prästimulation mit NTX zu einer partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II. Jedoch zeigte sich hier eine große Streuung der Messwerte. Der Effekt ließ sich

durch Verwendung höherer NTX-Dosen (10  $\mu\text{M}$ ) nicht steigern, sodass ein Sättigungseffekt angenommen werden konnte (Abb. 9, A blaue Linie). NTX zeigt insgesamt eine schwach ausgeprägte Wirkung auf die Deltorphin-II-vermittelte PKA-II-Inhibition (Abb. 9, B Fsk/DelII vs. Fsk/Ntx/DelII). Der ermittelte  $\text{IC}_{50}$ -Wert liegt für Deltorphin II bei  $< 3.2 \text{ nM}$  (Tab. 8, NTX/Deltorphin II). Die durchschnittliche Änderung betrug 0,093 a.u. ( $\text{SEM} = 0,054$ ). Die Reversion der Deltorphin-II-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX war statistisch nicht signifikant [ $t(2) = 1,740, p = 0,2240$ ].



**Abbildung 9: Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten, Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX (0 - 10  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,205, p = 0,2736$ ]. Deltorphin II inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,12 a.u. ( $\text{SD} = 0,12$ ). NTX revertiert die Deltorphin-II-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $\text{IC}_{50} < 3.2 \text{ nM}$ ). Der Effekt ist auch in hoher Dosierung (10  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,093 a.u.  $\pm$  0,054) und ist statistisch nicht signifikant [ $t(2) = 1,740, p = 0,2240$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RIIB-gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX (10  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RIIB-negativen und RIIB-positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 5$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $756 \pm (\text{SD} = 227)$  DRG-Neuronen pro Kondition.

Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt, kann unter Verwendung des NOP-Agonisten Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität partiell inhibiert werden (Abb. 10, B Fsk vs. Fsk/Noc, Abb. 1 NOP Agonists, Nocicieptin). Gemittelt über alle Replikate wurde in Abwesenheit von NTX eine Reduktion der pRII-Intensität auf 1,13 a.u. ( $SD = 0,073$ ) gemessen. Die durchschnittliche pRII-Intensität der Nozizeptin-behandelten DRG-Neurone unterschied sich in Abwesenheit ( $M = 1,13$ ,  $SD = 0,073$ ) und Anwesenheit von NTX ( $M = 1,13$  a.u.,  $SD = 0,038$ ) nicht signifikant [ $t(3) = 0,2384$ ,  $p = 0,8269$ ]. Demzufolge ist davon auszugehen, dass NTX die Nozizeptin-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort nicht beeinflusst (Abb. 10, B Fsk/Noc vs. Fsk/Ntx/Noc).



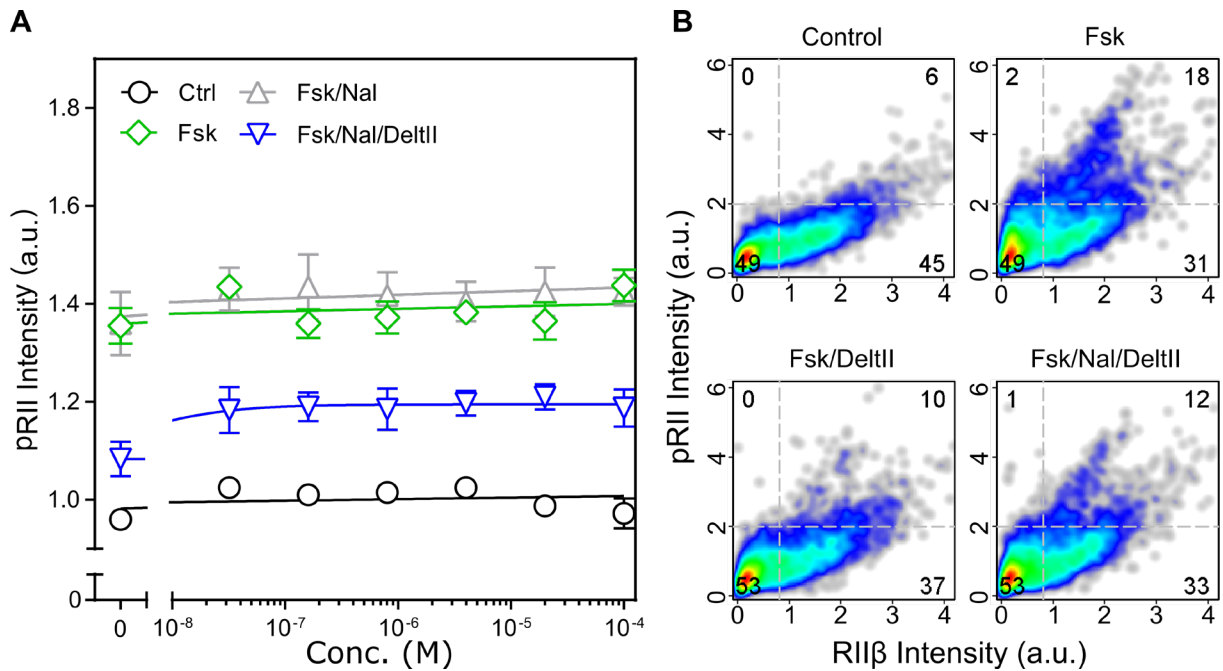
**Abbildung 10: Naltrexon (unspezifisch) zeigt keinen Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX (0 - 10  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,205$ ,  $p = 0,2736$ ]. Nozizeptin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,13 a.u., ( $SD = 0,073$ ). NTX hat keinen signifikanten Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(3) = 0,2384$ ,  $p = 0,8269$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX (10  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 5$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $756 \pm (SD = 227)$  DRG-Neuronen pro Kondition.

---

### 4.3.2 Effekt des DOR-Antagonisten Naltrindol auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten

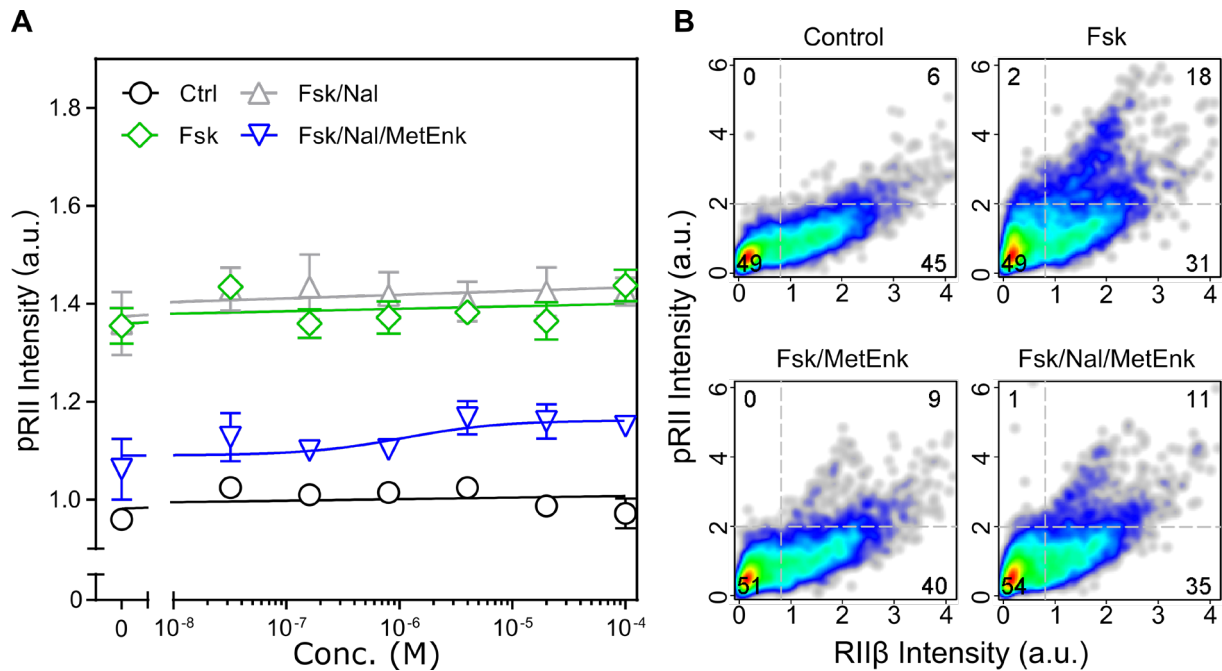
Unter Verwendung des DOR-spezifischen Agonisten Deltorphin II zeigte sich in vorherigen Studien eine partielle Inhibition der Forskolin-induzierten pRII-Antwort ([Abb. 1, DOR Agonists Deltorphin II](#)). Um zu untersuchen, ob dieser Effekt spezifisch durch DOR vermittelt wird, analysierte ich die Wirkung des DOR-spezifischen Antagonisten Naltrindol (NAL) auf die OR-induzierte PKA-II-Inhibition. Hierfür nutzte ich den oben beschriebenen Versuchsaufbau. Die fünfminütige Prästimulation erfolgte anstelle von NTX mit NAL in ansteigender Dosierung (0  $\mu$ M, 0,032  $\mu$ M, 0,16  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M). Die anschließende Stimulation wurde mit Forskolin (3  $\mu$ M) und den o. g. OR-Agonisten in fester Dosierung (50  $\mu$ M) durchgeführt. Die Prästimulation der DRG-Neuronen mit NAL in steigender Stoffmengenkonzentration (0 - 100  $\mu$ M) zeigte in Abwesenheit der OR-Agonisten keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 2,132, p = 0,0770$ ]. Demzufolge beeinflusst Naltrindol die Forskolin-Antwort in Abwesenheit von OR-Agonisten nicht ([Abb. 11 - 15, A graue vs. grüne Linie](#)). Wie bereits in vorherigen Studien gezeigt, gelang es mittels aller getesteter OR-Agonisten, die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität partiell zu inhibieren ([Abb. 11 - 15, B Fsk vs. Fsk/OR-Agonist](#)). Deltorphin II (50  $\mu$ M) erwies sich dabei erneut als potenter Inhibitor der Forskolin-Antwort ([Abb. 11, B Fsk vs. Fsk/DeltII](#)). Die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität wurde unter Verwendung von Deltorphin II (50  $\mu$ M) durchschnittlich auf 1,08 a.u. ( $SD = 0,061$ ) reduziert. Naltrindol revertiert bereits im nanomolaren Konzentrationsbereich (32 nM) partiell die Deltorphin-II-vermittelte PKA-II-Inhibition ([Abb. 11, A blaue Linie](#)). Der Effekt ließ sich nicht dosisabhängig steigern, sodass hier ein Sättigungseffekt angenommen werden kann. Der Mittelwert der Differenzen betrug im oberen getesteten Konzentrationsspektrum (100  $\mu$ M) 0,12 a.u. ( $SEM = 0,015$ ). Eine vollständige Reversion der Deltorphin-II-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NAL wurde nicht erreicht. Der Effekt war statistisch signifikant [ $t(2) = 7,856, p = 0,0158$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei  $< 32$  nM und war dementsprechend außerhalb des von uns gewählten Konzentrationsbereichs ([Tab. 8, NAL/Deltorphin II](#)).





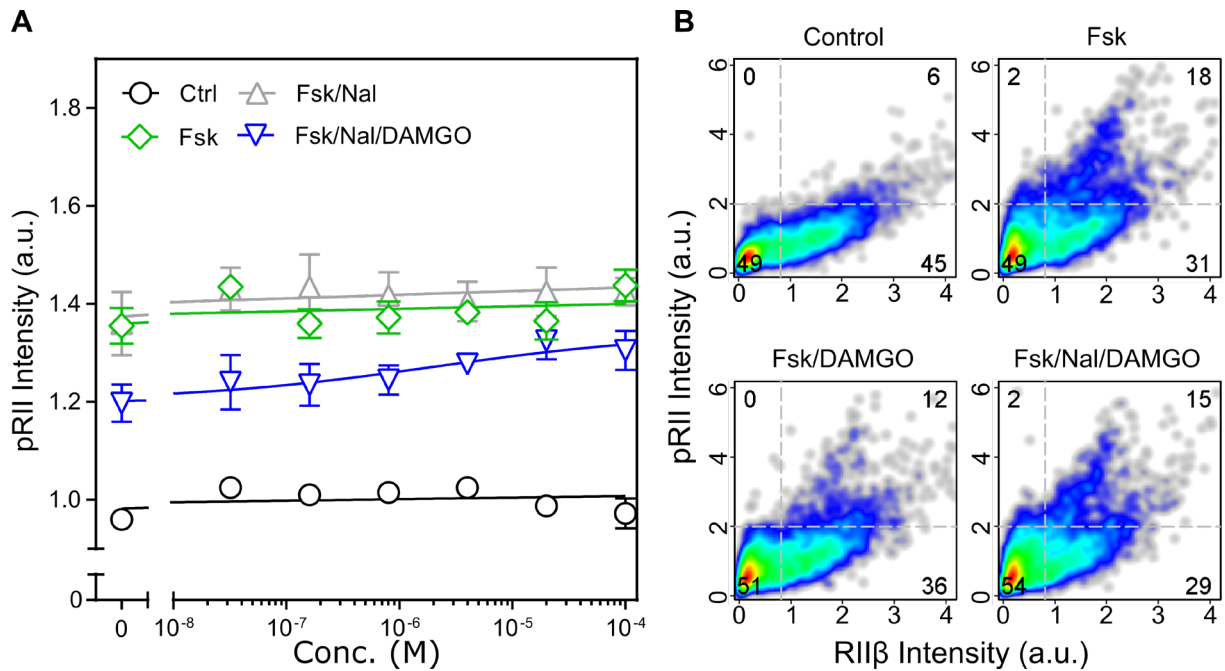
**Abbildung 11: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Deltorphin II (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NAL allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (6) = 2,132,  $p$  = 0,0770]. Deltorphin II inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,08 a.u. ( $SD$  = 0,06). NAL revertiert die Deltorphin-II-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  < 32 nM). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t$  (2) = 7,856,  $p$  = 0,0158], jedoch auch in hoher Dosierung (100  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,12 a.u.  $\pm$  0,015). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und Deltorphin II (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (100  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 4 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $921 \pm$  ( $SD$  = 147) DRG-Neuronen pro Kondition.

Unter Verwendung von Met-Enkephalin (50  $\mu$ M) wurde das pRII-Signal in Abwesenheit von NAL durchschnittlich auf 1,06 a.u. ( $SD$  = 0,13) reduziert (Abb. 12, B Fsk vs. Fsk/MetEnk). Die Prästimulation mit NAL (0 – 100  $\mu$ M) resultierte in einer Reversion des beschriebenen Effekts. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 1,1  $\mu$ M (Tab. 8, NAL/MetEnk). Die Reversion der PKA-II-Inhibition war unter Verwendung einer hohen Naltrindoldosis (100  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Abb. 12, B Fsk vs. Fsk/MetEnk vs. Fsk/Nal/MetEnk). Der Mittelwert der Differenzen betrug unter Verwendung von 100  $\mu$ M NAL 0,088 a.u. ( $SEM$  = 0,051). Die dargestellte Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition war statistisch nicht signifikant [ $t$  (3) = 1,714,  $p$  = 0,1851].



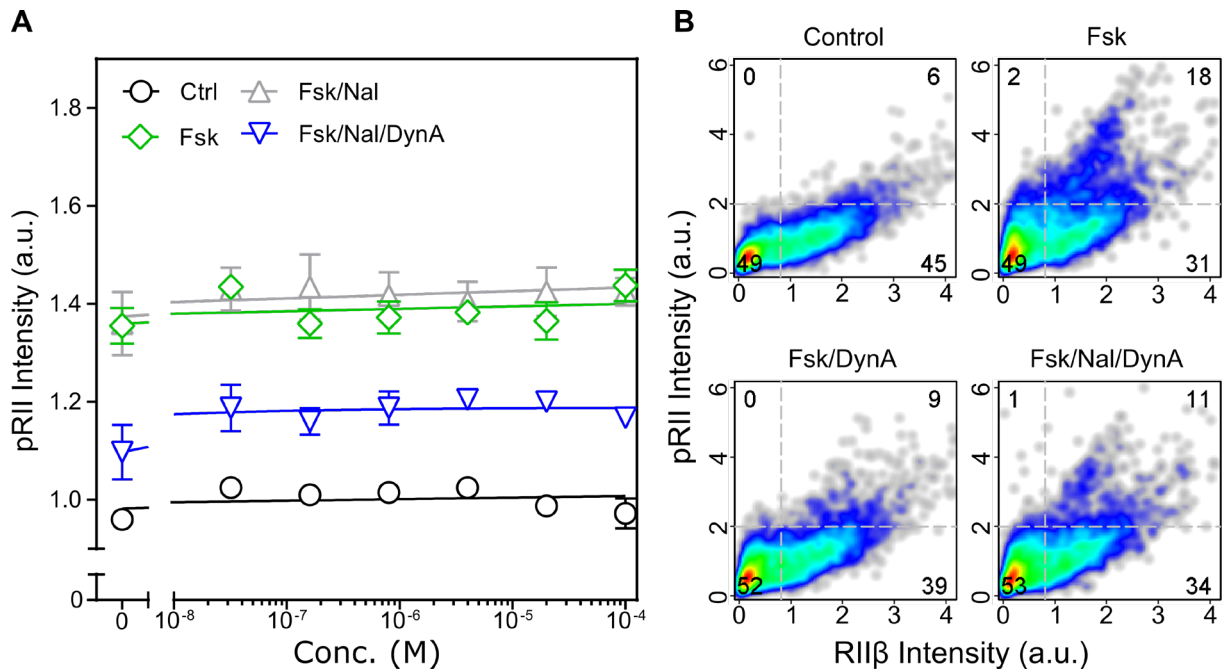
**Abbildung 12: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Met-Enkephalin (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NAL allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (6) = 2,132,  $p$  = 0,0770]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,06 a.u. ( $SD$  = 0,13). NAL revertiert die Met-Enkephalin vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  = 1,1  $\mu$ M). Der Effekt ist in hoher Dosierung (100  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,088 a.u.  $\pm$  0,051) und statistisch nicht signifikant [ $t$  (3) = 1,714,  $p$  = 0,1581]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und Met-Enkephalin (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (100  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 4 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 921 ( $SD$  = 147) DRG-Neuronen pro Kondition.

Der MOR-Agonist DAMGO (50  $\mu$ M) inhibierte die Forskolin-Antwort zuverlässig (Abb. 13, B Fsk vs. Fsk/DAMGO). Es wurde eine durchschnittliche Reduktion der Forskolin-Antwort auf 1,2 a.u. ( $SD$  = 0,077) gemessen. NAL-prästimulierte DRG-Neuronen zeigten eine partielle, dosisabhängige Reversion der DAMGO-vermittelten PKA-II-Inhibition (Abb. 13, A blaue Linie). Die Reversion der PKA-II-Inhibition war bereits ab einer NAL-Konzentration von 20  $\mu$ M maximal. Unter Verwendung von 20  $\mu$ M NAL zeigte sich eine signifikante Reversion der DAMGO-vermittelten PKA-II-Inhibition [ $t$  (3) = 3,380,  $p$  = 0,0431] um durchschnittlich 0,13 a.u. ( $SEM$  = 0,038). Dahingegen wurde bei weiterer Dosissteigerung auf 100  $\mu$ M NAL eine Reversion um durchschnittlich 0,11 a.u. ( $SEM$  = 0,051) gemessen, die statistisch nicht signifikant war [ $t$  (3) = 2,106,  $p$  = 0,1259]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 2,1  $\mu$ M (Tab. 8, NAL/DAMGO).



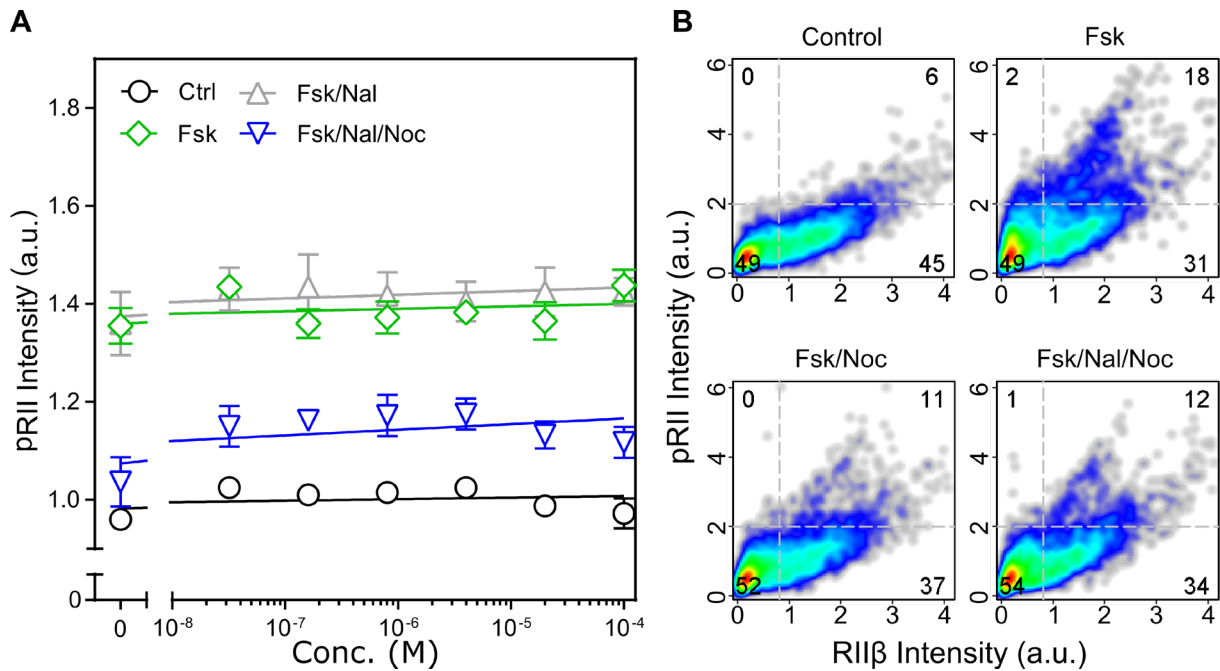
**Abbildung 13: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch DAMGO (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NAL allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (6) = 2,132,  $p$  = 0,0770]. DAMGO inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,2 a.u. ( $SD$  = 0,077). NAL revertiert die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  = 2,1  $\mu$ M). Der Effekt ist in hoher Dosierung (100  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,11 a.u.  $\pm$  0,051) und statistisch nicht signifikant [ $t$  (3) = 2,106,  $p$  = 0,1259], wohingegen sich unter Verwendung von 20  $\mu$ M eine statistisch signifikante [ $t$  (3) = 3,380,  $p$  = 0,0431] Reversion um durchschnittlich 0,13 a.u. (SEM = 0,038) zeigt. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und DAMGO (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (100  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 4 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 921 ( $SD$  = 147) DRG-Neuronen pro Kondition.

Unter Verwendung von Dynorphin A (KOR) wurde in Abwesenheit von NAL eine Reduktion der Forskolin-Antwort auf durchschnittlich 1,10 a.u. ( $SD$  = 0,11) gemessen (Abb. 14, B Fsk vs. Fsk/DynA). NAL revertierte in geringer Dosis (32 nM) partiell die Dynorphin-A-vermittelte PKA-II-Inhibition (Abb. 14, B Fsk/DynA vs. Fsk/Nal/Dyn). Durch eine Konzentrationssteigerung (100  $\mu$ M) wurde dieser Effekt nicht verstärkt (Abb. 14, A blaue Linie). Die durchschnittliche Differenz der pRII-Intensitäten betrug im oberen getesteten Konzentrationsbereich 0,07 a.u. ( $SEM$  = 0,052). Eine vollständige Reversion wurde nicht erreicht. Die dargestellte Reversion der Dynorphin-A-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NAL war statistisch nicht signifikant [ $t$  (3) = 1,343,  $p$  = 0,2718]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag unterhalb des von uns gewählten Konzentrationsbereiches (Tab. 8, NAL/Dynorphin A, NAL/Deltorphin II).



**Abbildung 14: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Dynorphin A (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NAL allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (6) = 2,132,  $p$  = 0,0770]. Dynorphin A inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,10 a.u. ( $SD$  = 0,11). NAL revertiert die Dynorphin-A-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50}$  < 32 nM). Der Effekt ist nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,07 a.u.  $\pm$  0,052) und statistisch nicht signifikant [ $t$  (3) = 1,343,  $p$  = 0,2718]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und Dynorphin A (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (100  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 4 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 921 ( $SD$  = 147) DRG-Neuronen pro Kondition.

Wie mit den zuvor präsentierten Daten gezeigt, inhibiert Nozizeptin (50  $\mu$ M) die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität substantiell (Abb. 10 und 15, B Fsk vs. Fsk/Noc). NAL revertierte in hoher Dosierung (100  $\mu$ M) signifikant die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t$  (2) = 10,58,  $p$  = 0,0088]. Die über alle Replikate gemittelte Differenz der pRII-Intensitäten betrug 0,093 a.u. ( $SEM$  = 0,0088). Hierbei unterlagen die Werte jedoch einer deutlichen Streuung (Abb. 15, A blaue Linie).

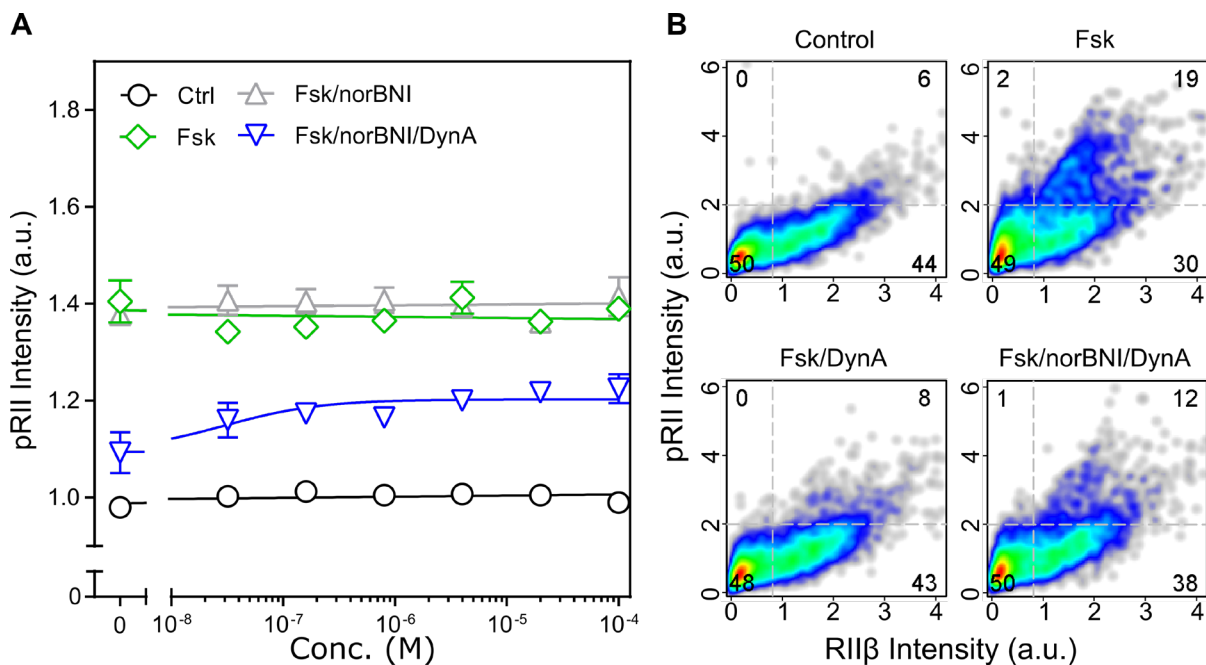


**Abbildung 15: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).** Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Nozizeptin (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NAL allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 2,132$ ,  $p = 0,0770$ ]. Nozizeptin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,04 a.u. ( $SD = 0,087$ ). NAL revertiert die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} < 32$  nM). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(2) = 10,58$ ,  $p = 0,0088$ ], jedoch nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,093 a.u.  $\pm$  0,0088). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und Nozizeptin (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (100  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 921 ( $SD = 147$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

### 4.3.3 Effekt des KOR-Antagonisten Norbinaltorphimin auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten

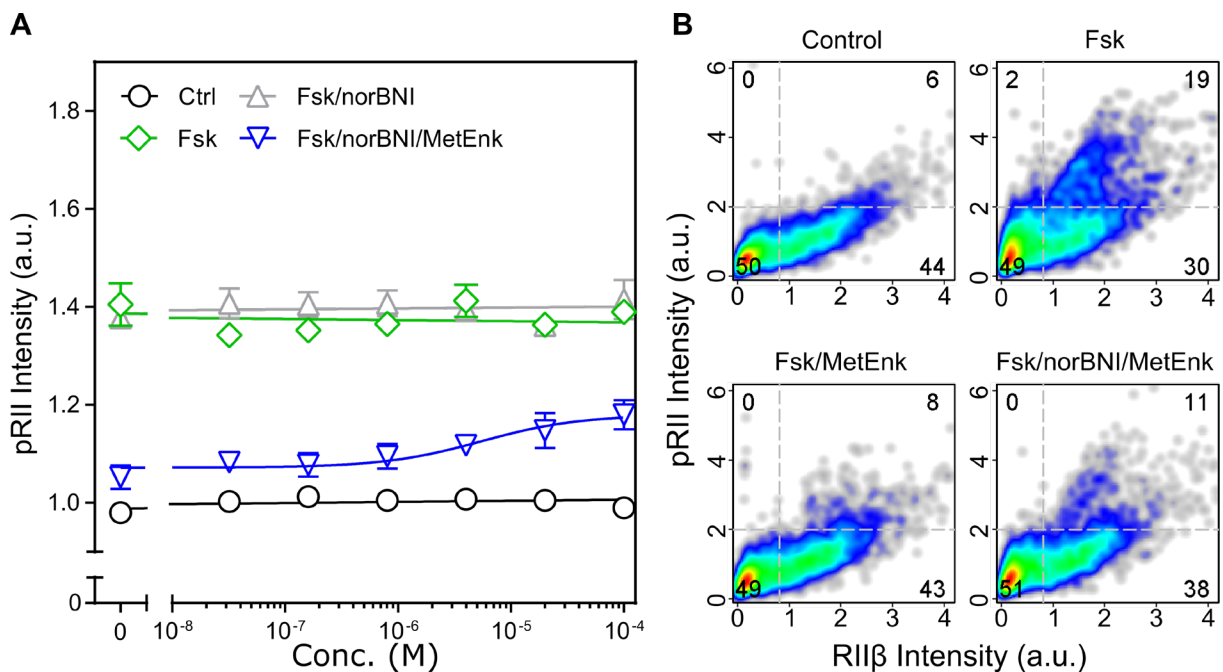
In dieser Versuchsreihe sollte die KOR-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort unter Verwendung des KOR-Antagonisten Norbinaltorphimin (norBNI) analysiert werden. Dabei wurde der zu Beginn des Kapitels beschriebene Versuchsaufbau genutzt und der Effekt von norBNI in ansteigender Dosierung (0  $\mu$ M, 0,032  $\mu$ M, 0,16  $\mu$ M, 0,8  $\mu$ M, 4  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 100  $\mu$ M) auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition analysiert (s. 4.3). Wie bereits für NTX und NAL beschrieben, beeinflusste norBNI die Forskolin-Antwort in Abwesenheit der OR-Agonisten nicht (Abb. 16 - 20, A graue vs. grüne Linie). Die durchschnittliche pRII-Intensität der Forskolin-Antwort zeigte keine signifikanten Unterschiede in An- ( $M = 1,40$  a.u.,  $SD = 0,019$ ) und Abwesenheit ( $M = 1,38$  a.u.,  $SD = 0,27$ ) von norBNI [ $t(6) = 1,467$ ,  $p = 0,1926$ ]. Auch in diesem

Experiment inhibierten alle getesteten OR-Agonisten (50  $\mu\text{M}$ ) die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität partiell (Abb. 16 - 20, A blaue Linie 0  $\mu\text{M}$ ). Hierbei zeigte Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) einen deutlichen Effekt auf die Forskolin-Antwort (Abb. 16, B Fsk vs. Fsk/DynA). In Abwesenheit von norBNI reduzierte Dynorphin A die PKA-II-Aktivität auf durchschnittlich 1,09 a.u. ( $SD = 0,085$ ). Dahingegen zeigte sich in Anwesenheit von norBNI in geringer Dosierung (32 nM) ein leichter Anstieg der pRII-Intensität. Dieser Effekt ließ sich dosisabhängig steigern, war jedoch auch in hoher Dosierung (100  $\mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Abb. 16, A blaue Linie). Die über alle Replikate gemittelte Differenz der pRII-Intensitäten betrug 0,13 a.u. ( $SEM = 0,053$ ). Die Differenz war statistisch nicht signifikant [ $t(3) = 2,501, p = 0,0976$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag mit  $< 32$  nM außerhalb des gewählten Konzentrationsspektrums (Tab. 8, norBNI/Dynorphin A).



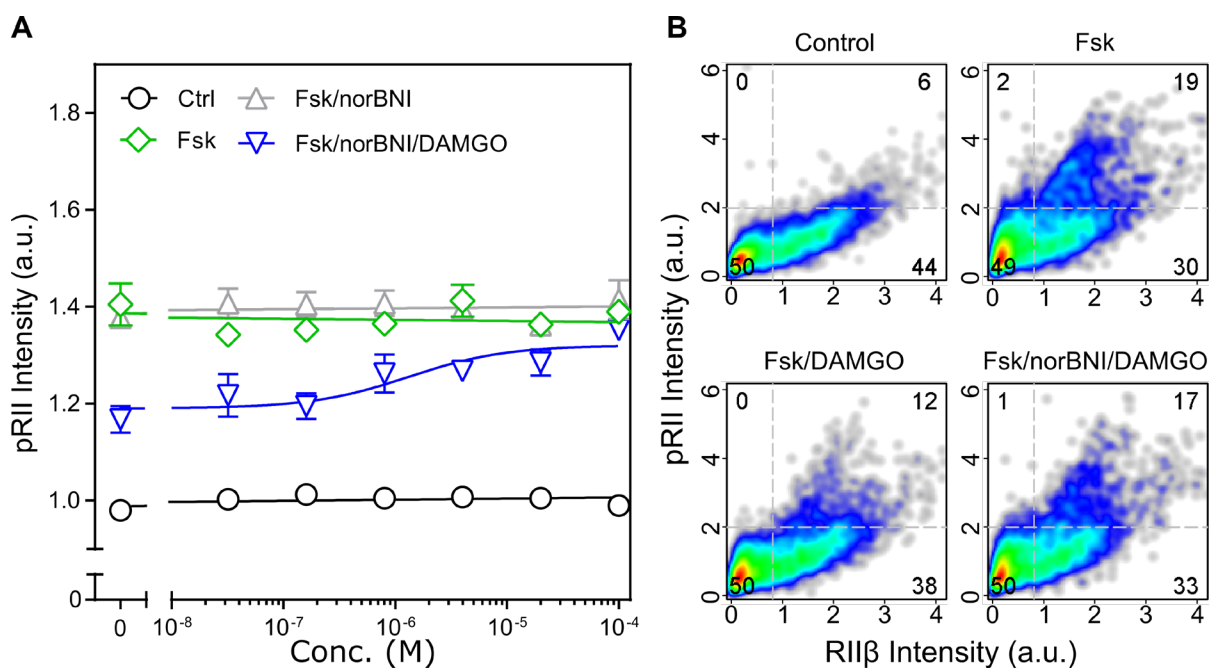
**Abbildung 16: Norbinaltorphinin (KOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NorBNI allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,467, p = 0,1926$ ]. Dynorphin A inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,09 a.u. ( $SD = 0,085$ ). NorBNI revertiert die Dynorphin A-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} < 32$  nM). Der Effekt ist statistisch nicht signifikant [ $t(3) = 2,501, p = 0,0876$ ] und nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,13$  a.u.  $\pm 0,053$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Dynorphin A (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI (100  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 952 ( $SD = 80$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Wie in den vorherigen Experimenten erwies sich Met-Enkephalin auch in dieser Versuchsreihe als potenter Inhibitor der Forskolin-Antwort und reduzierte die pRII-Intensität im Durchschnitt auf 1,05 a.u. ( $SD = 0,049$ ). Die Forskolin-Antwort wurde nach Stimulation mit Met-Enkephalin in Abwesenheit von norBNI beinahe bis auf das Basalaktivitätslevel reduziert, was einer vollständigen Inhibition der Forskolin-Antwort entspräche (Abb. 17, B Fsk vs. Fsk/MetEnk). Dieser Effekt konnte durch Prästimulation mit norBNI dosisabhängig revertiert werden (Abb. 17, A blaue Linie). Der Effekt war auch im oberen getesteten Konzentrationsspektrum nur partiell ausgeprägt. Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei  $5,5 \mu\text{M}$  (Tab. 8, norBNI/Met-Enkephalin). Die durchschnittliche Differenz der pRII-Intensitäten in Ab- und Anwesenheit von norBNI ( $100 \mu\text{M}$ ) betrug  $0,13 \text{ a.u.}$  ( $SEM = 0,037$ ) und war statistisch signifikant [ $t(3) = 3,462, p = 0,0406$ ].



**Abbildung 17: Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 -  $100 \mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort ( $3 \mu\text{M}$ ) durch Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NorBNI allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,467, p = 0,1926$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf  $1,05 \text{ a.u.}$  ( $SD = 0,049$ ). NorBNI revertiert die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} = 5,5 \mu\text{M}$ ). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(3) = 3,462, p = 0,0406$ ], jedoch nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,13 \text{ a.u.} \pm 0,037$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) und Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI ( $100 \mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $952 (SD = 80)$  DRG-Neuronen pro Kondition.

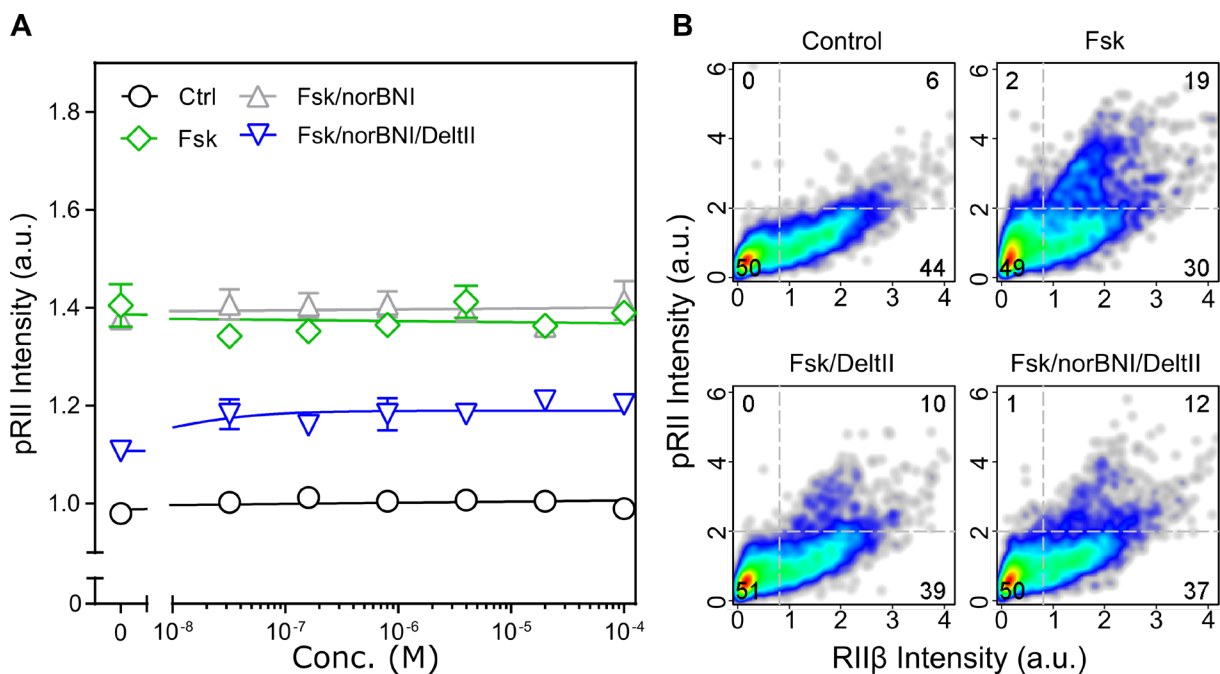
DAMGO (50  $\mu\text{M}$ ) reduzierte die Forskolin-induzierten PKA-II-Aktivität durchschnittlich auf 1,17 a.u. ( $SD = 0,056$ ). Dies entspricht einer Inhibition der Forskolin-Antwort um ca. 50 % (Abb. 18, B Fsk vs. Fsk/DAMGO). Die fünfminütige Prästimulation mit norBNI resultierte in einer Reversion der PKA-II-Inhibition (Abb. 18, A blaue Linie). Der Effekt ließ sich dosisabhängig steigern. Im oberen getesteten Konzentrationsbereich (100  $\mu\text{M}$ ) betrug der Durchschnitt der Unterschiede 0,19 a.u. ( $SEM = 0,023$ ), was beinahe einer vollständigen Reversion der DAMGO-vermittelten PKA-II-Inhibition entspricht. Der Effekt war statistisch signifikant [ $t(3) = 7,949, p = 0,0042$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert betrug 1,3  $\mu\text{M}$  (Tab. 8, norBNI/DAMGO).



**Abbildung 18: Norbinaltorphinin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch DAMGO (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NorBNI allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,467, p = 0,1926$ ]. DAMGO inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,17 a.u. ( $SD = 0,056$ ). NorBNI revertiert die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition beinahe vollständig (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,19 \text{ a.u.} \pm 0,023, IC_{50} = 1,3 \mu\text{M}$ ). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(3) = 7,949, p = 0,0042$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und DAMGO (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI (100  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 952 ( $SD = 80$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

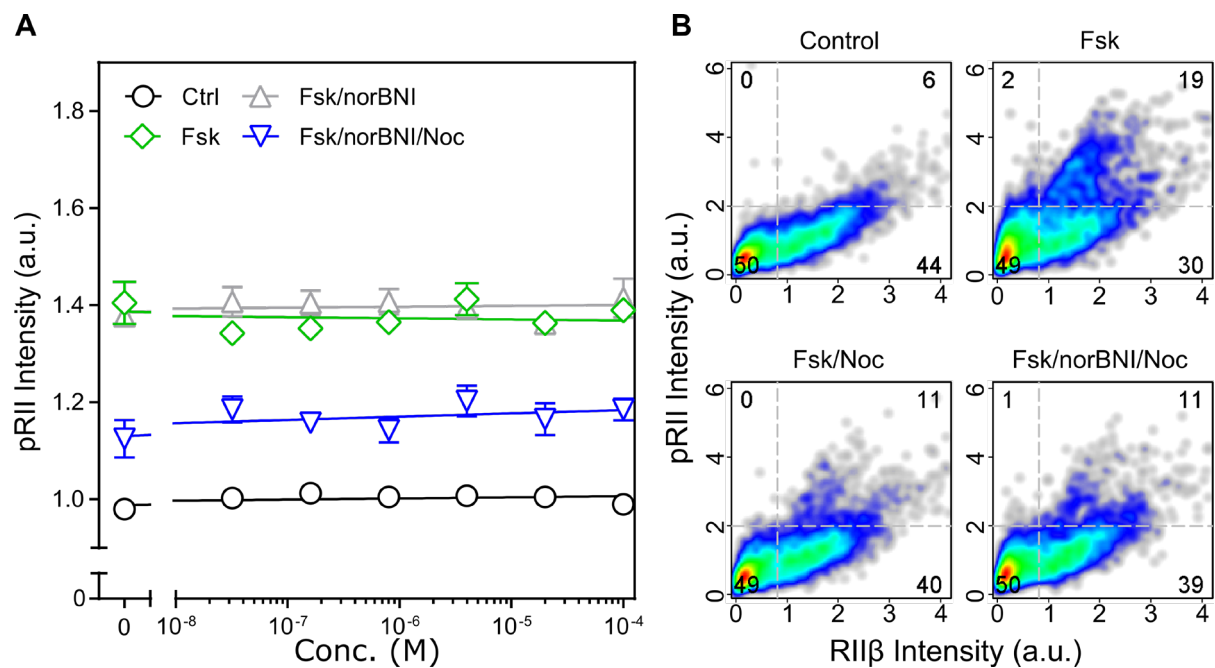


Unter Verwendung von norBNI und Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) wurden ähnliche Beobachtungen gemacht, wie unter Verwendung von NTX und NAL anstelle von norBNI (Abb. 9 und 11). Die Forskolin-induzierte pRII-Antwort wurde durch Deltorphin II im Durchschnitt auf 1,11 a.u. ( $SD = 0,030$ ) reduziert (Abb. 19, B Fsk vs. Fsk/DeltII). Darüber hinaus konnte auch mit norBNI in geringer Dosierung (32 nM) eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II erreicht werden. Im Durchschnitt zeigte sich eine Steigerung des pRII-Signals um 0,09 a.u. ( $SEM = 0,013$ ). Dieser Effekt ließ sich unter Verwendung höherer Dosierungen (100  $\mu\text{M}$ ) nicht verstärken, sodass ebenfalls von einem Sättigungseffekt auszugehen ist (Abb. 19, A blaue Linie). Der Effekt war statistisch signifikant [ $t(3) = 7,181, p = 0,0056$ ]. Auch unter Verwendung von norBNI konnte der  $IC_{50}$ -Wert aufgrund des gewählten Konzentrationsbereichs nicht exakt bestimmt werden, lag jedoch sicher unter 32 nM (Tab. 8, norBNI/ Deltorphin II).



**Abbildung 19: Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NorBNI allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,467, p = 0,1926$ ]. Deltorphin II inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,11 a.u. ( $SD = 0,030$ ). NorBNI revertiert die Deltorphin II-vermittelte PKA-II-Inhibition (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,09 \text{ a.u.} \pm 0,013, IC_{50} < 32\text{nM}$ ). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(3) = 7,181, p = 0,0056$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Deltorphin II (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI (100  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 952 ( $SD = 80$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Die Stimulation mit Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) führte, wie bereits in den vorherigen Experimenten gezeigt, zu einer deutlichen Inhibition der Forskolin-induzierten pRII-Antwort (Abb. 20, B Fsk vs. Fsk/Noc). Durchschnittlich wurde die Forskolin-Antwort auf 1,13 a.u. ( $SD = 0,077$ ) reduziert. Ähnlich den Daten, die unter Verwendung von NTX erhoben wurden, zeigten auch die folgenden Messwerte große Schwankungen (Abb. 20, B Fsk vs. Fsk/Noc vs. Fsk/norBNI/Noc). Es wurde kein statistisch signifikanter Effekt von norBNI auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition gemessen [ $t(3) = 1,462, p = 0,2398$ ].



**Abbildung 20: Norbinalmorphimin (KOR) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 - 100  $\mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu\text{M}$ ) durch Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NorBNI allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,467, p = 0,1926$ ]. Nozizeptin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,13 a.u. ( $SD = 0,077$ ). NorBNI zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(3) = 1,462, p = 0,2398$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu\text{M}$ ) und Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI (100  $\mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 952 ( $SD = 80$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

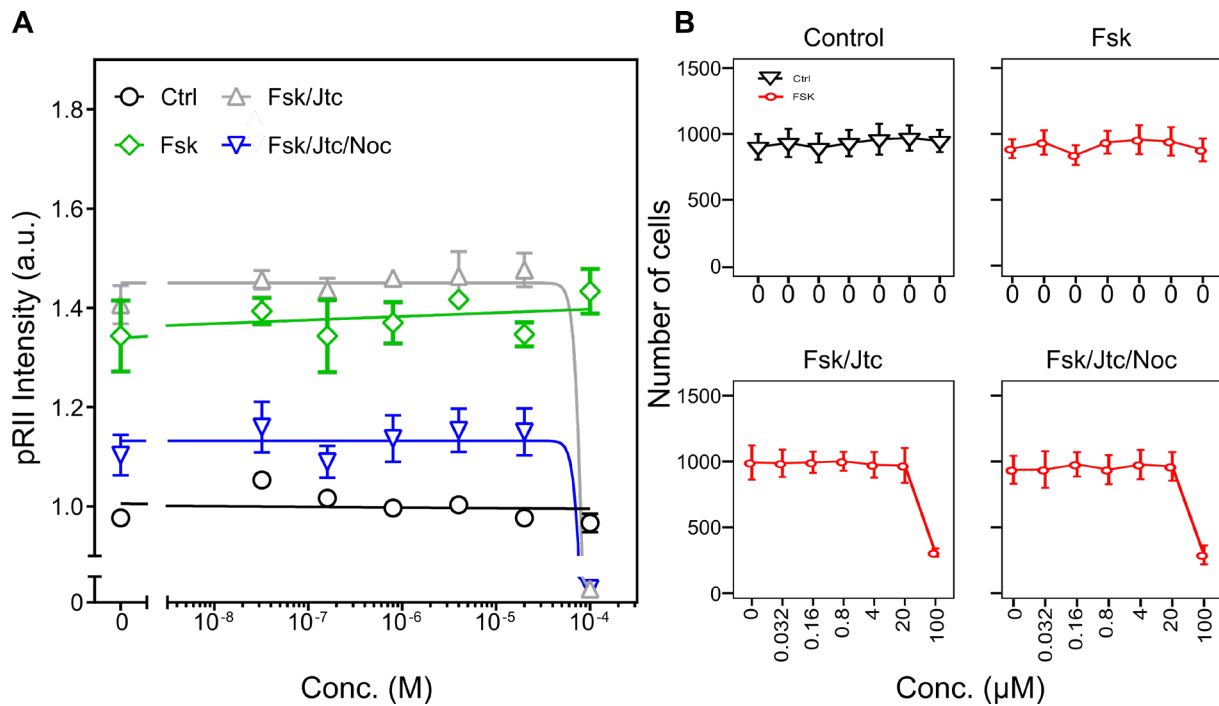
---

#### 4.3.4 Effekt des NOP-Antagonisten JTC 801 auf die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische und unspezifische OR-Agonisten

Die zuvor erhobenen Daten dieser Versuchsreihe zeigen, dass Nozizeptin in der gewählten Dosierung (50  $\mu\text{M}$ ) die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität partiell inhibiert (Abb. 10., 15 und 20, B Fsk vs. Fsk/Noc). Dies deckt sich mit den Daten älterer Studien der Arbeitsgruppe (Abb. 1, NOP Agonists Nociceptin). Im ersten Teil dieser Arbeit gelang es darüber hinaus auch die 5-HT-induzierte pRII-Antwort mittels Nozizeptin partiell zu inhibieren (Abb. 4, B Control/5-HT vs. 5-HT/Noc). Naltrexon und Norbinaltorphimin zeigten keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (Abb. 10 und 20, A blaue Linie). Naltrindol zeigte zwar in dem getesteten Konzentrationsspektrum eine partielle Reversion der Nozizeptin-vermittelten PKA-II-Inhibition, die Messpunkte unterlagen jedoch einer deutlichen Streuung. Dies lässt den Schluss zu, dass die Nozizeptin-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort spezifisch durch die selektive Aktivierung der NOP-Rezeptoren induziert wird. Ziel dieses Experiments war zu untersuchen, ob die Nozizeptin-vermittelte Inhibition der PKA-II-Aktivität tatsächlich durch die selektive Aktivierung der NOP-Rezeptoren vermittelt wird. Zu diesem Zweck nutzte ich o. g. Versuchsaufbau unter Verwendung des NOP-spezifischen Antagonisten JTC 801 in ansteigender Dosierung (0  $\mu\text{M}$ , 0,032  $\mu\text{M}$ , 0,16  $\mu\text{M}$ , 0,8  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{M}$ , 20  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ ) und verglich dessen Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (50  $\mu\text{M}$ ) mit dem Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch die o. g. weiteren OR-Agonisten (50  $\mu\text{M}$ ).

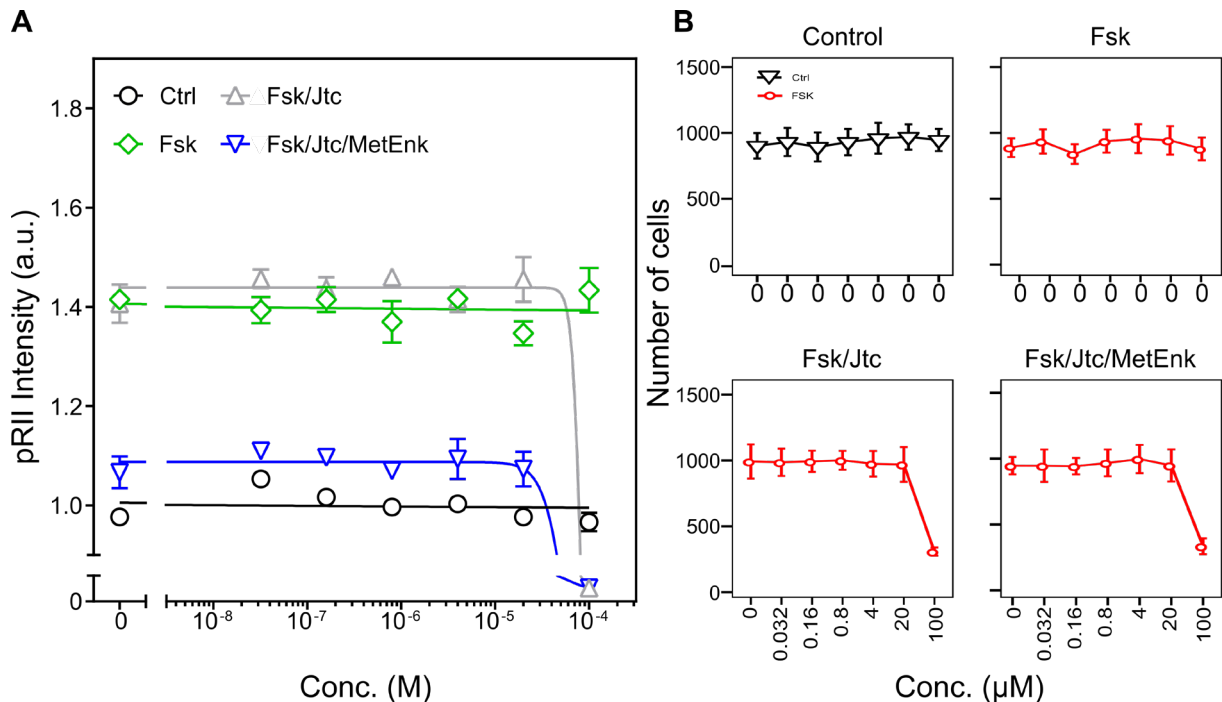
Im vorgestellten Versuchsaufbau gelang es unter Verwendung aller getesteter OR-Agonisten die Forskolin-induzierte PKA-II-Antwort partiell zu reduzieren (Abb. 21 - 25, blaue vs. grüne Linie). In einem Konzentrationsspektrum von 0 bis 20  $\mu\text{M}$  zeigte JTC 801 in Abwesenheit der OR-Agonisten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die pRII-Intensität Forskolin-stimulierten DRG-Neuronen [ $t(5) = 2,284$ ,  $p = 0,0712$ ]. JTC allein beeinflusst dementsprechend die Forskolin-Antwort nicht (Abb. 21 - 25, A grüne vs. graue Linie). Des Weiteren wurde in diesem Konzentrationsbereich kein statistisch signifikanter Effekt auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition gemessen (Abb. 21 - 25, blaue Linie). JTC zeigte keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(2) = 1,008$ ,  $p = 0,4197$ ]. Die Prästimulation mit JTC führte dementsprechend nicht zur Reversion der PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (Abb. 21, A blaue Linie). Unter Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  JTC wurde in allen Replikaten dieser Versuchsreihe in An- und in Abwesenheit der OR-Agonisten eine drastische Reduktion der Zellzahl gemessen. Die über alle Replikate gemittelte Anzahl von durchschnittlich 938 ( $SD = 27$ ) DRG-Neuronen pro Kondition wurde auf durchschnittlich 264 ( $SD = 52$ ) DRG-Neuronen reduziert (Abb. 21 - 25, B obere vs. untere Reihe), was einer

Verminderung um ca. 72 % entsprach. Dies legt den Schluss nahe, dass JTC in höheren Konzentrationen toxisch auf DRG-Neuronen wirkt und somit kein geeignetes Reagenz für den von uns verwendeten „pRII/RII $\beta$ -Assay“ darstellt.



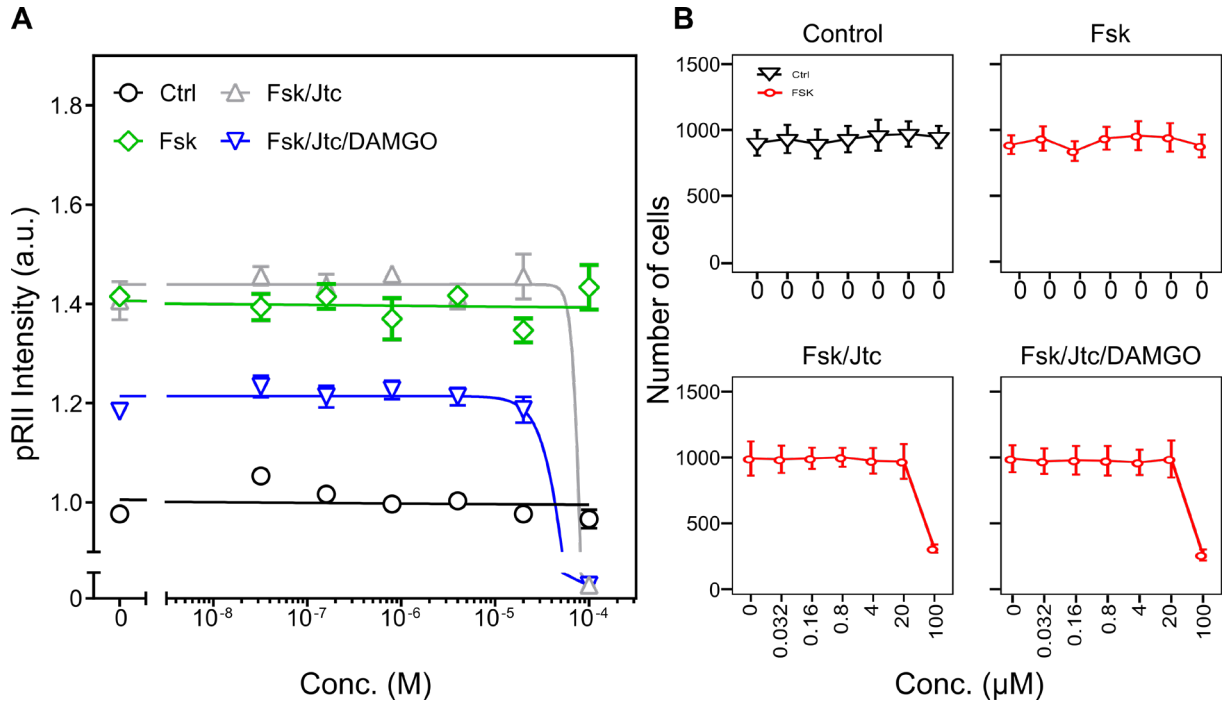
**Abbildung 21: JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20  $\mu$ M) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP) und zeigt in hoher Dosierung (100  $\mu$ M) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit JTC (0 – 100  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Nozizeptin (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. JTC allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t$  (5) = 2,284,  $p$  = 0,0712]. JTC (0 – 20  $\mu$ M) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t$  (2) = 1,008,  $p$  = 0,4197]. In hoher Dosierung (100  $\mu$ M) führt JTC zum Abfall der pRII-Intensität unter das Basisniveau. (B) Durchschnittliche Zellzahl in Relation zur JTC-Konzentration im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und JTC (0 – 100  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von Noc (50  $\mu$ M). In hoher Dosierung (100  $\mu$ M) reduziert JTC die durchschnittliche Anzahl der gezählten DRG-Neuronen um 72 %. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n$  = 3 Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 862 ( $SD$  = 158) DRG-Neuronen pro Kondition.

Wie unter Verwendung von Nozizeptin gezeigt, beeinflusste die Prästimulation der DRG-Kulturen mit JTC im unteren getesteten Konzentrationspektrum die Inhibition der Forskolin-Antwort durch Met-Enkephalin nicht signifikant [ $t$  (2) = 0,3780,  $p$  = 0,7418]. Unter Dosissteigerung (100  $\mu$ M) kam es zu einem deutlichen Abfall der pRII-Intensität sowie der Zellzahl (Abb. 22).



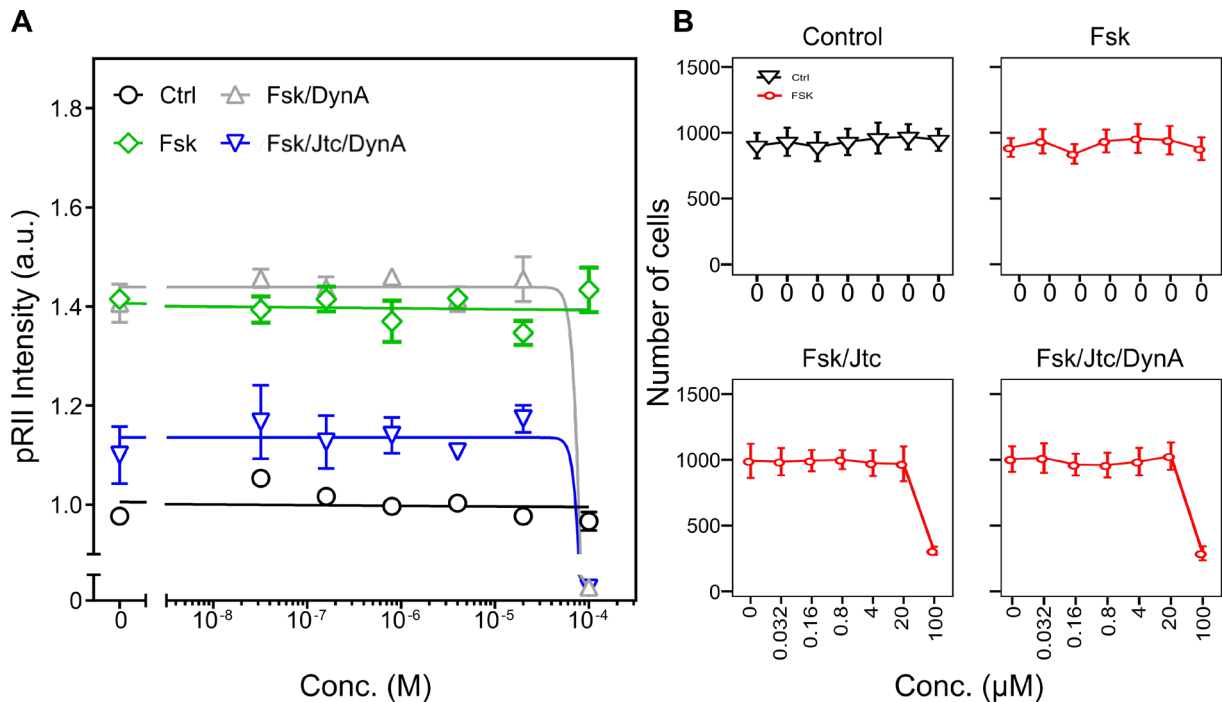
**Abbildung 22: JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit JTC (0 - 100 µM) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3 µM) durch Met-Enkephalin (50 µM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. JTC allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(5) = 2,284, p = 0,0712$ ]. JTC (0 – 20 µM) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(2) = 0,3780, p = 0,7418$ ]. In hoher Dosierung (100 µM) führt JTC zum Abfall der pRII-Intensität unter das Basisniveau. (B) Durchschnittliche Zellzahl in Relation zur JTC-Konzentration im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3 µM) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3 µM) und JTC (0 – 100 µM) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von Met-Enkephalin (50 µM). In hoher Dosierung (100 µM) reduziert JTC die durchschnittliche Anzahl der gezählten DRG-Neuronen um 72 %. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 3$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 862 ( $SD = 158$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass JTC im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 - 20 µM) die PKA-II-Inhibition durch DAMGO nicht signifikant veränderte [ $t(2) = 0,1048, p = 0,9261$ ]. Im oberen getesteten Konzentrationsbereich (100 µM) führt die Prästimulation mit JTC zu einem Abfall der pRII-Intensität unter das Basalaktivitätslevel und zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (Abb. 23).



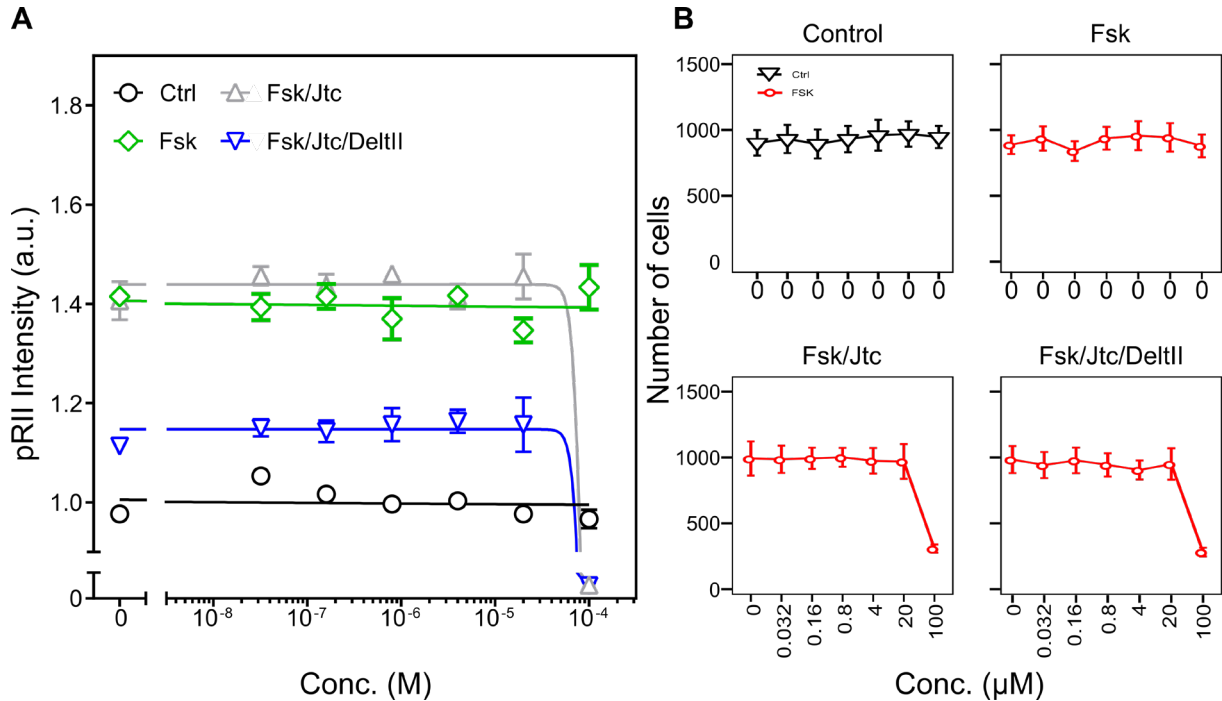
**Abbildung 23: JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit JTC (0 - 100 µM) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3 µM) durch DAMGO (50 µM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. JTC allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(5) = 2,284, p = 0,0712$ ]. JTC (0 – 20 µM) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(2) = 0,1048, p = 0,9261$ ]. In hoher Dosierung (100 µM) führt JTC zum Abfall der pRII-Intensität unter das Basisniveau. (B) Durchschnittliche Zellzahl in Relation zur JTC-Konzentration im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3 µM) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3 µM) und JTC (0 – 100 µM) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von DAMGO (50 µM). In hoher Dosierung (100 µM) reduziert JTC die durchschnittliche Anzahl der gezählten DRG-Neuronen um 72 %. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 3$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 862 ( $SD = 158$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Auch die Inhibition der Forskolin-Antwort durch Dynorphin A wurde durch JTC (0 – 20 µM) nicht signifikant verändert [ $t(2) = 1,065, p = 0,3986$ ]. In hoher Dosierung (100 µM) reduzierte JTC die Zellzahl und die pRII-Aktivität deutlich (Abb. 24).



**Abbildung 24:** JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen. (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit JTC (0 - 100 µM) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3 µM) durch Dynorphin A (50 µM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. JTC allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(5) = 2,284, p = 0,0712$ ]. JTC (0 – 20 µM) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Dynorphin A-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(2) = 1,065, p = 0,3986$ ]. In hoher Dosierung (100 µM) führt JTC zum Abfall der pRII-Intensität unter das Basisniveau. (B) Durchschnittliche Zellzahl in Relation zur JTC-Konzentration im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3 µM) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3 µM) und JTC (0 – 100 µM) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von Dynorphin A (50 µM). In hoher Dosierung (100 µM) reduziert JTC die durchschnittliche Anzahl der gezählten DRG-Neuronen um 72 %. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 3$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 862 ( $SD = 158$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

JTC zeigte im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die Deltorphin-II-vermittelte Reduktion des Forskolin-Signals [ $t(2) = 0,1048, p = 0,9261$ ]. Unter weiterer Dosissteigerung wurde ein deutlicher Abfall der pRII-Intensität und der Zellzahl beobachtet (Abb. 25).



**Abbildung 25: JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 – 20 μM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Deltorphan II (DOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 μM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten ± SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit JTC (0 - 100 μM) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3 μM) durch Deltorphan II (50 μM) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. JTC allein zeigt keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(5) = 2,284, p = 0,0712$ ]. JTC (0 – 20 μM) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Deltorphan-II-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(2) = 0,1048, p = 0,9261$ ]. In hoher Dosierung (100 μM) führt JTC zum Abfall der pRII-Intensität unter das Basisniveau. (B) Durchschnittliche Zellzahl in Relation zur JTC-Konzentration im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3 μM) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3 μM) und JTC (0 – 100 μM) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von Deltorphan II (50 μM). In hoher Dosierung (100 μM) reduziert JTC die durchschnittliche Anzahl der gezählten DRG-Neuronen um 72 %. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 3$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 862 ( $SD = 158$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.



#### 4.3.5 Zusammengefasste Daten der getesteten OR-Liganden

OR-Agonist	IC <sub>50</sub>	Mittelwertdifferenz ± SEM	t (df)	p
	Naltrexon			
Met-Enkephalin	-	0,092 a.u. ± 0,058	t (4) = 1,591	0,1868
DAMGO	< 3.2 nM	0,14 a.u. ± 0,040	t (4) = 3,549	0,0238
Deltorphin II	< 3.2 nM	0,093 a.u. ± 0,054	t (2) = 1,740	0,2240
Dynorphin A	5.9 µM	0,10 a.u. ± 0,024	t (4) = 4,296	0,0127
Nozizeptin	-	-	t (3) = 0,2384	0,8269
	Naltrindol			
Met-Enkephalin	1,1 µM	0,088 a.u. ± 0,051	t (3) = 1,714	0,1581
DAMGO (100 µM NAL)	2,1 µM	0,11 a.u. ± 0,051	t (3) = 2,106	0,1259
DAMGO (20 µM NAL)		0,13 a.u. ± 0,038	t (3) = 3,380	0,0431
Deltorphin II	< 32 nM	0,12 a.u. ± 0,015	t (2) = 7,856	0,0158
Dynorphin A	< 32 nM	0,070 a.u. ± 0,052	t (3) = 1,343	0,2718
Nozizeptin	< 32 nM	0,093 a.u. ± 0,0088	t (2) = 10,58	0,0088
	Norbinaltorphimin			
Met-Enkephalin	5,5 µM	0,13 a.u. ± 0,037	t (3) = 3,462	0,0406
DAMGO	1,3 µM	0,19 a.u. ± 0,023	t (3) = 7,949	0,0042
Deltorphin II	< 32nM	0,090 a.u. ± 0,013	t (3) = 7,181	0,0056
Dynorphin A	< 32 nM	0,13 a.u. ± 0,053	t (3) = 2,501	0,0876
Nozizeptin	-	-	t (3) = 1,462	0,2398

Tabelle 8: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Versuchsreihe 4.3 „Reversion der Met-Enkephalin- (unspezifisch), DAMGO- (MOR), Deltorphin-II- (DOR), Dynorphin-A- (KOR) und Nozizeptin- (NOP) vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)“. Aufgelistet sind die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>), die Mittelwertdifferenz ± SEM sowie t-Wert, Freiheitsgrade (df) und der p-Wert der jeweiligen Agonist-Antagonist-Kombination.

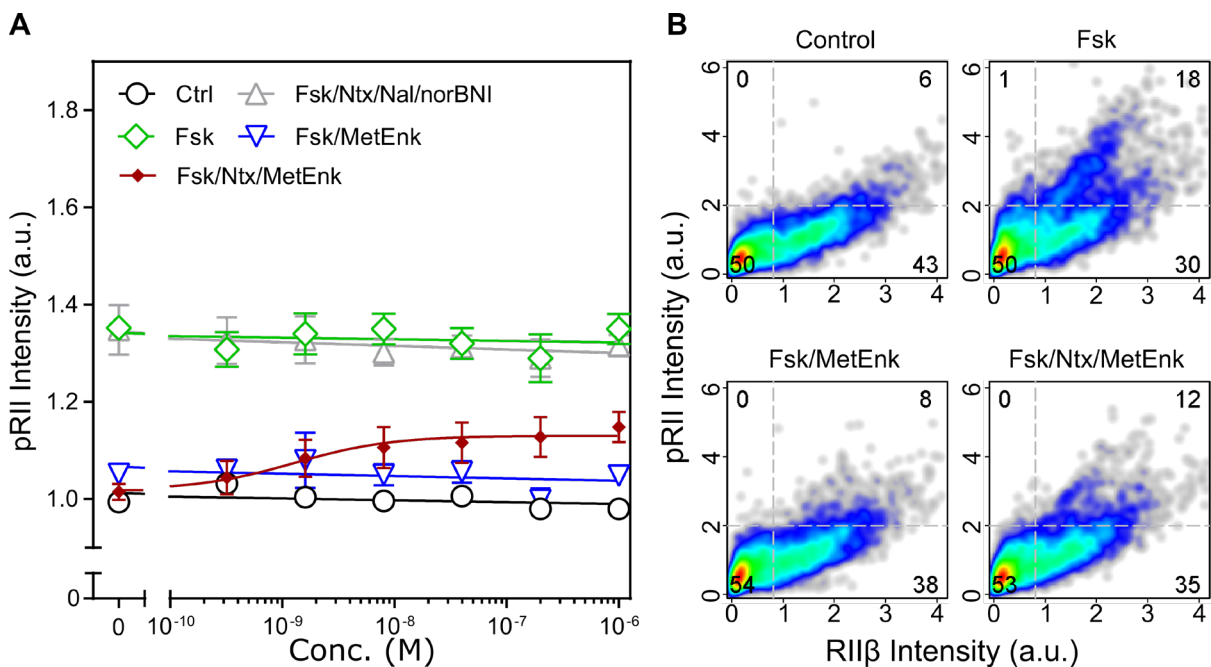
---

#### 4.4 Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) sowie Norbinaltorphimin (KOR) allein und in Kombination

Die im vorigen Abschnitt vorgestellten Daten zeigen, dass unter den getesteten Konditionen keine vollständige Reversion der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition hervorgerufen werden konnte. Auffallend war, dass, mit Ausnahme von JTC, alle getesteten OR-Antagonisten eine, partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin bewirkten (Abb. 6, 12 und 17, A blaue Linie). NorBNI bewirkte als einziger OR-Antagonist eine statistisch signifikante Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition. Jedoch induzierten auch NTX und NAL messbare Veränderungen der Met-Enkephalin-vermittelten Inhibition der Forskolin-Antwort (Tab 8, Met-Enkephalin). Dies führte zu der Überlegung, dass NTX, NAL und norBNI möglicherweise additive Effekte auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin hervorrufen, mit denen eine vollständige Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition erreicht werden könnte.

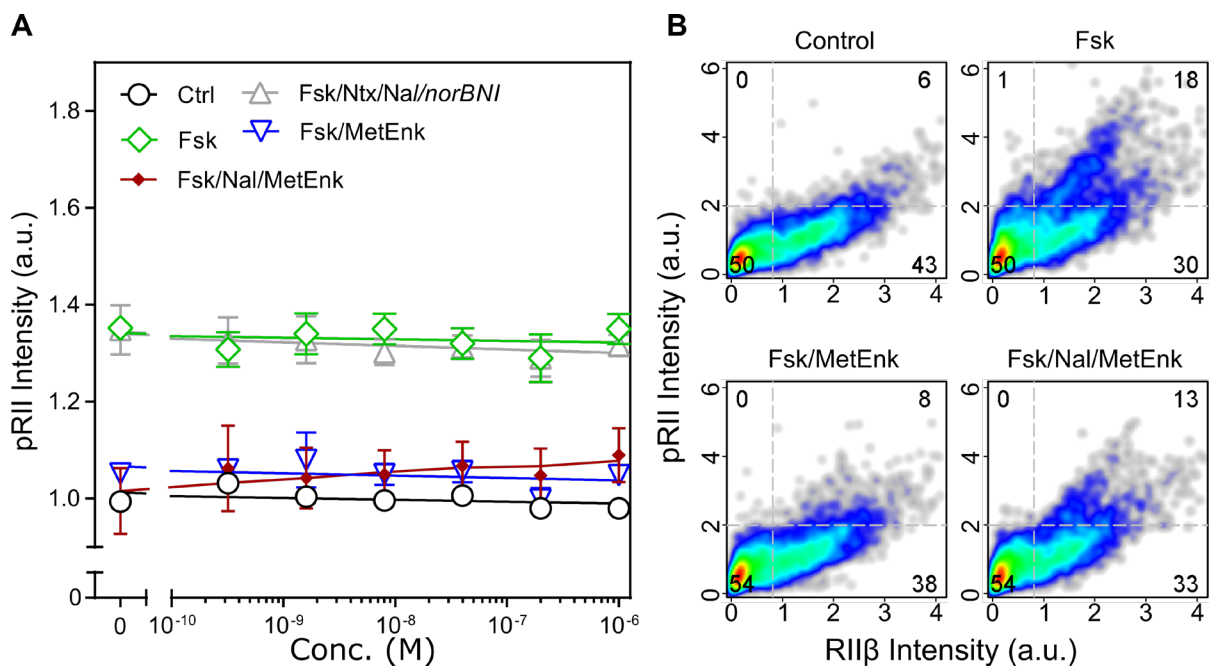
Um zu überprüfen, ob durch Kombination der drei genannten OR-Antagonisten eine vollständige Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition erzielt werden kann, führte ich eine fünfminütige Prästimulation mit NTX, NAL und norBNI durch. Anschließend wurden die DRG-Neuronen drei Minuten lang simultan mit dem unspezifischen OR-Agonisten Met-Enkephalin (50  $\mu\text{M}$ ) und Forskolin (3  $\mu\text{M}$ ) stimuliert. Um den Effekt der Kombination dieser Antagonisten mit dem Effekt der einzelnen Antagonisten vergleichen zu können, wurden diese sowohl einzeln als auch in Kombination verwendet. Da sich in den vorausgehenden Experimenten zeigte, dass die gewählten Konzentrationsbereiche den spezifischen Effekt der Antagonisten nur unzureichend darstellten, wählte ich hier einen Konzentrationsbereich von 0 bis 1,0  $\mu\text{M}$  (0  $\mu\text{M}$ , 0,00032  $\mu\text{M}$ , 0,0016  $\mu\text{M}$ , 0,008  $\mu\text{M}$ , 0,04  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ ). Die durchschnittlich gemessene Änderung der Forskolin-Antwort, gegenüber der auf 1,0 a.u. normierten Kontrollkondition, fiel mit 0,33 a.u. ( $SD = 0,033$ ) in diesem Experiment niedriger als in den vorherigen Experimenten (0,40 a.u.) aus (Abb. 26 - 29, A grüne Linie). Trotzdem zeigte sich ein signifikanter Anstieg der pRII-Intensität nach Stimulation mit Forskolin [ $t(6) = 26,45$ ,  $p < 0,0001$ ]. Auch kombiniert hatten die drei OR-Antagonisten keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort (Abb. 26 - 29, A graue Linie). NTX, NAL und norBNI beeinflussten die Forskolin-Antwort nicht signifikant [ $t(6) = 1,513$ ,  $p = 0,1810$ ]. Wie bereits in den vorangegangenen Experimenten gezeigt, gelang es unter Verwendung von Met-Enkephalin (50  $\mu\text{M}$ ) die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivierung beinahe vollständig zu inhibieren (Abb. 26 - 29, B Fsk vs. Fsk/ MetEnk). Die Differenz der durchschnittlichen pRII-Intensität der Forskolin-

stimulierten DRG-Neuronen in Abwesenheit ( $M = 1,33$  a.u.,  $SD = 0,024$ ) und in Anwesenheit ( $M = 1,05$  a.u.,  $SD = 0,025$ ) von Met-Enkephalin war signifikant [ $t(6) = 32,58$ ,  $p < 0,0001$ ]. Der Mittelwert der Unterschiede betrug gemittelt über alle Replikate  $-0,28$  a.u. ( $SEM = 0,0086$ ). Die Prästimulation mit NTX führte in geringer Dosierung ( $320$  pM) zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (Abb. 26, A rote vs. blaue Linie). Dieser Effekt ließ sich unter Verwendung höherer Dosierungen nur begrenzt steigern (Abb. 26, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/MetEnk). Im oberen getesteten Konzentrationsbereich ( $1$   $\mu$ M) zeigte sich eine durchschnittliche Änderung der pRII-Intensität um  $0,10$  a.u. ( $SEM = 0,025$ ). Die Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX war statistisch signifikant [ $t(3) = 4,163$ ,  $p = 0,0252$ ]. Der ermittelte  $IC_{50}$ -Wert lag bei  $1,3$  nM.



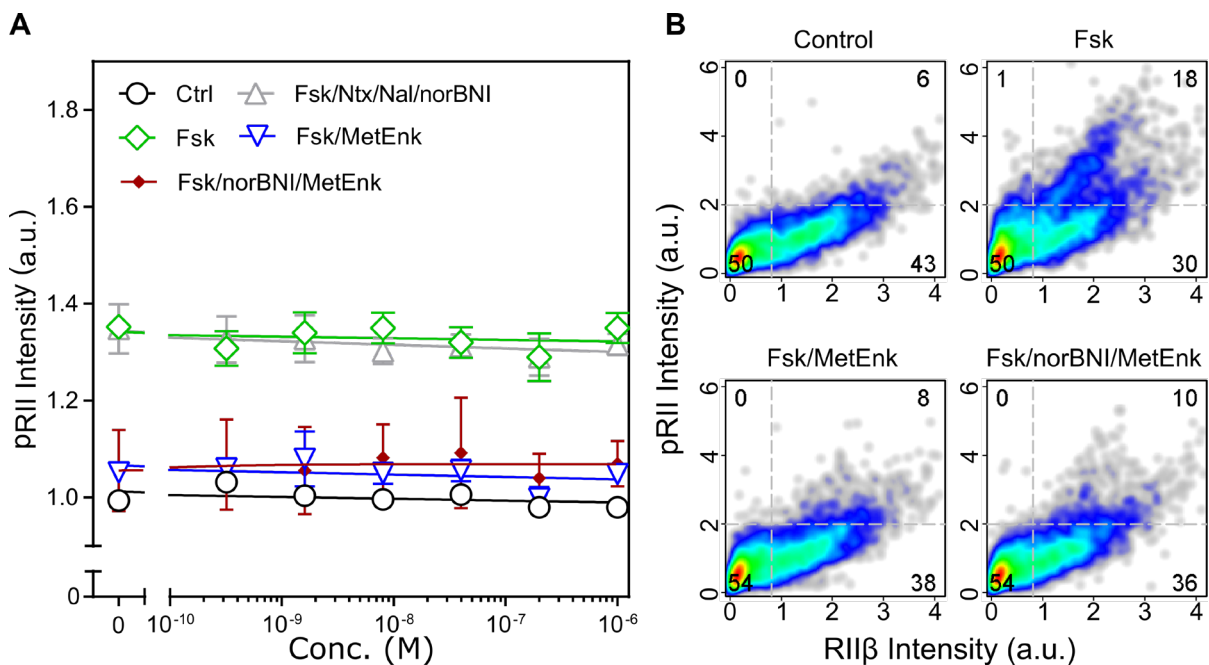
**Abbildung 26: Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX ( $0 - 1$   $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort ( $3$   $\mu$ M) durch Met-Enkephalin ( $50$   $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX, NAL und norBNI zeigen kombiniert, in Abwesenheit von Met-Enkephalin, keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,513$ ,  $p = 0,1810$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf  $1,05$  a.u. ( $SD = 0,025$ ). NTX revertiert dosisabhängig die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} = 1,3$  nM). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(3) = 4,163$ ,  $p = 0,0252$ ], jedoch auch in höherer Dosierung ( $1$   $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,1$  a.u.  $\pm 0,025$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk ( $3$   $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk ( $3$   $\mu$ M) und Met-Enkephalin ( $50$   $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX ( $1$   $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $861$  ( $SD = 77$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Nach fünfminütiger Prästimulation mit dem DOR-spezifischen OR-Antagonisten NAL konnte eine dosisabhängige Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition beobachtet werden (Abb. 27, A rote Linie). Der Effekt war partiell ausgeprägt (Abb. 27, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/MetEnk). Weiterhin wurden große Abweichungen der Messwerte in den verschiedenen Replikaten beobachtet. Der über alle Replikate gemittelte Durchschnitt der Unterschiede betrug 0,13 a.u. ( $SEM = 0,018$ ). Die beobachtete Reversion war statistisch signifikant [ $t(2) = 7,181, p = 0,0188$ ]. Der  $IC_{50}$ -Wert lag dabei außerhalb des getesteten Konzentrationsspektrums, jedoch sicher unter  $0,00032 \mu M$ .



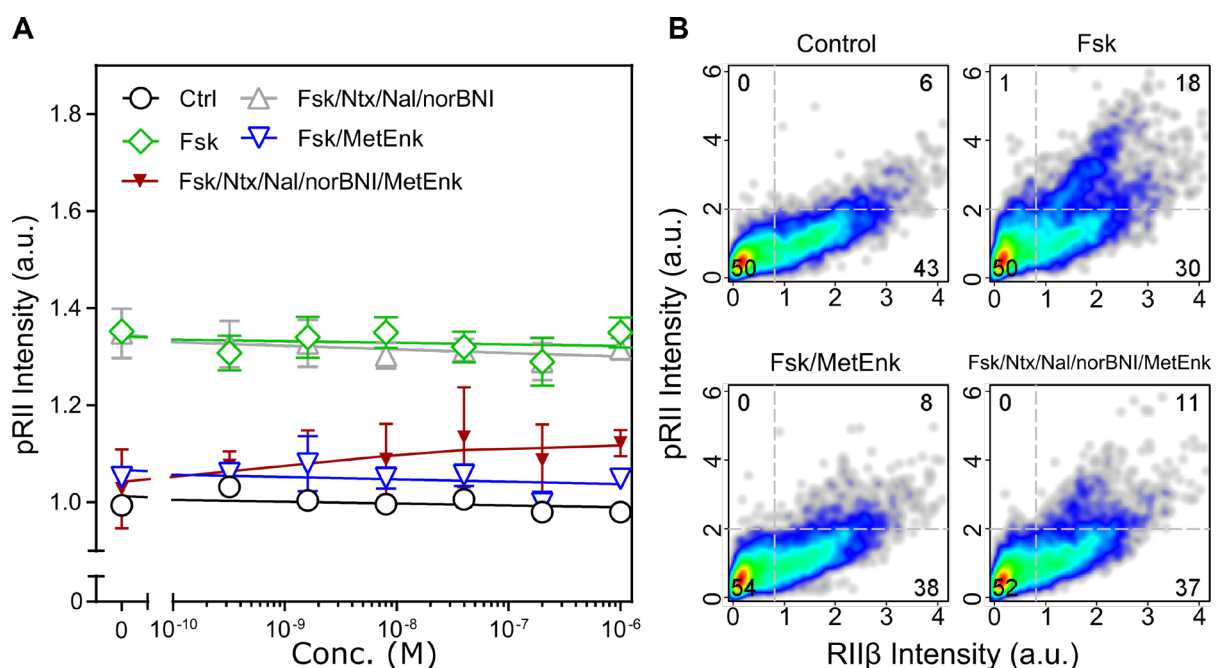
**Abbildung 27: Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm SEM$  zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NAL (0 - 1  $\mu M$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu M$ ) durch Met-Enkephalin (50  $\mu M$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX, NAL und norBNI zeigen kombiniert, in Abwesenheit von Met-Enkephalin, keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,513, p = 0,1810$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,05 a.u. ( $SD = 0,025$ ). NAL revertiert dosisabhängig die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} < 0,32 \text{ nM}$ ). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(2) = 7,181, p = 0,0188$ ], jedoch auch in höherer Dosierung (1  $\mu M$ ) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm SEM = 0,13 \text{ a.u.} \pm 0,018$ ). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu M$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu M$ ) und Met-Enkephalin (50  $\mu M$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NAL (1  $\mu M$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 861 ( $SD = 77$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Im vorherigen Abschnitt (s. 4.3.3) wurde unter Verwendung von norBNI (KOR) im oberen getesteten Konzentrationsbereich ( $> 1 \mu\text{M}$ ) eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch MetEnk gemessen (Abb. 17, A rote Linie). In dem hier gewählten Konzentrationspektrum (0 –  $1 \mu\text{M}$ ) zeigte norBNI keine Wirkung auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (Abb. 28, B Fsk/ rote vs. blaue Linie). Die durchschnittlich gemessenen pRII-Intensitäten Forskolin- und Met-Enkephalin-stimulierter DRG-Neuronen unterschieden sich in Abwesenheit ( $M = 1,06$ ,  $SD = 0,084$ ) und Anwesenheit von norBNI ( $M = 1,07$ ,  $SD = 0,047$ ) nicht signifikant [ $t(4) = 0,3669$ ,  $p = 0,7323$ ]. Darüber hinaus unterlagen die Messwerte einer deutlichen Streuung (Abb. 28, A rote vs. blaue Linie). Dies war zu erwarten, da der vorher ermittelte  $IC_{50}$ -Wert mit  $1,1 \mu\text{M}$  außerhalb des hier getesteten Konzentrationsbereichs lag (Tab. 8, norBNI/ Met-Enkephalin).



**Abbildung 28: Norbinaltorphinin (KOR) zeigt keine statistisch signifikanten Effekte auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit norBNI (0 -  $1 \mu\text{M}$ ) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort ( $3 \mu\text{M}$ ) durch Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX, NAL und norBNI zeigen kombiniert, in Abwesenheit von Met-Enkephalin, keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,513$ ,  $p = 0,1810$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf  $1,05$  a.u. ( $SD = 0,025$ ). NorBNI zeigte in dem gewählten Konzentrationspektrum keinen statistisch signifikanten Effekt auf die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition [ $t(4) = 0,3669$ ,  $p = 0,7323$ ]. (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk ( $3 \mu\text{M}$ ) und Met-Enkephalin ( $50 \mu\text{M}$ ) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von norBNI ( $1 \mu\text{M}$ ). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von  $861$  ( $SD = 77$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Die Prästimulation mit NTX, NAL und norBNI in Kombination resultierte in einer dosisabhängigen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (Abb. 29, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/Nal/norBNI/MetEnk). Dieser Effekt war auch in höherer Dosierung (1  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Abb. 29, A rote vs. blaue Linie). Die über alle Replikate gemittelten pRII-Intensitäten der DRG-Neurone, welche mit Forskolin und MetEnkephalin stimuliert wurden, unterschieden sich in Abwesenheit ( $M = 1,03$ ,  $SD = 0,082$ ) und Anwesenheit der kombinierten OR-Antagonisten ( $M = 1,12$ ,  $SD = 0,27$ ) signifikant [ $t(4) = 3,056$ ,  $p = 0,0378$ ]. Der Durchschnitt der Unterschiede betrug 0,094 a.u. ( $SEM = 0,031$ ). Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei 0,41 nM.



**Abbildung 29: Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) und Norbinaltorphimin (KOR) führen in Kombination zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).** (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der durchschnittlichen pRII-Intensitäten  $\pm$  SEM zur Darstellung des Effekts einer fünfminütigen Prästimulation mit NTX, NAL und norBNI in Kombination (0 - 1  $\mu$ M) auf die Inhibition der Forskolin-Antwort (3  $\mu$ M) durch Met-Enkephalin (50  $\mu$ M) nach dreiminütiger Stimulation muriner Wildtyp-DRG-Neuronen. NTX, NAL und norBNI zeigen kombiniert, in Abwesenheit von Met-Enkephalin, keinen signifikanten Effekt auf die Forskolin-Antwort [ $t(6) = 1,513$ ,  $p = 0,1810$ ]. Met-Enkephalin inhibiert die Forskolin-Antwort im Durchschnitt auf 1,05 a.u. ( $SD = 0,025$ ). NTX, NAL und norBNI revertieren in Kombination, dosisabhängig die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition ( $IC_{50} = 0,41$  nM). Der Effekt ist statistisch signifikant [ $t(4) = 3,056$ ,  $p = 0,0378$ ], jedoch auch in höherer Dosierung (1  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Mittelwertdifferenz  $\pm$  SEM = 0,094 a.u.  $\pm$  0,031). (B) Zelldichte der pRII/RII $\beta$ -gefärbten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand (Control), nach Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) sowie nach simultaner Stimulation mit Fsk (3  $\mu$ M) und Met-Enkephalin (50  $\mu$ M) in An- (unten rechts) und Abwesenheit (unten links) von NTX, NAL und norBNI in Kombination (1  $\mu$ M). Die gestrichelten Linien zeigen die gewählten Grenzwerte zur Quantifizierung der pRII-Antwort in RII $\beta$ -negativen und RII $\beta$ -positiven DRG-Neuronen. Die Zahlen repräsentieren den relativen Prozentsatz der Zellen im jeweiligen Quadranten. Dargestellt sind kombinierte Daten von  $n = 4$  Experimenten mit einer durchschnittlichen Zellzahl von 861 ( $SD = 77$ ) DRG-Neuronen pro Kondition.

Wider Erwarten wiesen die generierten Daten darauf hin, dass sich bei Kombination der einzelnen OR-Antagonisten keine additiven Effekte einstellen. So ähnelte der Effekt der kombinierten der OR-Antagonisten stark dem Effekt von NTX allein. Der Effekt stellte sich darüber hinaus als weniger konsistent dar (Abb. 26 und 27, A rote Linie vs. Abb. 29, A rote Linie). Die Dosis-Wirkungskurve, die unter Verwendung von NTX allein generiert wurde, unterschied sich nicht signifikant von der, die unter Verwendung von NTX, NAL und norBNI in Kombination generiert wurde ( $F_{3,61} = 0,2793$ ,  $p = 0,8401$ ).

OR-Antagonist	IC <sub>50</sub>	Mittelwertdifferenz ± SEM	t (df)	p
NTX	1,3 nM	0,1 a.u. ± 0,025	t (3) = 4,163	0,0252
NAL	< 0,32 nM	0,13 a.u. ± 0,018	t (2) = 7,181	0,0188
norBNI	-	-	t (4) = 0,3669	0,7323
NTX + NAL + norBNI	0,41 nM	0,094 a.u. ± 0,031	t (4) = 3,056	0,0378

**Tabelle 9: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Versuchsreihe 4.4 „Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) und Norbinaltorphimin (KOR) allein und in Kombination“.** Aufgelistet sind die mittlere inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>), die Mittelwertdifferenz ± SEM sowie t-Wert, Freiheitsgrade (df) und p-Wert in Abhängigkeit zum verwendeten OR-Antagonist.

---

## 5 Diskussion

### 5.1 Allgemein

Trotz der zentralen Rolle, die Opioide in der Schmerztherapie von Patientinnen und Patienten Fachrichtungen einnehmen, besteht für viele Indikationen keine ausreichende Evidenz. Gerade die Wirksamkeit einer Langzeit-Opioidtherapie (> 26 Wochen) konnte bisher nicht hinreichend wissenschaftlich belegt werden (66). Letztere führt in fast allen Fällen zu einer Toleranzentwicklung, die eine Dosissteigerung notwendig macht. Letztere erhöht die Wahrscheinlichkeit für unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Obstipation, Atemdepression, Tod und Entwicklung von Abhängigkeit sowie Entzugssymptomen bei Absetzen, die den Therapieverlauf oft negativ beeinflussen (36). Die Entschlüsselung der intrazellulären Signalkaskaden und der funktionellen Zusammenhänge des Opioidsystems mit anderen Neurotransmitter-Systemen, wie beispielsweise dem serotonergen System, kann dabei helfen die Wirksamkeit einer Opioidtherapie zu steigern, ohne dabei das Risiko für unerwünschte Arzneimittelwirkungen zu erhöhen. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind noch nicht vollständig erforscht und bedürfen weiterer Untersuchungen. Ist es beispielsweise möglich die 5-HT induzierte PKA-II-Aktivität durch selektive Aktivierung des NOPR oder des KOR zu inhibieren, wie es bereits für den MOR gezeigt werden konnte? Die Analyse des Effekts eines 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-spezifischen Antagonisten auf die Inhibition der 5-HT-Antwort durch OR-Agonisten kann weitere Erkenntnisse über die funktionellen Zusammenhänge von Opioid- und Serotonin-System liefern. Darüber hinaus birgt die Rolle der unterschiedlichen OR-Isoformen im Hinblick auf die PKA-II-Inhibition noch viele offene Fragen. Inwiefern die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische OR-Agonisten über die selektive Aktivierung der verschiedenen OR-Isoformen vermittelt wird, wurde daher durch die selektive Blockierung der Rezeptorisoformen unter Verwendung isoformspezifischer OR-Antagonisten untersucht.



---

## 5.2 Partielle Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)

Die Signalkaskaden von Opioid- und Serotoninrezeptoren sind funktionell eng miteinander verknüpft, rufen jedoch teilweise gegensätzliche Reaktionen hervor. Sie dienen u. a. gemeinsam der Regulation des Schmerzempfindens (94,138). Sowohl in peripheren als auch in zentralnervösen Neuronen aktiviert Serotonin über G<sub>s</sub>-gekoppelte 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren die Adenylcyclasen (AC). In DRG-Neuronen nimmt der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der 5-HT-induzierten Aktivierung der Proteinkinase A II (PKA II) ein (83). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei den Opioidrezeptoren um G<sub>i</sub>-Protein gekoppelte Rezeptoren, die inhibitorisch auf die AC wirken (158). Hierbei vermitteln Opioide ihre Wirkung hauptsächlich über AC5 (96,97,191). Ob 5-HT<sub>4</sub> seine Wirkung ebenfalls hauptsächlich über die spezifische Aktivierung einer AC-Isoform vermittelt, ist Gegenstand aktueller Forschung. Der funktionelle Antagonismus zwischen Opioid- und Serotoninrezeptorkaskade findet bereits mehrfach klinisch Anwendung. Serotonin-, besonders 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten werden häufig zur Behandlung systemischer, opioidinduzierter unerwünschter Arzneimittelwirkungen eingesetzt. Dies wird im Folgenden an zwei Beispielen veranschaulicht. Erstens können opioidinduzierte Atemdepressionen mit 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten behandelt werden. Manzke et al. zeigten diesbezüglich im Tiermodell, dass die Aufhebung einer opioidinduzierten Atemdepression unter fortbestehendem analgetischem Effekt durch selektive Stimulation von 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren mittels 5-HT<sub>4</sub>-Agonisten wie BIMU8 möglich ist. Im Zuge dessen wurde gezeigt, dass beide Rezeptoren im Prä-Bözing-Komplex des Atemzentrums exprimiert werden (113). Zweitens werden 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten zur Therapie opioidinduzierter Obstipationen genutzt (18,168). In diesem Fall werden sowohl 5-HT<sub>4</sub>- als auch Opioidrezeptoren von enterischen Neuronen des *Plexus myentericus* gebildet, welche direkt die Peristaltik des Verdauungstraktes regulieren. Prucaloprid führt als potenter und hoch spezifischer 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonist bei opioidinduzierter Obstipation, besonders in den ersten Wochen der Anwendung, zu einer signifikanten Steigerung der gastrointestinalen Motilität und Stuhlfrequenz (179,126). Dementgegen konnten Sengupta et al. mit ihren veröffentlichten Daten zeigen, dass der 5-HT<sub>4</sub>-Agonist Tegaserod durch die Freisetzung supraspinaler Opioide, zusätzlich zur prokinetischen Wirkung, viszeroanalgetische Effekte erzielt. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung supraspinaler 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren zur Freisetzung supraspinaler Opioide führt, was wiederum über absteigende noradrenerge spinale Bahnen zu Analgesie im Gastrointestinaltrakt führt (174). Letzteres belegt die Komplexität der Wechselwirkungen zwischen serotonergem und Opioid-System, die nicht auf einen reinen

---

Antagonismus zu reduzieren und bis heute nicht vollständig erforscht sind. Ein weiteres Beispiel für die Komplexität der Interaktion zwischen serotonerger und opioiderger System stellt die synergistische Wirkung von 5-HT<sub>4</sub>-Agonisten und manchen Opioid-Peptiden auf die adrenokortikale Kortikosteroidgenese dar. Louiset et al. konnten mithilfe von Fluoreszenzstudien in vitro und in vivo zeigen, dass die humane Kortikosteroidproduktion in der Nebennierenrinde über den 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor stimuliert wird. Die Wirkung konnte auf die Aktivierung der AC und einwärts gerichteter Ca<sup>2+</sup>-Kanäle vom T-Typ zurückgeführt werden (106). Auch MOR-Agonisten stimulieren ACTH-vermittelt kurzzeitig die Freisetzung von Kortikosteroiden. Dies konnte jedoch nur im Tiermodell dargestellt werden und führt bei langfristiger Opioidtherapie zur Suppression der der ACTH-Ausschüttung (88,53,28).

Um weitere Erkenntnisse über das Zusammenspiels von Serotonin- und Opioidsystem zu generieren, untersuchte ich in der ersten Versuchsreihe dieser Arbeit, ob die Serotonin-induzierte PKA-II-Aktivierung MOR-unabhängig durch die Stimulation anderer OR-Isoformen (KOR und NOP) inhibiert werden kann. Die Aktivierung der PKA II durch 5-HT stellte sich in der vorgestellten Versuchsreihe im Vergleich mit anderen Versuchsreihen, in denen der direkte AC-Aktivator Forskolin zur Stimulation der PKA II genutzt wurde, als weniger konsistent dar. Es zeigten sich innerhalb der Versuchsreihe starke Schwankungen der 5-HT-vermittelten maximalen pRII-Intensitäten (Abb. 2 - 5, A graue vs. grüne Linie). Darüber hinaus zeigte sich 5-HT als der weniger potente Aktivator der PKA II im Vergleich zu Forskolin (Abb. 1, Fsk). Diese Unterschiede können teilweise durch unterschiedliche Eigenschaften dieser AC-Aktivatoren erklärt werden. Forskolin aktiviert, mit Ausnahme von AC9, alle Adenylylcyclase-Isoformen und somit PKA II in allen DRG-Neuronen, inklusive nicht-nozizeptiver Mechano- und Propriozeptoren (65,140,151). Zudem erfolgt die Aktivierung direkt und somit unabhängig von Rezeptoren sowie von assoziierten G-Proteinen (139, 173). Im Gegensatz dazu erfolgt die Expression der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren stark subgruppenspezifisch. Sie werden nahezu ausschließlich in sogenannten nicht-peptidergen Nozizeptoren exprimiert, die nur 20 - 30 % der DRG-Neuronen ausmachen (105). Dementsprechend wird nur in 20 - 30 % muriner DRG-Neuronen PKA II durch 5-HT aktiviert (83). Im Einklang mit diesen Daten konnte ich ebenfalls beobachten, dass ca. 20 % der DRG-Neuronen bei der submaximalen Dosis von 250 nM 5-HT reagieren. Dies war so zu erwarten, da die relative Änderung des pRII-Signals mit 1.3-1.4-fach leicht unter dem publizierten Maximalwert von 1.6-fach bei hohen 5-HT-Dosen (>1 µM) liegen (83). Die beschriebenen Unterschiede bezüglich der 5-HT und der Forskolin-induzierten PKA-Aktivierung sind reine Beobachtungen und können von mir nicht mit ausreichender Evidenz belegt werden. Hierfür sollten in zukünftigen Arbeiten, die pRII-Intensitäten 5-HT- und

---

Forskolin-stimulierter DRG-Neuronen in eigenständigen Versuchsreihen verglichen und auf Unterschiede analysiert werden.

Fentanyl erwies sich in Vorarbeiten bereits als potenter MOR-Agonist, mit dem es uns gelang, die 5-HT-vermittelte PKA-II-Aktivierung partiell zu inhibieren. Dies geht aus bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe hervor (83). Ich konnte in dieser Arbeit zeigen, dass dieser Effekt auch durch OR-Agonisten anderer OR-Isoformen vermittelt wird. Durch keinen der genutzten OR-Agonisten wurde die Basalaktivität der PKA II beeinflusst. Dies deckt sich mit den Beobachtungen meiner Kollegin Ashley Storck, die in ihren Experimenten Forskolin anstelle von 5-HT zur Aktivierung der PKA II verwendete (Abb. 1, schwarze vs. blaue Linie). Dies deutet darauf hin, dass die untersuchten DRG-Neuronen im unstimulierten Zustand über eine geringe Adenylylcyclaseaktivität und demzufolge auch über eine geringe basale PKA-II-Aktivität verfügen.

Met-Enkephalin aktiviert als unselektiver OR-Agonist sowohl MOR als auch DOR und erwies sich als äußerst potenter Inhibitor der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivierung. Bereits in niedriger Dosierung (16 nM) reduzierte Met-Enkephalin die gemessene pRII-Intensität und folglich die PKA-II-Aktivität 5-HT-stimulierter DRG-Neuronen. Dieser statistisch signifikante Effekt ließ sich dosisabhängig steigern, war jedoch auch in hoher Stoffmengenkonzentration (50 µM) nur partiell ausgeprägt. In hoher Dosierung wurde eine durchschnittliche Reduktion der pRII-Intensität um 0,29 a.u. beobachtet (Abb. 2, A blaue Linie). Der Effekt zeigte sich in vorherigen Experimenten, in denen Forskolin anstelle von 5-HT verwendet worden war, ähnlich ausgeprägt. Letztere zeigten ebenfalls bereits bei geringer Met-Enkephalin-Konzentration (16 nM) eine PKA-Reduktion, die sich dosisabhängig steigern ließ (Abb. 1 Unselective Agonists). In Relation zu bereits veröffentlichten Daten unserer Arbeitsgruppe, welche die Inhibition der Serotonin-induzierten PKA-II-Aktivität durch Fentanyl beschreiben, erwies sich der unselektive OR-Agonist Met-Enkephalin gegenüber dem MOR-Agonisten Fentanyl als weniger potent. Ein Vergleich der IC<sub>50</sub>-Werte macht dies deutlich. So betrug der IC<sub>50</sub>-Wert für Fentanyl in einem Konzentrationsbereich von 0 - 10 µM 97 nM, wohingegen er für Met-Enkephalin in einem Konzentrationsbereich von 0 - 50 µM aufgrund des Kurvenverlaufs, der keine klare sigmoidale Form aufwies, nur unzureichend bestimmt werden konnte und ungefähr 520 nM betrug (83). Dies legt den Schluss nahe, dass MOR für die Inhibition der 5-HT-induzierten pRII-Antwort als funktionell ausschlaggebend anzusehen sind.

Der KOR-Agonist Dynorphin A reduzierte die 5-HT-induzierte pRII-Intensität in hoher Dosierung (50 µM) ebenfalls signifikant. Der maximale Effekt war gegenüber dem von Met-Enkephalin etwas weniger stark ausgeprägt. Die durchschnittliche Änderung der pRII-Intensität betrug -0,18 a.u. (Abb. 3, A blaue Linie 50 µM). Der IC<sub>50</sub>-Wert für Dynorphin A konnte

---

auf 1,45  $\mu\text{M}$  bestimmt werden. Möglicherweise verliert Dynorphin A in hoher Dosierung seine KOR-Spezifität und aktiviert ebenfalls MOR. Dies könnte die ähnliche maximale Ausprägung der Inhibition für Dynorphin A und Met-Enkephalin erklären.

Nozizeptin zeigte im unteren Konzentrationsbereich (0 - 2  $\mu\text{M}$ ) keine Effekte auf die Serotonin-induzierte pRII-Intensität. Nach Stimulation mit 10  $\mu\text{M}$  Nozizeptin konnte eine erhebliche Reduktion der PKA-II-Aktivität gemessen werden. Der Effekt ließ sich unter Erhöhung der Dosis auf 50  $\mu\text{M}$  nicht signifikant verstärken, sodass der maximale Nozizeptin-Effekt bereits ab einer Dosis von 10  $\mu\text{M}$  erreicht wurde und zu einer Reduktion der pRII-Intensität um ca. 0,12 a.u. führte (Abb. 4, A blaue Linie 50  $\mu\text{M}$ ). Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert wurde auf 9,31  $\mu\text{M}$  bestimmt. Diese Ergebnisse decken sich nur teilweise mit denen aus früheren Experimenten. Unter Nutzung von Forskolin anstelle von 5-HT zeigte sich der maximale Effekt erst ab einer Dosis von 50  $\mu\text{M}$ . Bereits Mitte der 90er Jahre konnten Reinscheid et al. und Meunier et al. demonstrieren, dass Nozizeptin trotz seiner, den OR-Agonisten ähnlichen, Molekularstruktur nicht an den bekannten OR (MOR, DOR und KOR) bindet. Weiterhin konnten sie zeigen, dass NOP, trotz großer molekularer Ähnlichkeit mit den OR, keinerlei Affinität gegenüber MOR-, DOR- oder KOR-spezifischen OR-Agonisten zeigen (159, 122). Daraus ist abzuleiten, dass der, unter Verwendung hoher Nozizeptin-Dosen beobachtete, Effekt auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort und demzufolge auf die PKA-II-Aktivierung nicht durch den Verlust der Spezifität zugunsten des MOR erklärt werden sollte. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des dritten Teils dieser Arbeit, die andeuten, dass eine Reversion der Nozizeptin-vermittelten PKA-II-Inhibition unter Verwendung der getesteten OR-Antagonisten (NTX, NAL, norBNI) nicht erzielt werden kann (Abb. 10., 15 und 20, A blaue Linie).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 5-HT einen potenten, körpereigenen PKA-Aktivator darstellt, unter dessen Verwendung sich die Auswirkung von Opioiden auf stimulierte DRG-Neuronen angemessen analysieren lässt. Gegenüber dem Effekt von Forskolin stellte sich der 5-HT-Effekt auf die pRII-Antwort jedoch als weniger konsistent und weniger stark ausgeprägt dar. Dies ist wahrscheinlich im Wesentlichen der Tatsache geschuldet, dass 5-HT nur eine nozizeptive Subgruppe der DRG-Neuronen aktiviert. Weiterhin konnte unter Verwendung hoher Dosierungen aller getesteten OR-Agonisten die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität inhibiert werden. Der Effekt war jedoch stets nur partiell ausgeprägt. Ob die PKA-II-Inhibition durch verschiedene OR-Agonisten spezifisch durch die selektive Aktivierung der respektiven OR-Isoformen vermittelt wird oder ob in höheren Konzentrationen unspezifisch MOR aktiviert werden, wurde im dritten Teil dieser Arbeit durch die Kombination der isoformspezifischen OR-Agonisten mit isoformspezifischen OR-Antagonisten dargestellt.

---

### 5.3 Nicht-synergistische Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch den 5-HT<sub>4</sub>-Antagonisten GR113808 und den MOR-Agonisten Fentanyl

Wie oben gezeigt, wirken sich G<sub>s</sub>- und G<sub>i</sub>-Protein-gekoppelte Rezeptorkaskaden gegensätzlich auf ihre jeweiligen Zielproteine aus. Während unter Serotoninstimulation die PKA-II-Aktivität in DRG-Neuronen gesteigert wird, lässt sich dieser Effekt mittels OR-Agonisten partiell inhibieren. Auf der Basis dieser Erkenntnisse stellte ich die These auf, dass sich die Wirkung eines Opioids auf die 5-HT-induzierte pRII-Antwort durch Koapplikation eines 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor-Antagonisten synergistisch potenzieren lässt. Demzufolge sollten in ihrer Dosis reduzierte Opiode bei Zugabe eines 5-HT<sub>4</sub>-spezifischen Antagonisten einen ähnlichen inhibitorischen Effekt auf die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität zeigen wie unter Verwendung der, in vorherigen Experimenten ermittelten, wirksamen Dosis.

An dieser Stelle sollen kurz die Begriffe „Synergismus“ und „Additivität“ unterschieden werden. Beide Begriffe benennen Formen von Kombinationseffekten, die größer sind als die Effekte der Einzelsubstanzen. Während additive Effekte zwischen ähnlichen Substanzen mit ähnlichen Wirkmechanismen auftreten, treten synergistische Effekte zwischen interaktiv wirkenden Substanzen auf. Diese interaktiv wirkenden Substanzen führen über unterschiedliche Wirkmechanismen zu, gegenüber den Einzelsubstanzen, verstärkten Effekten (13).

Ich konnte zeigen, dass GR113898 als 5-HT<sub>4</sub>-Antagonist die PKA-II-Grundaktivität der unstimulierten DRG-Neuronen nicht beeinflusst (Abb. 5, A graue vs. schwarze Linie). Dahingegen wurde in dem von mir durchgeführten Experiment eine signifikante Reduktion der PKA-Grundaktivität der unstimulierten DRG-Neuronen, unter die auf 1 normierte Basislinie, durch den MOR-Agonisten Fentanyl beobachtet (Abb. 5, B graue vs. schwarze Linie). Da sich jedoch trotz Dosissteigerung (0 - 10 µM) keine Dosis-Wirkungs-Beziehung ableiten ließ und sich diese Ergebnisse nicht mit denen früherer Experimente deckten, musste am ehesten von einem Messfehler ausgegangen werden. Frühere Experimente zeigten, dass Fentanyl die PKA-Grundaktivität nicht verändert (Abb. 1, MOR Agonists Fentanyl).

Mit Hilfe der analysierten Daten konnte die Erkenntnis aus früheren Studien, der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptor sei als funktionell potent und notwendig für die 5-HT-induzierte PKA-Aktivierung in DRG-Neuronen anzusehen, bestärkt werden (83). Die 5-HT-induzierte pRII-Antwort konnte bereits unter Verwendung sehr geringer Dosen (1,6 nM) des 5-HT<sub>4</sub>-spezifischen Antagonisten GR113808 partiell und unter Verwendung höherer Dosen (1 µM) vollständig inhibiert werden (Abb. 5, A blaue Linie). Der IC<sub>50</sub>-Wert konnte auf 13,2 nM bestimmt werden. Wie in vorherigen Studien gezeigt, inhibiert Fentanyl in geringer Dosis (10 nM) die 5-HT-induzierte pRII-Antwort

---

nicht. Ich erwartete durch Koapplikation eines 5-HT<sub>4</sub>-Antagonisten in steigender Dosis (0 - 5 µM) eine synergistische Wirkung und demzufolge einen gesteigerten Effekt von Fentanyl auf die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität. Entgegen dieser Vermutung zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen GR113808 allein und GR113808 in Kombination mit 10 nM Fentanyl in Bezug auf die Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität (Abb. 5, C obere vs. untere Reihe). Der IC<sub>50</sub>-Wert für diese Kondition betrug 17,6 nM. In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass Fentanyl ab dem oberen nanomolaren Bereich (400 nM) einen inhibitorischen Effekt auf die 5-HT-vermittelte pRII-Antwort bewirkt. Eine vollständige Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität gelang auch unter Verwendung höherer Dosen (10 µM) nicht. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag bei 316 nM. Bereits in Abwesenheit von Fentanyl reduziert GR113808 in geringer Dosis (5 nM), als potenter 5-HT<sub>4</sub>-Antagonist, die 5-HT-vermittelte pRII-Antwort. Dieser Effekt wurde durch Koapplikation von Fentanyl im unteren nanomolaren Konzentrationsspektrum (< 80 nM) nicht beeinflusst. Unter erhöhter Fentanyldosis (> 80 nM) zeigte sich eine verstärkte Inhibition der PKA II, welche auch unter höherer Fentanyldosis (10 µM) nur partiell ausgeprägt war. Der IC<sub>50</sub>-Wert betrug 83,2 nM (Abb. 5, D obere vs. untere Reihe). Obwohl GR113808 die Dosis-Wirkungskurve der Fentanyl-vermittelten PKA-II-Inhibition signifikant beeinflusst, wurde im oberen getesteten Konzentrationsbereich (10 µM) kein signifikanter Unterschied der PKA-II-Inhibition durch Fentanyl in An- und Abwesenheit von GR113808 gemessen. Die deutliche Reduktion des IC<sub>50</sub>-Wertes könnte als synergistischer Effekt zwischen GR113808 und Fentanyl interpretiert werden. Jedoch beruhen die unterschiedlichen Verläufe der Dosis-Wirkungskurven nicht auf einer gesteigerten Wirksamkeit von Fentanyl, sondern auf einer reduzierten Serotoninantwort. GR113808 reduziert bereits in Abwesenheit von Fentanyl die 5-HT-induzierte pRII-Intensität.

Entgegen meiner Vermutung konnte ich in dieser Versuchsreihe keinen Synergismus zwischen 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoragonisten und MOR-Agonisten darstellen. Zusammenfassend konnte eine Potenzierung der MOR-vermittelten PKA-II-Inhibition durch Zugabe eines 5-HT<sub>4</sub>-Antagonisten in dieser Versuchsreihe nicht erzielt werden.

---

#### 5.4 Partielle Reversion der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)

Wie in der Einleitung und im ersten Teil dieser Arbeit dargestellt, konnte mittels isoformspezifischer OR-Agonisten sowohl die Forskolin- als auch die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität partiell inhibiert werden. Dabei wurde die These aufgestellt, dass die getesteten OR-Agonisten in hoher Dosierung ihre Selektivität zugunsten des MOR verlieren. Um zu überprüfen, ob die beobachtete PKA-II-Inhibition durch die selektive Aktivierung bestimmter Opioidrezeptor-Isoformen vermittelt wird, führte ich mehrere Dosis-Wirkungs-Experimente durch. Ich überprüfte mit diesen, ob eine Reversion der PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische OR-Agonisten mittels spezifischer und unspezifischer OR-Antagonisten erzielt werden kann. Ich nutzte dafür die OR-Antagonisten Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC (NOP) und analysierte deren dosisbezogenen Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch), DAMGO (MOR), Deltorphin II (DOR), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP) in konstanter Dosierung (50  $\mu$ M). Auch in diesem Experiment gelang es mittels Forskolin eine deutliche pRII-Antwort zu induzieren. Die relative Änderung betrug dabei ca. 1,4 - 1,5 (Abb. 6 - 20, B Control vs. Fsk). Die erhobenen Daten decken sich mit den Daten früherer Studien und zeigen, dass mittels aller getesteter OR-Agonisten die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität partiell inhibiert werden kann (Abb. 1 vs. Abb. 6 - 20, A blaue Linie 0  $\mu$ M).

In Abwesenheit der OR-Agonisten zeigt keiner der genutzten OR-Antagonisten in dem von uns untersuchten Konzentrationsspektrum einen Effekt auf die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität (Abb. 6 - 20, A grüne vs. graue Linie). Diese Beobachtung deckt sich mit vorhergehenden Ergebnissen der Arbeitsgruppe unter Verwendung von NTX und könnte darauf hindeuten, dass in murinen kultivierten DRG-Neuronen keine basale OR-Aktivität inhibitorisch auf die PKA II wirkt (83).

Naltrexon (NTX) ist ein hochaffiner, unspezifischer OR-Antagonist, welcher klinisch häufig Anwendung findet. NTX-Retard-Präparate sind, neben Methadon- und Buprenorphin-Präparaten, durch die „U.S. Food and Drug Administration“ (FAD) genehmigte Medikamente zum Einsatz bei Opioidabusus (MOUD = „Medication for opioid use disorders“) und stellen eine wichtige Alternativtherapie zur Methadon-Substitution dar (102, 185). Darüber hinaus findet NTX in Kombination mit Bupropion Anwendung in der pharmakologischen Therapie von Fettleibigkeit (135). Interessanterweise konnten Hutchinson et al. mit ihren Studien zeigen, dass NTX und Naloxon an myeloiden Differenzierungsproteinen Typ 2 (MD2), wichtigen Co-

---

Rezeptoren der Toll-Like-Rezeptoren Typ 4 (TLR4), binden und dadurch zur Therapie mechanischer Allodynie eingesetzt werden könnten. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen konnte gezeigt werden, dass opioidinaktive Naloxon- und NTX-Isomere als TLR-4-Antagonisten eine Opioid-induzierte Analgesie potenzieren können. Dabei konnte eine deutliche Reduktion der opioidinduzierten UAWs, Toleranzentwicklungen, Hyperalgesien und des süchtigen Verlangens beobachtet werden (195, 200, 78, 77, 187, 132).

Die oben präsentierten Daten zeigen, dass NTX bereits in geringer Dosierung (3,2 nM) eine Reversion der PKA-II-Inhibition durch OR-Agonisten bewirkt. So konnte in allen Replikaten eine partielle Aufhebung der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin, DAMGO, Deltorphin II und Dynorphin A beobachtet werden (Abb. 6 - 9, A blaue Linie). Die Reversion der Deltorphin-II- und Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition war statistisch nicht signifikant (Tab. 8, NTX/Met-Enkephalin, NTX/Deltorphin II). Unter Verwendung von Met-Enkephalin konnte der Effekt dosisabhängig gesteigert werden. Dabei war letzterer auch nach deutlicher Konzentrationssteigerung (10 µM) nur partiell ausgeprägt. Durchschnittlich wurde ein Anstieg der pRII-Intensität um ca. 0,092 a.u. gemessen (Abb. 6, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/MetEnk). Zwar war die Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX statistisch nicht signifikant, der abgebildete Kurvenverlauf lässt jedoch in höherer Dosierung einen gesteigerten Effekt vermuten. Der IC<sub>50</sub>-Wert betrug 1,8 µM. Interessanterweise konnte ich in der folgenden Versuchsreihe unter Verwendung einer niedrigeren NTX-Dosierung (0 – 1 µM) eine statistisch signifikante Reversion der Met-Enkephalin-vermittelten PKA-II-Inhibition durch NTX darstellen (Tab. 9, Met-Enkephalin/NTX). Der Effekt war mit einer durchschnittlichen Änderung der pRII-Intensität um 0,1 a.u., in der geringeren Dosierung, ähnlich stark ausgeprägt. Möglicherweise konnte ich, durch mehr Erfahrung in der Durchführung der Versuche, die Schwankungen der Messwerte reduzieren, was die Signifikanz der Daten steigerte. Dies stellt eine Schwachstelle der vorliegenden Arbeit dar. Die Durchführung der Experimente ist äußerst fehleranfällig und die Ergebnisse korrelieren eng mit der Qualität der Versuchsdurchführung. Mit steigender Anzahl der durchgeführten Replikate stieg auch die Anzahl der untersuchten Neuronen, was deutlich wird, wenn man die Anzahl der untersuchten DRG-Neuronen pro Kondition der ersten mit denen der letzten Versuchsreihe vergleicht [585 (SD = 160) vs. 861 (SD = 77) DRG-Neuronen pro Kondition].

Die Prästimulation mit NTX resultierte in ähnlichen Effekten auf die PKA-II-Inhibition durch DAMGO und Dynorphin A. In beiden Telexperimenten konnte, wie oben beschrieben, unter Verwendung niedriger NTX-Konzentrationen (3,2 nM) eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition beobachtet werden, wobei dieser Effekt für DAMGO deutlicher ausgeprägt war.



---

Sowohl unter Verwendung von DAMGO als auch Dynorphin A wurde eine signifikante Reversion der OR-vermittelten PKA-Inhibition beobachtet. Des Weiteren konnte in beiden Fällen die Reversion durch eine Konzentrationssteigerung im nanomolaren Bereich (< 400 nM) zunächst nicht signifikant verstärkt werden. Jedoch zeigte sich für beide Substanzen im mikromolaren Konzentrationsspektrum ein weiterer Anstieg der RII-Phosphorylierung (Abb. 7 und 8., A blaue Linie). NTX erwies sich in Bezug auf die DAMGO- (MOR) vermittelte PKA-II-Inhibition als besonders wirkungsvoll. Diese wurde unter Verwendung von NTX beinahe vollständig aufgehoben. Für beide Kombinationen lag der IC<sub>50</sub>-Wert außerhalb des von uns gewählten Konzentrationsspektrums, sicher jedoch < 3.2 nM (Tab. 8, NTX/DAMGO und NTX/Dynorphin A). Unter Stimulation mit Deltorphin II zeigte sich eine starke Streuung der Messwerte, vor allem in Abwesenheit von NTX, was die Interpretation der erhobenen Daten erschwerte (Abb. 9, A Fsk/Ntx/DeltII 0 µM). Auch die Deltorphin-II-vermittelte PKA-II-Inhibition konnte durch eine niedrige Naltrexon-Dosis partiell revertiert werden. Im mikromolaren Bereich (10 µM) zeigte sich keine signifikante Steigerung des beschriebenen Effektes. Der Effekt von NTX auf die Deltorphin-II-induzierte Inhibition der pRII-Antwort war insgesamt nur schwach ausgeprägt. Aufgrund der Streuung der Messwerte, die sich vor allem in Abwesenheit von NTX in Bezug auf die Deltorphin-II-vermittelte Inhibition der pRII-Antwort zeigten, ist nicht sicher erkennbar, ob NTX die PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II beeinflusst (Abb. 9, A blaue Linie). Der Umstand, dass NTX eine klar ersichtliche Wirkung auf die DAMGO- (MOR) vermittelte PKA-II-Inhibition zeigte, könnte ein Hinweis dafür sein, dass Deltorphin-II seine Wirkung MOR-unabhängig vermittelt. NTX zeigte in dem von mir gewählten Konzentrationsspektrum keinen Einfluss auf die NOP-vermittelte PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (Abb. 10, B Fsk/Noc vs. Fsk/Ntx/Noc).

Zusammenfassend war eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch alle OR-Agonisten, mit Ausnahme von Nozizeptin, möglich. Für Deltorphin-II waren die erhobenen Daten nicht eindeutig. Dabei zeigte sich nur für Met-Enkephalin eine dosisabhängige Wirkung. Statistische Signifikanz konnte nur für die Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO und Dynorphin A nachgewiesen werden. Die Daten, die unter Verwendung eines niedrigeren Konzentrationsspektrums von NTX (0 - 1 µM) generiert wurden, zeigen dagegen statistisch signifikante Effekte auf die Met-Enkephalin-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort (Abb. 26, A rote Linie). Deshalb sind die hier erhobenen Daten mit Skepsis zu betrachten. Den deutlichsten Effekt zeigte NTX bei Stimulation mit dem MOR-Agonisten DAMGO. Eine vollständige Reversion der opioidinduzierten PKA-II-Inhibition durch NTX konnte in keiner der getesteten Konditionen beobachtet werden. Es steht ausreichende Evidenz darüber zur Verfügung, dass NTX als kompetitiver, reversibler OR-Antagonist durch OR-Agonisten von

---

den Bindungsstellen der OR verdrängt werden kann (192, 99, 19). Die beschriebene NTX-vermittelte, partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch OR-Agonisten geht somit am ehesten aus der Konkurrenz zwischen NTX und den OR-Agonisten um die Bindungsstellen an den OR hervor. NTX zeigte die deutlichste Wirkung auf die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass DAMGO NTX nur unzureichend aus den MOR-Bindungsstellen verdrängen kann. Demzufolge ist die Affinität von NTX zu MOR besonders hoch. Auf der anderen Seite ist NTX ein inverser Agonist. Das bedeutet, dass NTX auch in Abwesenheit des Agonisten einen Effekt auf die Aktivität der Rezeptoren zeigt. Der Effekt ist entgegengesetzt zu dem Effekt des Agonisten (49). Dies wurde in vorangehenden Arbeiten der Arbeitsgruppe untersucht. Die erhobenen Daten weisen jedoch daraufhin, dass NTX in Abwesenheit der OR-Agonisten und PKA-Aktivatoren wie Forskolin keinen Effekt auf die PKA-II-Aktivität zeigt (83). Interessanterweise wurde die Inhibition der Forskolin-Antwort durch Nozizeptin von NTX nicht beeinflusst. Dies könnte ein erster Hinweis dafür sein, dass NOP-Agonisten ihre Wirkung auf die PKA-II isoformspezifisch und unabhängig von anderen OR-Isoformen vermitteln.

Portoghese et al. stellten 1988 Naltrindol (NAL) als ersten nicht-peptidischen DOR-Liganden mit hoher Potenz und Selektivität vor. Dieses synthetische Alkaloid stellt als hochspezifischer DOR-Antagonist ein wichtiges Werkzeug in der Opioid-Forschung dar (150). Die Lokalisation von DOR und ihre Rolle im endogenen Opioidsystem sowie das Zusammenspiel von DOR und MOR in Bezug auf physiologische Funktionen wie Schmerzkontrolle, Emotion und Belohnung sind Gegenstand aktueller Forschung (111). DOR befinden sich in DRG-Neuronen und deren zentralen Fortsätzen im Hinterhorn des Rückenmarks. Auf spinaler Ebene vermitteln DOR antinozizeptive Effekte und stellen somit eine wichtige pharmakologische Zielstruktur für medikamentöse Analgesie dar (73,76,111). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass diese Effekte von DOR an nicht-TRPV1-exprimierenden afferenten Nervenendigungen und/oder postsynaptischen Hinterhornneuronen vermittelt werden (33). Obwohl DOR scheinbar nicht auf TRPV1-positiven hitzesensitiven Nozizeptoren exprimiert werden, ist es möglich mit Hilfe von DOR-Agonisten die Neurotransmission der Nozizeptoren nach thermischen Stimuli zu blockieren und somit eine thermische Analgesie hervorzurufen. Dies konnte in verschiedenen MOR-Knockout-Mausmodellen dargestellt und repliziert werden. Bisher wurde vermutet, dass dieser Effekt durch ein Zusammenspiel von MOR und DOR vermittelt wird (60,116,169, 180). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen wurde die Verteilung von DOR und das Zusammenspiel mit MOR von Scherrer et al. mit Hilfe von DOReGFP-Reporter-Knockin-Mausmodellen weiter analysiert. Sie konnten zeigen, dass DOR in myelinisierten und nicht-peptidergen unmyelinisierten DRG-Neuronen, nicht aber in peptidergen unmyelinisierten Nozizeptoren, wie

---

beispielsweise Substanz-P (SP)-positiven Nozizeptoren und kaum in Nozizeptoren viszeraler Organe exprimiert werden. Im Gegensatz dazu konnten sie MOR in SP- und TRPV1-positiven unmyelinisierten peptidergen Neuronen nachweisen. Die Analyse der Daten ließ den Schluss zu, dass die oben beschriebene thermische Analgesie durch eine Kreuzreaktion der DOR-Agonisten an MOR hervorgerufen wird und nicht, wie bisher vermutet, durch das Zusammenspiel von DOR und MOR (170). Lacoste et al. zeigten mit Hilfe von Aminosäure-Sequenzvergleichen, dass 64 % der Aminosäuren von MOR und DOR übereinstimmen, wobei die homologen Aminosäure-Sequenzen vor allem die Bindungsstellen der Rezeptoren betreffen, was eine Kreuzreaktion von DOR-Agonisten an MOR wahrscheinlich macht (101). Um die Wechselwirkungen und möglichen Interaktionen zwischen DOR und MOR genau zu verstehen, bedarf es weiterer Studien, um die bisher aufgestellten Thesen mit ausreichender Evidenz zu belegen. Interessanterweise stellt NAL darüber hinaus ein potentes Immunsuppressivum dar, welches die B-Zell-Proliferation unterdrückt, die Zytokinproduktion durch T-Helferzellen reduziert und die NK-Zell-Aktivität vermindert (75). Ähnlich der Wirkung von Cyclosporin A, unterdrückt NAL die allogene Lymphozytenreaktion und vermindert somit die Wahrscheinlichkeit einer Abstoßungsreaktion, beispielsweise nach einer Nierentransplantation (7). OR-Knockout-Mausmodelle weisen darauf hin, dass die immunsuppressiven Eigenschaften von NAL OR-unabhängig vermittelt werden (59). Beruhend auf diesen Erkenntnissen wird die Anwendung von NAL in der Behandlung multipler Myelome untersucht und diskutiert (127). Auch die Anwendung in der Therapie alkoholbezogener Störungen und deren Folgeerkrankungen stellt einen Gegenstand aktueller Forschung dar (114, 131).

Die von mir generierten Daten zeigen, dass NAL im unteren nanomolaren Bereich des gewählten Konzentrationsspektrums (32 nM) die PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II, Met-Enkephalin, DAMGO und Dynorphin A partiell revertierte. Eine vollständige Reversion der PKA-II-Inhibition wurde in keiner der untersuchten Konditionen gemessen (Abb. 11 - 15, A blaue Linie). Der Kurvenverlauf der Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen NAL und Deltorphin II ähnelte dem für NAL in Kombination mit Dynorphin A. In beiden Telexperimenten zeigte NAL in nanomolarer Dosis einen deutlichen Effekt auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition. Unter Verwendung dieser OR-Agonisten zeigte sich keine dosisabhängige Steigerung des beschriebenen Effektes. So wurde auch unter deutlicher Steigerung der Naltrindoldosis (100 µM) keine Verstärkung des Effektes beobachtet, sodass hier von einem Sättigungseffekt auszugehen ist. Dabei erwiesen sich die Messwerte für Dynorphin A gegenüber denen für Deltorphin II als weniger konsistent und unterlagen deutlicheren Schwankungen (Abb. 11 und 14, A blaue Linie). Während die Reversion der Deltorphin-II-vermittelten PKA-II-Inhibition

---

statistisch signifikant war, traf dies für die Reversion der Dynorphin-A-vermittelten PKA-II-Inhibition nicht zu. Die IC<sub>50</sub>-Werte konnten für beide OR-Agonisten nicht genau bestimmt werden (< 32 nM). Sie lagen außerhalb des gewählten Konzentrationsbereiches (Tab. 8, NAL/Deltorphin II, NAL/ Dynorphin A). Die Prästimulation mit NAL in ansteigender Dosis resultierte in einer statistisch signifikanten, dosisabhängigen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO. Erstaunlicherweise zeigte NAL von allen getesteten Konditionen die stärkste Wirkung auf die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition. In hoher Dosierung (20 µM) konnte beinahe eine vollständig ausgeprägte Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO beobachtet werden. Interessant war, dass unter Verwendung von 20 µM NAL ein stärkerer Effekt als unter Verwendung von 100 µM NAL gemessen wurde. Die Ergebnisse unterlagen jedoch einer deutlichen Schwankung. Eine vollständige Aufhebung der PKA-II-Inhibition konnte nicht erreicht werden (Abb. 13, B Fsk/ DAMGO vs. Fsk/Nal/DAMGO). Dies ist damit zu erklären, dass DAMGO zwar eine höhere Affinität gegenüber MOR aufweist, jedoch auch pharmakologische Eigenschaften eines DOR-Vollagonisten besitzt (203). Diese Eigenschaft beruht am ehesten auf den sich stark ähnelnden Aminosäure-Sequenzen. Wie oben beschrieben, sind 64 % der Aminosäuren von MOR und DOR identisch und gleichen sich besonders an den Bindungsstellen der Rezeptoren (101). Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde auf 2,1 µM bestimmt (Tab. 8, NAL/DAMGO). Die PKA-II-Inhibition durch DAMGO könnte dementsprechend auch teilweise durch DOR vermittelt werden. Andererseits ist es möglich, dass NAL ebenfalls an MOR bindet und eine Prästimulation mit NAL dazu führt, dass DAMGO mit NAL um die Bindungsstellen an MOR konkurriert. Die generierten Daten weisen darauf hin, dass NAL in Bezug auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin als weniger potent anzusehen ist. Im unteren Konzentrationsspektrum (< 4 µM) zeigte sich eine schwach ausgeprägte Reversion der PKA-II-Inhibition (Abb. 12, A blaue Linie). Letztere konnte dosisabhängig gesteigert werden, war jedoch im oberen mikromolaren Bereich (100 µM) nur gering ausgeprägt und nicht statistisch signifikant (Abb. 12, B Fsk vs. Fsk/MetEnk vs. Fsk/Nal/MetEnk). Der IC<sub>50</sub> Wert lag bei 1,1 µM (Tab. 8, NAL/MetEnk). NAL zeigte einen gering ausgeprägten, jedoch statistisch signifikanten Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition (Abb. 15, B Fsk vs. Fsk/Noc vs. Fsk/Nal/Noc). Die Werte unterlagen jedoch einer sehr breiten Schwankung, weshalb die Messwerte kritisch zu betrachten sind. Zusammenfassend wurde eine statistisch signifikante Reversion der DAMGO-, Deltorphin-II- und Nozizeptin-vermittelten Inhibition der Forskolin-Antwort durch NAL beobachtet, wobei letztere aufgrund großer Messschwankungen kritisch zu betrachten ist. Die partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A und Met-Enkephalin war statistisch nicht signifikant.

---

Daran anknüpfend wurde der Effekt des KOR-Antagonisten Norbinaltorphimin (norBNI) auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition untersucht. NorBNI ist als Bimorphinan mit pharmakologischen Eigenschaften eines selektiven und kompetitiven KOR-Antagonisten bekannt (149). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass norBNI als KOR-Antagonist, ähnlich dem Pertussis-Toxin, c-Jun N-Terminal Kinasen (JNK) aktiviert. Unter pharmakologischer oder genetischer Ausschaltung von JNK konnten keine Langzeitwirkungen von norBNI beobachtet werden. Dies legt den Schluss nahe, dass norBNI kurzfristig antagonistisch auf die  $G\alpha_i$ -vermittelten Effekte des KOR wirkt. Dahingegen stört norBNI den KOR-Signalweg langfristig durch Aktivierung des JNK-Signalwegs. Dementsprechend würde vor allem die langanhaltende Blockade der KOR-Funktionen im ZNS JNK-abhängig vermittelt werden (26,120,119). In diesem Zusammenhang wird von „funktioneller Selektivität“ (engl. biased agonism) gesprochen. Damit wird die Fähigkeit eines Liganden beschrieben, an einem Rezeptor verschiedene, teils gegensätzliche Signalwege zu induzieren (6). Aufbauend auf diesen Erkenntnissen zeigten Jamshidi et al., dass der langanhaltende Effekt von norBNI an peripheren Neuronen nicht durch die Blockade von KOR, sondern durch die JNK-abhängige Aktivierung der Proteintranslation in peripheren Nervenendigungen hervorgerufen wird. Darüber hinaus konnten sie zeigen, dass die Blockade der KOR mit norBNI zur langfristigen Verminderung einiger KOR-Funktionen wie der AC-Inhibition und der Antinozizeption führt, wohingegen andere Funktionen, wie die ERK-Aktivierung, nicht beeinflusst werden (86). Die klinische Anwendung KOR-spezifischer Antagonisten ist seit längerem Gegenstand medizinischer Forschung. So wurden die Effekte von KOR-Antagonisten in der Therapie verschiedener, vor allem psychiatrischer, Erkrankungen analysiert (121). Hierbei wurden besonders die positiven Effekte bei Suchterkrankungen wie der Kokain- und Opioidabhängigkeit sowie bei klassischen psychiatrischen Krankheitsbildern wie Depressionen, Angststörungen, Psychosen und Schizophrenie (100,196,8,164,109,162,25,163,165) beschrieben.

Durch die Prästimulation mit norBNI konnte die PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A partiell revertiert werden. Hierbei zeigte sich bereits unter Verwendung nanomolarer Dosen (32 nM) ein deutlicher Effekt auf die Dynorphin-A-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort (Abb. 16, A blaue Linie). Unter Dosissteigerung wurde zwar eine Dosis-Wirkungs-Beziehung beobachtet, jedoch war der Effekt auch unter deutlicher Dosissteigerung (100  $\mu$ M) nur partiell ausgeprägt (Abb. 16, B Fsk vs. Fsk/DynA vs. Fsk/norBNI/DynA). Der  $IC_{50}$ -Wert lag bei < 32 nM, konnte aber aufgrund des gewählten Konzentrationsspektrums nicht vollständig abgebildet werden (Tab. 8, NAL/MetEnk). Zwar zeigte sich im Durchschnitt eine Steigerung der pRII-Intensität um 0,13 a.u., die Ergebnisse waren jedoch statistisch nicht signifikant. Unter

---

Verwendung von DAMGO konnte ein deutlicher, statistisch signifikanter norBNI-Effekt beobachtet werden. Nach Prästimulation mit norBNI wurde beinahe eine vollständige Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO gemessen (Abb. 18, B Fsk vs. Fsk/DAMGO vs. Fsk/norBNI/DAMGO). Auch hier konnte eine dosisabhängige Wirkung beobachtet werden. Der IC<sub>50</sub>-Wert wurde auf 1,3 µM bestimmt (Tab. 8, norBNI/DAMGO). Dies ist insofern erstaunlich, da DAMGO, wie auch DADLE, als Vollagonist der MOR und DOR bekannt ist, jedoch nur einen Partialagonisten des KOR darstellt (203). Die Prästimulation mit norBNI resultierte auch bei Met-Enkephalin-stimulierten DRG-Neuronen in einer dosisabhängigen, statistisch signifikanten Reversion der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition (Abb. 17, A blaue Linie). Der Effekt war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, als für DAMGO beschrieben. Der IC<sub>50</sub>-Wert lag im Vergleich höher und wurde auf 5,5 µM bestimmt (Tab. 8, norBNI/metENk). Auch unter Verwendung von Deltorphin II führte die Prästimulation mit norBNI zu einer statistisch signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition. Im nanomolaren Bereich (32 nM) wurde eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition beobachtet, der Effekt konnte jedoch auch unter Verwendung hoher Dosen (100 µM) nicht gesteigert werden, sodass hier von einem Sättigungseffekt auszugehen ist (Abb. 19, A blaue Linie). Eine exakte Bestimmung des IC<sub>50</sub>-Wertes war aufgrund des gewählten Konzentrationsbereichs nicht möglich, er lag jedoch sicher unter 32 nM (Tab. 8, norBNI/ Deltorphin II). Die vorgestellten Daten zeigen deutliche Parallelen zu den Daten vorheriger Experimente, in denen NTX und NAL anstelle von norBNI mit Deltorphin II kombiniert wurden. Die aufgezählten OR-Antagonisten führten im nanomolaren Konzentrationsbereich zu einer partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II, wobei dieser Effekt auch unter Verwendung höherer Dosen nicht gesteigert werden konnte. Diese Parallelen lassen sich ebenfalls an der Bestimmung der IC<sub>50</sub>-Werte erahnen. So konnte in keinem der vorgestellten Kombinationsexperimente mit Deltorphin II der IC<sub>50</sub>-Wert exakt bestimmt werden und lag immer unter dem von uns gewählten Konzentrationsspektrum der OR-Antagonisten (Tab. 8, Deltorphin II). Ähnlich der Wirkung von NTX zeigte norBNI keine signifikanten Effekte auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition. Zusammenfassend resultierte die Prästimulation der DRG-Neuronen mit norBNI im niedrigen nanomolaren Konzentrationsbereich in einer partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch alle getesteten OR-Agonisten, mit Ausnahme von Nozizeptin. Der deutlichste Effekt wurde unter Verwendung des MOR-Agonisten DAMGO beobachtet. Die Ergebnisse waren unter Verwendung von Met-Enkephalin, DAMGO und Deltorphin II statistisch signifikant. Interessanterweise konnte unter Verwendung von Dynorphin A keine statistische Signifikanz nachgewiesen werden.

---

Für JTC und Nozizeptin zeigten sich von den übrigen OR-Antagonisten und Agonisten stark abweichende Ergebnisse (s. 4.3.4). JTC zeigte im unteren getesteten Konzentrationspektrum (0 - 20  $\mu\text{M}$ ) keinen Effekt auf die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition. Darüber hinaus wurde die PKA-II-Inhibition durch andere OR-Agonisten ebenfalls nicht durch JTC beeinflusst (Abb. 21 - 25, blaue Linie). In hoher Dosis (100  $\mu\text{M}$ ) wurde in allen Replikaten eine Reduktion der Zellzahl um ca. 72 % gemessen. Dies deutet darauf hin, dass JTC in höherer Dosierung toxisch auf DRG-Neuronen wirkt und somit nicht als geeignetes Reagenz für den von mir angewendeten „pRII/RII $\beta$ -Assay“ verwendet werden kann (Abb. 21 - 25, B Number of Cells). Unter Verwendung von Nozizeptin gelang es, in der von uns gewählten Dosierung (50  $\mu\text{M}$ ), die Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität signifikant zu inhibieren. Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Nozizeptin auch einen potenten Inhibitor der 5-HT-vermittelten PKA-II-Aktivität darstellt. Die oben präsentierten Daten zeigen, dass die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition lediglich durch NAL signifikant beeinflusst wird, wobei die Daten aufgrund ihrer deutlichen Schwankung kritisch beurteilt werden sollten (Abb. 10, 15 und 20, B Fsk vs. Fsk/OR-Antagonist). Dies legt den Schluss nahe, dass die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition durch die selektive Aktivierung von NOP induziert wird. Bedauerlicherweise war JTC, aufgrund seiner toxischen Wirkung im oberen mikromolaren Bereich, kein geeignetes Reagenz für den dargestellten Versuchsaufbau, sodass diese Vermutung nicht weiter belegt werden konnte.

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen sollte analysiert werden, ob NTX, NAL und norBNI additive Effekte auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition vermitteln. Dafür führte ich weitere Kombinationsexperimente durch, in denen die DRG-Neuronen mit NTX, NAL und norBNI in Kombination prästimuliert wurden. Dabei wurde der Effekt dieser Kombination auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin mit dem Effekt der o. g. OR-Antagonisten im Einzelnen verglichen. Ich wählte Met-Enkephalin für diese Versuchsreihe aus, da es sich in den vorherigen als besonders potenter und konstanter PKA-II-Inhibitor erwies. Dort zeigte ich, dass das gewählte Konzentrationspektrum die spezifischen Eigenschaften der OR-Antagonisten nur unzureichend darstellt. Aus diesem Grund wählte ich hier einen deutlich reduzierten Konzentrationsbereich (0 - 1  $\mu\text{M}$ ). NTX, NAL und norBNI zeigten in Abwesenheit von Met-Enkephalin, auch in Kombination keinen Einfluss auf die Forskolin-Antwort (Abb. 26 - 29, A graue Linie). NTX und NAL zeigten bereits im picomolaren Bereich (320 pM) einen Effekt auf die Met-Enkephalin induzierte PKA-II-Inhibition. Darüber hinaus zeigte sich in beiden Teilexperimenten eine dosisabhängige, statistisch signifikante Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin, wobei der Effekt nur partiell ausgeprägt war. Die Daten, die unter Verwendung von NAL erhoben wurden, erwiesen sich, im Vergleich zu denen unter

---

Verwendung von NTX, als deutlich weniger konstant und zeigten von geringerer Wirksamkeit in Bezug auf die PKA-II-Inhibition (Abb. 26, A rote Linie vs. Abb. 27, A rote Linie). Die präsentierten Ergebnisse zeigten, dass norBNI in dem gewählten Konzentrationsspektrum die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin nicht signifikant beeinflusst (Abb. 28, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/norBNI/MetEnk). Dieses Ergebnis war vorab so zu erwarten, da der in Vorarbeit ermittelte  $IC_{50}$ -Wert mit  $5,5 \mu\text{M}$  außerhalb des hier gewählten Konzentrationsspektrums ( $0 - 1 \mu\text{M}$ ) lag (Tab. 8 norBNI/ Met-Enkephalin). Nach fünfminütiger Prästimulation der DRG-Neuronen mit einer Kombination aus NTX, NAL und norBNI wurde eine dosisabhängige, statistisch signifikante Reversion der Met-Enkephalin-induzierten Inhibition der Forskolin-Antwort beobachtet (Abb. 29, A rote Linie). Die erhobenen Daten ähnelten stark denen, die unter Prästimulation mit NTX allein generiert wurden. Es zeigte sich bereits im picomolaren Konzentrationsbereich ( $320 \text{ pM}$ ) eine partielle Reversion der PKA-II-Inhibition (Abb. 26, A rote Linie vs. Abb. 26, A rote Linie). Dieser Effekt ließ sich zwar dosisabhängig steigern, war jedoch auch nach deutlicher Konzentrationssteigerung ( $1 \mu\text{M}$ ) nur partiell ausgeprägt (Abb. 29, B Fsk/MetEnk vs. Fsk/Ntx/Nal/norBNI/MetEnk). Der maximale Effekt der kombinierten OR-Antagonisten war nicht signifikant höher ausgeprägt als der von NTX oder NAL allein. Darüber hinaus wurde eine deutliche Streuung der Messwerte beobachtet, aufgrund derer der  $IC_{50}$ -Wert nicht sicher bestimmt werden konnte. Der Verlauf der Dosis-Wirkungskurve der kombinierten OR-Antagonisten unterschied sich nicht signifikant von dem der Dosis-Wirkungskurve, die unter Verwendung von NTX allein berechnet wurde. Die generierten Daten zeigten, dass die Kombination der getesteten OR-Antagonisten keine additiven Effekte auf die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition bewirkt.

In Zusammenschau der vorliegenden Ergebnisse war unter den getesteten Konditionen keine vollständige Reversion der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition durch OR-Antagonisten möglich. Jedoch konnte mit Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) und Norbinaltorphimin (KOR) eine Partielle Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch), DAMGO (MOR), Deltorphin II (DOR) und Dynorphin A (KOR) erzielt werden. Dies führt zu der Vermutung, dass die PKA-II-Inhibition durch isoformspezifische OR-Agonisten nicht durch die selektive Aktivierung bestimmter OR-Isoformen vermittelt wird. Möglicherweise verlieren OR-Agonisten in höherer Stoffmengenkonzentration ihre Selektivität zugunsten anderer OR-Isoformen. Diese Vermutung konnte unter Verwendung einer Kombination der o. g. OR-Antagonisten in niedriger Dosierung nicht bestätigt werden. Ebenso wenig konnten in dem, von uns bewusst niedrig gewählten, Konzentrationsspektrum additive Effekte der o. g. OR-Antagonisten dargestellt werden. Die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition wurde nur durch NAL statistisch signifikant beeinflusst, wobei die Ergebnisse aufgrund ausgeprägter



---

Messschwankungen kritisch zu betrachten sind. Dies führt zu der Annahme, dass Nozizeptin seine inhibitorische Wirkung auf die PKA-II unabhängig von anderen OR-Isoformen durch selektive Aktivierung von NOP induziert. Somit kann die dritte Frage der hier vorliegenden Arbeit, ob die Wirkung der OR-induzierte PKA-II-Inhibition durch die selektive Aktivierung bestimmter OR-Isoformen vermittelt wird, nicht abschließend geklärt werden. Die vorgelegten Daten weisen jedoch darauf hin, dass DOR- und KOR-Agonisten in höherer Dosierung ihre Selektivität zugunsten anderer OR-Isoformen verlieren und die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition durch die selektive Aktivierung des NOP induziert wird.

---

## 5.5 Ausblick

Wie oben beschrieben, gelang es unter Verwendung der getesteten OR-Antagonisten nicht, die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition vollständig zu revertieren. NTX erwies sich als potenter OR-Antagonist, mit dem die OR-induzierte PKA-II-Inhibition partiell revertiert werden konnte. Da im Vergleich zu den anderen OR-Antagonisten ein vermindertes Konzentrationsspektrum gewählt wurde, sollte in weiteren Studien eine Erweiterung des Konzentrationsspektrums von NTX im oberen mikromolaren Bereich ( $> 10 \mu\text{M}$ ) durchgeführt werden, um den Effekt von NTX in höherer Dosierung auf die OR-induzierte PKA-II-Inhibition zu analysieren. Die Ergebnisse aus Kapitel 4.3 führen dementsprechend zur ersten Frage, die in nachfolgenden Arbeiten bearbeitet werden sollte: Kann durch Prästimulation mit NTX in höherer Dosierung ( $> 10 \mu\text{M}$ ) eine vollständige Reversion der OR-induzierten PKA-II-Inhibition erreicht werden?

Des Weiteren sollte eine Wiederholung der letzten Versuchsreihe, welche den Effekt einer Kombination aus NTX, NAL und norBNI auf die Met-Enkephalin-vermittelte PKA-II-Inhibition untersuchte, in einem gesteigerten Konzentrationsspektrum (0 -  $100 \mu\text{M}$ ) durchgeführt werden. Die zweite Frage für zukünftige Arbeiten lautet dementsprechend: Erzielen NTX, NAL und norBNI in hoher Stoffmengenkonzentration (0 -  $100 \mu\text{M}$ ) additive Effekte auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition und ermöglichen so eine vollständige Reversion letzterer?

Interessanterweise zeigten alle getesteten OR-Antagonisten statistisch signifikante Effekte auf die PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR). Die Analyse des Effekts kombinierter OR-Antagonisten auf die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition könnte die Rolle von MOR in Bezug auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition weiter bestärken. Drittens könnte in zukünftigen Arbeiten folgende Frage bearbeitet werden. Erzielen NTX, NAL und norBNI additive Effekte auf die DAMGO-vermittelte PKA-II-Inhibition?

Die dargestellten Daten legen den Schluss nahe, dass MOR eine zentrale Rolle in der OR-vermittelten PKA-II-Inhibition einnehmen. Dies könnte in einem MOR-Knockout Mausmodell weiter untersucht werden. Die vierte Frage, die sich für zukünftige Arbeiten stellen könnte, lautet: Kann die 5-HT- oder Forskolin-induzierte PKA-II-Aktivität im MOR-Knockout-Mausmodell durch OR-Agonisten inhibiert werden und inwiefern unterscheidet sich die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition von der im Wildtyp-Mausmodell?

Ding et al. stellten AT-121 als bifunktionalen MOR- und NOP-Agonisten mit diversen Vorteilen gegenüber herkömmlichen OR-Agonisten vor. Dabei betonten sie die hohe analgetische Potenz bei deutlich reduzierten UAWs, wie beispielsweise kardiovaskulären Ereignissen und Atemdepressionen. Darüber hinaus berge AT-121 wenig bis kein Abhängigkeitspotential und führe deutlich seltener zu opioidinduzierter Hyperalgesie, Toleranzentwicklung oder

---

physischer Abhängigkeit (48). Als Zielstruktur der medikamentösen Analgesie bergen NOP ein großes Potential, welches es weiter zu analysieren gilt. Die von mir generierten Daten führen zu der Vermutung, dass Nozizeptin seine inhibitorische Wirkung auf PKA II unabhängig von anderen OR-Isoformen, NOP-selektiv vermittelt. Diese Vermutung gilt es in nachfolgenden Arbeiten weiter zu untersuchen. Der NOP-Antagonist JTC eignet sich, aufgrund der beobachteten Toxizität im oberen mikromolaren Bereich, nicht als Reagenz des vorgestellten „pRII/RII $\beta$ -Assays“. Eine Wiederholung der Experimente mit anderen NOP-Antagonisten, wie beispielsweise LY-2940094 oder MK-5757 könnte weitere Erkenntnisse über die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition liefern (201). Die fünfte Frage, die sich für nachfolgende Arbeiten stellt, lautet dementsprechend: Wird die Nozizeptin-vermittelte Inhibition der Forskolin-Antwort spezifisch durch die Aktivierung von NOP induziert und kann diese unter Verwendung der NOP-Antagonisten LY-2940094 oder MK-5757 vollständig revertiert werden?

Der Zusammenhang zwischen dem endogenen Opioidsystem und entzündlichen Prozessen wurde über Jahrzehnte intensiv analysiert. Zusammenfassend liegt ausreichend ergebnissichere Evidenz dafür vor, dass die analgetische Potenz von OR-Agonisten aller OR-Isoformen durch Entzündungen verstärkt wird (154,181,134). Dieser Effekt wurde in den 90er Jahren besonders den MOR zugeordnet. Hylden et al. zeigten mit Hilfe von Pfoten-Rückzug-Assays, dass die spinale Potenz von MOR-Agonisten stärker durch induzierte Entzündungen beeinflusst wird als die von DOR- und KOR-Agonisten (79). Entzündliche Prozesse führen auch zu verstärkenden Effekten auf die NOP-Signalkaskade. Andoh et al. wiesen bereits 1997 darauf hin, dass lokale Entzündungen die Genexpression von Nozizeptin in DRG-Neuronen verstärkt (5). Inzwischen wurden verschiedene Mechanismen identifiziert, welche die antinozizeptive Effektivität von OR in entzündetem Gewebe potenzieren. Hierzu zählen eine vermehrte mRNA-Transkription OR-codierender Gene, eine erhöhte Dichte der OR-Rezeptoren sowie ein gesteigerter axonaler Transport der OR in entzündetem Gewebe. Darüber hinaus induzieren Entzündungen eine erhöhte MOR-Bindungsrate und vermehrte G-Protein-Kopplungen (204,155,125,87). Cunha et al. demonstrierten, dass die Aktivierung peripherer KOR entzündliche Hyperalgesien inhibiert. Dabei konnte die Stimulation der nNOS/NO-Signalkaskade als wichtiger Aspekt dieser KOR-Funktion identifiziert werden (45). Eine Sonderrolle im Zusammenhang mit Inflammation werden DOR zuteil. DOR gelten in peripheren Neuronen, in unstimuliertem Zustand, als analgetisch inkompetent (183). Um analgetisch wirksam zu sein, benötigen DOR eine inflammatorische Prästimulation (20,21,166,141). Dabei nehmen GRK2 eine zentrale Rolle ein, da sie die funktionelle Inkompetenz der DOR an der Zellmembran vermitteln (20). Diese DOR-GRK2-Interaktion wird dabei durch die PKA-vermittelte GRK2-Phosphorylierung unterhalten, wobei PKA durch die

---

Proteinkinase-A-Ankerproteine 79/150 (AKAP) an der Zellmembran fixiert werden (21). Bradykinin stellt einen wichtigen Entzündungsmediator dar, welcher Proteinkinase-C (PKC)-abhängig die DOR-GRK2-Interaktion vermindert und PKC-unabhängig den Transport von DOR zur Plasmamembran induziert. Auf diese Weise induziert Bradykinin im Rahmen eines entzündlichen Prozesses Signalkaskaden, die zur antinozizeptiven Kompetenz des DOR in entzündlichem Gewebe führt (21,141). In zukünftigen Studien könnte der Effekt von Entzündungsmediatoren auf die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition untersucht werden. Der vorgestellte „pRII/RII $\beta$ -Assay“ könnte in Kombination mit HCS-Mikroskopie verwendet werden, um die Auswirkung von Entzündungsmediatoren wie Bradykinin auf die OR-induzierte PKA-II-Inhibition zu analysieren. Deltorphin II wurde von mir als potenter DOR-Agonist verwendet. Demnach könnte folgende sechste Frage gestellt werden: Resultiert die Prästimulation der DRG-Neuronen mit Bradykinin oder anderen Entzündungsmediatoren in einer Potenzierung der Deltorphin-II-vermittelten PKA-II-Inhibition? Anzunehmen wäre, dass die Bradykinin-induzierte Reduktion der DOR-GRK2-Interaktion die Deltorphin-II-vermittelte Inhibition der PKA-II-Aktivität verstärkt.

Ji et al. lieferten mit ihren Studien zum Thema KOR-B2R-Dimerisierung ausreichend Evidenz dafür, dass  $\kappa$ -Opioidrezeptoren Heterodimere mit Bradykinin B2 Rezeptoren bilden können. Weiterhin konnten sie mittels EPAC-cAMP-BRET-Biosensoren zeigen, dass Dynorphin A interessanterweise über diese KOR-B2R-Heterodimere intrazelluläres cAMP erhöht. Darüber hinaus wurde eine vermehrte CREB-Phosphorylierung gemessen. Ji et al. erklärten dies mit einer Aktivierung des  $G\alpha_s$ /cAMP/PKA/CREB Signalwegs durch die KOR-B2R-Heterodimere (51). Bradykinin B2 Rezeptoren lassen sich, wie auch Opioidrezeptoren, auf der Zelloberfläche von DRG-Neuronen finden. In Nozizeptoren nehmen sie, über die Stimulation der PKC und weiterer GPCRs, eine wichtige Rolle in Bezug auf die OR-Aktivierung und -Sensitivierung ein (103,3). Die Dynorphin-A-bedingte cAMP-Steigerung könnte hypothetisch für die, erst in hohen Dynorphin-A-Konzentrationen, beobachtete PKA-II-Inhibition mitursächlich sein. Um zu analysieren, inwiefern die PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A von der Bildung von Heterodimeren mit Bradykinin B2 Rezeptoren beeinflusst wird, könnte die Anwendung der vorgestellten Experimente an Bradykinin-B2-Rezeptor-Knockout-Mausmodellen siebtens folgende Frage klären: Kann unter Ausschaltung der Bradykinin B2 Rezeptoren, durch Verhinderung der Bildung von KOR-B2R-Heterodimeren, die Dynorphin-A-induzierte PKA-II-Inhibition verstärkt werden?

---

## 5.6 Fazit

Ziel dieser Arbeit war die Quantifizierung der Inhibition und Induktion der PKA II durch Opioidrezeptor-Agonisten und -Antagonisten sowie Serotonin und Serotoninantagonisten. Bislang wurden vor allem elektrophysiologisch die Effekte der  $\beta\gamma$ -Untereinheiten von Opioidrezeptoren auf Adenylylcyclasen (AC) und die PKA-II-Aktivierung untersucht. Unter Verwendung des von uns etablierten „pRII/RII $\beta$ -Assays“, in Kombination mit „*High Content Screening*“ (HCS)-Mikroskopie und automatisierter Bildanalyse, kann nun erstmalig die endogene Aktivität der PKA II in primären sensorischen Neuronen quantifiziert und somit die  $\alpha_i$ -induzierte AC-Inhibition sowie die PKA-II-Regulation beispielsweise durch Opioide und Serotonin dargestellt werden. Durch die Analyse von ca. 1.500.000 Einzelzellen wurden mit dieser Arbeit neue Erkenntnisse gewonnen, die zum besseren Verständnis der Wirkweise des Opioidsystems und seiner Vernetzung mit dem Serotonin-System beitragen.

Ich konnte erstens zeigen, dass die Serotonin-induzierte PKA-II-Aktivität mittels Opioidrezeptor-spezifischer und unspezifischer Agonisten partiell inhibiert werden kann. Dabei wurde deutlich, dass  $\kappa$ -Opioidrezeptor (KOR)- und Nozizeptin-Orphanin-FQ-Peptidrezeptor (NOP)-spezifische Agonisten zur Inhibition höhere Dosen benötigen als OR-Agonisten, die selektiv oder nicht-selektiv  $\mu$ -Opioidrezeptoren (MOR) aktivieren. Dies legt den Schluss nahe, dass erstere in hoher Dosierung ihre Selektivität verlieren und über die Aktivierung der MOR die Serotonin-induzierte pRII-Antwort inhibieren. Somit würde den MOR eine Sonderrolle im Gegenspiel zwischen Opioid- und Serotonin-System zuteil.

Zweitens konnte ich die zentrale Rolle der 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptoren in der PKA-II-Aktivierung erneut hervorheben und wider Erwarten zeigen, dass sich die OR-vermittelte Inhibition der Serotonin-Antwort nicht durch Kostimulation mit 5-HT<sub>4</sub>-Rezeptorantagonisten potenzieren lässt.

Drittens wurde unter Verwendung OR-spezifischer Antagonisten analysiert, ob die selektive Aktivierung der jeweiligen OR-Isoformen tatsächlich die PKA-II-Inhibition induziert oder ob letztere durch Verlust der Selektivität in hoher Dosierung über eine nicht-selektive Aktivierung von MOR vermittelt wird. Eine vollständige Reversion des Opioideffekts auf die PKA-II-Aktivierung wurde in den vorgestellten Versuchsreihen nicht erreicht. Lediglich unter Verwendung des unspezifischen OR-Antagonisten Naltrexon zeigte sich im vollen Konzentrationsspektrum ein Wiederanstieg der PKA-II-Aktivität nach Opioid-vermittelter, partieller Inhibition. DOR- und KOR-Antagonisten zeigten vor allem im unteren Konzentrationsbereich einen Effekt auf die PKA-II-Aktivität. In höherer Dosierung lassen sich Sättigungseffekte in Bezug auf die DOR- und KOR-vermittelte PKA-II-Inhibition vermuten. Erstaunlicherweise zeigten sowohl NAL als auch norBNI eine ausgeprägte Wirkung auf den

---

MOR-Agonisten DAMGO. Dies unterstreicht meine zu Beginn aufgestellte Vermutung bezüglich der Wichtigkeit des MOR für die Inhibition der PKA-II-Aktivität. Die vorgestellten Daten weisen darauf hin, dass die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin selektiv durch die Aktivierung von NOP induziert wird. Zwar wurde die Nozizeptin-vermittelte PKA-II-Inhibition unter Verwendung eines DOR-Antagonisten signifikant revertiert, jedoch wurden hierbei große Messschwankungen beobachtet, sodass die Daten kritisch bewertet werden müssen. Im Zuge der Versuchsreihen wurde gezeigt, dass der NOP-Antagonist JTC 801 in einer Stoffmengenkonzentration von 100  $\mu$ M toxisch auf DRG-Neuronen wirkt und somit für den verwendeten Versuchsaufbau nicht verwendet werden kann. Additive Effekte der getesteten OR-Antagonisten konnten nicht dargestellt werden.

Das Opioidsystem, seine Verbindungen und seine Vernetzungen sind komplex und werfen noch viele offene Fragen auf. Gerade das Gegenspiel zwischen Opioid- und serotonerem System ist in Mammalia von großem Wert für grundlegende Prozesse wie Atmung, Verdauung, Stimmung und Nozizeption (94,138,158). Ich konnte mit meiner Arbeit Daten präsentieren, die zum besseren Verständnis dieser wichtigen Hormon- und Neurotransmittersysteme beitragen können. Darauf aufbauend könnten Mechanismen identifiziert werden, welche die OR-vermittelte PKA-II-Inhibition potenzieren, um so die OR-vermittelte Analgesie zu verstärken, ohne dabei vermehrt unerwünschte Arzneimittelwirkungen hervorzurufen. Dies könnte eine Verbesserung der Effektivität und Sicherheit in der Opioidtherapie akuter und chronischer Schmerzpatienten ermöglichen.

---

## 6 Literaturverzeichnis

1. Abbadie, C., M.-C. Lombard, J.-M. Besson, J. A. Trafton und A. I. Basbaum (2002). "Mu and delta opioid receptor-like immunoreactivity in the cervical spinal cord of the rat after dorsal rhizotomy or neonatal capsaicin: an analysis of pre- and postsynaptic receptor distributions." *Brain Research* 930(1-2): 150–162.
2. Abraira, V. E., E. D. Kuehn, A. M. Chirila, M. W. Springel, A. A. Toliver, A. L. Zimmerman, L. L. Orefice, K. A. Boyle, L. Bai, B. J. Song, K. A. Bashista, T. G. O'Neill, J. Zhuo, C. Tsan, J. Hoynoski, M. Rutlin, L. Kus, V. Niederkofler, M. Watanabe, S. M. Dymecki, S. B. Nelson, N. Heintz, D. I. Hughes und D. D. Ginty (2017). "The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn." *Cell* 168(1-2): 295-310.
3. Al-Hasani, R. und M. R. Bruchas (2011). "Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior." *Anesthesiology* 115(6): 1363–1381.
4. Altman, D. G. (1998). "Confidence intervals for the number needed to treat." *BMJ (Clinical research ed.)* 317(7168): 1309–1312.
5. Andoh, T., M. Itoh und Y. Kuraishi (1997). "Nociceptin gene expression in rat dorsal root ganglia induced by peripheral inflammation." *Neuroreport* 8(12): 2793–2796.
6. Andresen, B. T. (2011). "A pharmacological primer of biased agonism." *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 11(2): 92–98.
7. Arakawa, K., T. Akami, M. Okamoto, H. Nakajima, M. Mitsuo, I. Nakai, T. Oka, H. Nagase und S. Matsumoto (1992). "Immunosuppressive effect of delta-opioid receptor antagonist on xenogeneic mixed lymphocyte reaction." *Transplantation proceedings* 24(2): 696–697.
8. Atigari, D. V., R. Uprety, G. W. Pasternak, S. Majumdar und B. M. Kivell (2019). "MP1104, a mixed kappa-delta opioid receptor agonist has anti-cocaine properties with reduced side-effects in rats." *Neuropharmacology* 150: 217–228.
9. Bagwell, C. B. und E. G. Adams (1993). "Fluorescence spectral overlap compensation for any number of flow cytometry parameters." *Annals of the New York Academy of Sciences* 677: 167–184.
10. Ballantyne, J. C. und N. S. Shin (2008). "Efficacy of opioids for chronic pain: a review of the evidence." *The Clinical journal of pain* 24(6): 469–478.

- 
11. Basbaum, A. I., D. M. Bautista, G. Scherrer und D. Julius (2009). "Cellular and molecular mechanisms of pain." *Cell* 139(2): 267–284.
  12. Bell, A. (2018). "The neurobiology of acute pain." *Veterinary journal* (London, England : 1997) 237: 55–62.
  13. Berenbaum, M. C. (1985). "The expected effect of a combination of agents: the general solution." *Journal of theoretical biology* 114(3): 413–431.
  14. Beydoun, A., T. J. Morrow, J. F. Shen und K. L. Casey (1993). "Variability of laser-evoked potentials: attention, arousal and lateralized differences." *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology/Evoked Potentials Section* 88(3): 173–181.
  15. Bhave, G., W. Zhu, H. Wang, D. J. Brasier, G. S. Oxford und R. W. Gereau (2002). "cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation." *Neuron* 35(4): 721–731.
  16. Bockaert, J., M. Sebben und A. Dumuis (1990). "Pharmacological characterization of 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub>(5-HT<sub>4</sub>) receptors positively coupled to adenylate cyclase in adult guinea pig hippocampal membranes: effect of substituted benzamide derivatives." *Molecular pharmacology* 37(3): 408–411.
  17. Bohn, L. M., R. J. Lefkowitz, R. R. Gainetdinov, K. Peppel, M. G. Caron und F. T. Lin (1999). "Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2." *Science (New York, N.Y.)* 286(5449): 2495–2498.
  18. Bouras, E. P., M. Camilleri, D. D. Burton und S. McKinzie (1999). "Selective stimulation of colonic transit by the benzofuran 5HT<sub>4</sub> agonist, prucalopride, in healthy humans." *Gut* 44(5): 682–686.
  19. Bowen, C. A., B. D. Fischer, N. K. Mello und S. S. Negus (2002). "Antagonism of the antinociceptive and discriminative stimulus effects of heroin and morphine by 3-methoxynaltrexone and naltrexone in rhesus monkeys." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 302(1): 264–273.
  20. Brackley, A. D., R. Gomez, A. N. Akopian, M. A. Henry und N. A. Jeske (2016). "GRK2 Constitutively Governs Peripheral Delta Opioid Receptor Activity." *Cell reports* 16(10): 2686–2698.



- 
21. Brackley, A. D., S. Sarrami, R. Gomez, K. A. Guerrero und N. A. Jeske (2017). "Identification of a signaling cascade that maintains constitutive  $\delta$ -opioid receptor incompetence in peripheral sensory neurons." *The Journal of biological chemistry* 292(21): 8762–8772.
  22. Brandon, E. P., R. L. Idzerda und G. S. McKnight (1997). "PKA isoforms, neural pathways, and behaviour: making the connection." *Current opinion in neurobiology* 7(3): 397–403.
  23. Breivik, H., B. Collett, V. Ventafridda, R. Cohen und D. Gallacher (2006). "Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment." *European journal of pain (London, England)* 10(4): 287–333.
  24. Brown, S. H., C. Y. Cheng, S. Adrian Saldanha, J. Wu, H. B. Cottam, B. Sankaran und S. S. Taylor (2013). "Implementing fluorescence anisotropy screening and crystallographic analysis to define PKA isoform-selective activation by cAMP analogs." *ACS chemical biology* 8(10): 2164–2172.
  25. Browne, C. A. und I. Lucki (2019). "Targeting opioid dysregulation in depression for the development of novel therapeutics." *Pharmacology & therapeutics* 201: 51–76.
  26. Bruchas, M. R., T. Yang, S. Schreiber, M. Defino, S. C. Kwan, S. Li und C. Chavkin (2007). "Long-acting kappa opioid antagonists disrupt receptor signaling and produce noncompetitive effects by activating c-Jun N-terminal kinase." *The Journal of biological chemistry* 282(41): 29803–29811.
  27. Buchser, W., M. Collins, T. Garyantes, R. Guha, S. Haney, V. Lemmon, Z. Li und O. J. Trask (2004). "Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging." In: Markossian S, A. Grossman, K. Brimacombe et al., *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences (Bethesda MD). Gefunden auf: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100913/#highcontent.Data\\_Management\\_for\\_High\\_Con](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK100913/#highcontent.Data_Management_for_High_Con). Zuletzt abgerufen am: 28.10.2021 [Stand: 22.09.2014].
  28. Buckingham, J. C. und T. A. Cooper (2004). "Differences in Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical Activity in the Rat after Acute and Prolonged Treatment with Morphine." *Neuroendocrinology* 38(5): 411–417.
  29. Campbell, J. N. und R. H. LaMotte (1983). "Latency to detection of first pain." *Brain Research* 266(2): 203–208.
  30. Cardenas, L. M., C. G. Cardenas und R. S. Scroggs (2001). "5HT increases excitability of nociceptor-like rat dorsal root ganglion neurons via cAMP-coupled TTX-resistant Na(+) channels." *Journal of neurophysiology* 86(1): 241–248.

- 
31. Centers for Disease Control and Prevention (2018). "2018 Annual Surveillance Report of Drug Related Risks and Outcomes." Gefunden auf: <https://www.cdc.gov/drugoverdose/pdf/pubs/2018-cdc-drug-surveillance-report.pdf> Zuletzt abgerufen am: 14.10.2018 [Stand: 08 2018].
  32. Chahine, M. und M. E. O'Leary (2014). "Regulation/modulation of sensory neuron sodium channels." *Handbook of experimental pharmacology* 221: 111–135.
  33. Chen, S.-R. und H.-L. Pan (2008). "Removing TRPV1-expressing primary afferent neurons potentiates the spinal analgesic effect of delta-opioid agonists on mechanonociception." *Neuropharmacology* 55(2): 215–222.
  34. Cheng, X., Z. Ji, T. Tsalkova und F. Mei (2008). "Epac and PKA: a tale of two intracellular cAMP receptors." *Acta biochimica et biophysica Sinica* 40(7): 651–662.
  35. Chevrier, S., H. L. Crowell, V. R. T. Zanotelli, S. Engler, M. D. Robinson und B. Bodenmiller (2018). "Compensation of Signal Spillover in Suspension and Imaging Mass Cytometry." *Cell systems* 6(5): 612-620.e5.
  36. Christie, M. J. (2008). "Cellular neuroadaptations to chronic opioids: tolerance, withdrawal and addiction." *British journal of pharmacology* 154(2): 384–396.
  37. Christie, S., G. A. Wittert, H. Li und A. J. Page (2018). "Involvement of TRPV1 Channels in Energy Homeostasis." *Frontiers in endocrinology* 9: 420.
  38. Clapham, D. E. und E. J. Neer (1997). "G protein beta gamma subunits." *Annual review of pharmacology and toxicology* 37: 167–203.
  39. Convertino, M., A. Samoshkin, J. Gauthier, M. S. Gold, W. Maixner, N. V. Dokholyan und L. Diatchenko (2015). " $\mu$ -Opioid receptor 6-transmembrane isoform: A potential therapeutic target for new effective opioids." *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry* 62: 61–67.
  40. Cope, L. C., A. S. Abuzour und M. P. Tully (2016). "Nonmedical prescribing: where are we now?" *Therapeutic advances in drug safety* 7(4): 165–172.
  41. Corder, G., D. C. Castro, M. R. Bruchas und G. Scherrer (2018). "Endogenous and Exogenous Opioids in Pain." *Annual review of neuroscience* 41: 453–473.

- 
42. Cortes-Altamirano, J. L., A. Olmos-Hernandez, H. B. Jaime, P. Carrillo-Mora, C. Bandala, S. Reyes-Long und A. Alfaro-Rodríguez (2018). "Review: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System." *Current neuropharmacology* 16(2): 210–221.
  43. Cox, J. J., F. Reimann, A. K. Nicholas, G. Thornton, E. Roberts, K. Springell, G. Karbani, H. Jafri, J. Mannan, Y. Raashid, L. Al-Gazali, H. Hamamy, E. M. Valente, S. Gorman, R. Williams, D. P. McHale, J. N. Wood, F. M. Gribble und C. G. Woods (2006). "An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain." *Nature* 444(7121): 894–898.
  44. Crofford, L. J. (2015). "Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain." *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 126: 167–183.
  45. Cunha, T. M., G. R. Souza, A. C. Domingues, E. U. Carreira, C. M. Lotufo, M. I. Funez, W. A. Verri, F. Q. Cunha und S. H. Ferreira (2012). "Stimulation of peripheral kappa opioid receptors inhibits inflammatory hyperalgesia via activation of the PI3Ky/AKT/nNOS/NO signaling pathway." *Molecular pain* 8: 10.
  46. Darmon, M., S. Al Awabdh, M.-B. Emerit und J. Masson (2015). "Insights into Serotonin Receptor Trafficking: Cell Membrane Targeting and Internalization." *Progress in molecular biology and translational science* 132: 97–126.
  47. Das, C., Q. Q. Hoang, C. A. Kreinbring, S. J. Luchansky, R. K. Meray, S. S. Ray, P. T. Lansbury, D. Ringe und G. A. Petsko (2006). "Structural basis for conformational plasticity of the Parkinson's disease-associated ubiquitin hydrolase UCH-L1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(12): 4675–4680.
  48. Ding, H., N. Kiguchi, D. Yasuda, P. R. Daga, W. E. Polgar, J. J. Lu, P. W. Czoty, S. Kishioka, N. T. Zaveri und M.-C. Ko (2018). "A bifunctional nociceptin and mu opioid receptor agonist is analgesic without opioid side effects in nonhuman primates." *Science translational medicine* 10(456).
  49. Divin, M. F., F. A. Bradbury, F. I. Carroll und J. R. Traynor (2009). "Neutral antagonist activity of naltrexone and 6beta-naltrexol in naïve and opioid-dependent C6 cells expressing a mu-opioid receptor." *British journal of pharmacology* 156(7): 1044–1053.
  50. Døskeland, S. O., E. Maronde und B. T. Gjertsen (1993). "The genetic subtypes of cAMP-dependent protein kinase — Functionally different or redundant?" *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1178(3): 249–258.

- 
51. Dray, A., I. A. Patel, M. N. Perkins und A. Rueff (1992). "Bradykinin-induced activation of nociceptors: receptor and mechanistic studies on the neonatal rat spinal cord-tail preparation in vitro." *British journal of pharmacology* 107(4): 1129–1134.
  52. Dubin, A. E. und A. Patapoutian (2010). "Nociceptors: the sensors of the pain pathway." *The Journal of clinical investigation* 120(11): 3760–3772.
  53. El Daly, E. S. (1996). "Influence of acute and chronic morphine or stadol on the secretion of adrenocorticotrophin and its hypothalamic releasing hormone in the rat." *Life Sciences* 59(22): 1881–1890.
  54. Elsenbruch, S., W. Häuser und W. Jänig (2015). "Viszeraler Schmerz." *Schmerz (Berlin, Germany)* 29(5): 496–502.
  55. England, S., S. Bevan und R. J. Docherty (1996). "PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade." *The Journal of physiology* 495 (Pt 2): 429–440.
  56. Evron, T., T. L. Daigle und M. G. Caron (2012). "GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization." *Trends in pharmacological sciences* 33(3): 154–164.
  57. Fitzgerald, E. M., K. Okuse, J. N. Wood, A. C. Dolphin und S. J. Moss (1999). "cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS." *The Journal of physiology* 516 (Pt 2): 433–446.
  58. Gaskin, D. J. und P. Richard (2012). "The economic costs of pain in the United States." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 13(8): 715–724.
  59. Gavériaux-Ruff, C., D. Filliol, F. Simonin, H. W. Matthes und B. L. Kieffer (2001). "Immunosuppression by delta-opioid antagonist naltrindole: delta- and triple mu/delta/kappa-opioid receptor knockout mice reveal a nonopioid activity." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 298(3): 1193–1198.
  60. Gendron, L., J. E. Pintar und C. Chavkin (2007). "Essential role of mu opioid receptor in the regulation of delta opioid receptor-mediated antihyperalgesia." *Neuroscience* 150(4): 807–817
  61. Gingras, J., S. Smith, D. J. Matson, D. Johnson, K. Nye, L. Couture, E. Feric, R. Yin, B. D. Moyer, M. L. Peterson, J. B. Rottman, R. J. Beiler, A. B. Malmberg und S. I. McDonough (2014). "Global Nav1.7 knockout mice recapitulate the phenotype of human congenital indifference to pain." *PloS one* 9(9): e105895.

- 
62. Ginzburg, K., N. Tsur, C. Karmin, T. Speizman, R. Tourgeman und R. Defrin (2015). "Body awareness and pain habituation: the role of orientation towards somatic signals." *Journal of behavioral medicine* 38(6): 876–885.
  63. Glaeske, G. (2017). "Medikamente 2015. Psychotrope und andere Arzneimittel mit Missbrauchs- und Abhängigkeitspotenzial." In: Deutsche Hauptstelle für Suchtfragen (DHS) (Hrsg.): *DHS Jahrbuch Sucht 2017*. Lengerich: Pabst Science Publishers: 85–106.
  64. Gonzalez, R. C. und R. E. Woods (2007). "Digital image processing." Pearson/Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ.
  65. Hacker, B. M., J. E. Tomlinson, G. A. Wayman, R. Sultana, G. Chan, E. Villacres, C. Disteché und D. R. Storm (1998). "Cloning, chromosomal mapping, and regulatory properties of the human type 9 adenylyl cyclase (ADCY9)." *Genomics* 50(1): 97–104.
  66. Häuser, W. (2020). "2. Aktualisierung der S3 Leitlinie „Langzeitanwendungen von Opioiden bei chronischen nicht-tumorbedingten Schmerzen „LONTS“." *Der Schmerz*(34): 204–244. .Gefunden auf: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/145-003.html> Zuletzt abgerufen am: 08.08.2021 [Stand: 12.10.2020].
  67. Heinrich, T., C. Hübner und I. Kurth (2016). "Isolation and Primary Cell Culture of Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons." *BIO-PROTOCOL* 6(7).
  68. Heitkamp, H. (2021). "Fragliche Revision der IASP-Schmerz-Definition." *Der Schmerzpatient* 4(01): 5–6.
  69. Herlitze, S., D. E. Garcia, K. Mackie, B. Hille, T. Scheuer und W. A. Catterall (1996). "Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by G-protein beta gamma subunits." *Nature* 380(6571): 258–262.
  70. Higgins, S. A. und J. Simons (2018). "The Opioid Epidemic and the Role of the Occupational Health Nurse." *Workplace health & safety*: 2165079918796242.
  71. Hirst, N. L., S. P. Lawton und A. J. Walker (2016). "Protein kinase A signalling in *Schistosoma mansoni* cercariae and schistosomules." *International journal for parasitology* 46(7): 425–437.
  72. Holden, J. E., Y. Jeong und J. M. Forrest (2005). "The endogenous opioid system and clinical pain management." *AACN clinical issues* 16(3): 291–301.

- 
73. Holdridge, S. V. und C. M. Cahill (2007). "Spinal administration of a delta opioid receptor agonist attenuates hyperalgesia and allodynia in a rat model of neuropathic pain." *European journal of pain* (London, England) 11(6): 685–693.
74. Höller, C., M. Freissmuth und C. Nanoff (1999). "G proteins as drug targets." *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 55(2): 257–270.
75. House, R. V., P. T. Thomas, J. T. Kozak und H. N. Bhargava (1995). "Suppression of immune function by non-peptidic delta opioid receptor antagonists." *Neuroscience Letters* 198(2): 119–122.
76. Hurley, R. W., T. S. Grabow, R. J. Tallarida und D. L. Hammond (1999). "Interaction between medullary and spinal delta1 and delta2 opioid receptors in the production of antinociception in the rat." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 289(2): 993–999.
77. Hutchinson, M. R., A. L. Northcutt, T. Hiranita, X. Wang, S. S. Lewis, J. Thomas, K. van Steeg, T. A. Kopajtic, L. C. Loram, C. Sfregola, E. Galer, N. E. Miles, S. T. Bland, J. Amat, R. R. Rozeske, T. Maslanik, T. R. Chapman, K. A. Strand, M. Fleshner, R. K. Bachtell, A. A. Somogyi, H. Yin, J. L. Katz, K. C. Rice, S. F. Maier und L. R. Watkins (2012). "Opioid activation of toll-like receptor 4 contributes to drug reinforcement." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 32(33): 11187–11200.
78. Hutchinson, M. R., Y. Zhang, M. Shridhar, J. H. Evans, M. M. Buchanan, T. X. Zhao, P. F. Slivka, B. D. Coats, N. Rezvani, J. Wieseler, T. S. Hughes, K. E. Landgraf, S. Chan, S. Fong, S. Phipps, J. J. Falke, L. A. Leinwand, S. F. Maier, H. Yin, K. C. Rice und L. R. Watkins (2010). "Evidence that opioids may have toll-like receptor 4 and MD-2 effects." *Brain, behavior, and immunity* 24(1): 83–95.
79. Hylden, J. L.K., D. A. Thomas, M. J. Iadarola, R. L. Nahin und R. Dubner (1991). "Spinal opioid analgesic effects are enhanced in a model of unilateral inflammation/hyperalgesia: possible involvement of noradrenergic mechanisms." *European journal of pharmacology* 194(2-3): 135–143.
80. International Association for the Study of Pain (IASP). "IASP Terminology." Gefunden auf: <https://www.iasp-pain.org/resources/terminology/>. Zuletzt abgerufen am: 17.05.2022 [Stand: 05/2022].
81. INTERNATIONAL NARCOTICS CONTROL BOARD (2021). "Narcotic Drugs. 2020 Estimated world requirements for 2021." Gefunden auf: [https://www.incb.org/documents/Narcotic-Drugs/Technical-Publications/2020/Narcotic\\_Drugs\\_Technical\\_publication\\_2020.pdf](https://www.incb.org/documents/Narcotic-Drugs/Technical-Publications/2020/Narcotic_Drugs_Technical_publication_2020.pdf). Zuletzt abgerufen am: 02.06.2021.

- 
82. Isensee, J. und T. Hucho (2017). "HCS-Mikroskopie – ein Schlüssel zu intrazellulären Schmerzmechanismen." *BIOspektrum* 23(3): 277–280.
  83. Isensee, J., L. Krahé, K. Moeller, V. Pereira, J. E. Sexton, X. Sun, E. Emery, J. N. Wood und T. Hucho (2017). "Synergistic regulation of serotonin and opioid signaling contributes to pain insensitivity in Nav1.7 knockout mice." *Science signaling* 10(461).
  84. Isensee, J., M. Diskar, S. Waldherr, R. Buschow, J. Hasenauer, A. Prinz, F. Allgöwer, F. W. Herberg und T. Hucho (2014). "Pain modulators regulate the dynamics of PKA-RII phosphorylation in subgroups of sensory neurons." *Journal of cell science* 127(Pt 1): 216–229.
  85. Isensee, J., M. Kaufholz, M. J. Knape, J. Hasenauer, H. Hammerich, H. Gonczarowska-Jorge, R. P. Zahedi, F. Schwede, F. W. Herberg und T. Hucho (2018). "PKA-RII subunit phosphorylation precedes activation by cAMP and regulates activity termination." *The Journal of cell biology* 217(6): 2167–2184.
  86. Jamshidi, R. J., L. C. Sullivan, B. A. Jacobs, T. A. Chavera, K. A. Berg und W. P. Clarke (2016). "Long-Term Reduction of Kappa Opioid Receptor Function by the Biased Ligand, Norbinaltorphimine, Requires c-Jun N-Terminal Kinase Activity and New Protein Synthesis in Peripheral Sensory Neurons." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 359(2): 319–328.
  87. Janson, W. und C. Stein (2003). "Peripheral opioid analgesia." *Current pharmaceutical biotechnology* 4(4): 270–274.
  88. Ježová, D., M. Vigaš und J. Jurčovičová (1982). "ACTH and corticosterone response to naloxone and morphine in normal, hypophysectomized and dexamethasone-treated rats." *Life Sciences* 31(4): 307–314.
  89. Ji, B., H. Liu, R. Zhang, Y. Jiang, C. Wang, S. Li, J. Chen und B. Bai (2017). "Novel signaling of dynorphin at  $\kappa$ -opioid receptor/bradykinin B2 receptor heterodimers." *Cellular signalling* 31: 66–78.
  90. Ji, R.-R., T. Kohno, K. A. Moore und C. J. Woolf (2003). "Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms?" *Trends in neurosciences* 26(12): 696–705.
  91. Joshi, P. und M.-Y. Lee (2015). "High Content Imaging (HCI) on Miniaturized Three-Dimensional (3D) Cell Cultures." *Biosensors* 5(4): 768–790.

- 
92. Kamenetsky, M., S. Middelhaufe, E. M. Bank, L. R. Levin, J. Buck und C. Steegborn (2006). "Molecular details of cAMP generation in mammalian cells: a tale of two systems." *Journal of molecular biology* 362(4): 623–639.
  93. Katz, N., F. C. Paillard und R. van Inwegen (2015). "A review of the use of the number needed to treat to evaluate the efficacy of analgesics." *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 16(2): 116–123.
  94. Kieffer, B. L. und C. Gavériaux-Ruff (2002). "Exploring the opioid system by gene knockout." *Progress in neurobiology* 66(5): 285–306.
  95. Kim, C., C. Y. Cheng, S. Adrian Saldanha und S. S. Taylor (2007). "PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation." *Cell* 130(6): 1032–1043.
  96. Kim, K.-S., J. Kim, S. K. Back, J.-Y. Im, H. S. Na und P.-L. Han (2007). "Markedly attenuated acute and chronic pain responses in mice lacking adenylyl cyclase-5." *Genes, brain, and behavior* 6(2): 120–127.
  97. Kim, K.-S., K.-W. Lee, K.-W. Lee, J.-Y. Im, J. Y. Yoo, S.-W. Kim, J.-K. Lee, E. J. Nestler und P.-L. Han (2006). "Adenylyl cyclase type 5 (AC5) is an essential mediator of morphine action." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10): 3908–3913.
  98. Kleinböhl, D., J. Trojan, C. Konrad und R. Hölzl (2006). "Sensitization and habituation of AMH and C-fiber related percepts of repetitive radiant heat stimulation." *Clinical neurophysiology: official journal of the International Federation of Clinical Neurophysiology* 117(1): 118–130.
  99. Ko, M. C., E. R. Butelman, J. R. Traynor und J. H. Woods (1998). "Differentiation of kappa opioid agonist-induced antinociception by naltrexone apparent pA2 analysis in rhesus monkeys." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 285(2): 518–526.
  100. Kuzmin, A. V., M. A. Gerrits und J. M. van Ree (1998). "Kappa-opioid receptor blockade with nor-binaltorphimine modulates cocaine self-administration in drug-naive rats." *European journal of pharmacology* 358(3): 197–202.
  101. Lacoste, A. und C. Evans (2003). "Cloning of Delta Opioid Receptors." In „The Delta Receptor“, Chang, K.-J., F. Porreca und J. H. Wood (2004). New York, USA: Marcel Dekker Inc.: 15–30.



- 
102. Larochele, M. R., D. Bernson, T. Land, T. J. Stopka, N. Wang, Z. Xuan, S. M. Bagley, J. M. Liebschutz und A. Y. Walley (2018). "Medication for Opioid Use Disorder After Nonfatal Opioid Overdose and Association With Mortality: A Cohort Study." *Annals of internal medicine* 169(3): 137–145.
103. Leeb-Lundberg, L. M., F. Marceau, W. Müller-Esterl, D. J. Pettibone und B. L. Zuraw (2005). "International union of pharmacology. XLV. Classification of the kinin receptor family: from molecular mechanisms to pathophysiological consequences." *Pharmacological reviews* 57(1): 27–77.
104. Levy, B., L. Paulozzi, K. A. Mack und C. M. Jones (2015). "Trends in Opioid Analgesic-Prescribing Rates by Specialty, U.S., 2007-2012." *American journal of preventive medicine* 49(3): 409–413.
105. Linnarsson Lab. "Peripheral sensory non-peptidergic neurons (taxon)." Gefunden auf: [http://mousebrain.org/taxonomy/r4\\_peripheral-sensory-non-peptidergic-neurons.html](http://mousebrain.org/taxonomy/r4_peripheral-sensory-non-peptidergic-neurons.html). Zuletzt abgerufen am: 16.12.2020 [Stand: 07.02.2020].
106. Louiset, E., C. Duparc, S. Lenglet, C. E. Gomez-Sanchez und H. Lefebvre (2017). "Role of cAMP/PKA pathway and T-type calcium channels in the mechanism of action of serotonin in human adrenocortical cells." *Molecular and Cellular Endocrinology* 441: 99–107.
107. Madsen, C. S., B. Johnsen, A. Fuglsang-Frederiksen, T. S. Jensen und N. B. Finnerup (2012). "The effect of nerve compression and capsaicin on contact heat-evoked potentials related to A $\delta$ - and C-fibers." *Neuroscience* 223: 92–101.
108. Magerl, W., Z. Ali, J. Ellrich, R. A. Meyer und R.-D. Treede (1999). "C- and A $\delta$ -fiber components of heat-evoked cerebral potentials in healthy human subjects." *Pain* 82(2): 127–137.
109. Mague, S. D., A. M. Pliakas, M. S. Todtenkopf, H. C. Tomasiewicz, Y. Zhang, W. C. Stevens, R. M. Jones, P. S. Portoghese und W. A. Carlezon (2003). "Antidepressant-like effects of kappa-opioid receptor antagonists in the forced swim test in rats." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 305(1): 323–330.
110. Makandar, A. und B. Halalli (2015). "Image Enhancement Techniques using Highpass and Lowpass Filters." *International Journal of Computer Applications* 109(14): 21–27.
111. Malmberg, A. B. und T. L. Yaksh (1992). "Isobolographic and dose-response analyses of the interaction between intrathecal mu and delta agonists: effects of naltrindole and its benzofuran analog (NTB)." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 263(1): 264–275.

- 
112. Manni, S., J. H. Mauban, C. W. Ward und M. Bond (2008). "Phosphorylation of the cAMP-dependent protein kinase (PKA) regulatory subunit modulates PKA-AKAP interaction, substrate phosphorylation, and calcium signaling in cardiac cells." *The Journal of biological chemistry* 283(35): 24145–24154.
113. Manzke, T., U. Guenther, E. G. Ponimaskin, M. Haller, M. Dutschmann, S. Schwarzacher und D. W. Richter (2003). "5-HT<sub>4</sub>(a) receptors avert opioid-induced breathing depression without loss of analgesia." *Science (New York, N.Y.)* 301(5630): 226–229.
114. Marinelli, P. W., D. Funk, S. Harding, Z. Li, W. Juzytsch und A. D. Lê (2009). "Roles of opioid receptor subtypes in mediating alcohol-seeking induced by discrete cues and context." *The European journal of neuroscience* 30(4): 671–678.
115. Marker, C. L., R. Luján, H. H. Loh und K. Wickman (2005). "Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 25(14): 3551–3559.
116. Matthes, H. W., R. Maldonado, F. Simonin, O. Valverde, S. Slowe, I. Kitchen, K. Befort, A. Dierich, M. Le Meur, P. Dollé, E. Tzavara, J. Hanoune, B. P. Roques und B. L. Kieffer (1996). "Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene." *Nature* 383(6603): 819–823.
117. McCorvy, J. D. und B. L. Roth (2015). "Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors." *Pharmacology & therapeutics* 150: 129–142.
118. McGlone, F., J. Wessberg und H. Olausson (2014). "Discriminative and affective touch: sensing and feeling." *Neuron* 82(4): 737–755.
119. Melief, E. J., M. Miyatake, F. I. Carroll, C. Béguin, W. A. Carlezon, B. M. Cohen, S. Grimwood, C. H. Mitch, L. Rorick-Kehn und C. Chavkin (2011). "Duration of action of a broad range of selective  $\kappa$ -opioid receptor antagonists is positively correlated with c-Jun N-terminal kinase-1 activation." *Molecular pharmacology* 80(5): 920–929.
120. Melief, E. J., M. Miyatake, M. R. Bruchas und C. Chavkin (2010). "Ligand-directed c-Jun N-terminal kinase activation disrupts opioid receptor signaling." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(25): 11608–11613.
121. Metcalf, M. D. und A. Coop (2005). "Kappa opioid antagonists: past successes and future prospects." *The AAPS journal* 7(3): E704-22.

- 
122. Meunier, J. C., C. Mollereau, L. Toll, C. Suaudeau, C. Moisand, P. Alvinerie, J. L. Butour, J. C. Guillemot, P. Ferrara und B. Monsarrat (1995). "Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor." *Nature* 377(6549): 532–535.
123. Middleton, S. J., A. M. Barry, M. Comini, Y. Li, P. R. Ray, S. Shiers, A. C. Themistocleous, M. L. Uhelski, X. Yang, P. M. Dougherty, T. J. Price und D. L. Bennett (2021). "Studying human nociceptors: from fundamentals to clinic." *Brain : a journal of neurology* 144(5): 1312–1335.
124. Minett, M. S., M. A. Nassar, A. K. Clark, G. Passmore, A. H. Dickenson, F. Wang, M. Malcangio und J. N. Wood (2012). "Distinct Nav1.7-dependent pain sensations require different sets of sensory and sympathetic neurons." *Nature communications* 3: 791.
125. Mousa, S. A., Q. Zhang, N. Sitte, R. Ji und C. Stein (2001). "beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue." *Journal of neuroimmunology* 115(1-2): 71–78.
126. Müller-Lissner, S., G. Bassotti, B. Coffin, A. M. Drewes, H. Breivik, E. Eisenberg, A. Emmanuel, F. Laroche, W. Meissner und B. Morlion (2017). "Opioid-Induced Constipation and Bowel Dysfunction: A Clinical Guideline." *Pain medicine (Malden, Mass.)* 18(10): 1837–1863.
127. Mundra, J. J., A. Terskiy und R. D. Howells (2012). "Naltrindole inhibits human multiple myeloma cell proliferation in vitro and in a murine xenograft model in vivo." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 342(2): 273–287.
128. National Institute on Drug Abuse (2018). "Opioid Overdose Crisis." Gefunden auf: <https://www.drugabuse.gov/drugs-abuse/opioids/opioid-overdose-crisis>. Zuletzt abgerufen am: 13.10.2018 [Stand: 03 2018].
129. National Institute on Drug Abuse (2022). "Overdose Death Rates." Gefunden auf: <https://nida.nih.gov/drug-topics/trends-statistics/overdose-death-rates> Zuletzt abgerufen am: 27.01.2022 [Stand: 01 2022].
130. Nickolls, S. A., S. Humphreys, M. Clark und G. McMurray (2013). "Co-expression of GRK2 reveals a novel conformational state of the  $\mu$ -opioid receptor." *PloS one* 8(12): e83691.
131. Nielsen, C. K., J. A. Simms, R. Li, D. Mill, H. Yi, A. A. Feduccia, N. Santos und S. E. Bartlett (2012). " $\delta$ -opioid receptor function in the dorsal striatum plays a role in high levels of ethanol consumption in rats." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32(13): 4540–4552.

- 
132. Northcutt, A. L., M. R. Hutchinson, X. Wang, M. V. Baratta, T. Hiranita, T. A. Cochran, M. B. Pomrenze, E. L. Galer, T. A. Kopajtic, C. M. Li, J. Amat, G. Larson, D. C. Cooper, Y. Huang, C. E. O'Neill, H. Yin, N. R. Zahniser, J. L. Katz, K. C. Rice, S. F. Maier, R. K. Bachtell und L. R. Watkins (2015). "DAT isn't all that: cocaine reward and reinforcement require Toll-like receptor 4 signaling." *Molecular psychiatry* 20(12): 1525–1537.
133. Nuwer, M. O., K. E. Picchione und A. Bhattacharjee (2010). "PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30(42): 14165–14172.
134. Obara, I., J. R. Parkitna, M. Korostynski, W. Makuch, D. Kaminska, B. Przewlocka und R. Przewlocki (2009). "Local peripheral opioid effects and expression of opioid genes in the spinal cord and dorsal root ganglia in neuropathic and inflammatory pain." *Pain* 141(3): 283–291.
135. Onakpoya, I. J., J. J. Lee, K. R. Mahtani, J. K. Aronson und C. J. Heneghan (2020). "Naltrexone-bupropion (Mysimba) in management of obesity: A systematic review and meta-analysis of unpublished clinical study reports." *British journal of clinical pharmacology* 86(4): 646–667.
136. Opsommer, E., E. Masquelier und L. Plaghki (1999). "Determination of nerve conduction velocity of C-fibres in humans from thermal thresholds to contact heat (thermode) and from evoked brain potentials to radiant heat (CO<sub>2</sub> laser)." *Neurophysiologie Clinique/Clinical Neurophysiology* 29(5): 411–422.
137. Ouadid, H., J. Seguin, A. Dumuis, J. Bockaert und J. Nargeot (1992). "Serotonin increases calcium current in human atrial myocytes via the newly described 5-hydroxytryptamine<sub>4</sub> receptors." *Molecular pharmacology* 41(2): 346–351.
138. Paredes, S., S. Cantillo, K. D. Candido und N. N. Knezevic (2019). "An Association of Serotonin with Pain Disorders and Its Modulation by Estrogens." *International journal of molecular sciences* 20(22).
139. Pateraki, I., J. Andersen-Ranberg, N. B. Jensen, S. G. Wubshet, A. M. Heskes, V. Forman, B. Hallström, B. Hamberger, M. S. Motawia, C. E. Olsen, D. Staerk, J. Hansen, B. L. Møller und B. Hamberger (2017). "Total biosynthesis of the cyclic AMP booster forskolin from *Coleus forskohlii*." *eLife* 6.
140. Paterson, J. M., S. M. Smith, A. J. Harmar und F. A. Antoni (1995). "Control of a novel adenylyl cyclase by calcineurin." *Biochemical and biophysical research communications* 214(3): 1000–1008.

- 
141. Patwardhan, A. M., K. A. Berg, A. N. Akopain, N. A. Jeske, N. Gamper, W. P. Clarke und K. M. Hargreaves (2005). "Bradykinin-induced functional competence and trafficking of the delta-opioid receptor in trigeminal nociceptors." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25(39): 8825–8832.
142. Perl, E. R. (2007). "Ideas about pain, a historical view." *Nature reviews. Neuroscience* 8(1): 71–80.
143. Petzke, F., F. Bock, M. Hüppe, M. Nothacker, H. Norda, L. Radbruch, M. Schiltenswolf, M. Schuler, T. Tölle, A. Viniol und W. Häuser (2020). "Long-term opioid therapy for chronic noncancer pain: second update of the German guidelines." *Pain reports* 5(5): e840.
144. Petzke, F., P. Klose, P. Welsch, C. Sommer und W. Häuser (2020). "Opioids for chronic low back pain: An updated systematic review and meta-analysis of efficacy, tolerability and safety in randomized placebo-controlled studies of at least 4 weeks of double-blind duration." *European journal of pain (London, England)* 24(3): 497–517.
145. Pidoux, G. und K. Taskén (2010). "Specificity and spatial dynamics of protein kinase A signaling organized by A-kinase-anchoring proteins." *Journal of molecular endocrinology* 44(5): 271–284.
146. Pierre, S., T. Eschenhagen, G. Geisslinger und K. Scholich (2009). "Capturing adenylyl cyclases as potential drug targets." *Nature reviews. Drug discovery* 8(4): 321–335.
147. Pindon, A., G. van Hecke, P. van Gompel, A. S. Lesage, J. E. Leysen und M. Jurzak (2002). "Differences in signal transduction of two 5-HT<sub>4</sub> receptor splice variants: compound specificity and dual coupling with Galphas- and Galphai/o-proteins." *Molecular pharmacology* 61(1): 85–96.
148. Ponimaskin, E. G., J. Profirovic, R. Vaiskunaite, D. W. Richter und T. A. Voynoyasenetskaya (2002). "5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G13 protein." *The Journal of biological chemistry* 277(23): 20812–20819.
149. Portoghese, A. S., A. W. Lipkowski und A. E. Takemori (1987). "Bimorphinans as highly selective, potent kappa opioid receptor antagonists." *Journal of medicinal chemistry* 30(2): 238–239.
150. Portoghese, P. S., M. Sultana und A. E. Takemori (1988). "Naltrindole, a highly selective and potent non-peptide  $\delta$  opioid receptor antagonist." *European journal of pharmacology* 146(1): 185–186.

- 
151. Premont, R. T., I. Matsuoka, M. G. Mattei, Y. Pouille, N. Defer und J. Hanoune (1996). "Identification and characterization of a widely expressed form of adenylyl cyclase." *The Journal of biological chemistry* 271(23): 13900–13907.
152. Prescott, S. A. (1998). "Interactions between depression and facilitation within neural networks: updating the dual-process theory of plasticity." *Learning & memory* (Cold Spring Harbor, N.Y.) 5(6): 446–466.
153. Price, D. D. und R. Dubner (1977). "Mechanisms of first and second pain in the peripheral and central nervous systems." *The Journal of investigative dermatology* 69(1): 167–171.
154. Przewłocki, R. und B. Przewłocka (2001). "Opioids in chronic pain." *European journal of pharmacology* 429(1-3): 79–91
155. Puehler, W., C. Zöllner, A. Brack, M. A. Shaqura, H. Krause, M. Schäfer und C. Stein (2004). "Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction." *Neuroscience* 129(2): 473–479.
156. R Development Core Team (2018). "R: A Language and Environment for Statistical Computing." R Foundation for Statistical Computing. Wien, Österreich. Gefunden auf: <https://www.R-project.org/>. Zuletzt abgerufen am 19.04.2022.
157. Raja, S. N., D. B. Carr, M. Cohen, N. B. Finnerup, H. Flor, S. Gibson, F. J. Keefe, J. S. Mogil, M. Ringkamp, K. A. Sluka, X.-J. Song, B. Stevens, M. D. Sullivan, P. R. Tutelman, T. Ushida und K. Vader (2020). "The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises." *Pain* 161(9): 1976–1982.
158. Ray, R. S., A. E. Corcoran, R. D. Brust, J. Chul Kim, G. B. Richerson, E. Nattie und S. M. Dymecki (2011). "Impaired respiratory and body temperature control upon acute serotonergic neuron inhibition." *Science (New York, N.Y.)* 333(6042): 637–642.
159. Reinscheid, R. K., H. P. Nothacker, A. Bourson, A. Ardati, R. A. Henningsen, J. R. Bunzow, D. K. Grandy, H. Langen, F. J. Monsma und O. Civelli (1995). "Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor." *Science (New York, N.Y.)* 270(5237): 792–794.
160. Richards, D. (2004). "The Oxford Pain Group League table of analgesic efficacy." *Evidence-Based Dentistry* 5(1): 22–23.

- 
161. Roeder, M. (1996). "Compensation in Flow Cytometry Analyses." Gefunden auf: <https://drrm.com/compensation/index.html> Zuletzt abgerufen am: 21.08.2019 [Stand: 24.05.2000]. Zuletzt abgerufen am 01.02.2022
162. Rogala, B., Y. Li, S. Li, X. Chen und G. J. Kirouac (2012). "Effects of a post-shock injection of the kappa opioid receptor antagonist norbinaltorphimine (norBNI) on fear and anxiety in rats." *PloS one* 7(11): e49669.
163. Roth, B. L., K. Baner, R. Westkaemper, D. Siebert, K. C. Rice, S. Steinberg, P. Ernsberger und R. B. Rothman (2002). "Salvinorin A: a potent naturally occurring nonnitrogenous kappa opioid selective agonist." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(18): 11934–11939.
164. Rothman, R. (2000). "An open-label study of a functional opioid  $\kappa$  antagonist in the treatment of opioid dependence." *Journal of Substance Abuse Treatment* 18(3): 277–281.
165. Rothman, R. B. (1994). "Evidence for Heterogeneity of Kappa-Opioid Binding Sites: A Review of Data Obtained Using Brain Membranes Depleted of Mu and Delta Binding Sites With Irreversible Agents." *Analgesia* 1(1): 27–49.
166. Rowan, M. P., N. B. Ruparel, A. M. Patwardhan, K. A. Berg, W. P. Clarke und K. M. Hargreaves (2009). "Peripheral delta opioid receptors require priming for functional competence in vivo." *European journal of pharmacology* 602(2-3): 283–287.
167. Rudd, R. A., N. Aleshire, J. E. Zibbell und R. Matthew Gladden (2016). "Increases in Drug and Opioid Overdose Deaths-United States, 2000-2014." *American Journal of Transplantation* 16(4): 1323–1327.
168. Sakurai-Yamashita, Y., K. Yamashita, T. Kanematsu und K. Taniyama (1999). "Localization of the 5-HT(4) receptor in the human and the guinea pig colon." *European journal of pharmacology* 383(3): 281–285.
169. Scherrer, G., K. Befort, C. Contet, J. Becker, A. Matifas und B. L. Kieffer (2004). "The delta agonists DPDPE and deltorphin II recruit predominantly mu receptors to produce thermal analgesia: a parallel study of mu, delta and combinatorial opioid receptor knockout mice." *The European journal of neuroscience* 19(8): 2239–2248.
170. Scherrer, G., N. Imamachi, Y.-Q. Cao, C. Contet, F. Mennicken, D. O'Donnell, B. L. Kieffer und A. I. Basbaum (2009). "Dissociation of the opioid receptor mechanisms that control mechanical and heat pain." *Cell* 137(6): 1148–1159.

- 
171. Scholz, J., N. B. Finnerup, N. Attal, Q. Aziz, R. Baron, M. I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, G. Cruccu, K. D. Davis, S. Evers, M. First, M. A. Giamberardino, P. Hansson, S. Kaasa, B. Korwisi, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, T. Nurmikko, S. Perrot, S. N. Raja, A. S. C. Rice, M. C. Rowbotham, S. Schug, D. M. Simpson, B. H. Smith, P. Svensson, J. W. S. Vlaeyen, S.-J. Wang, A. Barke, W. Rief und R.-D. Treede (2019). "The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain." *Pain* 160(1): 53–59.
172. Schubert, I., P. Ihle und R. Sabatowski (2013). "Increase in opiate prescription in Germany between 2000 and 2010: a study based on insurance data." *Deutsches Arzteblatt international* 110(4): 45–51.
173. Seamon, K. B., W. Padgett und J. W. Daly (1981). "Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 78(6): 3363–3367.
174. Sengupta, J. N., A. Mickle, P. Kannampalli, R. Spruell, J. McRorie, R. Shaker und A. Miranda (2014). "Visceral analgesic effect of 5-HT(4) receptor agonist in rats involves the rostroventral medulla (RVM)." *Neuropharmacology* 79: 345–358.
175. Sherrington, C. S. (1903). "Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus." *The Journal of physiology* 30(1): 39–46.
176. Sherrington, C. S. (1906). "The Integrative Action of the Nervous System." *Scribner*. New York.
177. Sierra, S., K. M. Lippold, D. L. Stevens, J. L. Poklis, W. L. Dewey und J. González-Maeso (2020). "Adjunctive effect of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor agonist lorcaserin on opioid-induced antinociception in mice." *Neuropharmacology* 167: 107949.
178. Sinclair, D. C. und B. A. Stokes (1964). "The Production and characteristics of "second pain"" *Brain : a journal of neurology* 87: 609–618.
179. Sloots, C. E., A. C. Poen, R. Kerstens, M. Stevens, M. de Pauw, J. C. van Oene, S. G. M. Meuwissen und R. J. F. Felt-Bersma (2002). "Effects of prucalopride on colonic transit, anorectal function and bowel habits in patients with chronic constipation." *Alimentary pharmacology & therapeutics* 16(4): 759–767.
180. Sora, I., M. Funada und G. R. Uhl (1997). "The mu-opioid receptor is necessary for D-Pen<sup>2</sup>,D-Pen<sup>5</sup>enkephalin-induced analgesia." *European journal of pharmacology* 324(2-3): R1-2.



- 
181. Stanfa, L. C. und A. H. Dickenson (1993). "Cholecystokinin as a factor in the enhanced potency of spinal morphine following carrageenin inflammation." *British journal of pharmacology* 108(4): 967–973.
182. Stefan, E., M. K. Malleshaiah, B. Breton, P. Hien Ear, V. Bachmann, M. Beyermann, M. Bouvier und S. W. Michnick (2011). "PKA regulatory subunits mediate synergy among conserved G-protein-coupled receptor cascades." *Nature communications* 2: 598.
183. Stein, C., M. J. Millan, T. S. Shippenberg, K. Peter und A. Herz (1989). "Peripheral opioid receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptors." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 248(3): 1269–1275.
184. Stewart, D., T. Jebara, S. Cunningham, A. Awaisu, A. Pallivalapila und K. MacLure (2017). "Future perspectives on nonmedical prescribing." *Therapeutic advances in drug safety* 8(6): 183–197.
185. Sullivan, M. A., A. Bisaga, M. Pavlicova, K. M. Carpenter, C. J. Choi, K. Mishlen, F. R. Levin, J. J. Mariani und E. V. Nunes (2019). "A Randomized Trial Comparing Extended-Release Injectable Suspension and Oral Naltrexone, Both Combined With Behavioral Therapy, for the Treatment of Opioid Use Disorder." *The American journal of psychiatry* 176(2): 129–137.
186. Suzuki, J. und S. El-Haddad (2017). "A review: Fentanyl and non-pharmaceutical fentanyl." *Drug and alcohol dependence* 171: 107–116.
187. Theberge, F. R., X. Li, S. Kambhampati, C. L. Pickens, R. St Laurent, J. M. Bossert, M. H. Baumann, M. R. Hutchinson, K. C. Rice, L. R. Watkins und Y. Shaham (2013). "Effect of chronic delivery of the Toll-like receptor 4 antagonist (+)-naltrexone on incubation of heroin craving." *Biological psychiatry* 73(8): 729–737.
188. Tracey, I. und P. W. Mantyh (2007). "The cerebral signature for pain perception and its modulation." *Neuron* 55(3): 377–391.
189. Treede, R.-D., W. Rief, A. Barke, Q. Aziz, M. I. Bennett, R. Benoliel, M. Cohen, S. Evers, N. B. Finnerup, M. B. First, M. A. Giamberardino, S. Kaasa, B. Korwisi, E. Kosek, P. Lavand'homme, M. Nicholas, S. Perrot, J. Scholz, S. Schug, B. H. Smith, P. Svensson, J. W. S. Vlaeyen und S.-J. Wang (2019). "Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11)." *Pain* 160(1): 19–27.
190. Turk, D. C., H. D. Wilson und A. Cahana (2011). "Treatment of chronic non-cancer pain." *Lancet (London, England)* 377(9784): 2226–2235.

- 
191. Vadakkan, K. I., H. Wang, S. W. Ko, E. Zastepa, M. J. Petrovic, K. A. Sluka und M. Zhuo (2006). "Genetic reduction of chronic muscle pain in mice lacking calcium/calmodulin-stimulated adenylyl cyclases." *Molecular pain* 2: 7.
192. Walker, E. A., M. M. Makhay, J. D. House und A. M. Young (1994). "In vivo apparent pA2 analysis for naltrexone antagonism of discriminative stimulus and analgesic effects of opiate agonists in rats." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 271(2): 959–968.
193. Wang, C., G.-W. Li und L.-Y. M. Huang (2007). "Prostaglandin E2 potentiation of P2X3 receptor mediated currents in dorsal root ganglion neurons." *Molecular pain* 3: 22.
194. Wang, H. und M. W. Wessendorf (2001). "Equal proportions of small and large DRG neurons express opioid receptor mRNAs." *The Journal of Comparative Neurology* 429(4): 590–600.
195. Wang, X., Y. Zhang, Y. Peng, M. R. Hutchinson, K. C. Rice, H. Yin und L. R. Watkins (2016). "Pharmacological characterization of the opioid inactive isomers (+)-naltrexone and (+)-naloxone as antagonists of toll-like receptor 4." *British journal of pharmacology* 173(5): 856–869.
196. Wee, S., L. Orio, S. Ghirmai, J. R. Cashman und G. F. Koob (2009). "Inhibition of kappa opioid receptors attenuated increased cocaine intake in rats with extended access to cocaine." *Psychopharmacology* 205(4): 565–575.
197. West, S. J., K. Bannister, A. H. Dickenson und D. L. Bennett (2015). "Circuitry and plasticity of the dorsal horn--toward a better understanding of neuropathic pain." *Neuroscience* 300: 254–275.
198. Wilkinson, K. D., K. M. Lee, S. Deshpande, P. Duerksen-Hughes, J. M. Boss und J. Pohl (1989). "The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase." *Science (New York, N.Y.)* 246(4930): 670–673.
199. Woolf, C. J. und Q. Ma (2007). "Nociceptors--noxious stimulus detectors." *Neuron* 55(3): 353–364.
200. Wu, H.-E., H.-S. Sun, C. W. Cheng, M. Terashvili und L. F. Tseng (2006). "dextro-Naloxone or levo-naloxone reverses the attenuation of morphine antinociception induced by lipopolysaccharide in the mouse spinal cord via a non-opioid mechanism." *The European journal of neuroscience* 24(9): 2575–2580.

- 
201. Zaveri, N. T. (2016). "Nociceptin Opioid Receptor (NOP) as a Therapeutic Target: Progress in Translation from Preclinical Research to Clinical Utility." *Journal of medicinal chemistry* 59(15): 7011–7028.
  202. Zhang, X., L. Bao, U. Arvidsson, R. Elde und T. Hökfelt (1997). "Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles." *Neuroscience* 82(4): 1225–1242.
  203. Zhao, G.-M., X. Qian, P. W. Schiller und H. H. Szeto (2003). "Comparison of Dmt1DALDA and DAMGO in binding and G protein activation at mu, delta, and kappa opioid receptors." *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307(3): 947–954.
  204. Zimmermann, M. (1983). "Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals." *Pain* 16(2): 109–110.
  205. Zylka, M. J., F. L. Rice und D. J. Anderson (2005). "Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd." *Neuron* 45(1): 17–25.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Inhibition der Forskolinantwort durch spezifische und unspezifische OR-Agonisten.	27
Abbildung 2:	Met-Enkephalin (unspezifisch) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.	39
Abbildung 3:	Dynorphin A (KOR) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.	40
Abbildung 4:	Nozizeptin (NOP) inhibiert partiell die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.	41
Abbildung 5:	Fentanyl (10 nM) zeigt keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch GR113808. GR113808 (5 nM) reduziert bereits in Abwesenheit von Fentanyl die 5-HT-induzierte PKA-II-Aktivität.	47
Abbildung 6:	Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten, Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).	49
Abbildung 7:	Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).	51
Abbildung 8:	Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).	52
Abbildung 9:	Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten, Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).	53
Abbildung 10:	Naltrexon (unspezifisch) zeigt keinen Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).	54
Abbildung 11:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).	56
Abbildung 12:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).	57
Abbildung 13:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).	58
Abbildung 14:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).	59
		123

---

Abbildung 15:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen, Reversion der PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).	60
Abbildung 16:	Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen, statistisch nicht signifikanten Reversion der PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR).	61
Abbildung 17:	Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).	62
Abbildung 18:	Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR).	63
Abbildung 19:	Norbinaltorphimin (KOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR).	64
Abbildung 20:	Norbinaltorphimin (KOR) hat keinen statistisch signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP).	65
Abbildung 21:	JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Nozizeptin (NOP) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.	67
Abbildung 22:	JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.	68
Abbildung 23:	JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch DAMGO (MOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.	69
Abbildung 24:	JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Dynorphin A (KOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.	70
Abbildung 25:	JTC 801 (NOP) hat im unteren getesteten Konzentrationsspektrum (0 – 20 µM) keinen signifikanten Effekt auf die PKA-II-Inhibition durch Deltorphin II (DOR) und zeigt in hoher Dosierung (100 µM) eine toxische Wirkung auf DRG-Neuronen.	71
Abbildung 26:	Naltrexon (unspezifisch) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).	74
Abbildung 27:	Naltrindol (DOR) führt zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch).	75

- 
- Abbildung 28: Norbinaltorphimin (KOR) zeigt keine statistisch signifikanten Effekte auf die PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch). 76
- Abbildung 29: Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) und Norbinaltorphimin (KOR) führen in Kombination zur partiellen Reversion der PKA-II-Inhibition durch Met-Enkephalin (unspezifisch). 77

---

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendetes Instrumentarium	29
Tabelle 2:	Verwendete Reagenzien	31
Tabelle 3:	Verwendete primäre Antikörper	31
Tabelle 4:	Verwendete sekundäre Antikörper	31
Tabelle 5:	Verwendete Software-Produkte	32
Tabelle 6:	Zusammenfassung der statistischen Auswertung von 4.1 „Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch Met-Enkephalin (unspezifisch), Dynorphin A (KOR) und Nozizeptin (NOP)“.	43
Tabelle 7:	Zusammenfassung der Ergebnisse von 4.2 „Inhibition der 5-HT-induzierten PKA-II-Aktivität durch isolierte sowie kombinierte Anwendung von Fentanyl (MOR) und dem 5-HT4-Rezeptor-spezifischen Antagonisten GR113808.“	46
Tabelle 8:	Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Versuchsreihe 4.3 „Reversion der Met-Enkephalin- (unspezifisch), DAMGO- (MOR), Deltorphin-II- (DOR), Dynorphin-A- (KOR) und Nozizeptin- (NOP) vermittelten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR), Norbinaltorphimin (KOR) und JTC 801 (NOP)“.	72
Tabelle 9:	Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Versuchsreihe 4.4 „Reversion der Met-Enkephalin-induzierten PKA-II-Inhibition durch Naltrexon (unspezifisch), Naltrindol (DOR) und Norbinaltorphimin (KOR) allein und in Kombination“.	78