

CharitéCentrum für Anästhesiologie, OP-Management und Intensivmedizin
Klinik für Anaesthesiologie m. S. operative Intensivmedizin
Campus Benjamin Franklin
Direktor: Prof. Dr. med. C. Stein

HABILITATIONSSCHRIFT

„Molekulare Mechanismen der Schmerzinhibition durch Opiode beim Entzündungsschmerz“

zur Erlangung der Venia Legendi
für das Fach Anästhesiologie

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
CHARITÉ – UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

vorgelegt von

J.Prof. Dr. med. C. Zöllner

Eingereicht: 04.12.2007
Dekan: Prof. Dr. med. M. Paul
1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Höllt
2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Schmelz

Inhaltsverzeichnis

„MOLEKULARE MECHANISMEN DER SCHMERZINHIBITION DURCH OPIOIDE BEIM ENTZÜNDUNGSSCHMERZ“	1
1. EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG	4
1.1. Geschichte der Opioide.....	4
1.2. Opioidrezeptoren.....	4
1.3. Opioidrezeptoragonisten	5
1.4. Opioidrezeptorantagonisten	5
1.5. Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS)	5
1.6. Opioidrezeptoren im peripheren Nervensystem (PNS).....	6
1.7. Opioide beim akuten und chronischen Schmerz	6
2. HYPOTHESEN, EXPERIMENTELLE STRATEGIEN UND ERGEBNISSE.....	8
2.1. Kontrolle der Opioidrezeptorexpression und –funktion in primär afferenten Neuronen.....	8
2.2. Synthese und Transport von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen.....	10
2.3. Funktionelle Aktivität von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen.....	11
2.4. μ -Opioidrezeptoren modulieren die Aktivität des transient receptor potential V1 (TRPV1) beim Entzündungsschmerz.....	12
2.5. Mechanismen der Opioidtoleranz unter pathophysiolog. Bedingungen einer Entzündung	13
3. DISKUSSION	15
3.1. Hypothese A - Regulation der Expression und Funktion von Opioidrezeptoren in primär afferenten Neuronen	15
3.2. Hypothese B und C - Regulation und Funktion von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen	16
3.3. Hypothese D - Interaktion von Opioiderezeptoren mit TRPV1 in primär afferenten Neuronen .	18
3.4. Hypothese E - Mechanismen der Opioidtoleranz unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung	20
4. ZUSAMMENFASSUNG	22
5. ABKÜRZUNGEN	23
6. LITERATUR	24
6.1. Literaturverzeichnis	24
6.2. Eigene Originalarbeiten – zitiert.....	27
6.3. Eigene Originalarbeiten – nicht zitiert	27

7.	DANKSAGUNG	29
8.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	30

1. EINLEITUNG UND STAND DER FORSCHUNG

1.1. Geschichte der Opioide

Opium ist das Extrakt aus dem getrockneten Milchsaft der Mohnblume, *Papaver somniferum*. Die erste dokumentierte Textstelle zur Kultivierung der Mohnpflanze findet sich in einem Text der Sumerer ca. 4000 vor Christus. Opium wird bis heute inhaliert oder intravenös appliziert. Dies führt zu einer Euphorie, einer Analgesie und in höheren Konzentrationen auch zum potentiell tödlichen Atemstillstand. Opium besteht aus einer Vielzahl unterschiedlicher chemischer Substanzen. Neben Zucker, Proteinen, Fette, Wasser und Gummi finden sich zahlreiche Alkaloide, vor allem Morphin (10-15 %), Codein (1-3 %), Noscapin (4-8%), Papaverin (1-3 %) und Thebain (1-2%). Alle Alkaloide außer Thebain haben Eingang gefunden in die klinische Behandlung unterschiedlicher Krankheitsbilder. Es war das Verdienst des deutschen Chemikers Sertürner das Alkaloid Morphin aus dem getrockneten Milchsaft der Mohnblume zu isolieren¹. Die Wirkung von Morphin ist sehr gut steuerbar. Dies hat zu einem weiten Einsatz der Substanz zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen geführt.

1.2. Opioidrezeptoren

Obwohl Erfahrungen in der Anwendung von Opioiden weit zurückreichen ist erst seit den 70er Jahren bekannt, dass deren verschiedenartige Wirkungen auf der Existenz von unterschiedlichen Opioidrezeptoren beruhen. Die Opioidrezeptoren wurden erst auf der Basis pharmakologischer Untersuchungen in die Gruppe der μ , δ und κ -Rezeptoren sowie deren Subklassen eingeteilt²⁻⁴. Die Existenz dieser Rezeptoren konnte später durch Klonierung der komplementären Desoxyribonukleinsäure (cDNA) bestätigt werden. Die erste cDNA, die einen Opioidrezeptor kodierte, wurde im Jahr 1992 durch zwei unabhängige Arbeitsgruppen identifiziert^{5,6}. Nach der Expression in einer Zelllinie konnte in pharmakologischen Untersuchungen gezeigt werden, dass das pharmakologische Profil mit dem des δ -Opioidrezeptors übereinstimmt. In den folgenden Jahren wurde die cDNA des μ - und des κ -Opioidrezeptors identifiziert^{7,8}.

Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) die nach ihrer Sequenzähnlichkeit in fünf Hauptgruppen unterteilt werden. Die Opioidrezeptoren werden, wie ca. 90% aller GPCR, der Gruppe der Rezeptoren vom Rhodopsin-Typ zugerechnet. Diese Gruppe G-Protein gekoppelter Rezeptoren besteht aus einem extrazellulärem N-terminalen Ende, einem intrazellulärem C-terminalen Ende und sieben hydrophoben, transmembranen Domänen. Im menschlichen Genom befinden sich drei Gene, die für den μ -, δ - und κ - Opioidrezeptor kodieren und auf drei verschiedenen Chromosomen 6q24-25, 1p34.3-p36.1 bzw. 8q11-12 lokalisiert sind. Die in zahlreichen pharmakologischen Studien postulierten Subtypen der Opioidrezeptoren μ_1 , μ_2 , δ_1 , δ_2 und κ_1 , κ_2 , κ_3 ⁹ beruhen möglicherweise auf Unterschieden in der gewebespezifischen Verarbeitung der messenger RNA (mRNS-Splicing). Die funktionelle Bedeutung dieser Rezeptorsubtypen ist jedoch fraglich. Ein weiterer Rezeptor mit großer Homologie zu den anderen Opioidrezeptoren, jedoch mit unzureichenden Bindungseigenschaften für die üblichen Opioidagonisten, wird nicht den klassischen

drei Opioidrezeptoren zugerechnet, sondern als Opioid ähnlicher „opioid receptor like (ORL-1)“ Rezeptor klassifiziert ¹⁰.

1.3. Opioidrezeptoragonisten

Ein Opioidagonist ist ein Ligand eines Opioidrezeptors, der nach reversibler Bindung eine Konformationsänderung des Rezeptors und nachfolgend eine Aktivierung der G-Protein gekoppelten Signalkaskade bewirkt und so eine biologisch messbare Antwort (z.B. Analgesie) auslöst ¹¹. Agonisten werden durch die Affinität ihrer Bindung zum Rezeptor und durch ihre biologische Wirksamkeit charakterisiert. Die Dissoziationskonstante K_d erfasst quantitativ die Affinität zwischen dem Ligand (Opioid) und der zugehörigen Bindungsstelle (μ -Opioidrezeptor). Die Dissoziationskonstante ist von der Temperatur abhängig und hat die Dimension einer Konzentration. Je höher die Affinität eines Liganden zum Rezeptor, desto größer ist seine Selektivität für diesen Rezeptor ¹².

Die in der Klinik gebräuchlichen Opioidagonisten sind hauptsächlich μ -Agonisten (Morphin, Fentanyl, Alfentanil, Sufentanil, Remifentanil, u.a.), die bereits bei niedriger Dosierungen eine biologische Antwort über den Opioidrezeptor hervorrufen. Entsprechend der Größe ihrer maximal erreichbaren Wirksamkeit (z.B. Analgesie) unterscheiden wir reinen Agonisten (mit hoher Wirksamkeit, z.B. Fentanyl) von partiellen Agonisten (mit relativ niedriger Wirksamkeit, z.B. Codein und teilweise antagonistischer Wirkung, z.B. Buprenorphin).

1.4. Opioidrezeptorantagonisten

Ein Opioidantagonist ist ein Ligand eines Opioidrezeptors, der nach reversibler Bindung keine biologische Antwort auslöst. Bei gleichzeitiger Anwesenheit von biologisch wirksamen Agonisten und Antagonisten kommt es in Abhängigkeit von den Mengenverhältnissen und der Affinität der beiden Substanzen zur kompetitiven Verdrängung des Agonisten vom Rezeptor und damit zur Abnahme seiner biologischen Wirkung. Die gebräuchlichsten Opioidantagonisten sind Naloxon und Naltrexon. Beide Substanzen wirken antagonistisch an allen drei Opioidrezeptoren, haben aufgrund ihrer höheren Affinität jedoch eine deutliche Präferenz für den μ -Opioidrezeptor ¹². Opioide vom Typ Agonist-Antagonisten (wie z.B. Pentazozin, Buprenorphin) weisen teilweise eine hohe Affinität für den κ -, sowie eine unterschiedliche Affinität für den μ - bzw. δ -Opioidrezeptor auf. Die biologische Wirkung dieser Agonist-Antagonisten ist in Bezug auf den κ -Opioidrezeptor agonistisch, in Bezug auf den μ - oder δ -Opioidrezeptor jedoch antagonistisch ¹³.

1.5. Opioidrezeptoren im zentralen Nervensystem (ZNS)

Die Identifizierung von Opioidrezeptoren gelang in bestimmten Strukturen des ZNS mittels radioaktiv markierter Liganden ². Dort befinden sie sich bevorzugt im Kortex, Thalamus, Hypothalamus, in Strukturen des limbischen Systems und des Hirnstamms ¹⁴. Bei chronischem Schmerz zeigte sich in Positron Emissions Tomografie Scan-Analysen mittels des radioaktiv markierten μ -Agonisten [¹¹C]-Carfentanil die Besetzung zentraler μ -Opioidrezeptoren durch endogene Liganden (Opioidpeptide),

die [^{11}C]-Carfentanil aus seiner Bindung an zentralen μ -Opioidrezeptoren verdrängen¹⁵. In Bindungsstudien wurden Opioidrezeptoren nicht nur im Gehirn, sondern auch im Rückenmark identifiziert¹⁶. Immunhistochemische Untersuchungen haben gezeigt, dass sich μ -, δ - und κ -Opioidrezeptoren bevorzugt im Hinterhorn des Rückenmarks befinden¹⁷, wo die zentralen Nervenendigungen peripherer auf zentrale sensorische Neurone synaptisch umgeschaltet werden. Opioidrezeptoren befinden sich sowohl auf prä- als auch auf postsynaptischen Neuronen.

1.6. Opioidrezeptoren im peripheren Nervensystem (PNS)

Die in dieser Habilitationsschrift durchgeführten Experimente beruhen auf der analgetischen Wirksamkeit von Opioiden im PNS. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine analgetische Wirkung von Opioiden auch durch die lokale Gabe außerhalb des zentralen Nervensystems hervorgerufen werden kann¹⁸. Entsprechend können μ -, δ - und κ -Opioidrezeptoren in peripheren Nervenendigungen sensorischer Neurone nachgewiesen werden. Diese Opioidrezeptoren werden in den Spinalganglien, wo sich die Zellkörper der sensorischen Neurone befinden, synthetisiert und sukzessiv entlang des Axons zum peripheren Nervenende und ins ZNS transportiert. Die lokale Applikation von Opioiden ist sowohl bei somatischen als auch bei viszerale Schmerzen wirksam¹⁹.

1.7. Opiode beim akuten und chronischen Schmerz

Auf allen Ebenen der Neuraxis (peripher, spinal, suprapinal), auf denen Schmerzimpulse moduliert werden können, befinden sich μ -, δ - und κ -Opioidrezeptoren. Experimentelle und klinische Studien zeigen, dass durch eine Applikation von Opioidagonisten auf jeweils einer der drei Ebenen eine wirksame Analgesie erzeugt werden kann. Die vorliegende Habilitationsschrift beschäftigt sich vorzugsweise mit den molekularen Mechanismen und der analgetischen Wirksamkeit peripher applizierter Opiode. An peripheren sensorischen Nervenendigungen bewirkt eine durch lokale Agonisten hervorgerufene Aktivierung von Opioidrezeptoren durch intrazelluläre Effektoren (Adenylyl-Zyklase, Ca^{2+} - und K^{+} -Ionenkanäle) eine Hemmung der Erregungsbildung und -ausbreitung nozizeptiver Impulse und eine Inhibition der Freisetzung exzitatorischer, pro-inflammatorischer Neuropeptide (z.B. Substanz P)^{20,21}. Dadurch kommt es zu einer klinisch relevanten Schmerzlinderung und einer Abnahme vermehrter Schmerzempfindlichkeit (Hyperalgesie). Die Applikation eines Opioids an den Ort des schmerzhaften Geschehens – häufig eine Gewebeverletzung, die mit einer Entzündung einhergeht – resultiert in einer wirksamen Schmerzreduktion. Diese peripher analgetische Wirksamkeit lokal verabreichter Opiode wurde in zahlreichen klinischen Studien bestätigt: Die Applikation von Morphin in ein Gelenk (d.h. intraartikulär) bewirkt eine signifikante Reduktion postoperativer Schmerzen nach arthroskopischen Kniegelenksoperationen²². Die Untersuchungen haben gezeigt, dass nicht nur die Schmerzintensität, sondern auch der postoperative Verbrauch an Schmerzmitteln deutlich abnimmt. Diese schmerzlindernde (d.h. analgetische) Wirkung dauert bis zu 24 Stunden an und ist frei von Nebenwirkungen. Die analgetische Wirksamkeit lokal applizierter Opiode konnte auch bei akuten, von den Bauchorganen ausgehenden Schmerzen

(viszeralen Schmerzen), bei Schmerzen nach Knochenspanentnahmen aus dem Beckenkamm und bei Schmerzen nach zahnchirurgischen Eingriffen nachgewiesen werden (s. Übersichtsarbeit ²³). Neuere klinische Untersuchungen konnten zeigen, dass periphere Opioide auch bei chronisch-entzündlichen Schmerzen eingesetzt werden können. Bei Patienten mit einer chronischen Arthritis führte die intraartikuläre Applikation von Morphin zu einer wirkungsvollen und mehrere Tage anhaltenden Schmerzreduktion ²⁴. Ein weiterer wichtiger Vorteil der peripheren Applikation von Opioiden liegt darin, dass der Ausbildung eines Schmerzgedächtnisses und der Schmerzchronifizierung durch die Hemmung der zentralwärts gerichtete Weiterleitung von Schmerzimpulsen gehemmt werden kann ²⁰. Zudem können die nach i.v. Applikation induzierten zentralen Nebenwirkungen wie Sedierung, Atemdepression, Euphorie und Abhängigkeit durch die periphere Applikation vermieden werden. Die zugrundeliegenden Mechanismen und Möglichkeiten der peripheren Opioidanalgesie sind jedoch bis heute nur teilweise erklärt. Unsere Untersuchungen in den zurückliegenden Jahren beschäftigten sich deshalb mit den molekularen Grundlagen der Opioidrezeptorfunktion in primär afferenten Neuronen, den molekularen Mechanismen der peripheren Opioidanalgesie und mit potentiell therapeutischen Einsatzmöglichkeiten peripher applizierter Opioide.

2. HYPOTHESEN, EXPERIMENTELLE STRATEGIEN UND ERGEBNISSE

Ausgangspunkt dieser Habilitationsschrift sind die folgenden 5 Hypothesen:

Hypothese A: Die Expression des Opioidrezeptors wird durch Genabschnitte im 5' und 3'-Nichtkodierungsbereich (UTR) der DNA reguliert. Eine intakte Disulfid-Brückenbindung zwischen der 2. und 3. extrazellulären Schleife des Rezeptors ist für die korrekte Faltung und Expression notwendig.

Hypothese B: Eine periphere Entzündung führt zu Veränderungen der Synthese von Opioidrezeptor-mRNA- und Opioidrezeptorprotein in primär afferenten Neuronen.

Hypothese C: Die Zunahme der peripheren Opioidanalgesie unter Entzündungsbedingungen ist auf eine verbesserte G-Protein Kopplung im PNS, nicht jedoch im ZNS zurückzuführen.

Hypothese D: μ -Opioidrezeptoren modulieren die Aktivität des „transienten receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)“.

Hypothese E: Die chronische Gabe peripher wirksamer Opioide führt unter Entzündungsbedingungen zu keiner Opioidtoleranz.

2.1. Kontrolle der Opioidrezeptorexpression und -funktion in primär afferenten Neuronen

Die Regulation der Expression des μ -Opioidrezeptorproteins an der Zelloberfläche kann Agonisten-abhängig oder -unabhängig erfolgen. Agonisten-abhängige Prozesse beinhalten die Phosphorylierung intrazellulärer Aminosäuren oder die Internalisierung des Rezeptors. Im Rahmen dieser Studie untersuchten wir, ob der Nichtkodierungsbereich (UTR) der mRNA des Rezeptors einen Agonisten-unabhängigen Einfluß auf die Rezeptorexpression ausüben kann. Grundlage für diese Untersuchung war die Tatsache, daß die Rezeptoren im zentralen Nervensystem besonders lange 3'UTR besitzen²⁵. In diesen Abschnitten der DNA könnten, obwohl der UTR nicht für das eigentliche Rezeptorprotein kodiert, physiologisch relevante Elemente der Regulation der Rezeptorexpression liegen. Mit Hilfe der Polymerase-Kettanreaktion (PCR) haben wir verschiedene Mutationen im UTR der cDNA des μ -Opioidrezeptors angefertigt. Unsere Wildtyp cDNA bestand aus 2162 Basenpaaren mit 212 Basenpaaren im 5'-Nichtkodierungsbereich, 1200 Basenpaaren im Kodierungsbereich und 750 Basenpaaren im 3'-Nichtkodierungsbereich. Für die erste Mutation (Deletion 1: D-I) entfernten wir ein 328 bp langes Fragment im 5'UTR, bei D-II wurde ein 185 bp langes Fragment im 5'UTR entfernt, D-III enthielt nur noch die 5'UTR Fragmente c und d und D-IV bestand lediglich aus einem 5'UTR mit 38 bp. Am 3'UTR entfernten wir ein 205 bp langes Fragment mit einem 38 bp langen Fragment im 5'-Ende (D-V). D-VI bestand aus einem vollständigen 5'-UTR und einem 7 Basenpaar langen 3'UTR. Nach Transfektion der DNA in HEK 293 Zellen zeigten die am 3'UTR durchgeführten Mutationen (D-I-IV) eine 29-93% höhere Rezeptorexpression in als der Wildtyp. Dieses Ergebnis war nicht Agonisten-abhängig und konnte ebenfalls für den μ -Opioidantagonisten [³H]-Naloxon gezeigt werden. Zwischen den einzelnen Mutanten ergaben sich Unterschiede in der Rezeptorzahl, abhängig von der Anzahl der entfernten Segmente. Die Deletion des 328 bp langen Segmentes g (D-I) erhöhte die Expression um 49%, die Entfernung der inneren Segmente d und e (D-II) hingegen steigerte die Rezeptorexpression

um 93%. Nach Entfernung aller Segmente im 3'UTR bis auf das 38 bp lange Segment c (D-IV) erhöhte sich die Rezeptorzahl nur um 48%. Mutant D-II bestehend aus den Segmenten c und d führte zu einem 29%igen Anstieg der maximalen Zahl der Bindungsstellen. Im 5'UTR entfernten wir ein 205 bp langes Fragment zu einem Mutanten D-VI (vollständiger 3'UTR) und D-V (nur 38 bp langes 3'UTR, 5'UTR wie D-VI und 3'UTR wie D-IV). D-VI zeigte einen 2-fachen Anstieg der Rezeptorzahl und D-V zeigte den stärksten Anstieg um 332% gegenüber dem Wildtyp. Die Ergebnisse zeigen, daß unterschiedliche Nukleotidsequenzen auf diversen Segmenten der UTR Einfluß auf die Expression von Opioidrezeptoren in HEK 293 Zellen haben.

Zwischen den Opioidrezeptortypen besteht eine ~60%ige Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz²⁶. Die Homologie ist am höchsten in den transmembranen Domänen (73-76%) und den verbindenden intrazellulären Schleifen (86-100%) und unterscheidet sich stärker in den extrazellulären Schleifen (14-72%), im N-terminalen extrazellulären (9-10%) und im C-terminalen intrazellulären Anteil (14-20%)²⁷. Für den μ -Opioidrezeptor konnte gezeigt werden, daß die extrazellulären Anteile des Rezeptors an der Erkennung von Opioid-Alkaloiden und -Peptiden beteiligt sind^{28,29}. Darüber hinaus ist bekannt, daß sich zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife zwei hochkonservierte Cystein Aminosäuren befinden, die eine Disulfidbrückenbindung eingehen können. Für den Rhodopsin Rezeptor konnte bereits gezeigt werden, daß diese Bindung an der Stabilisierung der transmembranen Domänen beteiligt ist³⁰. Wir untersuchten, ob die nach der Translation gebildete Disulfidbindung auch für den μ -Opioidrezeptor existiert und ob sie eine notwendige strukturelle Komponente des Rezeptors ist. Durch PCR Mutagenese wurden 550 Basenpaar lange Fragmente mit Alanin und Serin- Mutationen (C142A/S und C219A/S) hergestellt. Die Mutationen führen zum Austausch des Sulfur-Atoms der Cystein Seitenkette (-CH₂SH) durch ein Sauerstoff Atom der Serin Seitenkette (-CH₂OH) (C142S/C219S) oder einer Alanin Substitution (-CH₃) (C142A/C219A). Während nur die Cystein Sulfhydrylgruppe eine kovalente Bindung eingehen kann sind sowohl die Cystein als auch die Serin Seitenkette zur H-Brückenbindung in der Lage. Die pharmakologischen Untersuchungen wurden mit einem Peptid Agonisten (DAMGO), einem Alkaloid Agonisten (Morphin), einem Peptid Antagonisten (CTAP) und einem Alkaloid Antagonisten (Naloxon) durchgeführt. Nach der Transfektion in HEK 293 Zellen konnte weder bei den Alanin (C142A/C219A) noch bei den Serin (C142S/C219S) Mutationen eine Bindung mit den Liganden (³H-DAMGO, ³H-Morphin, ³H-CTAP; ³H-Naloxon) nachgewiesen werden. Zum gleichen Ergebnis kamen wir nach Transfektion der Opioidrezeptoren in die stabil exprimierenden CHO Zelllinie. Da Opioidrezeptoren zur Dimerenbildung fähig sind³¹⁻³³ haben wir durch die gleichzeitige Transfektion von C142S und C219S untersucht, ob die verbleibenden intakten Cystein Gruppen zu einer Sulfidbrückenbindung zwischen zwei Opioidrezeptoren in der Lage sind. Interessanterweise konnte in ca. 15% aller Experimente eine [³H]-Naloxon, [³H]-Morphin und [³H]-CTAP Bindung gemessen werden. Bei der höchsten Konzentration des Liganden (25 nM) konnten 25% der Wildtypbindung festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu war für das Opioid Peptid [³H]-DAMGO auch bei den co-transfektionierten Zellen keine Bindung nachweisbar.

Publikationen:

I. **Zöllner C**, Johnson PS, Bei Wang J, Roy AJ Jr, Layton KM, Min Wu J, Surratt CK
Control of mu opioid receptor expression by modification of cDNA 5'- and 3'-noncoding regions.

Brain Res. Mol. Brain Res. 2000; 79(1-2):159-162.

II. Zhang P, Johnson PS, **Zöllner C**, Wang W, Wang Z, Montes AE, Seidleck BK, Blaschak DJ, Surratt CK.

Mutation of human mu opioid receptor extracellular "disulfide cysteine" residues alters ligand binding but does not prevent receptor targeting to the cell plasma membrane.
Brain Res. Mol. Brain Res. 1999; 72(2):195-204.

2.2. Synthese und Transport von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen

Nachdem relevante Mechanismen der μ -Opioidrezeptor-Transkription, -Expression und funktionell wichtige Domänen auf dem Rezeptor charakterisiert werden konnten, wurde die funktionelle Veränderungen der Opioidrezeptorfunktion und -Expression unter pathophysiologischen Bedingungen untersucht. Für die tierexperimentellen Untersuchungen wurde ein Modell gewählt, dass sich zur Untersuchung des Entzündungsschmerzes etabliert hat. Die unilaterale Injektion von komplettem Freundschem Adjuvanz (CFA) in die Hinterpfote der Ratte führt zu einer auf wenige Tage beschränkten, lokalen Entzündung der Hinterpfote. Dieses Modell bietet den Vorteil, dass keine systemische Entzündungsreaktion auftritt. Die Schmerzschwellen lassen sich quantifizieren: Bei der modifizierten Randall-Selitto Methode wird lokal Druck ausgeübt und derjenige Druck bestimmt, bei dem das Tier die Pfote wegzieht (PPT: paw pressure threshold). Mit der Methode nach Hargreaves lassen sich thermische nozizeptive Schwellen erfassen: Ein hitzeinduzierender Lichtstrahl wird auf die Pfote gerichtet, und die Zeit bis zum Zurückziehen der Pfote bestimmt (PWL: paw withdrawal latency). Um die Bedeutung der Opioidrezeptorexpression auf sensorischen Neuronen von Tieren mit und ohne CFA induzierter Entzündung zu untersuchen, wurde mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien die Expression von μ -Rezeptoren untersucht. Zur Quantifizierung der Rezeptormenge wurde eine Sättigungsanalyse angewandt, bei der den endogenen Rezeptoren ein radioaktiv markierter Opioidligand in aufsteigender Konzentration angeboten wird. Aus der Sättigungsanalyse kann die Affinität des Liganden zum Rezeptor und die Zahl der Opioidrezeptor-Bindungsstellen bestimmt werden. Auf transkriptioneller Ebene konnten wir mit Hilfe von Light-cycler PCR Experimenten 24 h nach CFA induzierter Entzündung eine Zunahme der mRNA für μ - und δ -Opioidrezeptoren im DRG nachweisen. Bei der Polymerase-Kettenreaktion werden spezifische DNA-Sequenzen, die in unserem Fall für Opioidrezeptoren kodieren, in kurzer Zeit mit Hilfe zweier Primer vervielfältigt. Die Amplifikation korreliert mit der Menge an vorhandenen mRNA – Transkripten. Die Ligatur des peripheren Nerven führte 24 Stunden nach Beginn der Entzündung zu einer deutlichen Kumulation von Opioidrezeptorbindungsstellen an der Ligatur. Dies deutet auf einen erhöhten axonalen Transport an das periphere Nervenende unter Entzündungsbedingungen hin. Sowohl die Zunahme der mRNA Transkripte, als auch der vermehrte axonale Transport an das periphere Nervenende konnte vollständig durch eine neuronale Blockade der Nervenleitfähigkeit mit einem Lokalanästhetikum gehemmt werden. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass es unter Entzündungsbedingungen

zu einer gesteigerten elektrischen Aktivität am peripheren Nerven kommen kann, die zu einer Hochregulation der Opioidrezeptorsynthese führt.

Eine Zunahme der mRNA im DRG unter Entzündungsbedingungen resultierte in unseren Untersuchungen auch in einer Zunahme des μ -Opioidrezeptorproteins im DRG. In den sensorischen Neuronen der Hinterwurzelganglien die die entzündete Pfote innerviert, konnten wir mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien einen 2.4-fachen Anstieg der Menge an μ -Opioidrezeptoren nachweisen. Die Affinität unterschiedlicher Opioide änderte sich unter Entzündungsbedingungen nicht. Die vermehrte Expression von Opioidrezeptoren konnte durch eine zweite Technik bestätigt werden: In immunohistochemischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass unter Entzündungsbedingungen kleinzellige DRG Neurone (5-25 μ m) vermehrt μ -Opioidrezeptoren exprimieren. Die funktionelle Relevanz dieser Beobachtungen konnten wir in Verhaltensuntersuchungen näher spezifizieren: Unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung nehmen im Verhaltenstest (PPT) an Ratten die analgetischen Eigenschaften von Opioiden nach i.pl. Applikation zu.

Publikationen:

III. **Zöllner C***, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Schäfer M
"Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons"
Mol. Pharmacol. 2003; 64(2):202-210

IV. Pühler W, **Zöllner C**, Brack A, Shaqura MA, Krause H, Schäfer M, Stein C
Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction.
Neurosci. 2004;129(2):473-479.

2.3. Funktionelle Aktivität von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen

Die Menge der μ -Opioidrezeptoren im ZNS und DRG wurde unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen mit Hilfe von Radioligandenbindungsstudien quantifiziert. Die höchste Expression von μ -Opioidrezeptoren konnte im Hypothalamus > Rückenmark > DRG nachgewiesen werden. 24 und 96 Stunden nach Beginn einer lokal begrenzten, CFA-induzierten Entzündung der Rattenhinterpfote konnte eine Zunahme der μ -Opioidrezeptoren im DRG, nicht jedoch im ZNS gezeigt werden. Die Zunahme der Opioidrezeptorexpression war hierbei auf den μ -Opioidrezeptor beschränkt und konnte nicht für den δ -Opioidrezeptor gezeigt werden. Der zweite Schritt in der Signaltransduktionskaskade nach Bindung des Liganden an den korrespondierenden Rezeptor ist die Aktivierung und Spaltung des G-Proteins. Nach der Bindung des Opioids ändert sich die Konformation und Aktivität wodurch der Austausch von GDP durch GTP induziert wird. Wird ein [³⁵S]-radioaktiv markiertes Analog von GTPyS mit den Opioidrezeptoren inkubiert, kann die Menge an aktiviertem G-Protein gemessen werden. Die G-Protein-Kopplung wurde auf diese Weise in unterschiedlichen Abschnitten des Nervensystems (ZNS und DRG) gemessen. Hierbei konnten wir zeigen, dass im ZNS mehr G-Proteine aktiviert werden als im DRG. Die lokal begrenzte Entzündung der Rattenhinterpfote führte im DRG zu einer signifikanten Zunahme der G-Protein Kopplung. Die

Zunahme der analgetischen Wirksamkeit von Opioiden unter pathophysiologischen Bedingungen (wie unter Hypothese B gezeigt), ist deshalb nicht nur auf die Zunahme der Expression von Opioidrezeptoren sondern auch auf eine verbesserte Signaltransduktionskaskade zurückzuführen.

Publikationen:

V. Shaqura MA[#], **Zöllner C^{#*}**, Mousa SA, Stein C, Schäfer M
Characterization of μ opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain.
J Pharmacol Exp Ther. 2004;308(2):712-718.
[#] gemeinsame Erstautorenschaft

VI. Labuz D, Berger S, Mousa SA, **Zöllner C**, Rittner HL, Shaqura MA; Segovia-Silvestre T, Przewlocka B, Stein C, Machelska H
Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain.
J. Neurosci. 2006; 26(16):4350-4358.

2.4. μ -Opioidrezeptoren modulieren die Aktivität des transient receptor potential V1 (TRPV1) beim Entzündungsschmerz

In vorangegangenen Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass Opioide am peripher sensorischen Nerven inhibierend auf Na^+ - und Ca^{2+} -Ionenkanäle wirken. Neuere Studien haben gezeigt, dass der Capsaicinrezeptor (TRPV1), ein Mitglied aus der Familie der TRP-Ionenkanäle, entscheidend an der Entstehung des Entzündungsschmerzes beteiligt ist. Hieraus leitete sich die Frage ab, ob Opioide ebenfalls einen inhibierenden Effekt am TRPV1 ausüben können. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde an DRG Neuronen von Tieren mit und ohne CFA induzierter Entzündung die Inhibition der TRPV1-Aktivität durch Opioide untersucht.

In immunohistochemischen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Opioidrezeptoren und TRPV1 Ionenkanäle auf DRG Neuronen co-exprimiert werden. Dies ist eine Voraussetzung für die Interaktion beider Proteine. Unter Entzündungsbedingungen nahm die Anzahl der TRPV1 immunoreaktiven Neuronen um das 1,6-Fache zu. Quantitative Untersuchungen mit Hilfe von Radioliganden-Bindungsstudien ergaben, dass die Zahl der Bindungsstellen für TRPV1 um das 2,8-Fache ansteigt. Hieraus lässt sich schließen, dass sich sowohl die Anzahl - bezogen auf die gesamte Population - der Neuronen als auch die Dichte von TRPV1 pro Neuron unter Entzündungsbedingungen zunimmt. Die Zunahme an TRPV1 Ionenkanälen auf DRG Neuronen ist ein potentieller Mechanismus, der eine Hyperalgesie beim Entzündungsschmerz erklären kann. Die funktionelle Aktivität des Ionenkanals wurde mit Hilfe der Patch-Clamp Technik durchgeführt. Um Änderungen des Membranpotentials der untersuchten Zelle zu verhindern, wird ein sog. Kompensationsstrom erzeugt, der genauso groß ist wie der Strom, der durch die Membran fließt, der diesem aber entgegengerichtet ist. Es wird also das Membranpotential der Zelle gemessen und mit einem vorgegebenen gewünschten Wert der sog. Sollspannung U_{soll} verglichen. Bei Unterschieden zwischen der Sollspannung und der tatsächlich gemessenen Membranspannung wird ein entgegengerichteter Strom in die Zelle injiziert. Dieser sehr kleine Kompensationsstrom wird in Patch-Clamp-Experimenten gemessen. Wir konnten zeigen, dass Opioide den Capsaicin- und Hitze induzierten TRPV1 Strom hemmt. Dieser Effekt wird nach Aktivierung von Opioidrezeptoren durch inhibierende G-Proteine induziert. Die inhibierende

Eigenschaft der Opioide am peripheren Nerven wird nachfolgend durch einen cAMP/PKA abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt. Die Inhibition war an DRG Neuronen von Tieren mit und ohne CFA-induzierter Entzündung nachweisbar. Die funktionelle Relevanz dieser Untersuchungen konnte *in vivo* bestätigt werden: Die Capsaicin vermittelte Hyperalgesie konnte in einem Tiermodell durch die lokale Gabe einer nicht systemisch wirksamen Dosis eines Opioids inhibiert werden.

Publikation:

VII. Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schäfer M, Stein C, **Zöllner C***
Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain.
Mol. Pharmacol. 2007; 71(1):12-18.

2.5. Mechanismen der Opioidtoleranz unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung

Opioide sind die am häufigsten verwendeten Medikamente zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen. Die chronische Gabe von Opioiden führt in tierexperimentellen Untersuchungen zur Entstehung einer pharmakologischen Toleranz, d.h. einer signifikanten Abnahme der Wirksamkeit der Opioide nach repetitiver Gabe einer konstanten Dosis^{34,35}. Im Gegensatz hierzu führt die kontinuierliche Opioidaufnahme bei Patienten mit Tumorschmerzen^{36,37} oder chronisch-entzündlichen Schmerzerkrankungen^{38,39} oftmals zu keinem Wirkungsverlust der Opioide. Dies mag unter anderem an der klinisch/pathophysiologischen Situation liegen, die häufig experimentell unberücksichtigt bleibt. Beim Entzündungsschmerz wird die Opioidanalgesie zu einem erheblichen Teil durch Aktivierung von Opioidrezeptoren auf peripher sensorischen Neuronen vermittelt^{40,41}. Die Entzündung im peripheren Gewebe führt darüber hinaus zur Freisetzung endogener Opioidliganden aus körpereigenen Immunzellen, die ebenfalls analgetisch wirksame Eigenschaften an peripheren Opioidrezeptoren entfalten können. Hypothese E beschäftigt sich mit der Frage, ob pathophysiologische Veränderungen der Entzündung mit einer verminderten Opioidtoleranz einhergehen. In experimentellen Untersuchungen an Tieren mit und ohne CFA-induzierter Entzündung wurde nach chronischer subkutaner Gabe von Morphin die Entstehung der Opioidtoleranz untersucht. Hierzu wurde die Pfotendruckschwelle der Rattenhinterpfote nach akuter, intraplantar Injektion eines peripher wirksamen Opioids an Kontrolltieren und CFA-behandelten Tieren gemessen. Wir konnten zeigen, dass bei Tieren mit CFA-induzierter Entzündung die chronische Gabe von Opioiden zu keiner Opioidtoleranz führt. Auf zellulärer Ebene wurden Veränderungen der Expression und Funktion von Opioidrezeptoren weiter analysiert. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte eine ausgeprägte Internalisierung von Opioidrezeptoren auf sensorischen Neuronen von chronisch Morphin behandelten Tieren mit CFA-induzierter Entzündung nachgewiesen werden, nicht jedoch bei chronisch Morphin behandelten Tieren ohne Entzündung. In funktionellen Untersuchungen konnte nach chronischer Gabe von Morphin nur bei den CFA-behandelten Tieren eine verbesserte G-Protein Kopplung und eine Zunahme der Inhibition von cAMP durch Opioide gezeigt werden, nicht jedoch bei Tieren ohne CFA-induzierter Entzündung. Um die Rolle der endogenen Opioidpeptide bei der Entstehung der Opioidtoleranz unter pathophysiologischen Veränderungen zu untersuchen, wurden diese durch lokale Injektion von Antikörpern oder durch Depletion Opioid-produzierender Immunzellen

durch Cyclophosphamid (CTX) eliminiert. Unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die kontinuierliche Präsenz endogener Opioidpeptide zu einer verbesserten Opioidrezeptorinternalisierung und –funktion führen und der Entstehung einer Opioidtoleranz entgegenwirken.

Publikation:

VIII. **Zöllner, C.**, Mousa, S.A., Fischer, O., Rittner, H., Shaqura, M., Brack, A., Shakibaei, M., Binder, W., Urban, F., Stein, C., Schäfer, M.
Inflammatory pain prevents the development of tolerance at peripheral opioid receptors.
J Clin Invest 2008; 118:1065-1073.

3. DISKUSSION

Opioide sind bis heute die potentesten Schmerzmittel zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen. Ihr Einsatz unter klinischen Bedingungen nach intravenöser Applikation ist jedoch durch Nebenwirkungen limitiert. Bereits in analgetischen Dosen führen Opioiden zur Atemdepression, Übelkeit, Erbrechen, Sedierung, Konstipation und nach längerer Gabe zur Entstehung von Sucht und Toleranz. Aus diesem Grunde wurde in den zurückliegenden Jahren versucht, eine neue Generation von peripher wirksamen Opioiden zu entwickeln. Der Vorteil der peripheren Applikation liegt darin, dass die, nach intravenöser Applikation zentral vermittelten Nebenwirkungen, vollständig ausbleiben. Die periphere Applikation von Opioiden stellt deshalb eine attraktive Methode zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen dar. Die vorliegende Habilitationsschrift beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen der peripheren Opioidanalgesie unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen.

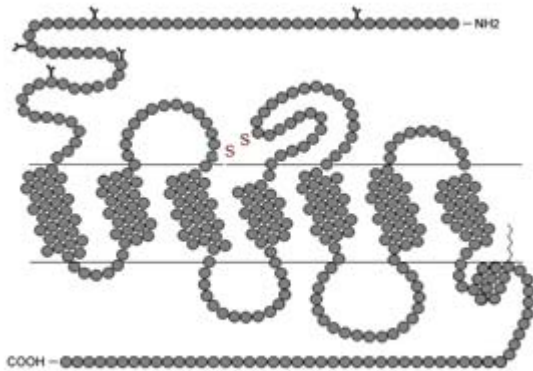
3.1. Hypothese A - Regulation der Expression und Funktion von Opioidrezeptoren in primär afferenten Neuronen

Agonisten-abhängige und -unabhängige Mechanismen sind an der Regulation der Expression von Opioidrezeptoren beteiligt. Ein potentiell Agonisten-unabhängiger Mechanismus ist im Nichtkodierungsbereich der mRNA des Opioidrezeptors zu suchen. In der von uns durchgeführten Untersuchung wurden 7 μ -Opioidrezeptor-cDNA Konstrukte mit unterschiedlich langen Nichtkodierungsbereichen kloniert (5'-UTR: 212 Basenpaare (bp), 7 bp; 3'-UTR: 38 bp, 223 bp, 305 bp, 422 bp, 750 bp). Nach Transfektion in HEK293-Zellen konnte gezeigt werden, dass ein zweifach höhere Expression von Opioidrezeptoren zu erzielen ist, wenn die 5'-UTR bis auf ein kurzes, 7 bp langes Fragment entfernt wird. Die Deletion unterschiedlicher Segmente auf dem 3'-UTR führte zu einem 4.3 fachen Anstieg der Opioidrezeptorexpression verglichen mit Wildtyp-Konstrukten. Mögliche Erklärungen für die unterschiedlichen Expressionsmuster könnte die Ausbildung von RNA Sekundärstrukturen zwischen einzelnen Segmentabschnitten sein. Hairpinstrukturen können starke Modulatoren der Transkription und der Translation sein⁴². Darüber hinaus können AU-reiche Sequenzen der mRNA als Bindungsseiten für Proteine dienen, die die Transkription destabilisieren^{43,44}. Neben AUUUA reichen Sequenzen können auch GUUUG Abschnitte die RNA destabilisieren. Beide Formen des Pentanukleotides treten im 3'UTR unseres μ -Opioidrezeptors und in den Segmenten e, f und g des 5'UTR auf.

Wir konnten weiter zeigen, daß eine Disulfidbrückenbindung zwischen der ersten und zweiten extrazellulären Schleife des μ -Opioidrezeptors existiert und entscheidend zur Ligandenbindung der Opioide am μ -Opioidrezeptor beiträgt. Nach Mutation des C142 in der ersten extrazellulären Schleife und des C219 in der zweiten Schleife zu einem Alanin und einem Serin konnte für die getesteten Opioidagonisten und Opiodantagonisten keine Bindung am Rezeptor festgestellt werden. Die Mutanten wurden in der Zellmembran von HEK293 Zellen in geringerer Menge als der Wildtyp nachgewiesen. Die Disulfidbrückenbindung trägt zu einer effizienten Faltung des Proteins bei und die

Entfernung dieser stabilisierenden Verbindung führt zu einer verminderten Expression des Rezeptors. Dennoch wurden auch für die Mutanten genügend Rezeptoren auf der Zelloberfläche nachgewiesen, die eine ausreichende und meßbare Ligandenbindung ermöglichen sollte. Wie unsere Untersuchungen gezeigt haben, hat die Mutation zu einem Serin keinen Einfluß auf die Ligandenbindung durch eine mögliche H-Brückenbindung. Aus diesem Ergebnis schließen wir, daß auch das Cystein C142 und C219 keinen direkten Kontaktpunkt für die Ligandenbindung darstellt, sondern entscheidend zur „Architektur“ der extrazellulären Schleife beiträgt. Wie von Metzger et al. beschrieben⁴⁵, könnte die Struktur der extrazellulären Anteile des Rezeptors ein sterisches Hindernis für bestimmte Liganden darstellen. Die Zerstörung der Disulfidbrücke könnte die gesamte Rezeptorstruktur oder die Struktur der extrazellulären Loops verändern und nun für alle Liganden den Zugang zu den Bindungsstellen in den transmembranen Domänen blockieren.

Zusammenfassung Hypothese A:



Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der 7-TM Domänen G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Die Ausbildung von RNA Sekundärstrukturen kann ein starker Modulator der Transkription und der Translation sein. Dies führt zu einem Agonisten-unabhängigen Mechanismus der Expression von Opioidrezeptoren.

In Übereinstimmung mit Arbeiten zu anderen GPCR's konnte gezeigt werden, daß für den μ -Opioidrezeptor eine extrazelluläre

Disulfidbrückenbindung zwischen der zweiten und dritten TM-Domäne besteht und entscheidend zur Bindung der Opioiden am μ -Opioidrezeptor beiträgt. Diese Ergebnisse führen zur Entwicklung molekularer Modelle, die die Bedeutung der extrazellulären Anteile des Rezeptors an der Ligandenbindung untersucht.

3.2. Hypothese B und C - Regulation und Funktion von Opioidrezeptoren beim Entzündungsschmerz in primär afferenten Neuronen

Gewebedestruktion und Nervenverletzungen sind häufig mit Entzündungsprozessen assoziiert. Neben Schwellung, Rötung und Erwärmung zählt der Schmerz zu den klassischen Parametern einer Entzündung. Schmerz wird definiert als „eine unangenehme sensorische oder emotionale Empfindung, die mit einem tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschaden einhergeht“ (Definition der International Association for the Study of Pain; IASP) Unter Entzündungsbedingungen vermitteln myelinisierte (Adelta) und nicht-myelinisierte (C) Fasern die Reize mechanischer, chemischer oder Hitzestimuli in das zentrale Nervensystem. Auf sensorischen Neuronen konnten alle drei bekannten Opioidrezeptortypen nachgewiesen werden. Dort entfalten Opioiden ihre analgetischen Eigenschaften, indem sie spannungsabhängige Calcium-Kanäle und TTX-resistente Natriumkanäle, die maßgeblich an der Transduktion schmerzhafter Stimuli beteiligt sind, hemmen. Die Inhibition der genannten Ionenkanäle erfolgt hierbei, nach Spaltung des G-Proteins, durch einen $G\beta\gamma$ -Untereinheiten-

vermittelten oder durch einen cAMP/PKA-inhibierenden Effekt am peripheren Nerven. Darüber hinaus hemmen Opioide die Freisetzung proinflammatorischer Neuropeptide (Substanz P, calcitonin gene-related peptide) aus peripheren und zentralen sensorischen Nervenendigungen⁴⁶. Beim Entzündungsschmerz konnte gezeigt werden, dass Opioide nach lokaler Applikation in systemisch nicht-wirksamen Dosierungen zu einer Analgesie beitragen können^{47,48}. Diese Applikationsform bietet gegenüber der systemischen intravenösen Injektion eine Reihe von Vorteilen: 1. Die nach systemischer Applikation beobachteten Nebenwirkungen wie Atemdepression, Übelkeit und Erbrechen treten nach peripherer Applikation nicht auf. 2. Opioide hemmen den Schmerz nach peripherer Applikation direkt am Ort der Schmerzentstehung. 3. Neben den analgetischen Effekten vermitteln Opioide nach peripherer Applikation einen entzündungshemmenden Effekt direkt am Ort der Entzündung. Deshalb ist es auch nicht weiter verwunderlich, dass der Organismus selbst in der Lage ist, durch die Freisetzung endogener Opioide den Schmerz direkt am Ort des Entstehens zu hemmen. Körpereigene Liganden von Opioidrezeptoren sind Opioidpeptide wie β -Endorphin, Enkephaline, Dynorphin und Endomorphine. Im entzündeten Gewebe lassen sich Opioidpeptide in verschiedenen Leukozytenpopulationen wie Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten (T-Zellen) nachweisen⁴⁹. Zudem exprimieren Leukozyten mehrere Rezeptoren (u. a. für CRF und Katecholamine), deren Aktivierung eine Freisetzung von Opioidpeptiden aus Leukozyten und eine periphere Schmerzhemmung bewirkt⁵⁰. Hieraus ergibt sich ein Modell einer körpereigenen opioidvermittelten Schmerzhemmung im entzündeten Gewebe. Im Tiermodell können unter Stressbedingungen (z. B. Schwimmen in kaltem Wasser oder nach lokaler Injektion verschiedener Mediatoren (u. a. corticotropin releasing factor), die endogenen Opioidpeptide freigesetzt werden und zu einer signifikanten Inhibition des Schmerzes führen⁵¹. Diese Schmerzhemmung lässt sich durch lokale Gabe von Opioidrezeptorantagonisten in systemisch unwirksamer Dosierung blockieren. Auch bei Patienten nehmen postoperative Schmerzen und Analgetikabedarf nach Operationen signifikant zu, wenn lokal Naloxon in geringer Menge injiziert wird²².

Neben den endogen freigesetzten Opioidpeptiden hat der Körper eine Reihe weiterer Anpassungsmechanismen, die einem schmerzhaften Stimulus entgegenwirken. Im Rahmen dieser Habilitationsschrift wurde untersucht, welche Veränderungen auf der Ebene der Opioidrezeptoren zur Analgesie beim Entzündungsschmerz beitragen. In tierexperimentellen Untersuchungen konnten wir zeigen, dass Opioide nach peripherer Applikation analgetisch wirksam sind⁵¹. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass eine gesteigerte Analgesie in entzündetem Gewebe auf ein Aussprossen der peripheren Nervenendigungen (sprouting) oder einer, durch das Gewebetrauma bedingten, Unterbrechung der perineuralen Scheide⁵² zurückzuführen ist. Wir konnten eine Reihe weiterer adaptiver Veränderungen am Opioidrezeptor aufzeigen: Unter Entzündungsbedingungen kommt es (1.) auf transkriptioneller Ebene zu einer vermehrten Synthese von für μ -Opioidrezeptoren kodierender mRNA (2.) zu einer vermehrten Expression von μ -Opioidrezeptoren auf peripher sensorischen Neuronen (3.) zu einem vermehrten Transport von Opioidrezeptoren aus den sensorischen Neuronen an das periphere Nervenende (4.) nach Applikation von endogen und exogen applizierten Opioidliganden zu einer erhöhten G-Proteinkopplung in sensorischen Neuronen. Diese adaptiven Vorgänge können die tierexperimentellen Befunde erklären, die eine verbesserte Opioidanalgesie unter Entzündungsbedingungen zeigten. Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen

konnten zeigen, dass der Anstieg der Opioidrezeptorexpression Zytokin-vermittelt sein kann. Interleukin-4 führt nach der Bindung des Transkriptions-Faktors STAT-6 am μ -Opioidrezeptorpromotor zu einer gesteigerten mRNA-Synthese⁵³. Diese Untersuchungen tragen zu einem besseren Verständnis der molekularen Opioidwirkung bei und könnten langfristig die Therapie akuter und chronischer Schmerzen beeinflussen.

Zusammenfassung Hypothese B + C:



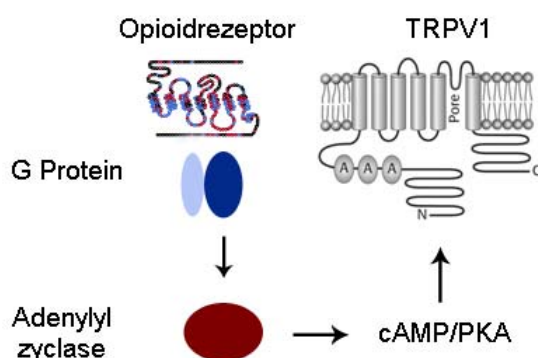
Unter der pathophysiologischen Bedingung einer Entzündung in peripherem Gewebe kommt es zu einer vermehrten Synthese von μ -Opioidrezeptoren (MOR) in spinalen Hinterwurzelganglien. Die gesteigerte elektrische Aktivität des Nerven ist assoziiert mit einer Zunahme von MOR – mRNA, DNA und Protein. MOR werden vermehrt an das periphere Nervenende transportiert. Die Zunahme der Expression von

Opioidrezeptoren und die verbesserte G-Protein Kopplung erklärt die verbesserte analgetische Wirksamkeit peripher applizierter Opiode beim Entzündungsschmerz (modifiziert nach Stein et al. 2003 NatMed⁵¹)

3.3. Hypothese D - Interaktion von Opioidrezeptoren mit TRPV1 in primär afferenten Neuronen

TRPV1 ist ein hitzesensibler Ionenkanal der vorzugsweise auf sensorischen Neuronen exprimiert wird. Insbesondere unter entzündlichen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass TRPV1 eine wichtige Rolle bei der Schmerzentstehung spielt⁵⁴. Der Ionenkanal kann durch die zahlreichen Entzündungsmediatoren, die im Rahmen eines entzündlichen Geschehens freigesetzt werden, sensitiviert werden⁵⁵⁻⁵⁷. Proinflammatorisch wirkende Chemokine potenzieren Hitze- und Capsaicin induzierte TRPV1 Ströme⁵⁷. Prostaglandine - Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels - aktivieren mittels Prostaglandinrezeptoren den cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg, woraufhin TRPV1 PKA-vermittelt phosphoryliert und sensibilisiert wird.⁵⁸ Bradykinin und NGF potenzieren Capsaicin- und Protonen-induzierte TRPV1 Ströme durch Aktivierung der Phospholipase C- γ ⁵⁹. TRPV1 ist wesentlich an der Entstehung der thermalen Hyperalgesie beteiligt⁶⁰: In DRG Neuronen von TRPV1-Knockout Mäusen sind Capsaicin-, Hitze- und Protonen-induzierte Ströme zum großen Teil nicht detektierbar⁶⁰. Im Verhaltenstest mit TRPV1-Knockout-Mäusen verändert sich die thermale Algesie nach Carrageenan-Injektion in die Pfote im Vergleich zu Tieren ohne Entzündung. Sie weisen jedoch eine normale Reaktion auf thermische Stimuli unter physiologischen Bedingungen auf. Da Opiode bei der

Therapie des Entzündungsschmerzes eine wichtige Rolle spielen, beschäftigte sich diese Studie mit der Frage, ob Opiode inhibierend am TRPV1 wirken können. Wir konnten zeigen, dass es unter Entzündungsbedingungen zu einer 2.8-fachen Zunahme der TRPV1 Ionenkanäle auf sensorischen Neuronen kommt. Immunhistochemisch konnten wir zeigen, dass sowohl die Anzahl der μ -Rezeptors als auch der TRPV1 immunoreaktiven Neuronen nach CFA-induzierter Entzündung zunehmen. Auch der Anteil der Neuronen, die μ -Rezeptor und TRPV1 co-exprimieren, stieg unter Entzündungsbedingungen von 14% auf 22% an. Auf mRNA Ebene konnte mit Hilfe der *Real-time* PCR keine entzündungsbedingte Hochregulation von TRPV1 Transkripten detektiert werden, weder 96 h nach CFA Injektion noch zu wesentlich früheren Zeitpunkten der Entzündung. Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die immunhistochemisch ebenfalls eine Hochregulation von TRPV1 auf Proteinebene, jedoch nur geringe Änderungen der mRNA Transkripte detektierten, bestätigen unsere Ergebnisse. Amaya et al. zeigen eine Zunahme der TRPV1 Immunreaktivität in besonders klein- bis mittelzelligen DRG Neuronen nach 2-tägiger CFA Entzündung von 27% auf 44%⁶¹. Neurone, die TRPV1 mRNA Transkripte aufwiesen, veränderten sich nur geringfügig von 43% auf 48%. Ji et al. fanden eine Zunahme der TRPV1 Proteinexpression von 23% auf 36%, Breese et al. von 11% auf 25%^{55,62}. Die Anzahl der TRPV1 mRNA Transkripte blieb dagegen nach 24 h, 48 h und 96 h CFA-induzierter Entzündung unverändert^{55,63}. Eine mögliche Ursache für diese vermehrte Proteinexpression unter Entzündungsbedingungen könnte in der Ausschüttung des Nervenwachstumsfaktors NGF (nerve growth factor) liegen. NGF wird vom Ort der Entzündung retrograd zu den Zellkörpern der DRG Neuronen transportiert und führt dort zur Aktivierung der MAP Kinase p38. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der TRPV1 Bindungsstellen, nicht aber der mRNA Transkripte nach CFA-induzierter Entzündung wäre, dass der Ionenkanal in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird und erst durch den Entzündungsstimulus an die Zelloberfläche rekrutiert wird. Bezzerides et al. konnten diesen Mechanismus für TRPC5 nachweisen, dessen vermehrter Transport zur Plasmamembran durch Wachstumsfaktoren initiiert werden kann⁶⁴. Zudem ist bekannt, dass TRPV1 in Vesikeln gespeichert wird und an die Zelloberfläche rekrutiert werden kann⁶⁵. In unseren *whole-cell* Patch-Clamp Untersuchungen waren 80 % der klein- bis mittelzelligen DRG Neuronen von CFA-behandelten Tieren Capsaicin-sensitiv. Unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass Opiode inhibierend am TRPV1 wirken. Die Opioid-induzierte Inhibition der TRPV1 Aktivität war in sensorischen Neuronen von Tieren mit und ohne CFA-induzierter Entzündung gleich. In Verhaltensuntersuchungen konnten unsere *in vitro* Daten bestätigt werden. Die lokale i.pl. Applikation von Morphin in einer Konzentration, die nicht systemisch analgetisch wirksam ist, führte zu einer signifikanten Inhibition einer Capsaicin-induzierten Hyperalgesie.



Zusammenfassung Hypothese D:

Die Opioidrezeptoraktivierung führt zur Spaltung des G-Proteins in die aktivierte G α und G $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die G α -Untereinheit senkt die Aktivität der Adenylzyklase (AC), inhibiert die Bildung von cAMP und reduziert die PKA Aktivität. Eine verminderte PKA

Aktivität senkt die Sensitivierung des TRPV1. Die Ergebnisse konnten erstmals zeigen, dass der analgetische Effekt peripher applizierter Opioide nicht nur durch die Inhibition spannungsabhängiger Na^{2+} und Ca^{+} -Kanäle, sondern auch durch einen inhibierenden Effekt des ligandengesteuerten Ionenkanals TRPV1 vermittelt wird. Da es unter Entzündungsbedingungen zu einer signifikanten Zunahme an TRPV1 Bindungsstellen und einer Sensitivierung des TRPV1 Ionenkanals kommt, unterstreichen die Beobachtungen die Bedeutung der Opioidtherapie beim Entzündungsschmerz.

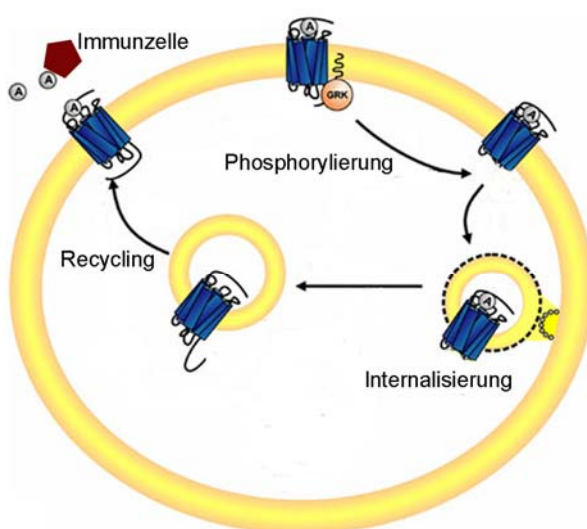
3.4. Hypothese E - Mechanismen der Opioidtoleranz unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung

Toleranz als analgetischer Wirkungsverlust von Opioiden ist für zentrale Opioidrezeptoren extensiv dokumentiert⁶⁶. Die chronische Gabe von Opioiden führt zu zahlreichen zellulären Veränderungen und kann die Entstehung einer pharmakologischen Opioidtoleranz begünstigen. Im Verlauf einer solchen Toleranzentwicklung werden häufig eine Rezeptor-„down-Regulation“⁶⁷ und eine reduzierte G-Proteinkopplung beobachtet⁶⁸. Am ehesten beruht dies auf einer durch GRK-2⁶⁹ oder CaMKII2⁷⁰ vermittelten Phosphorylierung des Opioidrezeptors und einer durch β -Arrestin induzierten Entkopplung des Rezeptors von seinem G-Protein³⁴. Untersuchungen zeigen in β -Arrestin „knock-out“-Mäusen das Fehlen einer Toleranzentwicklung³⁴ und in Tieren mit einer β -Arrestin Überexpression eine vermehrte Toleranzentstehung⁶⁹. Die funktionelle Aktivität von Opioidrezeptoren nach chronischer Opioidexposition kann durch die Internalisierung funktionell inaktiver und Re-expression funktionell aktiver Rezeptoren wiederhergestellt werden⁶⁶. Opioide, die mit einer starken Rezeptorinternalisierung assoziiert sind, führen in zellulären Untersuchungen zu einer verminderten Opioidtoleranz⁷¹. Die überwiegende Zahl der Studien zur Opioidtoleranz wurde jedoch in Abwesenheit einer schmerzhaften Gewebsverletzung durchgeführt. Die Übertragbarkeit dieser Untersuchungen in den klinischen Alltag ist deshalb limitiert, da schmerzfreie Patienten in der Regel nicht mit Opioiden behandelt werden. Dies könnte die Diskrepanz experimenteller⁶⁶ und klinischer^{37,72} Studien zur Opioidtoleranz erklären. Aus diesem Grund untersuchten wir die zellulären Veränderungen nach chronischer Opioidgabe in einem Tiermodell, das den postoperativen Schmerz, die Arthritis und andere entzündliche Schmerzzuständen sehr gut widerspiegelt⁴⁰. Zahlreiche tierexperimentelle Studien^{73,74} und unsere Untersuchungen haben gezeigt, dass die chronische Gabe von Morphin zu einer Opioidtoleranz an peripheren Opioidrezeptoren führt. In Gegenwart einer schmerzhaften Entzündung konnte eine Opioidtoleranz hingegen nicht beobachtet werden. In quantitativen Opioidrezeptorbindungsstudien an sensorischen Neuronen konnten wir zeigen, dass die chronische Gabe von Opioiden unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung zu einer signifikanten Opioidrezeptorinternalisierung, einer verbesserten G-Protein Kopplung und einer signifikanten Inhibition der cAMP Bildung führt. Dies deutet darauf hin, dass trotz chronischer Morphingabe die Entzündung zu einem vermehrten Opioidrezeptorrecycling und Bereitstellung funktionell aktiver Opioidrezeptoren an der Oberfläche sensorischer Neurone führt. Das Recycling funktionell aktiver Rezeptoren aus der Zelle wirkt der Entstehung der Opioidtoleranz unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung entgegen.

Zahlreiche vorangegangene Studien haben gezeigt, dass Opioidrezeptoren nach Aktivierung durch endogene Opioidliganden sehr schnell internalisiert werden können^{75,76}. Bei der Entzündung kommt

es zur Migration von Immunzellen in das entzündete Gewebe und zu einer Freisetzung endogener Opioidpeptide ⁴⁰. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen konnten wir β -Endorphin-haltigen Immunzellen im entzündeten Gewebe als Makrophagen, polymorphonukleäre Zellen und Lymphozyten identifizieren. Die Rolle der endogenen Opioidpeptide bei der Opioidtoleranz wurde durch die Gabe von Cyclophosphamid untersucht. Die Cyclophosphamid Behandlung führte zu einem vollständigen Verlust der Opioidpeptid-haltigen Immunzellen im entzündeten Gewebe. Tiere, die mit Cyclophosphamid und CFA behandelt wurden, zeigten nach chronischer Morphinbehandlung eine ausgeprägte Opioidtoleranz. In quantitativen Rezeptorbindungsstudien an sensorischen Neuronen von Hinterwurzelganglien dieser Tiere konnten wir zeigen, dass die Opioidtoleranz auf einer verminderten Opioidrezeptorinternalisierung beruht. Gleichzeitig konnte in funktionellen Untersuchungen eine vermehrte Opioidrezeptordesensitivierung nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass die tonische Freisetzung endogener Opioidpeptide beim Entzündungsschmerz der Opioidtoleranz entgegenwirkt.

Zusammenfassung Hypothese E:



Unter den pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung konnte eine Opioidtoleranz nach chronischer Opioidgabe im peripheren Nervengewebe nicht nachgewiesen werden. Die Freisetzung endogener Opioidagonisten (A) aus Immunzellen des entzündeten Gewebes führen zu einer vermehrten Internalisierung phosphorylierter, inaktivierter Opioidrezeptoren. Nach „intrazellulärem Processing“ wird der funktionell wieder aktive Rezeptor erneut exprimiert. Die Zunahme der Opioidrezeptorinternalisierung beim Entzündungsschmerz wirkt

der Entstehung einer Opioidtoleranz entgegen. Dies könnte darauf hindeuten, dass der Einsatz peripher wirksamer Opioidliganden zur Behandlung von Patienten mit chronischer Arthritis, entzündlich-neuropathischem Schmerz oder Tumorschmerz nicht mit der Entstehung einer Opioidtoleranz einhergeht.

4. ZUSAMMENFASSUNG

Opioidrezeptoren gehören zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Bindung des Liganden an den Opioidrezeptor führt zur Aktivierung und Spaltung des G-Proteins in seine aktive $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheit sowie zur Inhibition der cAMP/PKA Signaltransduktionswege. In dieser Habilitationsschrift wurden molekularbiologische Mechanismen der Opioidrezeptorsynthese, -expression und -funktion unter physiologischen, aber insbesondere auch pathophysiologischen Bedingungen charakterisiert. Die Untersuchungen wurden laborchemisch und tierexperimentell durchgeführt. Ausgehend von den ursprünglich formulierten fünf Hypothesen können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

Hypothese A:

Die Expression von Opioidrezeptoren wird wesentlich reguliert durch Promotorsequenzen auf dem Nichtkodierungsbereich der cDNA. Die Ausbildung von RNA Sekundärstrukturen moduliert die Transkription und Translation des Proteins und stellt einen vom Agonisten unabhängigen Mechanismus der Opioidrezeptorexpression dar. Im weiteren konnten wir zeigen, dass eine korrekte Proteinfaltung und Rezeptorexpression in der Zellmembran wesentlich abhängig ist von einer intakten Disulfid-Brücke zwischen der 1. und 2. extrazellulären Domäne des Rezeptorproteins.

Hypothese B:

Unter den Bedingungen einer peripheren Entzündung kommt es zu einer vermehrten Synthese von mRNA Transkripten für Opioidrezeptoren in sensorischen Neuronen. Die Zunahme der mRNA führt zu einer vermehrten Expression von Opioidrezeptoren im spinalen Hinterwurzelganglion und am peripheren Nervenende. Dies könnte ein möglicher Erklärungsmechanismus für eine verbesserte analgetische Wirksamkeit peripher applizierter Opioide unter Entzündungsbedingungen darstellen.

Hypothese C:

Neben der Zunahme der Opioidrezeptoren (s. Hypothese B) konnten wir beim Entzündungsschmerz eine Zunahme der G-Protein Kopplung nach Opioidrezeptoraktivierung nachweisen. Die $G\alpha$ - und $G\beta\gamma$ -Untereinheiten des aktivierten G-Proteins interagieren mit intrazellulären Effektoren (Adenylyl-Zyklase, Ca^{2+} - und K^+ -Ionenkanäle) und führen zu einer Hemmung der Erregungsbildung und -ausbreitung nozizeptiver Impulse. Dadurch kommt es in unseren Untersuchungen nach peripherer Applikation von Opioiden zu einer relevanten Schmerzlinderung im entzündeten Gewebe.

Hypothese D:

TRPV1 spielt bei der Entstehung der Hyperalgesie im entzündeten Gewebe eine wichtige Rolle. Wir konnten zeigen, dass Opioide unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen inhibierend auf TRPV1 in sensorischen Neuronen wirken. Die Inhibition wird durch einen cAMP/PKA abhängigen Signaltransduktionsweg vermittelt und führt zu einer verminderten Schmerzsensibilität im entzündeten Gewebe.

Hypothese E:

Die Applikation peripher wirksamer Opioide führt beim Entzündungsschmerz zu einer vermehrten Opioidrezeptorinternalisierung und wirkt der Entstehung einer Opioidtoleranz entgegen. Die Untersuchung zeigt, dass bei entzündlichen Erkrankungen die kontinuierliche Applikation von Opioiden nicht mit der Abnahme der analgetischen Wirksamkeit dieser Substanzen einhergeht.

5. ABKÜRZUNGEN

[³ H]	Tritium
μ-Rezeptor	mu-Opioid-Rezeptor, MOR
AC	Adenylylcyclase (-en)
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CFA	Complete Freund's Adjuvans
CGRP	Calcitonin gene-related peptide
CTAP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
CTX	Cyclophosphamid
DAMGO	[D-Ala, MePhe, Glyol]enkephalin
DRG	Dorsal root ganglion - Hinterwurzelganglion
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EZL	Extrazellulärer Loop
FSK	Forskolin
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
H-89	N-[2-p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid
HEK	human embryonic kidney
i.pl.	intraplantar
i.v.	intravenös
MAPK	mitogen activated protein kinase
mRNA	messenger RNA
NLX	Naloxon
PKA	Protein Kinase A
PNS	Peripheres Nervensystem
PPT	Paw pressure threshold - Pfortendrucktest
PTX	Pertussis Toxin
RTX	Resiniferatoxin
TM	Transmembrandomänen
TRP	Transient receptor potential
TRPV1	Transient receptor potential vanilloid 1
UTR	Untranslated region – Nichtkodierungsbereich
ZNS	Zentrales Nervensystem

6. LITERATUR

6.1. Literaturverzeichnis

1. Schmitz, R. Friedrich Wilhelm Serturmer and the discovery of morphine. *Pharm Hist* 1985;27:61-74
2. Pert, C.B. & Snyder, S.H. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science* 1973;179:1011-4
3. Martin, W.R., Eades, C.G., Thompson, J.A., *et al.* The effects of morphine- and nalorphine-like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1976;197:517-32
4. Lord, J.A., Waterfield, A.A., Hughes, J., *et al.* Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 1977;267:495-9
5. Kieffer, B., Befort, K., Gaveriaux-Ruff, C., *et al.* The d-opioid receptor: Isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. in *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, Vol. 89 12048-52 (1992).
6. Evans, C.J., Keith, D.E., Jr., Morrison, H., *et al.* Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 1992;258:1952-5
7. Wang, J.B., Imai, Y., Eppler, C.M., *et al.* mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:10230-4
8. Meng, F., Xie, G.X., Thompson, R.C., *et al.* Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1993;90:9954-8
9. Pan, Y.X., Xu, J., Bolan, E., *et al.* Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms. *Mol.Pharmacol.* 1999;56:396-403
10. Grond, S., Meuser, T., Pietruck, C., *et al.* [Nociceptin and the ORL1 receptor: pharmacology of a new opioid receptor]. *Anaesthesist* 2002;51:996-1005
11. Hulme, E.C., Lu, Z.L., Ward, S.D., *et al.* The conformational switch in 7-transmembrane receptors: the muscarinic receptor paradigm. *Eur.J.Pharmacol.* 1999;375:247-60
12. Raynor, K., Kong, H., Chen, Y., *et al.* Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu- opioid receptors. *Mol.Pharmacol.* 1994;45:330-4
13. Huang, P., Kehner, G.B., Cowan, A., *et al.* Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2001;297:688-95
14. Duncan, J.S. Positron emission tomography receptor studies. *Adv Neurol* 1999;79:893-9
15. Zubieta, J.K., Smith, Y.R., Bueller, J.A., *et al.* Regional mu opioid receptor regulation of sensory and affective dimensions of pain. *Science* 2001;293:311-5
16. Kuhar, M.J., Pert, C.B. & Snyder, S.H. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 1973;245:447-50
17. Honda, C.N. & Arvidsson, U. Immunohistochemical localization of delta- and mu-opioid receptors in primate spinal cord. *Neuroreport* 1995;6:1025-8
18. Stein, C., Schäfer, M. & Hassan, A.H. Peripheral opioid receptors. *Ann Med* 1995;27:219-21
19. Schafer, M. Peripheral opioid analgesia: from experimental to clinical studies. *Curr Opin Anaesthesiol* 1999;12:603-7
20. Woolf, C.J. & Salter, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 2000;288:1765-9
21. Ji, R.R. & Woolf, C.J. Neuronal plasticity and signal transduction in nociceptive neurons: implications for the initiation and maintenance of pathological pain. *Neurobiol.Dis.* 2001;8:1-10
22. Stein, C. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N.Engl.J.Med.* 1995;332:1685-90
23. Oeltjenbruns, J. & Schafer, M. Peripheral opioid analgesia: clinical applications. *Curr Pain Headache Rep* 2005;9:36-44
24. Likar, R., Schafer, M., Paulak, F., *et al.* Intraarticular morphine analgesia in chronic pain patients with osteoarthritis. *Anesth.Analg.* 1997;84:1313-7
25. Peng, S.S., Chen, C.Y. & Shyu, A.B. Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c- jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol.Cell Biol.* 1996;16:1490-9
26. Mansour, A., Taylor, L.P., Fine, J.L., *et al.* Key residues defining the mu-opioid receptor binding pocket: a site- directed mutagenesis study. *J.Neurochem.* 1997;68:344-53
27. Law, P.Y., Wong, Y.H. & Loh, H.H. Mutational analysis of the structure and function of opioid receptors. *Biopolymers* 1999;51:440-55

28. Wang, W.W., Shahrestanifar, M., Jin, J., *et al.* Studies on mu and delta opioid receptor selectivity utilizing chimeric and site-mutagenized receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1995;92:12436-40
29. Fukuda, K., Terasako, K., Kato, S., *et al.* Identification of the amino acid residues involved in selective agonist binding in the first extracellular loop of the d. *FEBS Lett.* 1995;373:177-81
30. Karnik, S.S. & Khorana, H.G. Assembly of functional rhodopsin requires a disulfide bond between cysteine residues 110 and 187. in *J.Biol.Chem.*, Vol. 265 17520-4 (1990).
31. George, S.R., O'Dowd, B.F., Xie, Z., *et al.* Oligomerization of mu- und delta-opioid receptors. in *J.Biol.Chem.*, Vol. 275 26128-35 (2000).
32. Jordan, B.A., Cvejic, S. & Devi, L.A. Opioids and their complicated receptor complexes. in *Neuropsychopharmacology*, Vol. 23 5-18 (2000).
33. Jordan, B.A. & Devi, L.A. G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function. *Nature* 1999;399:697-700
34. Bohn, L.M., Gainetdinov, R.R., Lin, F.T., *et al.* Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence.[In Process Citation]. *Nature* 2000;408:720-3
35. Finn, A.K. & Whistler, J.L. Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron* 2001;32:829-39
36. Portenoy, R.K., Moulin, D.E., Rogers, A., *et al.* I.v. infusion of opioids for cancer pain: clinical review and guidelines for use. *Cancer Treat Rep* 1986;70:575-81
37. Zech, D.F., Grond, S., Lynch, J., *et al.* Validation of World Health Organization Guidelines for cancer pain relief: a 10-year prospective study. *Pain* 1995;63:65-76
38. Adriaensen, H., Vissers, K., Noorduyn, H., *et al.* Opioid tolerance and dependence: an inevitable consequence of chronic treatment? *Acta Anaesthesiol Belg* 2003;54:37-47
39. Portenoy, R.K. Appropriate use of opioids for persistent non-cancer pain. *Lancet* 2004;364:739-40
40. Stein, C., Schäfer, M. & Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003;9:1003-8
41. Tegeder, I., Meier, S., Burian, M., *et al.* Peripheral opioid analgesia in experimental human pain models. *Brain* 2003;126:1092-102
42. Lee, F. & Yanofsky, C. Transcription termination at the trp operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1977;74:4365-9
43. Wilson, T. & Treisman, R. Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* 1988;336:396-9
44. Shaw, G. & Kamen, R. A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 1986;46:659-67
45. Metzger, T.G. & Ferguson, D.M. On the role of extracellular loops of opioid receptors in conferring ligand selectivity. in *FEBS Lett.*, Vol. 375 1-4 (1995).
46. Stein, C., Machelska, H. & Schafer, M. Peripheral analgesic and antiinflammatory effects of opioids. *Z Rheumatol* 2001;60:416-24
47. Stein, C., Hassan, A.H., Przewlocki, R., *et al.* Opioids from immunocytes interact with receptors on sensory nerves to inhibit nociception in inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1990;87:5935-9
48. Machelska, H., Cabot, P.J., Mousa, S.A., *et al.* Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat.Med.* 1998;4:1425-8
49. Rittner, H.L., Brack, A., Machelska, H., *et al.* Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. *Anesthesiology* 2001;95:500-8
50. Rittner, H.L., Machelska, H. & Stein, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. *J Leukoc Biol* 2005;78:1215-22
51. Stein, C., Schafer, M. & Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat Med* 2003;9:1003-8
52. Antonijevic, I., Mousa, S.A., Schäfer, M., *et al.* Perineurial defect and peripheral opioid analgesia in inflammation. *J.Neurosci.* 1995;15:165-72
53. Kraus, J., Borner, C., Giannini, E., *et al.* Regulation of mu-opioid receptor gene transcription by interleukin-4 and influence of an allelic variation within a STAT6 transcription factor binding site. *J.Biol.Chem.* 2001;276:43901-8
54. Tominaga, M., Caterina, M.J., Malmberg, A.B., *et al.* The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 1998;21:531-43

55. Ji, R.R., Samad, T.A., Jin, S.X., *et al.* p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron* 2002;36:57-68
56. Amaya, F., Shimosato, G., Nagano, M., *et al.* NGF and GDNF differentially regulate TRPV1 expression that contributes to development of inflammatory thermal hyperalgesia. *Eur J Neurosci* 2004;20:2303-10
57. Bie, B., Peng, Y., Zhang, Y., *et al.* cAMP-mediated mechanisms for pain sensitization during opioid withdrawal. *J Neurosci* 2005;25:3824-32
58. Hu, H.J., Bhawe, G. & Gereau, R.W. Prostaglandin and protein kinase A-dependent modulation of vanilloid receptor function by metabotropic glutamate receptor 5: potential mechanism for thermal hyperalgesia. *J Neurosci* 2002;22:7444-52
59. Chuang, H.H., Prescott, E.D., Kong, H., *et al.* Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 2001;411:957-62
60. Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., *et al.* Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000;288:306-13
61. Amaya, F., Oh-hashii, K., Naruse, Y., *et al.* Local inflammation increases vanilloid receptor 1 expression within distinct subgroups of DRG neurons. *Brain Res* 2003;963:190-6
62. Breese, N.M., George, A.C., Pauers, L.E., *et al.* Peripheral inflammation selectively increases TRPV1 function in IB4-positive sensory neurons from adult mouse. *Pain* 2005;115:37-49
63. Voilley, N., de Weille, J., Mamet, J., *et al.* Nonsteroid Anti-Inflammatory Drugs Inhibit Both the Activity and the Inflammation-Induced Expression of Acid-Sensing Ion Channels in Nociceptors. *J Neurosci* 2001;21:8026-33
64. Bezzerides, V.J., Ramsey, I.S., Kotecha, S., *et al.* Rapid vesicular translocation and insertion of TRP channels. *Nat Cell Biol* 2004;6:709-20
65. Morenilla-Palao, C., Planells-Cases, R., Garcia-Sanz, N., *et al.* Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. *J Biol Chem* 2004;279:25665-72
66. Williams, J.T., Christie, M.J. & Manzoni, O. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev.* 2001;81:299-343
67. Chen, J.J., Dymshitz, J. & Vasko, M.R. Regulation of opioid receptors in rat sensory neurons in culture. *Mol.Pharmacol.* 1997;51:666-73
68. Sim, L.J., Selley, D.E., Dworkin, S.I., *et al.* Effects of chronic morphine administration on mu opioid receptor- stimulated [35S]GTPgammaS autoradiography in rat brain. *J.Neurosci.* 1996;16:2684-92
69. Zhang, J., Ferguson, S.S., Barak, L.S., *et al.* Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1998;95:7157-62
70. Bruggemann, I., Schulz, S., Wiborny, D., *et al.* Colocalization of the mu-opioid receptor and calcium/calmodulin- dependent kinase II in distinct pain-processing brain regions. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 2000;85:239-50
71. Koch, T., Widera, A., Bartzsch, K., *et al.* Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol* 2005;67:280-7
72. Gutstein, H.B. The effects of pain on opioid tolerance: how do we resolve the controversy? *Pharmacol.Rev.* 1996;48:403-7
73. Aley, K.O., Green, P.G. & Levine, J.D. Opioid and adenosine peripheral antinociception are subject to tolerance and withdrawal. *J Neurosci* 1995;15:8031-8
74. Kolesnikov, Y. & Pasternak, G.W. Topical opioids in mice: analgesia and reversal of tolerance by a topical N-methyl-D-aspartate antagonist. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;290:247-52
75. Keith, D.E., Murray, S.R., Zaki, P.A., *et al.* Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J.Biol.Chem.* 1996;271:19021-4
76. Keith, D.E., Anton, B., Murray, S.R., *et al.* mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol.Pharmacol.* 1998;53:377-84

6.2. Eigene Originalarbeiten – zitiert

- I. **Zöllner C**, Johnson PS, Bei Wang J, Roy AJ Jr, Layton KM, Min Wu J, Surratt CK
Control of mu opioid receptor expression by modification of cDNA 5'- and 3'-noncoding regions.
Brain Res. Mol. Brain Res. 2000; 79(1-2):159-62.
- II. Zhang P, Johnson PS, **Zöllner C**, Wang W, Wang Z, Montes AE, Seidleck BK, Blaschak DJ, Surratt CK.
Mutation of human mu opioid receptor extracellular "disulfide cysteine" residues alters ligand binding but does not prevent receptor targeting to the cell plasma membrane.
Brain Res. Mol. Brain Res. 1999; 72(2):195-204.
- III. **Zöllner C**, Shaqura MA, Bopaiah CP, Mousa S, Stein C, Schäfer M
Painful inflammation-induced increase in mu-opioid receptor binding and G-protein coupling in primary afferent neurons.
Mol. Pharmacol. 2003; 64(2):202-10.
- IV. Pühler W, **Zöllner C**, Brack A, Shaqura MA, Krause H, Schäfer M, Stein C
Rapid upregulation of mu opioid receptor mRNA in dorsal root ganglia in response to peripheral inflammation depends on neuronal conduction.
Neurosci. 2004; 129(2):473-479.
- V. Shaqura MA, **Zöllner C**, Mousa SA, Stein C, Schäfer M
Characterization of mu opioid receptor binding and G protein coupling in rat hypothalamus, spinal cord, and primary afferent neurons during inflammatory pain.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 2004; 308(2):712-718.
- VI. Labuz D, Berger S, Mousa SA, **Zöllner C**, Rittner HL, Shaqura MA; Segovia-Silvestre T, Przewlocka B, Stein C, Machelska H
Peripheral antinociceptive effects of exogenous and immune cell-derived endomorphins in prolonged inflammatory pain.
J. Neurosci. 2006; 26(16):4350-4358.
- VII. Endres-Becker J, Heppenstall PA, Mousa SA, Labuz D, Oksche A, Schäfer M, Stein C, **Zöllner C**
Mu-opioid receptor activation modulates transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain.
Mol. Pharmacol. 2007; 71(1):12-18.
- VIII. **Zöllner C**, Mousa SA, Fischer O, Rittner H, Shaqura M, Brack A, Shakibaei M, Binder W, Urban F, Stein C, Schäfer M
Inflammatory pain prevents the development of tolerance at peripheral opioid receptors.
JCI; zur Publikation angenommen.

6.3. Eigene Originalarbeiten – nicht zitiert

- IX. Plant, T.D., **Zöllner C**., Kepura, F., Mousa, S.A., Eichorst, J., Schaefer, M., Furkert, J., Stein, C., Oksche, A.
Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C.
Mol Pain; in press.
- X. Plant TD, **Zöllner C**, Mousa SA, Oksche A
Endothelin-1 potentiates capsaicin-induced TRPV1 currents via the endothelin A receptor.
Exp Biol Med (Maywood). 2006; 231(6):1161-1164.

- XI. Brack A, Rittner HL, Machelska H, Shaqura M, Mousa SA, Labuz D, **Zöllner C**, Schäfer M, Stein C. Endogenous peripheral antinociception in early inflammation is not limited by the number of opioid-containing leukocytes but by opioid receptor expression. *Pain* 2004; 107:67-75.
- XII. Spivak CE, Beglan CL, **Zöllner C**, Surratt CK Beta-Funaltrexamine, a gauge for the recognition site of wildtype and mutant H297Q μ -opioid receptors. *Synapse* 2003; 49:55-60.
- XIII. **Zöllner C**, Goetz AE, Weis M, Mörstedt K, Pichler B, Lamm P, Kilger E, Haller M. Continuous Cardiac output measurements do not agree with conventional bolus thermodilution cardiac output determination. *Can. J. Anesth.* 2001; 48:1143–1147.
- XIV. **Zöllner C**, Haller M, Weis M, Mörstedt K, Lamm P, Kilger E, Goetz AE Beat-to-beat measurement of cardiac output by intravascular pulse contour analysis: a prospective criterion standard study in patients after cardiac surgery. *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2000; 14:125-129.
- XV. **Zöllner C**, Polasek J, Kilger E, Pichler B, Jaenicke U, Briegel J, Vetter HO, Haller M. Evaluation of a new continuous thermodilution cardiac output monitor in cardiac surgical patients: a prospective criterion standard study. *Crit Care Med.* 1999; 27(2):293-298.
- XVI. **Zöllner C**, Briegel J, Kilger E, Haller M. Retrospective analysis of transpulmonary and pulmonary arterial measurement of cardiac output in ARDS patients. *Anaesthesist.* 1998; 47(11):912-917.
- XVII. Haller M, **Zöllner C**, Manert W, Briegel J, Kilger E, Polasek J, Hummel T, Forst H, Peter K. Thermodilution cardiac output may be incorrect in patients on venovenous extracorporeal lung assist. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1995; 152(6):1812-1817.
- XVIII. Haller M, **Zöllner C**, Briegel J, Forst H. Evaluation of a new continuous thermodilution cardiac output monitor in critically ill patients: a prospective criterion standard study. *Crit Care Med.* 1995; 23(5):860-866.
- XIX. **Zöllner C**, Bayer I, Langer E, Keller A, Resch A, Stömmer P. Myiasis in female travelers to the tropics. *Pathologe.* 1993; 14(1):37-41.

7. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt meinen akademischen Lehrern. Während meines Forschungsaufenthaltes am Albert Einstein College of Medicine in New York habe ich unter Prof. Dr. Chris Surratt die Grundlagen moderner molekularbiologischer Forschung erlernen können. Herr Prof. Chris Surratt hat mir in vorbildlicher und geduldiger Art und Weise wichtige Aspekte wissenschaftlichen Arbeitens gelehrt. Er ist mir bis heute ein wichtiges Vorbild für eine wissenschaftliche Karriere geblieben.

Meinem zweiten akademischen Lehrer, Herrn Prof. Dr. C. Stein, bin ich dankbar für die herausragende Unterstützung der wissenschaftlichen Projekte und die Hilfe beim Aufbau einer eigenen wissenschaftlichen Arbeitsgruppe. Die Forschungsvorhaben und Publikationen der zurückliegenden Jahre wären ohne seine Hilfe nicht möglich gewesen.

Dem Leiter unseres Forschungslabors, Herrn Prof. Dr. M. Schäfer danke ich für die jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit. Die kritischen Diskussionen mit Herrn Prof. Dr. Schäfer haben meine wissenschaftliche Denkweise nachhaltig beeinflusst.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Kollegen und Freund Herrn Prof. Dr. Paul Heppenstall. Seine Expertise und die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen haben unsere wissenschaftliche Untersuchungen stark bereichert.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitgliedern der eigenen Arbeitsgruppe, die durch ihren unermüdlichen Einsatz maßgeblich an den in der Habilitationsschrift gezeigten Daten beteiligt waren. Frau Dr. Jeannette Endres-Becker, Frau Nicole Siegemund, Frau Viola Spahn und Herrn Oliver Fischer gilt mein grosser Dank für die jahrelange Zusammenarbeit.

Den Kolleginnen und Kollegen in der Klinik für Anästhesiologie bin ich zu Dank verpflichtet. Die gemeinsame klinische Arbeit ist geprägt von Freundlichkeit und Anerkennung. Meine Forschungstätigkeit wurde zu jeder Zeit durch die klinisch tätigen Kollegen unterstützt.

Mein herzlichster und wichtigster Dank gilt meiner Familie. Meine Frau und meine beiden Kinder Dennis und Tobi haben meine wissenschaftliche Laufbahn über viele Jahre begleitet und mir den nötigen Rückhalt geliefert, ohne den meine wissenschaftliche und klinische Tätigkeit nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Mutter danke ich für die liebevolle Erziehung. Leider hatte sie keine Möglichkeit auch meine berufliche Ausbildung zu begleiten.

8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

ERKLÄRUNG

§ 4 Abs. 3 (k) der HabOMed der Charité

Hiermit erkläre ich, dass

weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wird bzw. wurde,

- welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern/ Wissenschaftlerinnen und mit technischen Hilfskräften sowie die verwendete Literatur vollständig in der Habilitationsschrift angegeben wurden.
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

.....

04. Dezember 2007

.....

C. Zöllner