

**Funktion carboxyterminaler Phosphorylierungsstellen bei der
ligandenabhängigen Internalisierung des μ -Opioid Rezeptors**

**Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)**

**vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Diplom-Biologe Sascha Just

geboren am 14.04.1975 in Neuwied

Eingereicht am:

10.11.2011

Gutachter

Prof. Dr. med. Stefan Schulz

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
Universitätsklinikum Jena
Drackendorfer Straße 1
07747 Jena

Prof. Dr. Oliver Werz

Institut für Pharmazie
Universität Jena
Philosophenweg 14
07743 Jena

Prof. Dr. med. vet. Hermann Ammer

Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
Ludwig-Maximilians-Universität München
Königinstr. 16
80539 München

Datum der Disputation:

20.04.2012

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass mir die geltende Promotionsordnung der Fakultät (in der Fassung vom 22.08.2007, Stand November 2011) bekannt ist, dass ich die Dissertation selbst angefertigt habe, keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen wurden und alle von mir benutzten Hilfsmittel und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Weiter erkläre ich, dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe, dass ich nicht die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials, sowie bei der Herstellung des Manuskriptes haben mich folgende Personen unterstützt:

Prof. Dr. Stefan Schulz

Dipl. Bioch. Wiebke Müller

Sascha Just

Ort, Datum

Curriculum Vitae

- 14.04.1975 Geboren als Sascha Manfred Just in Neuwied, Rheinland-Pfalz
- 1981-1985 Besuch der Friedrich Ebert Grundschule, Oberbieber
- 1985-1990 Besuch der Hauptschule Niederbieber
- 1990-1993 Berufsausbildung zum Kunststoff-Formgeber
Fachrichtung Spritzguss bei Klöckner-Moeller, Werk Gladbach
- 1993-1994 Besuch der Berufsaufbauschule an der BBS Technik Koblenz
Erwerb des qualifizierten Sekundarabschlusses I
- 1994-1997 Besuch des Staatlichen Koblenz-Kolleg
Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
- 1997-1998 Grundwehrdienst bei der Stabskompanie Panzerbrigade 34 in Diez
- Grundstudium der Biologie, Diplom***
- 1998-2002 Universität Regensburg
Erwerb des Vordiploms
- Hauptstudium der Biologie, Diplom***
- 2002-2003 Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- 2003-2006 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg
Erwerb des Diplomzeugnisses
Erwerb des akademischen Grades Diplom-Biologe (univ.)
- Prüfungsfächer**
- Zell- und Entwicklungsbiologie
Genetik
Biochemie

Thema der Diplomarbeit

„Untersuchungen zu epigenetischen Markierungen innerhalb der Adenom-Karzinom-Sequenz an humanen Adenom und Karzinomzellen des Kolons“

Betreuung der Diplomarbeit: PD Dr. Robert Hock

Zoologie 1, Lehrstuhl für Zell- und Entwicklungsbiologie

Theodor-Boverie-Institut für Biowissenschaften der Universität Würzburg

Promotionsstudium

2007-2008

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Rudolf Virchow Zentrum der Universität Würzburg

2008-2011

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Thema der Promotionsarbeit

„Funktion carboxyterminaler Phosphorylierungstellen bei der ligandenabhängigen Internalisierung des μ -Opioid Rezeptors“

Betreuung der Promotionsarbeit: Prof. Dr. med. habil. Stefan Schulz

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Universitätsklinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Publikationen

Grecksch G, Just S, Pierstorff C, Imhof AK, Glück L, Doll C, Lupp A, Becker A, Koch T, Stumm R, Höllt V, Schulz S.

Analgesic Tolerance to High-Efficacy Agonists But Not to Morphine Is Diminished in Phosphorylation-Deficient S375A μ -Opioid Receptor Knock-In Mice.

J Neurosci. 2011; 31(39):13890-6

Publikation mit Haupt-Autorenschaft in Arbeit

Zusammenfassung

Bei der Behandlung starker Schmerzen ist Morphin nach wie vor das am meisten verwendete Schmerzmittel. Dem therapeutischen Nutzen wirken allerdings die Entstehung einer Toleranz und Abhängigkeit entgegen. Die molekularen bzw. zellulären Mechanismen, die zu diesen unerwünschten Nebenwirkungen führen, sind bisher noch wenig verstanden. Das Zielprotein, über das Opioide wie Morphin ihre Wirkung vermitteln, ist der μ -Opioid Rezeptor (MOR), der hauptsächlich in Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert wird und zu den G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört.

Im Falle der Toleranz konnte beobachtet werden, dass Agonisten, die auf zellulärer Ebene nach Rezeptorbindung zu einer Internalisierung des Rezeptors führen, *in vivo* ein verringertes Toleranzpotential besitzen. Deshalb wird die Internalisierung des Rezeptors als präventiver Mechanismus gegenüber der Toleranz diskutiert. Dabei ist es wichtig zu verstehen, welche Ereignisse auf molekularer Ebene am Rezeptor zur Internalisierung beitragen. Eine entscheidende Modifikation erfährt der Rezeptor nach Agonistbindung durch Phosphorylierung an verschiedenen Serin- und Threoninresten des Carboxy-Terminus. Im Vorfeld dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Stimulation mit Morphin das Serin 375 phosphoryliert wird, nach DAMGO allerdings auch weitere Phosphorylierungsstellen. Gleichzeitig führt DAMGO zu einer Internalisierung des Rezeptors, Morphin jedoch nicht.

Auf Basis dieser Beobachtungen wurde eine MOR S375A Knockin-Maus generiert und im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert. Im Vergleich zu wildtypischen Mäusen erscheint die Verteilung des MOR zumindest im Rückenmark gleich. Während sich die Phosphorylierung des Serin 375 *in vivo* nach Morphin für wildtypische Mäuse zeigen ließ, konnte sie bei den Knockin-Tieren erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Bei Verhaltensversuchen im Hot Plate Test zeigten die Knockin-Tiere kein verändertes Schmerzverhalten und die Toleranzentwicklung bei chronischer Morphingabe blieb ebenfalls unverändert.

Um die agonistinduzierte Internalisierung besser zu verstehen, wurden für *in vitro* Versuche in HEK 293 Zellen verschiedene Rezeptormutanten erzeugt. Bei diesen wurden bestimmte Serine und Threonine durch Alanin ausgetauscht. Internalisierungsversuche mit immunzytochemischen Methoden, qualitativ in der Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ im ELISA-Assay, gaben dabei Hinweise auf die potentiell beteiligten Phosphorylierungs-

stellen. Gegen die betreffenden Aminosäurereste innerhalb der MOR Sequenz wurden phosphospezifische Antikörper hergestellt. Mit diesen konnte im Westernblot gezeigt werden, dass der Rezeptor ligandenabhängig, in unterschiedlicher Stärke an Threonin 370, Serin 375 und Threonin 379 phosphoryliert wird. Mit Threonin 379 wurde dabei auch eine neue Phosphorylierungsstelle am Carboxy-Terminus des MOR identifiziert. Die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste des Carboxy-Terminus, sowie der Grad der Phosphorylierung, scheinen darüber zu entscheiden, ob der Rezeptor internalisiert werden kann.

Summary

Morphine is the most commonly used analgesic drug in treatment of severe pain, but development of tolerance and addiction counteract its therapeutic benefits. Molecular and cellular mechanisms underlying these adverse side effects are less understood. The μ -opioid receptor (MOR) is the primary target of opioids like Morphine. The MOR is mainly expressed in neurons of the central nervous system and belongs to the G-protein-coupled receptors.

In case of tolerance, it was observed that agonists causing internalisation of MOR on cellular level after agonist binding even produce a lower tolerance *in vivo*. Therefore internalisation is discussed as preventive mechanism against tolerance. For this reason it is important to understand changes at the receptor on molecular level linked to internalisation. Phosphorylation of Serine and Threonine residues at carboxy-terminus of MOR is an important modification after agonist binding. It was previously shown, that Morphine can induce phosphorylation at Serin 375. DAMGO in contrast can induce phosphorylation at further phosphorylation sites. In contrast to Morphine DAMGO can also induce receptor internalisation.

Based on these findings a MOR S375A knock-in-mouse was generated and characterised in this study. Distribution of MOR in spinal cord appears normal in comparison to wild type mice. Phosphorylation of Serin 375 could be found in wild type mice, but like expected not in knock-in mice after Morphine injection. In hot plate tests was shown, that pain behaviour and development of tolerance under chronic Morphine treatment was not changed in knock-in mice.

Different receptor mutants were made for *in vitro* experiments in HEK 293 cells to gain better knowledge about agonist-induced internalisation. Certain Serine and Threonine were replaced by Alanine in these mutants. After this, internalisation was examined by using fluorescence microscopy as qualitative and ELISA assay as quantitative immunocytochemical methods. Results of these experiments gave hints to the potentially involved phosphorylation sites. Phosphospecific antibodies were generated against these residues within the sequence of MOR. In western blot analysis phosphospecific antibodies showed phosphorylation of Threonine 370, Serine 375 and Threonine 379 in a ligand-dependent manner at different rates. With Threonine 379 also a novel phosphorylation site was identified

at the carboxy-terminus of MOR. Phosphorylation of these residues within the carboxy-terminus and the level of phosphorylation seem to determine, if MOR can be internalized or not.

Inhaltsverzeichnis

Curriculum Vitae	III
Zusammenfassung / Summary	V/VII
Inhaltsverzeichnis	IX
Abbildungsverzeichnis	XIII
Abkürzungsverzeichnis	XIV
1 Einleitung	16
1.1 Der μ-Opioid Rezeptor	
1.1.1 Charakterisierung des μ -Opioid Rezeptors.....	16
1.1.2 Signaling über G-Proteine.....	17
1.1.3 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung.....	19
1.1.4 Rezeptorphosphorylierung.....	20
1.1.5 Rezeptorinternalisierung.....	21
1.1.6 Rezeptordephosphorylierung.....	21
1.2 Opioid Toleranz.....	22
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	22
2 Material	24
2.1 Versuchstiere.....	24
2.2 Prokaryotische und eukaryotische Zellen.....	24
2.3 Oligonukleotide, DNA und Vektoren.....	24
2.4 Enzyme.....	25
2.5 Antikörper.....	25
2.6 Rezeptoragonisten.....	26
2.7 Medien, Seren, Pufferlösungen und Antibiotika.....	26
2.8 Chemikalien.....	27
2.9 Kits und Größenstandards.....	29

2.10 Verbrauchsmaterialien.....	30
2.11 Geräte.....	30
3 Methoden	33
3.1 Methoden der Nukleotid Biochemie	
3.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR).....	33
3.1.2 DNA-Agarosegelelektrophorese.....	34
3.1.3 Plasmidaufreinigung aus Bakterienzellen.....	34
3.1.4 DNA-Fällung für die Sequenzierung.....	34
3.1.5 Restriktionsverdau.....	35
3.1.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
3.1.7 Dephosphorylierung reaktiver DNA 5'-Enden.....	35
3.1.8 Ligation.....	36
3.1.9 Klonierung von PCR Produkten.....	36
3.1.10 Klonierung von Oligonukleotiden.....	37
3.1.11 Transformieren chemisch kompetenter Bakterien.....	38
3.1.12 Kolonie-PCR.....	38
3.1.13 Herstellung der Rezeptormutanten.....	39
3.1.14 Isolierung genomischer, muriner DNA.....	40
3.2 Methoden der Protein Biochemie	
3.2.1 Rezeptoraufreinigung über Weizenkeim-Lektine (WGA-Beads).....	40
3.2.2 Rezeptoraufreinigung aus Maushirnen.....	41
3.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	42
3.2.4 Westernblot.....	42
3.2.5 Strippen eines Westernblots.....	43
3.3 Methoden der Immunzytochemie	
3.3.1 Präparation von Kulturzellen für die Fluoreszenzmikroskopie.....	44
3.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Internalisierungs-ELISA).....	44
3.3.3 cAMP Assay.....	45
3.4 Methoden der Mikrobiologie	
3.4.1 Kultivierung von Bakterien (Agarplatten und Flüssigkultur).....	46
3.4.2 Glycerinkultur von Bakterien.....	47

3.4.3	Herstellen chemisch kompetenter Bakterien.....	47
3.5	Methoden der Zellkultur	
3.5.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	48
3.5.2	Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen.....	48
3.5.3	Poly-L-Lysin Beschichtung von Oberflächen für die Zellkultur.....	49
3.5.4	Transfektion von Kulturzellen mit Polyethylenimin.....	49
3.5.5	Transfektion von Kulturzellen mit Lipofectamine.....	50
3.5.6	Herstellen stabil exprimierender Kulturzellen.....	50
3.6	Methoden der Immunhistochemie	
3.6.1	Immunhistochemie an murinen Gewebeschnitten	50
3.7	Tierhaltung und Verhaltensversuche	
3.7.1	Verhaltensversuche im Hot Plate Test.....	51
3.7.2	Verhaltensversuche zur Abhängigkeit.....	52
3.7.3	Herstellung der MOR S375A Knockin-Maus.....	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Charakterisierung der MOR S375A Knockin-Maus	
4.1.1	Genotypisierung der MOR ^{S375A} Maus.....	53
4.1.2	Sequenzierung der MOR ^{S375A} Maus.....	54
4.1.3	Lokalisation des MOR im Rückenmark der MOR ^{S375A} Maus.....	55
4.1.4	Agonistinduzierte S375 Phosphorylierung des MOR <i>in vivo</i>	55
4.1.5	Schmerzverhalten der MOR ^{S375A} Maus im Hot Plate Test.....	57
4.1.6	Chronische Morphin Toleranz der MOR ^{S375A} Maus.....	57
4.1.7	Abhängigkeitsverhalten der MOR ^{S375A} Maus.....	58
4.2	Bedeutung der MOR Phosphorylierung für die Internalisierung, Downregulierung und Aktivierung des Rezeptors	59
4.2.1	Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Internalisierung des Rezeptors.....	60
4.2.2	Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Downregulierung des Rezeptors.....	63
4.2.3	Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Rezeptoraktivierung.....	64

4.3 Identifikation einer neuen Phosphorylierungsstelle am MOR	67
4.3.1 Phosphorylierung des MOR an Serin 363, Threonin 370 und Serin 375.....	67
4.3.2 Charakterisierung der phosphospezifischen Antikörper anti-pMOR pT376 und anti-pMOR pT379	68
4.3.3 Ligandenabhängige Phosphorylierung des Threonin 379.....	69
5 Diskussion	73
5.1 Charakterisierung der MOR S375A Knockin-Maus	73
5.2 Phosphorylierung und Internalisierung des MOR	
5.2.1 Die Rolle der Phosphorylierungszustände am MOR C-Terminus für die Rezeptor Internalisierung	77
5.2.2 Bedeutung eines Phosphorylierungsmotives für die Arrestin 3 Bindung....	83
5.2.3 Ligandenspezifische Phosphorylierung des MOR.....	84
5.2.4 Bedeutung eines Phosphorylierungsmotives für die Agonistinduzierte Internalisierung der MOR Spleißvarianten	86
5.3 Schlussfolgerung	87
6 Literaturverzeichnis	89
Danksagung	95

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3-1	Herstellung der MOR S375A Knockin-Maus.....	52
Abb. 4-1	Genotypisierung der MOR ^{S375A} Maus.....	53
Abb. 4-2	Exon 3 des OPRM1 Gens der MOR ^{S375A} Maus.....	54
Abb. 4-3	Lokalisation des μ -Opioid Rezeptors im Rückenmark bei Mäusen.....	55
Abb. 4-4	Agonistinduzierte S375 Phosphorylierung des μ -Opioid Rezeptors im Maushirn.....	56
Abb. 4-5	Schmerzverhalten der MOR ^{S375A} Maus im Hot Plate Test.....	57
Abb. 4-6	Chronische Morphintoleranz bei MOR ^{S375A} Mäusen.....	58
Abb. 4-7	Abhängigkeitsverhalten der MOR ^{S375A} Maus.....	59
Abb. 4-8	Sequenzänderungen der Rezeptormutanten.....	60
Abb. 4-9	Immunlokalisation des MOR in HEK 293 Zellen nach Agonistenstimulation.....	61
Abb. 4-10	ELISA-Daten, Internalisierung des MOR in HEK 293 Zellen nach Agoniststimulation	62
Abb. 4-11	Downregulierung des MOR in HEK 293 Zellen nach Langzeitstimulation.....	64
Abb. 4-12	Einfluss des MOR Signalings auf die ERK1/2 Phosphorylierung.....	65
Abb. 4-13	DAMGO-vermittelte Inhibierung der durch Forskolin aktivierten cAMP Produktion	66
Abb. 4-14	Selektivität der phosphospezifischen Antikörper.....	69
Abb. 4-15	Phosphorylierung des Serin 363, Threonin 370 und Serin 375.....	71
Abb. 4-16	Ligandenabhängige Phosphorylierung des Threonin 379.....	72
Abb. 5-1	Konservierte Serine und Threonine innerhalb des Opioidrezeptor C-Terminus.....	83
Abb. 5-2	Schema eines für die Internalisierung grundlegenden Phosphorylierungsmotives am MOR C-Terminus.....	85
Abb. 5-3	Spleißvarianten des murinen MOR.....	86

Abkürzungsverzeichnis

ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
AEC	3-amino-9-ethylcarbazole
APS	Amoniumpersulfat
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxy-Terminus
DAMGO	D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , glycinol ⁵]-Enkephalin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dNTP	Desoxy-Nukleinsäure-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPDPE	[d-Pen ² ,d-Pen ⁵]-enkephalin
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	Extrazellulär Signal regulierte Kinase
FBS	Foetal Bovine Serum
GPCR	G-protein coupled receptor
GRK	G-protein coupled receptor kinase
HEK	Human Embryonic Kidney
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	Immunglobulin G
KO	Knockout
LB-Medium	Lysogeny Broth Medium auch als Luria Bertani Medium bezeichnet
LSM	Laser-Scanning-Mikroskope
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase

MOR	μ-Opioid Rezeptor
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
Pei	Polyethylenimin
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PTX	Pertussis Toxin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
PP	Proteinphosphatase
RIPA-Puffer	Radioimmunpräzipitations-Assay-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SB	Sodium-Borat
siRNA	small interfering RNA
SL	Stammlösung
SOC-Medium	Super-Optimal-Catabolite repression Medium
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBST/T	Tris Buffered Saline with Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
tpd	total phosphorylation deficient
TR-FRET	Time Resolved Förster Resonance Energy Transfer
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolett
WGA	Wheat Germ Agglutinin
wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der μ -Opioid Rezeptor

1.1.1 Charakterisierung des μ -Opioid Rezeptors

Gegenstand dieser Arbeit sind Untersuchungen zum μ -Opioid Rezeptor (MOR). Er bindet Substanzen, die zur Stoffklasse der Opioide gehören, mit denen sich vor allem die Schmerzweiterleitung effektiv modulieren lässt. Daher gehört er zu den wichtigsten Zielstrukturen analgetischer Substanzen in der Schmerztherapie starker bis stärkster Schmerzen. Wie seine Verwandten, die δ -, und κ -Opioid Rezeptoren, sowie der *opioid receptor like* (ORL) Rezeptor, gehört er zur großen Familie der *G-Protein-gekoppelten Rezeptoren* (GPCRs).

GPCRs sind *Sieben-Transmembrandomänen-Rezeptoren* und wie aus beiden Namen bereits hervorgeht, besitzen sie als gemeinsame Charakteristika zum einen sieben transmembrane α -Helices, welche die Zellmembran durchspannen und über inter- und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind, sowie zum anderen die Fähigkeit extrazelluläre Signale über die Aktivierung von G-Proteinen ins Zellinnere weiter zu leiten.

GPCRs werden in vier Klassen eingeteilt. Zur Klasse 1 gehören Rhodopsin ähnliche Rezeptoren, zur Klasse 2 Secretin ähnliche Rezeptoren, zur Klasse 3 GABA_B und Glutamat Rezeptoren und zu Klasse 4 die Familie der Frizzled Rezeptoren (Foord *et al.*, 2005).

Funktional sind GPCRs bei der Perzeption äußerer Sinnesreize wie Sehen, Riechen und Schmecken ebenso beteiligt, wie bei der Weiterleitung endogener Signale, die durch Hormone, Neurotransmitter und Zytokine vermittelt werden. Etwa 15% aller humanen Membranproteine sind GPCRs, deren Codierung etwa 5% des Genoms beansprucht (Fredriksson *et al.*, 2003). Auf Grund dieser Vielfalt, sowie ihrer Bedeutung für die Signaltransduktion in verschiedenen Geweben und Zelltypen, bilden sie wichtige Angriffspunkte für eine große Bandbreite pharmazeutischer Substanzen. Der Anteil auf GPCRs zielender Medikamente liegt derzeit bei etwa 30% aller eingesetzten Pharmaka (zusammengefasst in Hopkins & Groom, 2002).

Da sich GPCRs allgemein nur sehr schwer kristallisieren lassen, liegt für den MOR zur Zeit keine Röntgenkristallstruktur vor. Daher stützen sich strukturelle Analysen auf Analogien und computergestützte Suchalgorithmen zum Auffinden bekannter Proteinmotive (Progozheva *et al.*, 1998).

Der μ -Opioid Rezeptor findet sich in Gehirnstrukturen wie Thalamus, Hippocampus, Striatum, Locus Coeruleus (Delfs *et al.*, 1994; Mansour *et al.*, 1994), im Rückenmark, den dorsalen Wurzelganglien (Członkowski *et al.*, 1983; Maekawa *et al.*, 1994) und in Darmganglien, sowie der Gallenblase (Lupp *et al.*, 2011).

Das den Rezeptor codierende Gen OPRM1 besitzt mehrere bekannte Exons, die alternativ gespleißt werden können. So finden sich Angaben über 11 humane, 25 murine und 8 Spleißvarianten bei der Ratte (zusammengefasst in Pan, 2005). Ob allerdings all diese Spleißvarianten eine eigene physiologische Rolle spielen, ist ebenso wenig geklärt, wie die Regulationsmechanismen des MOR in den unterschiedlichen Geweben.

1.1.2 Signaling über G-Proteine

Unter dem Begriff *GTP-bindende Protein*, kurz *G-Proteine*, werden neben den monomeren *kleinen G-Proteinen*, die *heterotrimeren G-Proteine* zusammengefasst. Deren Untereinheiten werden mit α , β und γ bezeichnet und liegen in der inaktiven Form als Komplex vor, wobei die α -Untereinheit in diesem Zustand ein Guanosindiphosphat (GDP) trägt. Über einen GPCR, der die Eigenschaft eines GTP-Austauschfaktors besitzt, wird GDP gegen Guanosin-triphosphat (GTP) ausgetauscht und so das G-Protein in den aktiven Zustand versetzt. In der Folge dissoziiert das Heterotrimer in die GTP tragende $G\alpha$ -Untereinheit und ein $G\beta\gamma$ -Heterodimer, wobei beide Dissoziationsprodukte als Second Messenger unterschiedliche Zielstrukturen ansteuern können. Zu diesen als Effektoren bezeichneten Zielproteinen gehören die Adenylylcyclase (AC), Phospholipase C (PLC), Ionen-Kanäle oder *Mitogenaktivierte Protein Kinasen* (MAP-Kinasen). Die Inaktivierung der G-Proteine erfolgt nach einiger Zeit unter der Beteiligung des *GTPase aktivierenden Proteines* (GAP). Dieses verstärkt die GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit, wodurch es zur Hydrolyse des GTP zu GDP kommt. In Folge wird auch freies $G\beta\gamma$ durch Bindung an $G\alpha$ wieder inaktiv in den heterotrimeren Komplex gebunden (zusammengefasst in Oldham & Hamm, 2008).

Für jede der drei G-Protein Untereinheiten existieren verschiedene Isoformen. Die Isoformzusammensetzung der G-Proteine entscheidet über deren Affinität zu bestimmten Rezeptortypen bzw. über die Spezifität ihrer Signalwirkung (zusammengefasst in Gudermann *et al.*, 1996). G-Proteine werden klassisch entsprechend ihrer $G\alpha$ -Isoformen in vier Gruppen unterteilt. G-Proteine des Typs G_s ($G\alpha_s$, $G\alpha_{Olf}$) können die Aktivität der Adenylylcyclase stimulieren, während die des Typs G_i ($G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$) die Aktivität der Adenylylcyclase inhibieren. Auf diese Weise lässt sich über entsprechende GPCRs die Konzentration des *cyclischen Adenosinmonophosphat* (cAMP) in der Zelle herauf oder herunter regulieren. G-Proteine des Typs G_q ($G\alpha_{q11}$, $G\alpha_{16}$) aktivieren die Phospholipase C und nehmen somit Einfluss auf den IP3/DAG-Signalweg. Die PLC spaltet *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate* (PIP_2) in *Inositol-1,4,5-trisphosphat* (IP3) und Diacylglycerol (DAG), die beide als Signalmoleküle wirken. Über IP3 lassen sich Ca^{2+} -Kanäle des Endoplasmatischen Retikulums (ER) ansteuern und öffnen. Mittelbar lässt sich über GPCRs so neben dem cAMP-Spiegel auch der Ca^{2+} -Spiegel einer Zelle regulieren. Schließlich werden noch G-Proteine des Typs G_{12} ($G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$) aufgelistet, die aktivierend auf Rho-GDP wirken (zusammengefasst in Simon *et al.*, 1991). Neben der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion der GPCRs konnte in jüngerer Zeit auch ein G-Protein unabhängiges Signaling über β -Arrestine gezeigt werden (zusammengefasst in Lefkowitz & Shenoy, 2005).

Der MOR ist ein $G\alpha_{i/o}$ gekoppelter Rezeptor. Seine Aktivierung wirkt sich daher direkt hemmend auf die AC aus und führt zu einer Senkung des cAMP. In DRG Neuronen wirkt die Aktivierung des MOR über $G\alpha_{i/o}$ und $G\beta\gamma$ hemmend auf *high voltage-gated Calcium channels* (VGCC) (Moises *et al.*, 1994; Rusin & Moises, 1995; Wu *et al.*, 2004, Raingo *et al.*, 2007). In Folge kommt es zu einer verringerten Ausschüttung an Neurotransmittern, wie Glutamat und Substanz P, in den synaptischen Spalt und somit zu einer präsynaptischen Hemmung der nozizeptiven Signalweiterleitung. Postsynaptisch vermittelt die Aktivierung des MOR über $G\beta\gamma$ eine Aktivierung der *G protein-coupled inwardly-rectifying potassium channels* (GIRKs) 1 und 2 und in Folge dessen zu einer Hyperpolarisation der Zelle, wodurch die nozizeptive Signalweiterleitung ebenfalls gehemmt wird (Marker *et al.*, 2005; Mitrovic *et al.*, 2003).

1.1.3 Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung

Liganden werden nach ihrer Wirkung auf die Rezeptoraktivität in verschiedene Gruppen eingeteilt. Während ein Ligand, der als Agonist bzw. Vollagonist bezeichnet wird, den Rezeptor vollständig zu aktivieren vermag, erreicht ein Partialagonist nur einen Teil der möglichen Signalwirkung. Wird die Signalwirkung mittels einer Dosiswirkungskurve quantifiziert, weißt ein Partialagonist neben einem Vollagonist eine entsprechend geringere mittlere Effektivdosis (ED_{50}) auf. Die Bindung eines Agonisten an den Rezeptor kann durch einen Konkurrenten um die Bindungsstelle, den so genannten Antagonisten, blockiert werden. Allerdings begünstigt ein Antagonist den inaktiven Zustand des Rezeptors, führt also nicht zu einer Signalwirkung. Schließlich finden sich noch die inversen Agonisten, welche an konstitutiv oder basal aktive Rezeptoren binden und deren Aktivität inhibieren können.

Unter endogenen Liganden finden sich nur Agonisten, während Antagonisten und Partialagonisten pharmazeutische Produkte sind. Bindet ein Agonist extrazellulär an den Rezeptor, ändert sich dessen Konformation, wobei der aktive Zustand begünstigt wird. Dabei ist die Konformationsänderung differenziert zu betrachten, da sie komplexer scheint als bei einem Wechsel zwischen nur zwei distinkten Zuständen wie inaktiv und aktiv. Vielmehr scheinen unterschiedliche Liganden mehrere unterschiedliche Konformationen des gleichen Rezeptors induzieren zu können. Auf diese Weise können verschiedene Liganden die Spezifität eines Rezeptors für unterschiedliche Signalwege beeinflussen (zusammengefasst in Rosenbaum *et al.*, 2009).

Im Fall des MOR zählen zu den endogenen Liganden, den Opioidpeptiden, die Endorphine (endogene Morphine), Enkephaline und Dynorphine. Zu den Agonisten welche therapeutisch eingesetzt werden zählen Morphin, Fentanyl, Sufentanyl, Methadon oder Nortilidin, wobei das Morphin auch partialagonistische Eigenschaften besitzt (Schulz *et al.*, 2004). In der Veterinärmedizin kommt auch das Etorphin zum Einsatz. Ein nicht therapeutisch eingesetzter, aber in der Forschung weit verbreiteter Agonist ist (D-Ala²,N-Me-Phe⁴,glycinol⁵)-Enkephalin (DAMGO) ein künstliches Enkephalinderivat, welches spezifisch an den MOR bindet (Handa *et al.*, 1981). Da DAMGO nicht die Bluthirnschranke passieren kann, muss es im Tierversuch intrathekal injiziert werden, ein Grund, weshalb es für den klinischen Gebrauch ungeeignet ist. Im Labor hingegen ist es auf Grund seiner spezifischen Wirkung am MOR und seiner freien Verfügbarkeit im Handel aber dennoch von besonderem Nutzen.

Als Partialagonist wäre Buprenorphin zu nennen, welches ebenfalls als Schmerzmittel eingesetzt wird und von allen bekannten Liganden die höchste Affinität zum MOR besitzt. Unter

den Antagonisten finden sich Naloxon und Naltrexon. Naloxon kann bei Überdosierung oder Unverträglichkeit von Opioiden eingesetzt werden. Da es allerdings nur eine relativ kurze Bindungsdauer am Rezeptor besitzt, ist zur Vermeidung eines Rebound-Effekts nachträgliche Applikation angezeigt.

1.1.4 Rezeptorphosphorylierung

Die Konformationsänderungen begünstigen primär die oben angesprochene G-Protein Aktivierung. Sekundär begünstigen sie die Phosphorylierung des Rezeptors an intrazellulären Schleifen und dem in das Cytosol ragenden Carboxy-Terminus (C-Terminus). Hier werden Serin- und Threoninreste für Rezeptorkinasen zugänglich und können durch diese phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung verursacht eine Desensibilisierung des Rezeptors. Dieses Phänomen beschreibt einen Zustand verminderter Aktivierbarkeit bzw. geringer Bindungsaffinität des Rezeptors zu Liganden und G-Proteinen und somit eine inhibierte Signalwirkung des Rezeptors (Pitcher *et al.*, 1992). Grund hierfür sind wahrscheinlich erneute Konformationsänderungen des Rezeptors in Folge der eingebrachten Phosphatgruppe/n und deren negativer Ladung, sowie im weiteren Verlauf eine Verdrängung heterotrimerer G-Proteine durch andere Proteine, wie β -Arrestine, die nach erfolgter Phosphorylierung an den Rezeptor rekrutiert werden.

An der Phosphorylierung der GPCRs können nicht nur PKA, aktiviert durch cAMP, oder PKC, aktiviert durch Diacylglycerol, beteiligt sein, sondern auch eine Gruppe von Kinasen, die eigens als *G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen* (GRKs) bezeichnet werden. Es gibt sieben humane GRKs, die in drei Klassen, GRK1-like, GRK2-like und GRK4-like eingeteilt werden. Während GRK1 und GRK7 primär in der Retina und GRK4 in den Testis vorkommen, werden GRK2, GRK3, GRK5 und GRK6 in vielen Geweben exprimiert, weshalb diesen vier sicher auch die größere Bedeutung bei der Regulation der meisten GPCRs zukommt. GRK2 und GRK3 können direkt durch PIP_2 und $\text{G}\beta\gamma$ an die Zellmembran und dort an aktivierte GPCRs rekrutiert werden (Benovic *et al.*, 1986; zusammengefasst in Premont & Gainetdinov, 2007). Da die Kinasen durch die Second Messenger der entsprechenden Signalwege aktiviert werden, kann der Prozess der Desensibilisierung durch Phosphorylierung in Folge einer negativen Rückkopplung als autoregulatorisch betrachtet werden, um anhaltende Signalwirkung des Rezeptors zu vermeiden.

1.1.5 Rezeptorinternalisierung

Der Rezeptorphosphorylierung kann sich eine Rezeptorinternalisierung anschließen. Nachdem der Rezeptor durch GRKs phosphoryliert wurde, kann der Rezeptor Arrestin 3 (β -Arrestin 2) rekrutieren, welches als Linker sowohl mit Clathrin, als auch dem *Adaptor-Proteinkomplex-2* (AP2), assoziieren kann. Clathrine sind strukturgebende Proteine der *coated pits* und bilden unter Dynamin vermittelter Abschnürung von der Zellmembran clathrinbeschichtete Vesikel. AP2 sorgt für die Kopplung von Proteinen an die coated pits. Durch die Translokation des Rezeptors an coated pits und die anschließende Aufnahme in Vesikel, kommt es zu einer als Internalisierung bezeichneten Endozytose des Rezeptors. Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass eine Clathrin und Dynamin vermittelte GPCR Internalisierung auch ohne Beteiligung des Arrestin 3 möglich ist (Paing *et al.*, 2002).

Der internalisierte Rezeptor kann im weiteren Verlauf zwei unterschiedliche Schicksalswege nehmen. Der erste führt zu einem lysosomalen Abbau des Rezeptors, wobei man von einer Rezeptor Down-Regulierung spricht. Der zweite führt ihn durch einen Recyclingprozess, wobei er dephosphoryliert und somit resensitisiert an die Zellmembran zurück transportiert wird. Es wird diskutiert, ob die Rezeptorinternalisierung neben der Rezeptordesensitierung einen weiteren Mechanismus darstellt, übermäßige Stimulation der Zelle in Gegenwart eines Liganden zu vermeiden. Allerdings sollte angemerkt werden, dass auch internalisierte Rezeptoren noch in der Lage sein können, ihr Signaling aufrecht zu halten (Calebiro *et al.*, 2010).

1.1.6 Rezeptordephosphorylierung

Die Dephosphorylierung und Resensitierung von GPCRs durch Proteinphosphatasen (PP) ist bisher noch wenig untersucht. Entgegen der lange verbreiteten Meinung, dass die Internalisierung des Rezeptors eine Voraussetzung für dessen Dephosphorylierung ist, gibt es mittlerweile Hinweise, dass eine Internalisierung nicht zwingend erforderlich ist, sondern auch ein an der Membran befindlicher Rezeptor dephosphoryliert werden kann (Gardner *et al.*, 2001; zusammengefasst in Kelly 2006). Die Spezifität verschiedener PPs in Bezug auf unterschiedliche GPCRs und deren Phosphorylierungsstellen ist Gegenstand aktueller Forschung.

1.2 Opioid Toleranz

Morphin ist das am häufigsten verabreichte Schmerzmittel. An MOR Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass es seine analgetische Wirkung allein über den MOR vermittelt (Matthes *et al.*, 1996). Als unerwünschte Arzneimittelwirkung treten bei Morphin, zum einen, eine profunde Toleranz (Aghajanian, 1978), mit der Notwendigkeit einer steigenden Morphin Dosierung bis zu mehr als der zehnfachen Ausgangsdosis (Buntin-Mushock *et al.*, 2005), sowie zum anderen bei längerer Gabe eine physische Abhängigkeit auf (Bozarth & Wise, 1981; Trujillo & Akil, 1991). Da diese Nebenwirkung dem therapeutischen Nutzen entgegenwirken, ist es Gegenstand der momentanen Forschung die molekularen Grundlagen und zellulären Prozesse aufzuklären, die zu diesen Nebenwirkungen führen.

Im Zuge unterschiedlicher Agonistwirkung auf den MOR, wurde das *relative activity versus endocytosis* (RAVE) Model entwickelt. Dabei wird das activity / endocytosis (A/E) Verhältnis eines Liganden mit dessen Potenz zur Toleranzentwicklung in Relation gesetzt. Dabei verursachen Agonisten mit niedrigen RAVE-Werten geringere Toleranzentwicklung, als Agonisten mit hohen RAVE-Werten (Whistler *et al.*, 1999).

Ein Faktor dieser Relation ist die ligandeninduzierte Internalisierung des Rezeptors. Entsprechend zeigt ein schwacher Internalisierer des MOR, eine höhere Toleranzwirkung, als ein starker Internalisierer (Grecksch *et al.*, 2006). Im Vergleich zu anderen Liganden ist Morphin ein schwacher Internalisierer (Keith *et al.*, 1996; Keith *et al.*, 1998; Sternini *et al.*, 1996), der aber ein starkes Toleranzpotential besitzt. Entsprechend wird die Internalisierung des MOR als Mechanismus diskutiert, über den die Toleranzentwicklung vermindert werden kann. Deshalb ist es Gegenstand dieser Arbeit die ligandeninduzierte Internalisierung des MOR besser zu verstehen.

1.3 Ziel dieser Arbeit

Da die Liganden abhängige Phosphorylierung des S375 bereits in Kulturzellen gezeigt wurde, sollte die Bedeutung dieser Phosphorylierungsstelle auch im Tiermodel untersucht werden. Dazu wurde die MOR S375A Knockin-Maus generiert. In *in vivo* Studien sollte diese Maus hinsichtlich ihres Schmerzverhaltens und ihrer Toleranzentwicklung charakterisiert werden.

Da seit einigen Jahren diskutiert wird, ob die auf zellulärer Ebene beobachtete Rezeptor-internalisierung die Opioidtoleranz *in vivo* beeinflussen kann, sollte der molekulare Mecha-

nismus am MOR, der zur Internalisierung des Rezeptors beiträgt, eingehender untersucht werden. Da die Internalisierung von einer Phosphorylierung des μ -Opioidrezeptors begleitet wird, sollte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, ob die Phosphorylierung eine generelle Voraussetzung für die Internalisierung ist. Dafür sollte eine Rezeptormutante erzeugt werden, die nicht mehr über C-Terminale Phosphorylierungsstellen verfügt und somit nicht mehr durch Serin- und Threoninkinasen phosphoryliert werden kann. Im Vergleich mit dem wildtypischen Rezeptor, sollte dann mittels immunzytologischer Versuche ein möglicher Unterschied bei der Internalisierung gezeigt werden.

Doch nicht nur die Frage nach der generellen Abhängigkeit dieser Prozesse von der Phosphorylierung sollte beantwortet werden, auch die entscheidenden Phosphorylierungsstellen sollten identifiziert werden. Dabei sollte ebenfalls berücksichtigt werden, dass unterschiedliche Liganden zu unterschiedlichem Verhalten des Rezeptors bezüglich Internalisierung und Toleranzentwicklung *in vivo* führen. Hier sollten geeignete phosphorylierungsdefiziente Mutanten weiteren Aufschluss über die ligandenabhängige Phosphorylierung geben. Mit den gewonnenen Hinweisen aus den Internalisierungsversuchen sollten dann neue phosphospezifische Antikörper generiert werden, um die vermuteten Phosphorylierungen an bestimmten Aminosäureresten direkt nachweisen zu können.

2 Material

2.1 Versuchstiere

MOR Knockout Mäuse (MOR^{-/-})

Dr. H. Loh, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA

MOR S375A Knockin Mäuse (MOR^{S375A}), Stamm: C57BL/6J
Ozgene, Bentley DC, Australia

2.2 Prokaryotische und eukaryotische Zellen

dam⁻/dcm⁻ competent *E. coli*

NEB, Frankfurt a.M. (C2925I, Methyltransferase negativ, chemisch kompetent)

DH5 α *E. coli*

Institut für Toxikologie, Universität Würzburg

Human Embryonic Kidney Zellen 293 (HEK 293)

Institut für Pharmakologie, Universität Magdeburg

Human Embryonic Kidney Zellen mit SV40 large T-Antigen (HEK tsA, HEK T)

Institut für Toxikologie, Universität Würzburg

2.3 Oligonukleotide, DNA und Vektoren

mOPRM1c wt in pCR-Blunt II-TOPO

Open Biosystems, BioCat GmbH, Heidelberg (Cat-Nr. MMM1013-99827903, Clone Id: 40056952)

pCI-neo Vektor

Promega, Mannheim (Cat-Nr. E1841)

pcDNA3.1(+) Vektor

Invitrogen, Carlsbad, USA (Cat-Nr. V790-20)

pCR2.1_HA-mOPRM1a N-214bp, pCR2.1_mOPRM1a C-260bp, pCR2.1_mOPRM1a S375A C-260bp, pCR2.1_mOPRM1 S363A T370A S375A C-284bp, pCR2.1_mOPRM1_tpd C-284bp

Eurofins MWG Operon, Ebersberg

pcDNA3.1_HA-mOPRM1 (wt), pcDNA3.1_HA-mOPRM1 S363A-S375A (AAA), pcDNA3.1_HA-mOPRM1 S363A-T383A (TSST-T), pcDNA3.1_HA-mOPRM1 T354A-T394A (tpd), Gensynthese, Sequenzoptimiert zur Expression in humanen Zellen

Imagene, Source BioScience, Nottingham, UK

Primer und Oligonukleotide (siehe Tabellen, S. 31-32)

2.4 Enzyme

Ligase, T4 DNA Ligase recombinant *E. Coli* (origin T4 Virus), 500U und zugehörigen Enzympuffer
CAS-Nr. 9015-85-4, Promega, Mannheim (Cat-Nr: M1804)

Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase, 20U, 2U/μl
New England BioLabs, Frankfurt a.M. (Cat.-Nr: F-530)

Proteinase K, recombinant from *Pichia pastoris*,
CAS-Nr. 39450-01-6, Roche (Cat-Nr. 03 115 828 001)

Restriktionsenzyme und zugehörige Enzympuffer
New England Biolabs, Frankfurt a.M. und Fermentas, St. Leon-Rot

Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) von *Pandalus borealis*, 500U und zugehörigen Enzympuffer
CAS-Nr. 9001-78-9, Promega, Mannheim (Cat-Nr: M8201)

Taq-DNA Polymerase
CAS-Nr. 9012-90-2, Rekombinant aus eigener Herstellung

Taq-DNA Polymerase, innuTaq DNA Polymerase, 500U, 5U/μl
Analytik Jena, Jena (Cat-Nr. 845-EZ-1000500)

2.5 Antikörper

Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (H+L) *2 mg/mL
Invitrogen-Gibco, Carlsbad (Cat-Nr. A11008)

goat Anti-rabbit IgG-HRP
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (Cat-Nr. sc 2004)

guinea pig anti-MOR IgG {GP6}, polyklonal, Peptid (L386-P398): LENLEAETAPLP
Gramsch Laboratories, Schwabhausen

guinea pig anti-pS375 IgG {GP2}, polyklonal, Peptid (R371-V380): REHP(pS)TANTV
Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA

mouse anti-Transferrin Receptor IgG
Invitrogen, Carlsbad, USA (Cat-Nr. 13-6800)

rabbit anti-HA IgG, polyklonal, Peptid: YPYDVDPYA
Gramsch, Schwabhausen

rabbit anti-mouse IgG-HRP
Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA (Cat-Nr. sc-358914)

rabbit anti-MOR IgG {UMB-3}, monoklonal, Peptid (L386-P398): LENLEAETAPLP
Epitomics, Burlingame, CA, USA

rabbit anti-p44/42 MAPK (Erk1/2) IgG
Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA (Cat-Nr. 9102)

rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) IgG
Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA (Cat-Nr. 4370)

rabbit anti-pMOR pS363, polyklonal, Peptid (E359-Q368) EQQN(pS)ARIRQ
Gramsch, Schwabhausen

rabbit anti-pMOR pT370, polyclonal, Peptid (I366-R374) IRQN(pT)REHP
Gramsch, Schwabhausen

rabbit anti-pMOR pT376, polyklonal, Peptid (R371-V380): REHPS(pT)ANTV
Gramsch, Schwabhausen

rabbit anti-pMOR pT379, polyclonal, Peptid (S375-T383): STAN(pT)VDRT
Gramsch, Schwabhausen

2.6 Rezeptoragonisten

DAMGO ([D-Ala², N-MePhe⁴, glycinol⁵]-Enkephalin) Acetate salt
CAS-Nr. 100929-53-1, Bachem, Bubendorf, Schweiz (Cat-Nr. H-2535)

Etonitazen (2-(*p*-Ethoxybenzyl)-1-diethylaminoethyl-5-nitrobenzimidazole)
CAS-Nr. 911-65-9, Novartis, Basel

Fentanyl-Cytrat (N-(1-(2-phenylethyl)-4-piperidinyl)-N-phenylpropanamide), 0,05mg/ml
CAS-Nr. 990-73-8, Rotexmedica, Trittau (Cat-Nr. 4993564)

Forskolin (7β-Acetoxy-8,13-epoxy-1α,6β,9α-trihydroxylabd-14-en-11-one, Coleonol)
CAS-Nr. 66575-29-9, Sigma Aldrich (Cat-Nr.: F6886-10mg)

Morphinhydrochlorid ((5α,6α)-7,8-didehydro-4,5-epoxy-17-methylmorphinan-3,6-dio), 10mg/ml
CAS-Nr. 52-26-6, Merck Pharma, Darmstadt

2.7 Medien, Seren, Pufferlösungen und Antibiotika

Ampicillin Natriumsalz 99%, (SL: 100mg/ml, Endkonz.: 100μg/ml)
CAS-Nr. 69-52-3, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. K029)

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), 4,5g/l Glucose, ohne L-Glu, ohne Sodium Pyruvate
PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. E15-009)

Dulbecco's PBS, ohne Ca²⁺ u. Mg²⁺
PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. H15-002)

FBS (Foetal Bovine Serum) Gold
PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. A15-151)

Geneticinsulfat Solution, 50mg/ml, (Endkonz.: 0,6mg/ml)
CAS-Nr. 108321-42-2, PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. P11-012)

Normal Goat Serum
PAA, Pasching Österreich (Cat-Nr. B11-035)

HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution)
Sigma Aldrich, Steinheim (Cat.-Nr. H8264)

HEPES Puffer, 1M
CAS-Nr. 7365-45-9, PAA, Pasching (Cat-Nr. S11-001)

LB Agar, Pulver (Lennox L Agar)
CAS-Nr. 7647-14-5, Invitrogen, Carlsbad (Cat-Nr. 22700)

LB Broth Base, Pulver (Lennox L Broth Base)
CAS-Nr. 7647-14-5, Invitrogen, Carlsbad (Cat-Nr. 12780)

opti-MEM I Reduced Serum Medium (1x), liquid, mit GlutaMAX™ I
Invitrogen Gibco, Carlsbad (Cat-Nr- 51985)

Penicillin/Streptomycin, L-Glutamin (100x), with 10.000U/ml Pen., 10mg/ml Strep., 200mM L-Glu
PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. P11-013)

2.8 Chemikalien

ABTS (2,2' -Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)), Liquid Substrate System
CAS-Nr. 28752-68-3, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. A3219)

Acrylamidlösung, Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1), 30%ige mit 0,8% Bisacrylamid
CAS-Nr. 79-06-1, CAS-Nr. 110-26-9, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 3029)

AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) Substrate Pack (H₂O₂ Substrat in Acetat Puffer)
BioGenex, San Ramon, CA, USA (Cat-Nr. HK092-5K)

Agarose, Pulver, LE Agarose, universal für Gelelektrophorese
CAS-Nr. 9012-36-6, Biozym, (Cat-Nr. 840004)

APS (Ammoniumpersulfat, Ammoniumperoxodisulfat)
CAS-Nr. 7727-54-0, AppliChem, Darmstadt (Cat-Nr. A2941)

Borsäure
CAS-Nr. 10043-35-3, Merck, Darmstadt (Cat-Nr. 100160)

Bromphenolblau Natriumsalz, für die Elektrophorese
CAS-Nr. 34725-61-6, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. A512.1)

BSA (Bovin Serum Albumin), ph 7
CAS-Nr. 9048-46-8, PAA, Pasching, Österreich (Cat-Nr. K45-001)

Calciumchlorid Dihydrat (CaCl₂), ReagentPlus®, 99%
CAS-Nr. 10035-04-8, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. C3881)

Citronensäure
CAS-Nr. 5949-29-1, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. C1909)

di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na₂HPO₄), 99,5%, p.a.
CAS-Nr. 10028-24-7, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 4984)

DMSO (Dimethylsulfoxid), ROTIPURAN®
CAS-Nr. 67-68-5, (Cat-Nr. 4720)

DTT (1,4-Dithiotreit, 1,4-Dithiotreitl)
CAS-Nr. 3483-12-3, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 6908.3, 99%, p.a.)

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat)
CAS-Nr. 6381-92-6, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. X986)

Ethanol, absolut
CAS-Nr. 64-17-5, Mallinckrodt Baker, Deventer USA (Cat-Nr. 8006)

Ethidiumbromid, Lösung 1%
CAS-Nr. 1239-45-8, AppliChem, Darmstadt (Cat-Nr. A1152)

Glycerol (Glycerin),
CAS-Nr. 56-81-5, MP Biomedicals, Illkirch Cedex (Cat-Nr. 800688)

IBMX Phosphodiesterase Inhibitor

CAS-Nr. 28822-58-4, Sigma Aldrich, Steinheim (Cat-Nr.: I7018)

Igepal CA-630, (Nonidet-P40)

CAS-Nr. 9036-19-5, Sigma Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. I3021)

Isopropanol (2-Propanol), 99,9%

CAS-Nr. 67-63-0, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. T910.1)

Kaliumchlorid (Potassium chloride), 99%, for molecular biology

CAS-Nr. 7447-40-7, Sigma Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. P9541)

Lithiumchlorid, 99%, p.a., Ultra Qualität

CAS-Nr. 7447-41-8, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 3739)

Luminol, 3-Aminophthalhydrazid, 5-Amino-2,3-dihydro-phthalazin-1,4-dion

CAS-Nr. 521-31-3, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 4203.1)

Magnesiumchlorid-Hexahydrat, 99%, p.a., ACS

CAS-Nr. 7791-18-6, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 2189)

2-Mercaptoethanol

CAS-Nr. 60-24-2, Merck (Cat-Nr. 805740)

Methanol, 99%

CAS-Nr. 67-56-1, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 8388)

Natriumdeoxycholat

CAS-Nr. 302-95-4, AppliChem, Darmstadt (Cat-Nr. A1531.0100)

Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat (NaH₂PO₄), 98%, p.a., ACS

CAS-Nr. 10049-21-5, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. K300)

Natriumhydroxid Plätzchen

CAS-Nr. 1310-73-2, AppliChem, Darmstadt (Cat-Nr. A3910)

Orange G

CAS-Nr. 1936-15-8, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 0318)

Paraformaldehyd (PFA), reinst, DAC

CAS-Nr. 30525-89-4, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 0335.3)

p-Cumarsäure

CAS-Nr. 7400-08-0, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 9908.1)

Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol 25/24/1, Roti®-Phenol/C/I

Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. A156.1)

PEI (Polyethylenimin), linear MW: 25000

CAS-Nr. 9002-98-6, Polysciences Eppelheim (Cat-Nr. 23966-2)

Phosphatase Inhibitoren, PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets

Roche, Basel Schweiz (Cat-Nr.: 04906837001)

Pikrinsäure, Picric acid solution 1,3% in H₂O, saturated

CAS-Nr. 88-89-1, Sigma Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. P6744)

Poly-L-Lysin Hydrobromid, mol wt ≤150.000

CAS-Nr. 25988-63-0, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. P1274)

Protease Inhibitoren, Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets

Roche, Basel, Schweiz (Cat-Nr.: 04693159001)

Pertussis Toxin (PTX) von *Bordetella pertussis*

CAS-Nr. 70323-44-3, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. P2980)

SDS, Sodiumdodecylsulfat-Lösung 20%, Rotistock
CAS-Nr. 151-21-3, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 1057)

TEMED (N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin, 1,2-Bis(dimethylamino)-ethan), 99% P.A.
CAS-Nr. 110-18-9, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 2367.3, 99% P.A., f.d. Elektrophorese)

TRIS (Tris-hydroxymethyl-aminoethan), Pufferan[®] 99,9%,
CAS-Nr. 77-86-1, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 5429)

TRIS-HCl (Tris-hydroxymethyl-aminoethanhydrochlorid), Pufferan[®] 99,9%,
CAS-Nr. 1185-53-1, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 9090)

Triton[®]-X-100 (97% Polyethylenglycol-octylphenylether, 3% Polyethylenglycol)
CAS-Nr. 9036-19-5, CAS-Nr. 25322-68-3, Carl Roth, Karlsruhe (Cat-Nr. 3051)

Tween[®] 20, viscous liquid
CAS-Nr. 9005-64-5, Sigma-Aldrich, Steinheim (Cat-Nr. P1379)

VectaMount[™] AQ
Vector Laboratories, Biozol, Eching (Cat-Nr. VEC-H-5501)

Weizenkeim-Lektine (WGA-Beads) Lectin immobilized on Agarose CL-4B from *Triticum vulgare*
Sigma (Fluka), Steinheim (Cat-Nr. 61768)

Xylencyanol FF
CAS-Nr. 4463-44-9, AppliChem, Darmstadt (Cat-Nr. A1408)

2.9 Kits und Größenstandards

dNTP Mix, 50x Nucleotide Mix
Analytik Jena, Jena (Cat-Nr: 845-AS-9000001)

GeneRuler[™] 100bp DNA Ladder, 0,5µg/µl
Fermentas, St. Leon-Rot (Cat-Nr. SM0242)

GeneRuler[™] 1kb DNA Ladder, 0,5µg/µl
Fermentas, St. Leon-Rot (Cat-Nr. SM0311)

High Pure Plasmid Isolation Kit, mini scale
Roche, Basel, Schweiz (Cat-Nr. 11754785001)

Lance Ultra cAMP Assay Kit
Perkin Elmer, Rodgau (Cat-Nr: TRF0262)

Page Ruler Prestained Protein Ladder
Fermentas, St. Leon-Rot (Cat-Nr. SM0671)

peqGOLD Gel Extraction Kit
peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen (Cat-Nr. 12-2501-01)

pGEM-T Vector System I
Promega, Mannheim (Cat-Nr. A3600)

PureLink[™] HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit
Invitrogen, Carlsbad (Cat-Nr. K2100-17)

QIAfilter[™] Plasmid Midi Kit
QIAGEN GmbH, Hilden (Cat-Nr. 12243)

Vectastain Elite ABC Kit (Goat IgG)
Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA (Cat-Nr. PK-6105)

2.10 Verbrauchsmaterialien

Cryoröhrchen, 2ml, mit Außengewinde, PP, steril
Carl Roth, Karlsruhe (Cat.-Nr. E292.1)

Deckgläschen, Ø18mm
Carl Roth, Karlsruhe (Cat.-Nr. P233.1)

Falcons, Cellstar, (15ml), (50ml), PS, conical bottom, sterile, DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 188271, 227261)

Kulturflasche, 75cm², 250ml, PS, with filter cap, sterile, DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 658175)

Kulturplatten, (6 Well), (12 Well), (24 Well), PS, with lid, sterile, DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 657160, 665180, 662160)

Kulturplatte, 96er Well, F-bottom, PS, sterile DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 655180)

Kulturschalen, (Ø60mm), (Ø100mm), (Ø145mm), PS sterile, DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 628160, 664160, 639160)

Objektträger, 76x26mm, Mattrand
Menzel-Gläser, Braunschweig (Cat.-Nr. AA00000112E)

PCR Gefäße, 0,2ml, flacher Deckel
Hartenstein, Würzburg (Cat.-Nr. R02)

Plate, ½ Area 96er Well, weiß
Perkin Elmer, Rodgau (Cat.-Nr. 6005560)

Serologische Pipetten, (5ml), (10ml), with tip, PS, sterile, DNase/RNase free, non pyrogenic
Greiner Bio-One, Frickenhausen (Cat.-Nr. 606180, 607180)

UV-Küvetten, 70µl Mikro, Kunststoff, 12,5x12,5x45mm, Schichtdicke 10mm, Zentrumshöhe 8,5mm
Carl Roth, Karlsruhe (Cat.-Nr. Y200.1)

2.11 Geräte

Binocular, Motic AE20

Blotapparatur, BioRad Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell System

Chemilumineszenzsystem, Fusion FX7, Vilber Lourmat, Peqlab; **Software: Fusion 15.16**

Drehscheibe, Labinco B.V. L28

Elektrophoresesystem für DNA, BioRad Sub-Cell® GT Agarose Gel Electrophoresis System

Elektrophoresesystem für Proteine, BioRad Mini-PROTEAN® 3 Cell Systems

Entwicklungsmaschine, Cawomat 2000IR, (Entwickler AGFA G153, Fixierer AGFA G354)

Geldokumentation, Vilber Lourmat; **Software: Quantum-Capt 15.18**

Hot Plate, Ugo Basile 35100

Inkubator, Heraeus Thermo Electron Corporation BBD 6220

Kolbenschüttler, Infors HT TR-225

Kryoeinfriergerät, Nalge Nunc International

Laborwaage, Sartorius MC1

Laser Scanning Mikroskop, Zeiss LSM 150 Meta; **Software: Zen 2008**

Magnetrührer, Heidolph MR Hei-Standard

Mikrotom, Microm HM 335 E

Neubauerkammer, HBG Precicolor (Tiefe 0,1mm, 0,0025mm²)

Orbitalschüttler, Heidolph Unimax 1010

Platereader, Molecular Devices FlexStation 3 Microplate Reader; **Software: SoftMAX Pro 5**

Reinraumbank, BDK-SK Laminar-Flow-Sicherheitswerkbank

Sonifizierer, Branson Sonifier 450

Thermoblock, Eppendorf Thermomixer comfort

Tischzentrifugen, Eppendorf (5403, Rotor 16F24-11), (5424, Rotor FA-45-24-11), (5804, Rotor A-4-44)

Wasserbad, Medingen WB 22

Zentrifuge, Beckman AvantiTM J-25, Rotor JA-14 und JA-17

Zentrifuge, Hettich EBA 12 R, Rotor 30F

Zentrifuge, Thermo Scientific, Sorvall RC 6+, Rotor F13-14x50cy

Tabellen für Primer und Sequenzen für Oligonukleotide und cDNA

1. Typisierungsprimer (Primerpaare für PCR mit genomischer DNA)

K	Spezies Datenbank Nr	Name	Sequenz 5'-3'	Tm	An	Zy	Fr bp
T1f	<i>m. musculus</i> MGI:97441	T_mOPRM1_üLoxS2_for_01	ggctaatacacagtgatcgaaactaac	58°C	56°C	34	367 537 +KI
T1r	<i>m. musculus</i> MGI:97441	T_mOPRM1_üLoxS2_rev_01	taactgtcttggtacattcctttc	54°C			
	<i>m. musculus</i> MGI:97441	T_mOPRM1geno_E3_for_01	acccatctgtaagcaacaacctta	53°C	58°C		689
	<i>m. musculus</i> MGI:97441	T_mOPRM1geno_E3_rev_01	agactggtatcaggtgctgtgtt	55°C			

(K Kürzel, An Annealing, Zy Zyklen, Fr Fragmentgröße, KI Knockin)

2. PCR Primer (Primerpaare für PCR mit Plasmid DNA)

K	Spezies Datenbank Nummer	Name	Sequenz 5'-3'	Tm	An	Zy	Fr bp
I1f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	mOPRM1_intern_for_01	ACCATCATGGCCCTCTATCTAT	53°C	60°C	30	294
I1r	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	mOPRM1_intern_rev_01	AATGTAGCGGTCTACACTCATGG	55°C			
I2f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	mOPRM1_intern_for_02	CTCTATTCTATCGTGTGTAGTGG	56°C	55°C	30	249
I2r	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	mOPRM1_intern_rev_02	GAAGATACTGGTGAACATGTTGTAG	54°C			
I3f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	I_mOPRM1_for_03	TCACGTTCTCTCATCCACACA	52°C	55°C	30	300
I3r	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	I_mOPRM1_rev_03	GCCAGGAAACAGTCTGGAAA	52°C			

(K Kürzel, An Annealing, Zy Zyklen, Fr Fragmentgröße)

3. Sequenzierungsprimer (Primer für komplette Sequenzierung der cDNA)

K	Spezies Datenbank Nummer	Name	Sequenz 5' - 3'	Tm	Pos bp
S1f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_E1_for_01	CAACTTGTCCACGTTGATG	52 °C	90
S1r	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_E1_rev_01	CATCAACGTGGGACAAGTTG	52 °C	90
S2f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_E2_for_01	CATCCTCTGCAAGATCGTGA	52 °C	411
S2r	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_E2_rev_01	TCACGATCTTGCAGAGGATG	52 °C	411
S3f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_E3_for_01	GCAAACCTCTGCTCGAATCC	52 °C	1068
S4f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_UTR_for_01	AGGCTGCCATCTACTTGGA	52 °C	1223
S5f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_UTR_for_02	GTGAGGAAAATGTTGCTTCCA	53 °C	1641
S6f	<i>m. musculus</i> ENSMUST00000052751	S_mOPRM1_UTR_for_03	GCTGCGTGTGAAAATGAAAGG	53 °C	1762

(K Kürzel, An Annealing, Zy Zyklen, Fr Fragmentgröße, Pos Position)

4. Vektorprimer (Sequenzierung, für PCR kombinierbar)

Name	Sequenz 5' - 3'	Tm	An
M13 uni (-21)	TGTAACACGACGGCCAGT	48 °C	52 °C
M13 rev (-29)	GGTCATAGCTGTTCCCTG	48 °C	52 °C
sP6	ATTTAGGTGACACTATAG	41 °C	52 °C
T3	ATTAACCCCTACTAAAGGG	47 °C	52 °C
T7 (short)	TAATACGACTCACTATAGG	45 °C	52 °C
BGH rev	TAGAAGCACAGTCGAG	47 °C	52 °C

5. Oligonukleotide (phosphoryliert, für Oligoklonierung)

mOPRM1 C-Term for 5' P-GTACGAACCACCAGCTAGAAAATCTGGAAGCAGAAAAGCTCCATTGCCCTAAGGGCC

mOPRM1 C-Term rev 5' P-CTTAGGGCAATGGAGCAGTTTCTGCTCCAGATTTTCTAGCTGGTGGTT

mOPRM1d C-Term for 5' P-GTACGAACCACCAGGAAATGAGGAACCTTCTTCTGATGATGGCCCGATATCGGGCC

mOPRM1d C-Term rev 5' P-CGATATCGGGCCATCATCAGGAAGAAGTTCTCATTCCCTCTGGTGGTT

cDNA (Sequenzabschnitte für Subklonierungen)

>pCR2.1_HA-mOPRM1a N-214bp

GCTACGATATCCTCGAAGATTCGCCCTGGAACCCGAACACTCTTGAGTCTCTCAGTTACAGCCTACCAGTCCGAGCAAGCATTGAGAACCATGTACCCATACGATGTTCCGATTTACGCTGACAGCAGCGCCGCGCCAGGAAACATCAGCAGACTCTCTGACCCCTTAGCTCCTGCAAGTTGCTCCAGCACTGGCTCCTGGCTCACTTGTCCACGTTGATGGCAACAGTCCGACCCATGC

>pCR2.1_mOPRM1a C-260bp

TGATCAGATTCCAGAAACCACTTCCAGACTGTTTCTGGCACTTCTGCATTGCCCTGGGTTACACAAACAGCTGCCTGAACCCAGTTCTTTATGCGTTCCTGGATGAAAACCTCAAACGATGT

>pCR2.1_mOPRM1a S375A C-260bp

TGATCAGATTCCAGAAACCACTTCCAGACTGTTTCTGGCACTTCTGCATTGCCCTGGGTTACACAAACAGCTGCCTGAACCCAGTTCTTTATGCGTTCCTGGATGAAAACCTCAAACGATGT

>pCR2.1_mOPRM1 S363A T370A S375A C-284bp

TGATCAGATTCCAGAAACCACTTCCAGACTGTTTCTGGCACTTCTGCATTGCCCTGGGTTACACAAACAGCTGCCTGAACCCAGTTCTTTATGCGTTCCTGGATGAAAACCTCAAACGATGT

>pCR2.1_mOPRM1_tpd C-284bp

TGATCAGATTCCAGAAACCACTTCCAGACTGTTTCTGGCACTTCTGCATTGCCCTGGGTTACACAAACAGCTGCCTGAACCCAGTTCTTTATGCGTTCCTGGATGAAAACCTCAAACGATGT

3 Methoden

Alle Experimente, bei denen mit Tieren gearbeitet wurde, wurden gemäß des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland durchgeführt.

3.1 Methoden der Nukleotid Biochemie

3.1.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)

PCR-Ansatz (50 μ l):

20 ng-500 ng DNA	
3%	(v/v 1,5 μ l/50 μ l) Dimethylsulfoxid
10%	(v/v 5 μ l/50 μ l) 10 \times Taq DNA-Polymerase-Puffer
1,5 mM	(v/v 3 μ l/50 μ l) 25 mM MgCl ₂ -Lsg.
0,2 mM	(v/v 1 μ l/50 μ l) 10 mM dNTP Mix
0,2 mM	(v/v 1 μ l/50 μ l) 100 μ M 5'-Primer
0,2 mM	(v/v 1 μ l/50 μ l) 100 μ M 3'-Primer
1 μ l	Taq DNA-Polymerase
mit ddH ₂ O auf 50 μ l auffüllen	

Programm für Thermozykler:

Deckeltemperatur:	105°C
Zyklen:	variabel (<i>siehe Primerliste</i>)
Initiale Denaturierung:	2 min/95°C
Denaturierung:	30 sek/95°C
Primer-Annealing:	30 sek/ (Temperatur, <i>siehe Primerliste</i>)
Elongation:	1 min pro 1000 Basen (für Taq-DNA Polymerase), bei 72°C
Finale Elongation:	10 min/72°C
Kühlung:	8°C

Der PCR-Ansatz wird in 50 μ l PCR-Reaktionsgefäßen pipettiert. Bei mehreren Ansätzen wird ein Master-Mix angesetzt. Für die Reaktion wird der Thermozykler entsprechend programmiert. Die PCR-Produkte können im Anschluss mit 6 \times DNA-Probenpuffer versetzt und für die DNA-Agarosegelelektrophorese auf ein Agarosegel aufgetragen werden.

3.1.2 DNA-Agarosegelelektrophorese

Für ein Gel mit 1% Agarose werden 0,5 g Agarose auf 50 ml Natrium-Borat (SB) Laufpuffer pH 8,2 (10 mM NaOH pellets, 40 mM Borsäure) in einem 250 ml Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Der handwarmen Lösung wird 1% Ethidiumbromid-Lsg. (Endkonzentration: ca. 0,6-1 µg/ml) zugegeben und durch Schwenken gut vermischt. Die Lösung wird in einen vorbereiteten Gelschlitten gegossen und polymerisiert innerhalb von 20-30 min. Das Gel wird in die Elektrophoreskammer gelegt mit Puffer überschichtet und mit den DNA-Proben in 6× Ladebuffer (10 mM Tris HCl pH 7,6, 60% Glycerol, 60 mM EDTA, 0,55 mM Xylencyanol FF, 0,43 mM Bromphenolblau Na-Salz, 3,32 mM Orange G) beladen. Die Elektrophorese erfolgt bei 200 V für 10-12 min. Die angefärbte DNA wird auf einem UV-Transiluminator sichtbar gemacht und dokumentiert.

3.1.3 Plasmidaufreinigung aus Bakterienzellen

Die Aufreinigung der Plasmid-DNA aus Bakterienzellen erfolgt nach Herstellerangabe mit dem *Roche High Pure Plasmid Isolation Kit* (Mini), sowie dem *QIAfilterTM Plasmid Midi Kit* und dem *Invitrogen PureLinkTM HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit*.

3.1.4 DNA-Fällung für die Sequenzierung

Ansatz für die DNA-Fällung:

500 ng DNA
10 µl 8 M LiCl
80 µl 100% Isopropanol
mit ddH₂O auf 190 µl auffüllen

Der Ansatz wird bei RT und 12.000 g für 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Es werden 500 µl 70% Ethanol (eikalt) zugegeben und kurz gevortext. Es wird erneut bei RT und 12.000 g für 20 min zentrifugiert. Das Ethanol wird abgegossen und das Pellet für ca. 2 h an der Luft getrocknet. Das getrocknete Pellet kann im Anschluss zur Sequenzierung an einen Sequenzierungsdienstleister (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) gegeben werden.

3.1.5 Restriktionsverdau

Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgt nach der zu schneidenden DNA-Sequenz, wobei im Resultat *sticky ends* den *blunt ends* vorzuziehen sind, da diese später eine bessere Ligation ermöglichen. Die Ansätze werden zwischen 30 min und 1 h bei Temperatur nach Herstellerangabe inkubiert. Bei angegebener Star-Aktivität eines Enzyms, ist die Reaktionszeit so kurz wie möglich zu halten. Bei Doppelverdau mit unterschiedlichen Enzymtemperaturen wird für die erste Hälfte der Reaktionszeit die niedrigere Temperatur verwendet. Bei den meisten Enzymen erfolgt eine thermische Inaktivierung bei 65°C für 15 min. Die Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgt über DNA-Agarosegelelektrophorese.

Ansatz eines Restriktionsverdaus (10 µl):

- 0,5-1 µg Plasmid-DNA
- 1 µl 10× Reaktions-Puffer (*siehe Herstellertabelle für Enzym bzw. Doppelverdau*)
- 1 µl Restriktionsenzym
- 1 µl Restriktionsenzym 2 (*bei Doppelverdau*)
- 1 µl 10× BSA (*optional, nach Herstellerangabe*)
- mit ddH₂O auf 10 µl auffüllen

3.1.6 Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Interessierende DNA-Fragmente werden unter kurzer UV-Exposition mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in tarierte 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Im Anschluss wird die DNA nach Herstellerangabe mit dem *peqGOLD Gel Extraction Kit* an aus den ausgeschnittenen Gelstückchen extrahiert.

3.1.7 Dephosphorylierung reaktiver DNA 5'-Enden

Ansatz einer Dephosphorylierung (20 µl):

- 15 µl linearisierter Vektor aus Gelextraktion
- 1 µl Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (max. 10 U SAP/µg DNA)
- 2 µl 10× SAP-Puffer
- 2 µl ddH₂O

Um eine Autoligation des Vektors bei der nachfolgenden Ligation zu vermeiden, werden die während der Restriktion entstandenen reaktiven 5'-Enden des linearisierten Vektors dephosphoryliert. Der Dephosphorylierungsansatz wird für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgt die irreversible Enzyminaktivierung bei 65°C für 15 min. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert und kann bei -20°C mehrere Wochen gelagert werden.

3.1.8 Ligation

Ansatz einer Ligation für sticky Ends (15 µl):

5 µl	linearisierter, dephosphorylierter Vektor
5 µl	Insert-DNA
1,5 µl	10× T4 DNA-Ligase-Puffer
1 µl	T4 DNA-Ligase
2,5 µl	ddH ₂ O

Der Ansatz wird über Nacht bei 16° inkubiert. Die Ligase verbindet die 5'-Phosphatgruppen der Insert DNA kovalent mit den freien 3'-Hydroxylgruppen des Vektors zu Phosphodiesterbindungen. Die verbleibenden Nicks an den dephosphorylierten Vektorenden werden nach der Transformation durch bakterieneigene DNA Reparatur Systeme geschlossen. Klassisch wird bei der Ligation ein Verhältnis: Insert DNA zu Vektor von 3:1 vorgeschlagen. Die einzusetzenden Mengen werden nach folgender Formel: $\text{Gewicht Insert (ng)} = [\text{Gewicht Vektors (ng)} \times \text{Länge Insert (bp)} \times \text{Ratio (3/1)}] / \text{Länge Vektor (ng)}$ berechnet.

3.1.9 Klonierung von PCR-Produkten

Für die Klonierung von PCR-Fragmenten wurden diese über Elektrophorese aufgetrennt und aus dem Gel extrahiert (*siehe oben*). Die Klonierung erfolgte über das *pGEM-T Vector System I*. Dieses System nutzt die während der PCR von der Taq-DNA-Polymerase an den 3'-Enden der PCR-Produkten angefügten Adeninüberhänge. Bei Amplifikation der DNA über PCR mit der Phusion DNA-Polymerase ist ein Zwischenschritt erforderlich. Da die Phusion keine Adeninüberhänge anfügt, müssen diese mit der Taq DNA-Polymerase angehängt werden. Im Anschluss kann das PCR-Produkt im pGEM Klonierungsvektor an dessen Thyminüberhänge ligiert werden. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C.

Ansatz zum Erzeugen von Adeninüberhängen (20 μ l):

15 μ l DNA (Eluat aus PCR Aufreinigung)
0,5 μ l Taq DNA-Polymerase
2 μ l 10 \times Taq DNA-Polymerase Puffer
1,2 μ l 25mM MgCl₂-Lsg.
0,5 μ l 10mM dATP
0,8 μ l ddH₂O

Die PCR erfolgt bei 72°C für 20 min.

Ansatz einer Ligation für sticky Ends (15 μ l):

5 μ l PCR-Fragment aus Gelextraktion
1 μ l pGEM-Vektor
1,5 μ l 10 \times T4 DNA-Ligase-Puffer
1 μ l T4 DNA-Ligase
6,5 μ l ddH₂O

3.1.10 Klonierung von Oligonukleotiden

Kurze DNA-Sequenzen, bis 60 bp Länge, die zum Beispiel Tags codieren, lassen sich über eine Oligoklonierung in Plasmide einfügen. Oligonukleotide werden so designed, dass ihre Enden zu denen des geschnittenen Plasmides komplementär sind und an ihren 5'-Enden eine Phosphatgruppe tragen. Vor der Ligation werden die beiden komplementären Oligonukleotide hybridisiert und der Vektor entsprechend verdaut. Die Ligation erfolgt über Nacht bei 16°C. Die verwendeten Oligonukleotide (100 pmol/ μ l) wurden bei einem Dienstleister (Eurofins MWG GmbH, Ebersberg) in Auftrag gegeben.

Ansatz einer Oligo-Hybridisierung (10 μ l):

10 μ M (v/v 1 μ l/10 μ l) 100 μ M 5'-Oligonukleotide
10 μ M (v/v 1 μ l/10 μ l) 100 μ M 3'-Oligonukleotide
8 μ l ddH₂O

Programm für Thermozykler:

Deckeltemperatur: 105°C
Denaturierung: 2 min/95°C
Annealing: 30 sek/ bei mittlerer Schmelztemperatur der Oligonukleotide
Kühlung: 8°C

Ligationsansatz (15 µl):

- 5 µl linearesierter, dephosphorylierter Vektor
- 5 µl hybridisierte Oligonukleotide
- 1,5 µl 10× T4 DNA Ligase Puffer
- 1 µl T4 DNA Ligase
- 2,5 µl dd H₂O

3.1.11 Transformieren chemisch kompetenter Bakterien

Die kompetenten Zellen werden auf Eis aufgetaut. Nach dem Auftauen werden 0,5-1 µg Plasmid-DNA, bzw. 5 µl Ligationsansatz pro 20-40 µl Zellsuspension zugeben und für 12 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgt ein Hitzeschock für 80 sec bei 42°C im Wasserbad. Danach werden die Zellen sofort für 2 min auf Eis abgekühlt.

Bei Ampicillinresistenz können die Zellen sofort ausplattiert werden. Inkubation in SOC-Medium ist nicht notwendig. Als Negativkontrolle werden nicht transformierte Zellen ausplattiert. Als Positivkontrolle wird mit aufgereinigter Plasmid-DNA transformiert.

3.1.12 Kolonie-PCR

PCR-Ansatz für Kolonie-PCR (25 µl):

- 1 Kolonie von LB-Agarplatte gepickt
- 3% (v/v 0,7 µl/25 µl) Dimethylsulfoxid
- 10% (v/v 2,5 µl/25 µl) 10× Taq DNA-Polymerase-Puffer
- 1,5 mM (v/v 1,5 µl/25 µl) 25 mM MgCl₂-Lsg.
- 0,2 mM (v/v 0,5 µl/25 µl) dNTP Mix
- 0,2 pmol (v/v 0,5 µl/25 µl) 5'-Primer
- 0,2 pmol (v/v 0,5 µl/25 µl) 3'-Primer
- 0,5 µl Taq DNA-Polymerase
- 18,3 µl ddH₂O

Je nach Zahl der zu testenden Klone wird ein entsprechender Master-Mix des PCR-Ansatzes hergestellt und zu je 25 µl auf 50 µl PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Für jeden zu testenden Klon wird mit einer Pipettenspitze eine Kolonie von der Agarplatte gepickt, auf eine neue Agarplatte als backup übertragen und dann für etwa 10 min in das Reaktionsgefäß getaucht. Auf der neuen Agarplatte werden alle Klone entsprechend den Reaktionsgefäßen gekenn-

zeichnet, um nach der PCR eine Zuordnung treffen zu können. Die Backupplatte wird über Nacht bei 37°C inkubiert und dann bei 4°C gelagert. Die PCR und die Analyse der Produkte erfolgt wie oben beschrieben. Das Vorhandensein des Inserts läßt sich durch eine positive PCR mit dem Einsatz entsprechender Primer bestätigen. Zudem ermöglicht diese Methode nach einfachem Verdau auch die Orientierung des Inserts innerhalb des Plasmids festzustellen. Dazu wählt man die Primer so, dass das resultierende PCR-Fragment den Übergang von der Insert-Sequenz zur flankierenden Vektor-Sequenz überspannt.

3.1.13 Herstellung der Rezeptormutanten

Als Ausgangsgerüst zur Herstellung der verschiedenen Genkonstrukte diente ein Fragment des mOPRM1C in pCR-BluntII-Topo, erworben bei BioCat. Das Fragment wurde mit EcoRI verdaut und in den pCI-neo Vektor umklontiert. Das trunkierte 5'-Ende wurde durch Subklonierung (Doppelverdau mit NheI und XcmI) erneuert. Dabei wurde die kodierende Sequenz für einen HA-Tag angefügt. Da die zu mutierenden Basen im Bereich des 3'-Endes lagen, wurde der betreffende Sequenzabschnitt ebenfalls durch Subklonierung (sequenzieller Doppelverdau mit NotI und BclI) ausgetauscht. Dabei wurde am Ende des durch Exon 3 kodierten Bereichs durch stille Mutation eine BsiWI Schnittstelle eingefügt. Diese sollte später den Austausch des durch Exon 4 kodierten Bereichs über Oligoklonierung und somit für die einzelnen Rezeptormutanten einen Wechsel zwischen den Spleißvarianten ermöglichen. Die zur Subklonierung verwendeten DNA-Sequenzen wurden bei MWG synthetisiert und als Plasmide in pCR2.1 geliefert. Da das benötigte Enzym BclI an methylierten Basen nicht schneiden kann, wurden zur Gewinnung nicht methylierter DNA *dam*⁻/*dcm*⁻ kompetente *E. coli* Zellen verwendet. Um die Fehlerrate bei der Replikation zu minimieren, wurde nach Ligation wieder in DH5α *E. coli* transformiert. Später wurden die vorhandenen Konstrukte unter Verwendung von XL1 Blue *E. coli* in den pcDNA3.1(+) Vektor umklontiert. Die Herstellung der Oligonukleotide, sowie die Sequenzierung der Klone erfolgte ebenfalls bei MWG. Für die Planung und Analyse der Klonierungsarbeiten wurden folgende Online-Dienste genutzt:

Datenbankrecherche: *NCBI, Ensembl* und *ExpASy*

Restriktionsanalyse: *NEBcutter* (New England BioLabs)

Multiple Analignments:	<i>ClustalW2</i> (EMBL-EBI)
Primerdesign:	<i>Primer3</i> (Howard Hughes Medical Institute)
T _m Kalkulation:	<i>BioMath Calculators</i> (Promega)
Allg. Sequenzalgorithmen:	<i>The Sequence Manipulation Suite</i> (Bioinformatics Organisation)

3.1.14 Isolierung genomischer, muriner DNA

Der Maus wird ein ca. 5 mm langes Stück der Schwanzspitze entfernt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Es werden 500 µl Lysepuffer, pH 8,0 (50 mM Tris, 100 mM EDTA, 1% SDS) zur Schwanzspitze gegeben und mit 10 µl Proteinase K-Lsg. (14-22 mg/ml Proteinase K in Tris-HCl, pH 7,5) komplettiert (Endkonzentration: ca. 300 µg/ml). Die Lyse erfolgt über Nacht bei 50°C unter Schütteln im Thermoblock. Das Lysat wird mit 500 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl Alkohol 25/24/1 versetzt und 60 min auf der Drehscheibe inkubiert. Um die Phasen zu trennen wird bei 15.000 g und 4°C für 30 min zentrifugiert. Die obere Phase (ca. 350 µl) wird mit abgeschnittener Pipettenspitze sehr vorsichtig abgehoben und in neues Reaktionsgefäß überführt. Zum Fällern der DNA wird die Lösung mit 50 µl 8 M LiCl-Lsg. und 500 µl 100% Isopropanol versetzt und bei 15.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 500 µl 70% Ethanol (eiskalt) resuspendiert und bei 15.000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das DNA Pellet an der Luft getrocknet und schließlich in 100 µl 10% TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA) bei 40°C für 30 min unter Schütteln im Thermoblock gelöst.

3.2 Methoden der Protein Biochemie

3.2.1 Rezeptoraufreinigung über Weizenkeim-Lektine (WGA-Beads)

Es werden 250.000 Zellen auf 10 ml Medium in einer Ø 100 mm Schale ausgesät und bis 80% Konfluenz wachsen gelassen. Das Medium wird durch 6 ml Medium ohne FBS und Antibiotikum ersetzt. Für Zeitreihen werden die Zellen entsprechend lange mit Agonist stimuliert, beginnend mit der längsten Stimulationsdauer. Der Radioimmunpräzipitations Assay (RIPA) Puffer, pH 7,4 (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 2,5 mM EDTA, 12 mM

Natriumdeoxycholat, 1% Igepal CA-630, 0,1% SDS) wird frisch mit den benötigten Inhibitoren (1 Tablette/10 ml Protease Inhibitoren, *Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets* und 1 Tablette/10 ml Phosphatase Inhibitoren, *PhosSTOP, Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets*) komplettiert und die benötigten 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt. Die Zellen werden in der Schale 1× mit eiskaltem PBS gewaschen. Es werden 1,2 ml eiskalter komplettierter RIPA-Puffer zur Lyse der Zellen zugeben und 10min auf Eis inkubiert. Die Zellen werden mit einem Zellschaber geerntet und in die eisgekühlten Reaktionsgefäße überführt. Das Lysat wird für 30 min bei 14.000 g und 4°C zentrifugiert und im Anschluss auf Eis gelagert.

In der Zwischenzeit werden pro Ansatz 40 µl Weizenkeim-Lektine (Wheat germ agglutinin (WGA)-Beads, Lectin immobilized on Agarose) angesetzt. Die Stammlösung der WGA-Beads wird gut gevortext. Zum besseren Pipettieren werden die WGA-Beads dazu entsprechend der Zahl der Ansätze in ein großes Volumen RIPA-Puffer (960 µl pro 40 µl WGA-Beads) aufgenommen, gevortext und zu 1000 µl auf die Reaktionsgefäße verteilt. Die WGA-Beads werden bei 350 g für 1 min abzentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen.

Der Überstand aus der Lysatzentrifugation (ca. 750µl) wird auf die 40 µl WGA-Beads überführt und für 2-3 h bei 4° auf der Drehscheibe inkubiert. Im Anschluss werden die WGA-Beads für 1 min bei 4°C und 500 g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Zum Waschen werden die WGA-Beads mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer versetzt, gevortext und 1 min bei 4°C und 500 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und dieser Waschschritt noch 2× wiederholt. Zum Schluss werden die WGA-Beads mit 80 µl 1× SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris HCl, pH 7,6, 100 mM Dithiothreitol, 20% Glycerol, 2% SDS, 75 µM Bromphenolblau) bei 43°C versetzt und 20 min bei 43°C im Thermoschüttler inkubiert. Die Proben können bis zum Auftragen auf das Gel bei -20°C gelagert werden.

3.2.2 Rezeptoraufreinigung aus Maushirnen

Die Agonisten werden in physiologischer Kochsalzlösung gelöst und den Mäusen subkutan injiziert (10 ml/kg). Nach 30 min werden die Tiere betäubt, getötet und das Gehirn entnommen. Das Gewebe wird in RIPA-Puffer aufgenommen und im Eisbad mit dem Sonifizierer (Output 2,5) für 7-10 Sekunden aufgeschlossen. Die Aufreinigung des Rezeptors erfolgt über Immunpräzipitation an Agarosebeads mit rabbit anti-MOR IgG {UMB-3}. Für den

Westernblot wird der Primärantikörper guinea pig anti-pS375 {GP2} (Verdünnung: 1:1.000) und als Sekundärantikörper rabbit anti-GP IgG-HRP (Verdünnung 1:5.000) verwendet. Nach Detektion wird die Membran gestrippt und zur Kontrolle erneut mit phosphorylierungsunabhängigem guinea pig anti-MOR IgG (GP6) (Verdünnung 1:1.000) inkubiert. Die Detektion erfolgt wie unter Westernblot beschrieben.

3.2.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die Komponenten des Gels werden entsprechend dem Pippetierschema gemischt und gegossen. Die Proben werden im Thermoblock 2min bei 43°C erhitzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelkammer wird mit Elektrodenpuffer pH: 8,3 (25 mM Tris, 190 mM Glycin, 3,5 mM SDS) aufgefüllt. Die Elektrophorese erfolgt in bei 200 V für 40 min.

Pippetierschema für 2 Gele (2x 8ml):

Trenngel	7,5%	Sammelgel	4%
H ₂ O	8 ml	H ₂ O	4,7 ml
30% Acrylamid-Lsg. 37,5:1	4 ml	30% Acrylamid-Lsg. 37,5:1	1 ml
1,5 M Tris pH 8,8	4 ml	0,5 M Tris pH 6,8	1,8 ml
20% SDS-Lsg.	100 µl	20% SDS-Lsg.	100 µl
10% APS-Lsg.	75 µl	10% APS-Lsg.	100 µl
TEMED	7,5 µl	TEMED	10 µl

3.2.4 Westernblot

Die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran wird für 5 min in 100% Methanol aktiviert und mit Blotpuffer, pH 8,3 (25 mM Tris, 150 mM Glycin, 10% Methanol) gespült. Die Membran wird entsprechend dem Gel markiert. Membran, Filterpapiere und Gel werden für 5 min in Blotpuffer equilibriert. Der Aufbau des Blotsystems erfolgt entsprechend der Blotapparatur. Das Bloten erfolgt mit 5 mA/cm² Gel (Standardgel 5 cm x 9 cm= 45 cm², 225 mA pro Gel) für 40-45 min.

Der Blot wird 3× 3 min mit Tris Buffered Saline mit Tween (TBS/T) Puffer, pH 7,6 (140 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween) gewaschen und mit 5% Milch oder 5% BSA in TBS/T bei RT für 60 min auf dem Schüttler geblockt. Der Primärantikörper wird in 5% Milch oder

5% BSA in TBS/T bei 4° über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Der Blot wird 3× 5min mit TBS/T gewaschen und der Sekundärantikörper in 5% Milch oder 5% BSA in TBS/T bei RT für 2 h auf dem Schüttler inkubiert. Der Blot wird 3× 5min mit TBS/T gewaschen.

Die Substratlösungen werden zu 2× 12,5ml 100 mM Tris, pH 8,3 (A und B) in 15 ml Falcons angesetzt. Zu Ansatz A werden 55 µl 90 mM p-Cumarsäure in DMSO und 125 µl 250 mM Luminol in DMSO zugegeben. Zu Ansatz B werden 7,5 µl 30% H₂O₂ zugegeben. Beide Ansätze werden gemischt und auf den Blot gegeben. Die Detektion der Lumineszenz erfolgt mit Röntgenfilm in der Entwicklungsmaschine oder dem Fusion FX7 Multi-Imaging System. Die Auswertung der Bandenstärke erfolgt mit der Software BIO-1D.

Antikörperverdünnungen, jeweils in 5% Milch (Ausnahme angegeben):

rabbit anti-HA IgG	(Serum 1:2000, aufgereinigt 1:500)
rabbit anti-MOR IgG {UMB3}	(1:200)
guinea pig anti-MOR IgG {GP6}	(1:5.000)
rabbit anti-pMOR pT363	(1:300)
rabbit anti-pMOR pT370	(1:300)
rabbit anti-pMOR pT376	(1:300)
rabbit anti-pMOR pT379	(1:300)
mouse anti-Transferrinrezeptor IgG	(1:2.000) in 5% BSA
rabbit anti-ERK1/2 Antikörper	(1:2.500)
rabbit anti-pERK1/2 Antikörper	(1:1.000)
goat anti-rabbit IgG HRP gekoppelt	(1:5.000)
goat anti-mouse IgG HRP gekoppelt	(1:5.000)

3.2.5 Strippen eines Westernblots

Die Blotmembran wird in Stripping Puffer, pH 6,8 (62,5 mM Tris, 2% SDS, 0,7% β-Mercaptoethanol) gelegt und für 30 min bei 50°C abgedeckt im Wasserbad geschüttelt. Im Anschluss wird die Membran solange mit TBS/T gewaschen, bis kein Geruch mehr wahrzunehmen ist. Die Membran wird 15 min mit TBS/T gewaschen und kann erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert werden (*siehe oben*).

3.3 Methoden der Immunzytochemie

3.3.1 Präparation von Kulturzellen für die Fluoreszenzmikroskopie

Es werden 100.000 Zellen/Well in einer 12-Well-Platte auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläschen (\varnothing 18 mm) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70-80% kultiviert. Das Medium über den Zellen wird abgesaugt und der Primärantikörper rabbit anti-HA IgG (Verdünnung 1:1.000) in opti-MEM) 350 μ l/Well zugegeben. Die Inkubation erfolgt in einer Feuchtkammer bei 4°C für 2 Stunden. Im Anschluss wird 1 \times mit Dulbecco's PBS gewaschen und der Ligand in DMEM-Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) zu 350 μ l/Well zugegeben und im Inkubator bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Zellen werden 1 \times mit Dulbecco's PBS vorsichtig gewaschen und mit Zamboni-Fixierlösung (0,23% Pikrinsäure-Lsg., 1,33 M Paraformaldehyd, 0,125% NaOH-Lsg., in Phosphatpuffe [13,3% 200 mM NaH₂PO₄, 56,7% 200 mM Na₂HPO₄]) bei RT für 40 min auf dem Orbitalschüttler fixiert. Nach dem Fixieren werden die Zellen 3 \times 3 min mit PBS, pH 7,4, (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 70% Phosphatpuffer) gewaschen und für je 3 min mit 50% Methanol (eiskalt) und 100% Methanol (eiskalt) permeabilisiert. Die Zellen werden erneut 3 \times 3min mit PBS gewaschen und mit 350 μ l/Well 3% Goat Serum in PBS bei RT für 1 h auf dem Orbitalschüttler geblockt. Die Deckgläschen werden den Wells mit einer Pinzette entnommen, seitlich abgetupft und in eine Feuchtkammer auf Parafilm überführt. Jedes Deckgläschen wird unverzüglich mit 70 μ l Sekundärantikörper Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit IgG (Verdünnung 1:500) in 1% Normal Goat Serum in PBS beschichtet. Die Inkubation erfolgt lichtgeschützt bei RT für 1,5 Stunden. Die Deckgläschen werden seitlich abgetupft, auf einen Deckgläschenständer überführt und 2 \times 5 min mit PBS gewaschen. Auf einem Objektträger wird pro Deckgläschen ein Tropfen VectaMount vorgelegt. Das Deckgläschen wird dem Ständer entnommen seitlich und auf der Unterseite abgetupft und dann mit der Oberseite eingebettet.

3.3.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (Internalisierungs-ELISA)

Es werden 100.000 Zellen/Well in einer mit Poly-L-Lysin beschichteten 24-Well-Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 90-100% kultiviert. Der Primärantikörper wird 1:500 in opti-MEM verdünnt. Das Medium über den Zellen wird abgesaugt und der Primär-

antikörper rabbit anti-HA IgG (Verdünnung 1:500) in opti-MEM 200µl/Well zugegeben. Die Inkubation erfolgt in einer Feuchtkammer bei 4°C für 2 Stunden. Bei der Hintergrundkontrolle wird kein Primärantikörper zugegeben. Im Anschluss wird 1× mit Dulbecco's PBS gewaschen und der Ligand in DMEM-Medium (ohne Penicillin/Streptomycin) zu 250 µl/Well zugeben und im Inkubator bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Zellen werden 1× mit Dulbecco's PBS vorsichtig gewaschen und mit Zamboni-Fixierlösung (0,23% Pikrinsäure-Lsg., 1,33 M Paraformaldehyd, 0,125% NaOH-Lsg., in Phosphatpuffe [13,3% 200 mM NaH₂PO₄, 56,7% 200 mM Na₂HPO₄]) bei RT für 40 min auf dem Orbitalschüttler fixiert. Nach dem Fixieren werden die Zellen 3× 3 min mit PBS, pH 7,4, (10 mM Tris, 150 mM NaCl, 70% Phosphatpuffer) gewaschen. Die Zellen werden mit 250 µl/Well 3% Normal Goat Serum in PBS bei RT für 1 h auf dem Orbitalschüttler geblockt. Es werden 200 µl/Well Sekundärantikörper goat anti-rabbit IgG-HRP (Verdünnung 1:1.000) in 1% Normal Goat Serum in PBS zugegeben und bei RT für 1,5 Stunden auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Im Anschluss werden die Zellen 3× 3 min mit PBS gewaschen. Es werden 250 µl/Well Peroxidasesubstrat ABTS zugegeben und für 20-25 min bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Bei ablaufender Reaktion kommt es zu einem dunkelgrünen Farbumschlag. Nachdem die Reaktion ihre Sättigung erreicht hat, werden aus jedem Well 200 µl des Substrates mit einer Pipette abgehoben und in eine 96-Well Platte überführt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt bei 405 nm im Plate Reader.

3.3.3 cAMP Assay

Die einzelnen Lösungen für den Assay werden unter Verwendung des *Lance Ultra cAMP Assay Kit* frisch angesetzt. Um den cAMP Spiegel in den Zellen zu heben wird der DAMGO-Verdünnungsreihe (Endkonzentrationen in Zehnerpotenzschritten: 1×10^{-13} bis 1×10^{-4} M) in Stimulationspuffer (10 ml HBSS, 5 mM HEPES, 0,5 mM IBMX, 0,1% BSA Stabilizer solution) 15µM Forskolin zugegeben. Die 40 µl Pufferkontrolle, die 10 µl Forskolin Basiskontrolle und je 10 µl der DAMGO Verdünnung mit Forskolin werden in einer 96 Well Platte (½ Area, weiß) vorgelegt. Die Zellen werden in der Zellkulturflasche mit 10 ml Medium abgespült und 5 ml in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden in der Neubauerkammer ausgezählt und dann bei 500 g für 2 min abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in Stimulationspuffer (100.000 Zellen/ml) resuspendiert. Es werden

10 µl Zellsuspension (1.000 Zellen pro Well) mit der Achtkanal-Pipette auf der Platte zugegeben und für 30 min bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Im Anschluss werden 10 µl/Well 4× Eu-cAMP-Lsg. (1,8% Eu-cAMP tracer solution, 98,2% cAMP detection buffer) und 10 µl/Well 4× ULight-anti-cAMP-Lsg. (0,6% ULight-anti-cAMP stock solution, 99,4% cAMP detection buffer) mit der Multipette zugeben und 1 Stunde lichtgeschützt bei RT auf dem Orbitalschüttler inkubiert. Die Messung des TR-FRET Signals erfolgt mit dem Plate Reader.

Protokoll Parameter für *SoftMax Pro*:

Endpoint: Time Resolved, Integ Delay 50µs, Integration 100 µs, Top read
 Wavelengths: Lm1: Ex 340 nm Em 615 nm Cutoff 610
 Lm2: Ex 340 nm Em 665 nm Cutoff 630
 Sensitivity: Readings 100, PMT: Auto
 Assay Plate Type: 96 Perkin Elmer Half Area white
 Auto calibrate: on

Korrektur des FRET-Signals bei 665 nm:

$$F665k = ((F665s - F665p) \times F615m) / F615s$$

F665k = F665 nm korrigierter Wert
 F665s = F665 nm Sampel Wert (Well)
 F665p = F665 nm Puffer Wert (Pufferhintergrund)
 F615m = F665 nm maximum Wert (maximale Entkopplung)
 F615s = F615 nm Sampel Wert (Well)

3.4 Methoden der Mikrobiologie

3.4.1 Kultivierung von Bakterien (Agarplatten und Flüssigkultur)

Für Agarplatten wird LB-Agar (3,2% Lennox L Agar) autolaviert und auf unter 40°C abgekühlt. Das Ampicillin (Endkonz. 100 µg/ml) wird zugegeben und auf dem Magnetrührer zügig vermischt. Der warme Agar wird in Kunststoffpetrischalen (Polystyrol, Ø 90 mm, mit Belüftungsnocken) gegossen, so dass der Boden der Schale vollständig benetzt ist. Nachdem der Agar fest ist, werden die Platten mit dem Deckel nach unten gestapelt und bei 4°C für 6-8 Wochen gelagert. Angeimpfte Platten werden bei 37°C inkubiert, bis Bakterienkolonien

sichtbar werden. Die Bakterien können auf den Platten für einige Wochen bei 4°C gelagert werden.

Für die Flüssigkultur wird eine Kolonie von einer Agarplatte gepickt, oder ein Abstrich aus einer Glycerinkultur entnommen. Es werden 3 ml (Minipräp) oder 30 ml (Vorkultur für Maxipräp) LB-Medium (2% LB Broth Base) inkubiert. Zuvor wird dem Medium entsprechend der verwendeten Bakterien ein Antibiotikum zugegeben. Die Kultur wird über Nacht bei 37°C geschüttelt und kann dann für die weitere Verwendung genutzt werden. Die Flüssigkultur erfolgt aerob, deshalb sollte bei der Verwendung von Zentrifugenröhrchen darauf geachtet werden, dass eine genügende Luftzufuhr gewährleistet ist.

3.4.2 Glycerinkultur von Bakterien

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden 200 µl Glycerol durch langsames Pipettieren vorgelegt. Im Anschluss werden 900 µl einer Flüssigkultur hinzu gegeben und mit der Pipette durch mehrmaliges, langsames Triturieren mit dem Glycerin vermischt. Die Glycerinkultur wird bei -70°C bis -80°C gelagert.

3.4.3 Herstellen chemisch kompetenter Bakterienzellen

Für eine Übernachtskultur werden 30 ml LB-Medium ohne Antibiotikum mit Bakterienzellen angeimpft. Die Vorkultur wird in einen Kolben zu 400 ml LB-Medium gegeben und bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ bis $0,6$ wachsen gelassen. Der Kolben wird für 5 min auf Eis gekühlt und die Flüssigkultur im Anschluss in sechs frische 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden bei 4°C für 10 min bei 4.000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen auf Eis in 80 ml 100 mM $MgCl_2$ hexahydrat (eiskalt) resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Die Suspension wird in zwei frische 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und erneut bei 4°C für 10 min bei 4.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen auf Eis in 4 ml Resuspensionslösung (100 mM $CaCl_2$ dihydrat, 15% Glycerol) (eiskalt) resuspendiert. Die Suspension wird in gekühlte 1,5 ml Reaktionsgefäße auf Eis zu je 200 µl aliquotiert und sofort in einem Dewargefäß in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die

kompetenten Zellen werden bei -80°C gelagert. Die Kompetenz wird über Retransformation mit Plasmid-DNA getestet.

3.5 Methoden der Zellkultur

3.5.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

HEK 293 und HEK tsA Medium:

89%	(v/v 445 ml/500 ml)	DMEM 4,5 g/ml Glucose
10%	(v/v 50 ml/500 ml)	FBS
1%	(v/v 5 ml/500 ml)	100× L-Glutamin, Penicilin, Streptomycin-Lsg.
1,2%	(v/v 6 ml/500 ml)	50 mg/ml G418-Lsg. (<i>nur für stabil transfizierte Zellen</i>)

Die Zellen werden in 75 cm^2 Flaschen in 10 ml Kulturmedium im Inkubator bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Arbeiten mit den Zellen werden unter der Reinraumbank durchgeführt. Die adherenten Zellen wachsen auf dem Flaschenboden als Monolayer und sterben nach Erreichen einer vollständigen Konfluenz ab. Daher ist es erforderlich, die Zellen ab 80% Konfluenz zu Splitten. Die Zellen werden mit der Pipette mit 10 ml Medium vom Boden der Flasche abgespült. Die Suspension wird bis auf 1 ml abgesaugt und mit 9 ml frischem Medium komplettiert.

3.5.2 Einfrieren und Auftauen von Kulturzellen

Die Zellen werden bei 80% Konfluenz mit 10 ml Medium in der Kulturflasche abgespült, in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 500 g für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird verworfen und das Pellet wird in 5 ml Einfriermedium (10% Dimethylsulfoxid, 15% Foetal Bovine Serum, 75% DMEM) zu ca. 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Es wird je 1 ml der Suspension in Kryoröhrchen überführt. Die Röhrchen werden im Isopropanolständer bei -70°C bis -80°C langsam eingefroren. Die Kryoröhrchen werden nach drei Tagen in normale Kryolagerboxen bei -70°C bis -80°C überführt.

Zum auftauen wird das Kryoröhrchen in der Hand aufgewärmt. Sobald das Einfriermedium schmilzt wird es in eine $\varnothing 60\text{ mm}$ Kulturschale mit 4 ml Medium mit Zusätzen überführt. Die Schale wird leicht geschwenkt und die Zellen im Inkubator kultiviert. Das

Medium wird täglich gewechselt. Ab 80% Konfluenz können die Zellen in eine 75m² Kulturflasche überführt werden.

3.5.3 Poly-L-Lysin Beschichtung von Oberflächen für die Zellkultur

Um den Zellen während Medienwechseln und Waschschritten einen besseren Halt zu geben, werden Kunststoff und Glasoberflächen mit Poly-L-Lysin-Hydrobromid (SL: 0,1 g/ml, Endkonz: 0,1 mg/ml) für 15 min beschichtet. Im Anschluss wird 3× mit autoklaviertem Wasser gewaschen und die Oberfläche dann bei RT 1h getrocknet. So behandelte Materialien können bei 2-8°C für 1 Jahr gelagert werden.

3.5.4 Transfektion von Kulturzellen mit Polyethylenimin

Die Zellen können in Poly-L-Lysin beschichteten Wells oder auf Deckgläschen transfiziert werden. Die Zellen werden dafür in Medium mit Zusätzen, aber ohne Antibiotikum über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transfektionsansatz (für eine 12-Well-Platte, pro Well):

200 µl DMEM ohne Zusätze,
3 µg DNA
7,5 µl 40 µM Polyethylenimin (Pei)-Lsg., pH 7

Damit das kationische Pei mit der DNA einen Komplex bilden kann, wird der Ansatz bei RT für 30 min inkubiert. Das Medium wird von den Zellen abgesaugt und durch 800 µl DMEM mit Zusätzen, aber ohne Antibiotikum ersetzt. Der Ansatz wird hinzu gegeben und die Zellen auf Grund der Toxizität des Pei nicht länger als 3-5 Stunden inkubiert. Das Medium wird abgesaugt, die Zellen mit Dulbecco's PBS gewaschen und im Anschluss je nach Verwendung weiter präpariert.

3.5.5 Transfektion von Kulturzellen mit Lipofectamine

Die Zellen werden nach Herstellerprotokoll des *LipofectamineTM 2000 Reagent* mit Plasmid-DNA transfiziert. Zur Transfektion werden die Zellen in einer 12-Well-Platte (150.000 Zellen/Well) oder einer 6-Well-Platte (300.000 Zellen/Well) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Wegen der Toxizität des Lipofectamins werden die Zellen nicht länger als 3-4 h inkubiert. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und mit frischem Medium versorgt.

3.5.6 Herstellen stabil exprimierender Kulturzellen

Zur Generierung von stabil exprimierenden Zellen wird 24 h nach Transfektion der Zellen mit Lipofectamin auf Medium mit eukaryotischem Selektionsantibiotikum gewechselt. Das Medium wird täglich gewechselt. Bei 80-90% Konfluenz werden die Zellen gesplittet und auf Ø 10 cm Kulturschalen weiter kultiviert. Da die Zellen Resistenz entwickeln und behalten können, ohne gleichzeitig das gewünschte Protein zu exprimieren, muss die stabile Expression stets kontrolliert werden.

3.6 Methoden der Immunhistochemie

3.6.1 Immunhistochemie an murinen Gewebeschnitten

Die Mäuse werden mit Ether betäubt, getötet, das Gehirn mit dem Rückenmark entfernt und in 10% gepuffertem Formaldehyd fixiert. Nach dem Fixieren wird das Gewebe in Parafin eingebettet. Mit dem Mikrotom werden 5 µm Schnitte angefertigt und auf positiv geladene Objektträger gespült. Die Schnitte werden in 10 mM Citronensäure (pH 6,0) für 16 min bei 600 W in der Mikrowelle vom Parafin befreit. Die Schnitte werden über Nacht bei 4°C mit rabbit anti-MOR IgG {UMB-3} (Verdünnung 1:10) inkubiert und 5 min mit 1% BSA in PBS gewaschen. Die weitere Detektion erfolgt unter Verwendung des *Vectastain ABC Elite Kits*. Die Schnitte werden mit biotinyliertem anti-rabbit IgG für 30 min inkubiert und 5 min mit 1% BSA in PBS gewaschen. Zur Bindung an das Biotin wird das Peroxidase-konjugierte-Avidin

(Verdünnung 1:20) für 30 min inkubiert und 5min mit 1% BSA in PBS gewaschen. Die Anfärbung erfolgt mit 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in Acetat Puffer für etwa 5 min mit anschließendem Waschen mit 1% BSA in PBS. Zum Schluß werden die Schnitte auf Objektträgern mit Vectamount eingebettet.

3.7 Tierhaltung und Verhaltensversuche

Haltung und Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den Gesetzen der Bundesrepublik Deutschland und der European community regulation.

Alle Versuche wurden an männlichen Mäusen im Alter von 12-16 Wochen (25-30g) durchgeführt. Die Tiere wurden in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus in Plastik-käfigen bei Raumtemperatur $22 \pm 2^\circ$ und Luftfeuchtigkeit $50 \pm 10^\circ\text{C}$ gehalten und hatten dabei freien Zugang zu Zuchtdiät Pellets Altromin 1316 (Altromin, Lage) und Wasser *ad libitum*.

3.7.1 Verhaltensversuche im Hot Plate Test

Die Mäuse werden auf eine Hot Plate bei 56°C gesetzt und ihr Verhalten beobachtet. Um die analgetische Wirkung des Morphins zu bestimmen, wird das Tier zuvor mit Morphin, gelöst in physiologischer Kochsalzlösung, subkutan gespritzt (10 ml/kg). Das Experiment wird abgebrochen, sobald das Tier beginnt, mit den Hinterläufen zu zucken, oder diese zu lecken. Um Verletzungen des Gewebes zu vermeiden, wird die Verweildauer des Tieres auf der Platte zeitlich beschränkt und das Tier nach spätestens 30 Sekunden wieder von der Platte genommen, auch wenn es bis dahin keine entsprechende Reaktion gezeigt hat. Deshalb wird die Reaktionszeit des Tieres als *maximaler zu erwartender Effekt (maximal possible effect, MPE)* in Prozent angegeben und nach folgender Formel berechnet: $(\% \text{ MPE}) = 100 \times ([\text{Reaktionszeit mit Analgetikum} - \text{Reaktionszeit ohne Analgetikum}] / 30\text{s} - \text{Reaktionszeit ohne Analgetikum})$.

3.7.2 Verhaltensversuch zur Abhängigkeit

Den Tieren wird über einen Zeitraum von 10 Tagen 2× täglich mit steigender Dosierung Morphin (10-100 mg/kg) oder Etonitazen (10-100 µg/kg) subkutan injiziert. Dann wird ein akuter Entzug mit Naloxon (0,02, 0,2 und 1 mg/kg) ausgelöst. Das Verhalten der Tiere wird im Blindversuch durch einen unabhängigen Beobachter überwacht. Die Häufigkeit von Entzugszeichen werden dabei registriert. Als Entzugszeichen gelten Springen, Schütteln (wet dog shakes), Tremor der Läufe, Durchfall und Gewichtsverlust durch geringere Nahrungsaufnahme.

3.7.3 Herstellung der MOR S375A Knockin-Maus

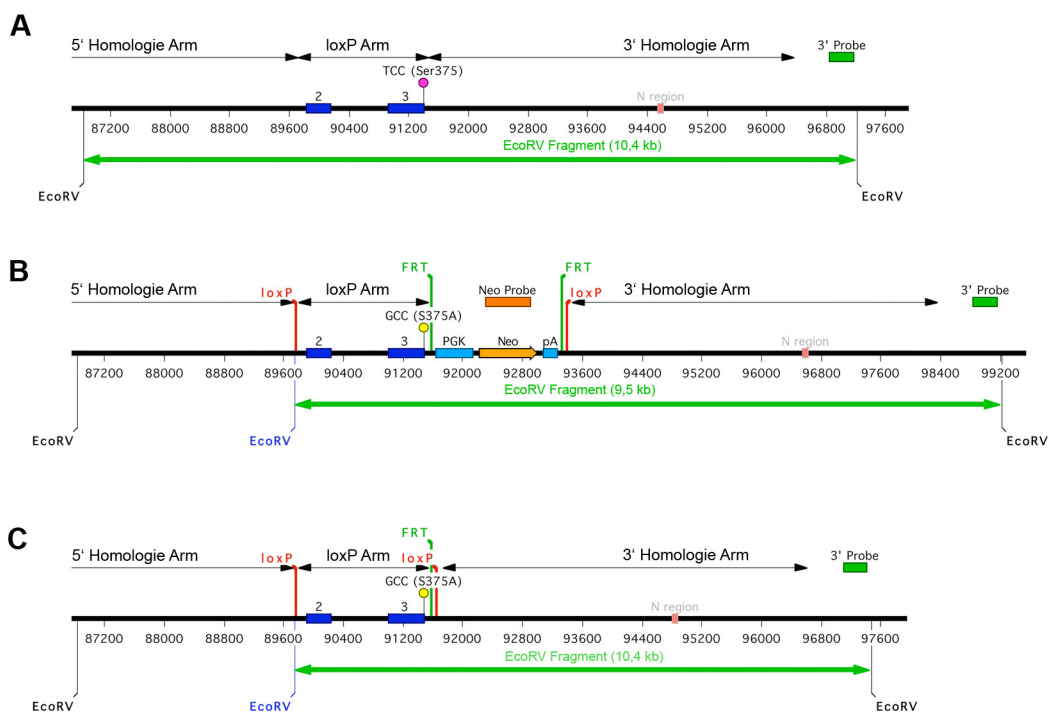


Abb. 3-1: Herstellung der MOR S375A Knockin-Maus. Die MOR S375A Knockin-Maus wurde bei Ozone (Bentley DC, Australia) in Auftrag gegeben. In der Abbildung ist der Austausch des Sequenzabschnittes schematisch dargestellt. (A) Genomische Zielsequenz. (B) Durch homologe Rekombination wurde ein Sequenzabschnitt des OPRM1 Gens ausgetauscht. Dieser enthält dabei die gewünschte Mutation, die an Stelle des S375 für A375 (S575A) codiert. Zur Selektion Embryonaler Stammzellen auf einen erfolgten Sequenzaustausch wurde in das Intron nach Exon 3 (dunkelblau) zusätzlich eine FRT-Site flankierte Neomycin-Kassette (Neo) eingebracht. (C) Diese wurde später mit der FLP-Rekombinase an den FRT-Sites (FRT) ausgeschnitten. In den Intronsequenzen bleiben eine FRT-Site und die beiden loxP-Sites (loxP) zurück.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der MOR S375A Knockin-Maus

4.1.1 Genotypisierung der MOR^{S375A} Maus

Bei der Generierung der MOR S375A Knockin-Maus (MOR^{S375A} Maus) durch OZGENE wurde das Exon 3 des OPRM1 Gens mit der Punktmutation des Codons „tcc“ zu „gcc“ (entsprechend der Codierung der Proteinsequenz Serin 375 zu Alanin 375) durch Rekombination als Knockin eingebracht. Um die Mäuse hinsichtlich ihres Genotyps für die Zucht oder die experimentale Auswahl bestimmen zu können, wurde ihre DNA in der PCR mit geeigneten Primern überprüft.

Dazu wurde die genomische DNA der MOR^{S375A} Mäuse durch Verdauung des Gewebes der Schwanzspitze und anschließende Phenol/Chloroformfällung isoliert. Um den Genotyp zu bestimmen, wurde mittels der Primer T_mOPRM1_üLoxS2_for_01 und T_mOPRM1_üLoxS2_rev_01 über PCR jene Stelle des Genoms amplifiziert, die bei den Knockin-Tieren die im Intron verbliebene loxP-Site trägt. Die PCR-Produkte wurden dann über Elektrophorese aufgetrennt. Bei wildtypischen Tieren (MOR^{+/+}) findet sich eine 367 bp große Bande, bei homozygoten Knockin-Tieren (MOR^{S375A/S375A}) eine 537 bp Bande und bei heterozygoten Knockin-Tieren (MOR^{+/S375A}) finden sich beide Banden. In Abbildung 4-1 ist eine Typisierung der drei Genotypen über PCR gezeigt.

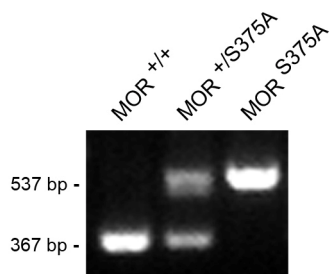


Abb. 4-1: Genotypisierung der MOR^{S375A} Maus. Die genomische DNA der Mäuse wurde aus Schwanzgewebe isoliert und mit entsprechenden PCR-Primern über die loxP-Site im Bereich des Exon 3 des OPRM1 Gens in der PCR amplifiziert. Die PCR Produkte sind hier auf einem Agarosegel aufgetragen und zeigen die drei

möglichen Maus Genotypen. Die untere Bande bei 367 bp entspricht einer wildtypischen Maus DNA, die obere Bande bei 537 bp einer homozygoten Knockin-Maus DNA und die Doppelbande einer heterozygoten Knockin-Maus DNA.

4.1.3 Lokalisation des MOR im Rückenmark der MOR^{S375A} Maus

Um die MOR^{S375A} Mäuse hinsichtlich der Rezeptorverteilung im Gewebe zu untersuchen, wurden sie mit den Wildtypen (MOR^{+/+}) und mit MOR Knockout-Mäusen (MOR^{-/-}) verglichen. Den Tieren wurden Teile des Rückenmarks entnommen und immunhistochemisch mit anti-MOR Antikörper {UMB-3} markiert. Abbildung 4-3 zeigt die Lokalisation des μ -Opioid Rezeptors im Gewebe. Während in den Knockout Tieren, wie zu erwarten, kein MOR nachgewiesen werden kann, zeigen die Knockin-Tiere eine vergleichbare Verteilung und Dichte des MOR im untersuchten Gewebe.

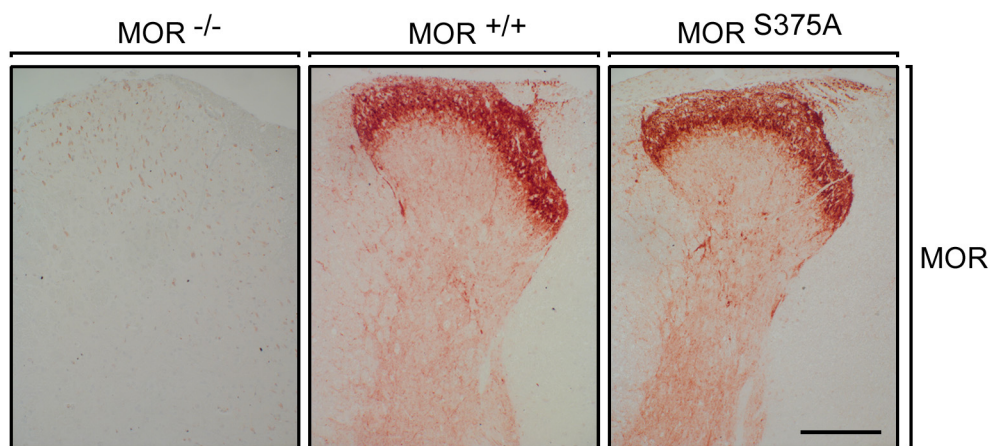


Abb. 4-3: Lokalisation des μ -Opioid Rezeptors im Rückenmark bei Mäusen. Die Abbildung zeigt einen Vergleich der Verteilung und Dichte des MOR im Rückenmark an MOR Knockout-Mäusen (MOR^{-/-}), an Wildtypen (MOR^{+/+}) und S375A Knockin-Mäusen (MOR^{S375A}). Den Tieren wurde das Rückenmark entnommen und der Rezeptor an Gewebeschnitten immunhistochemisch markiert. Als Primärantikörper wurde rabbit anti-MOR Antikörper {UMB-3} verwendet. An diesen wurde unter Verwendung des *Vectastain ABC Elite Kits* biotinyliertes anti-rabbit IgG und Peroxidase-konjugiertes Avidin komplexiert. Die Detektion erfolgte mit AEC. In den Knockout Tieren ist der Rezeptor nicht nachweisbar. Bei den Knockin-Tieren zeigt der Rezeptor eine vergleichbare Verteilung und Dichte wie in den wildtypischen Tieren. (Maßstab: 200 μ m)

4.1.4 Agonistinduzierte S375 Phosphorylierung des MOR *in vivo*

Das Morphin am MOR einzig eine Phosphorylierung des Serin 375 induziert wurde bereits im heterologen System an Zellen gezeigt. Diese Erkenntnis war ausschlaggebend für die Generierung der MOR S375A Knockin-Maus. Um den in Kulturzellen gewonnen Befund *in vivo*

zu bestätigen, wurden MOR^{S375A} Mäuse mit Wildtypen verglichen. Nach dem den Tieren Morphin (30 mg/kg, subkutan), Etonitazen (30 µg/kg, subkutan) oder zur Kontrolle Kochsalzlösung injiziert wurde, wurden sie nach 30 min betäubt, getötet und das Gehirn entnommen. Das Cerebellum wurde entfernt, das Gewebe homogenisiert und die Zellen lysiert. Der Rezeptor wurde aus dem Lysat über Immunpräzipitation mit {UMB-3} aufgereinigt und schließlich im Westernblot mit dem phosphospezifischen Antikörper {GP2} detektiert. Der Blot wurde gestrippt und mit dem nicht phosphorylierungsabhängigen MOR Antikörper {GP6} inkubiert, um den Gesamtrezeptor zu zeigen.

Der Blot (Abb.4-4) zeigt, dass entgegen der Kontrolle, nach Stimulation mit beiden Agonisten der MOR Rezeptor im Wildtyp auch *in vivo* im Maushirn an S375 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung kann in der MOR^{S375A} Maus im Gegensatz zum Wildtyp nicht nachgewiesen werden und bestätigt die Mutation auf Proteinebene.

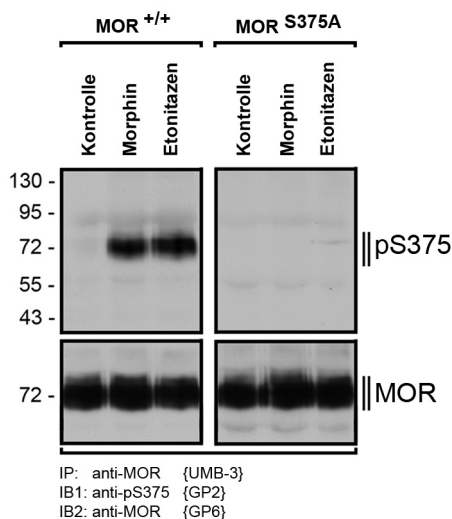


Abb. 4-4: Agonistinduzierte S375 Phosphorylierung des μ -Opioid Rezeptors im Maushirn. Der Westernblot zeigt einen Vergleich der S375 Phosphorylierung nach Injektion von Morphin oder Etonitazen, sowie Kochsalzlösung als Kontrolle in wildtypischen Mäusen (MOR^{+/+}) und MOR S375A Knockin-Mäusen (MOR^{S375A}). Die Tiere wurden 30 min nach subkutaner Injektion betäubt, getötet und das Gehirn entnommen. Das Gewebe wurde homogenisiert, die Zellen lysiert und der Rezeptor über Immunpräzipitation mit {UMB-3} aufgereinigt. Als Primäantikörper wurde der phosphospezifische guinea pig anti-pS375 Antikörper {GP2} verwendet. Zur Kontrolle wurde der Blot gestrippt und mit nicht phosphorylierungsabhängigem guinea pig anti-MOR Antikörper {GP6} inkubiert. Der Blot zeigt, dass in wildtypischen Mäusen im Gegensatz zur Kontrolle beide Agonisten eine Phosphorylierung des Rezeptors an S375 induzieren. Bei Knockin-Mäusen kann erwartungsgemäß keine Phosphorylierung detektiert werden. Die Ergebnisse bestätigen das Vorhandensein der Mutation auf Proteinebene bei den Knockin-Mäusen, sowie die Phosphorylierung des S375 *in vivo* im WT.

4.1.5 Schmerzverhalten der MOR^{S375A} Maus im Hot Plate Test

Das Schmerzverhalten der Knockin-Mäuse wurde mit dem der Wildtypen im Hot Plate Test verglichen. Abbildung 4-5.A zeigt, dass die basale Schmerzschwelle in beiden Linien gleich ist. Die Latenzzeit auf der Platte nimmt dabei mit steigender Temperatur ab. Die Tiere reagieren entsprechend gleich auf den erhöhten Schmerzreiz.

In Abbildung 4-5.B ist die Reaktion der Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach Morphininjektion gezeigt. Der Kurvenverlauf der Knockin-Mäuse ist dabei mit dem der Wildtypen vergleichbar. In beiden Fällen zeigt sich ein starker analgetischer Effekt nach Morphinapplikation innerhalb der ersten 45 Minuten. Dieser Effekt fällt dann stetig auf den basalen Wert zurück. Ein stärkerer analgetischer Effekt ist bei den Knockin-Mäusen nicht zu beobachten.

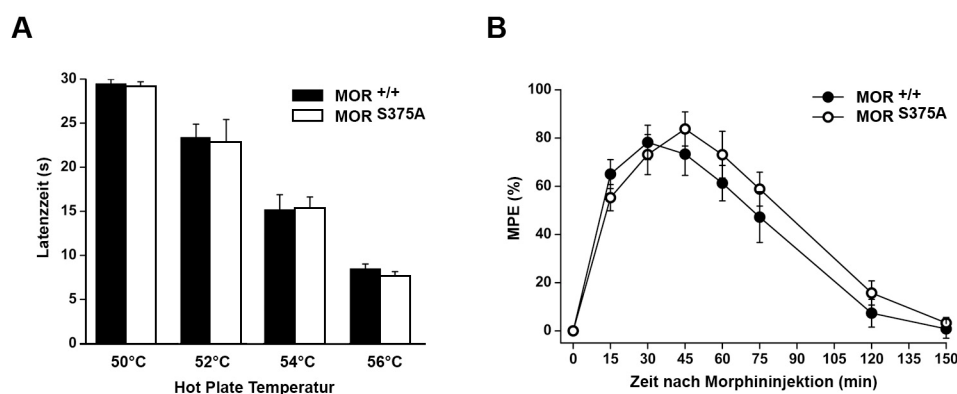


Abb. 4-5: Schmerzverhalten der MOR^{S375A} Maus im Hot Plate Test. Vergleich der MOR S375A Knockin-Mäuse (MOR^{S375A}) mit wildtypischen Mäusen (MOR^{+/+}) im Hot Plate Test. **(A)** Basale Latenzzeiten der Tier auf der Hot Plate. Beide Gruppen zeigen ein vergleichbares Schmerzprofil hinsichtlich der Latenzzeiten bei unterschiedlichen Temperaturen. **(B)** Nach Morphin Injektion zeigt sich bei beiden Gruppen ein vergleichbarer analgetischer Effekt. Dieser ist über die ersten 45 min nach Injektion am stärksten und fällt dann ähnlich schnell auf den basalen Wert zurück.

4.1.6 Chronische Morphin Toleranz der MOR^{S375A} Maus

Von besonderem Interesse war das Verhalten der Knockin-Maus hinsichtlich der chronischen Toleranz. Dafür wurden die Tiere im Vergleich zu den Wildtypen über mehrere Tage zweimal täglich mit Morphin gespritzt und der analgetische Effekt des Morphins im Hot Plate Test

bestimmt. Abbildung 4-6 zeigt, dass die analgetische Wirkung des Morphins bereits am zweiten Tag abnimmt und sich am dritten Tag auf einem anhaltenden Level einpendelt. Die Knockin-Maus entwickelt dabei die gleiche chronische Toleranz wie der Wildtyp.

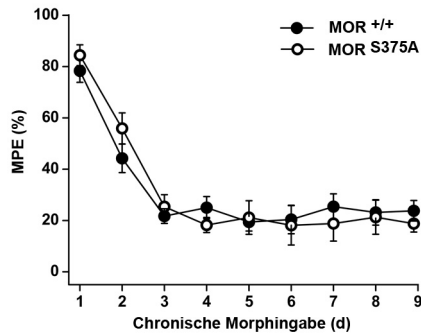


Abb. 4-6: Chronische Morphintoleranz bei MOR^{S375A} Mäusen. Der Graph zeigt den analgetischen Effekt nach chronischer Gabe von Morphin über mehrere Tage. Die Wildtypen (MOR^{+/+}) und MOR S375A Knockin-Mäuse (MOR^{S375A}) zeigen dabei eine gleiche Toleranz gegenüber dem Morphin. Die analgetische Wirkung sinkt bereits in den ersten drei Tagen ab und pendelt sich dann auf einem vierfach niedrigerem Wert ein.

4.1.7 Abhängigkeitsverhalten der MOR^{S375A} Maus

Ein weiteres beobachtbares Phänomen, das nach chronischer Morphingabe eintritt, ist die Abhängigkeit, die bei Absetzen des Morphins zu Entzugserscheinungen führt. Um die Abhängigkeit zu untersuchen, wurde MOR S375A Knockin-Mäusen und wt Mäusen über zehn Tage zweimal täglich subkutan in steigender Dosierung Morphin (10-100 mg/kg) oder Etonitazen (10-100 µg/kg) injiziert. Daraufhin wurde durch Verabreichung von Naloxon (0,02, 0,2 und 1 mg/kg) akuter Entzug ausgelöst. Im Anschluss wurden die Tiere beobachtet und die Häufigkeit von Entzugserscheinungen ausgewertet. Verhaltensmuster wie Springen, Schütteln (wet dog shakes), Tremor der Pfoten, Durchfall und Fressverhalten wurden dabei einzeln bestimmt. In Abbildung 4-7 sind die Häufigkeiten der jeweiligen Entzugszeichen für beide Gruppen angegeben. Ein signifikanter Unterschied findet sich nicht. Das Abhängigkeitsverhalten der MOR S375A Knockin-Mäuse scheint unverändert.

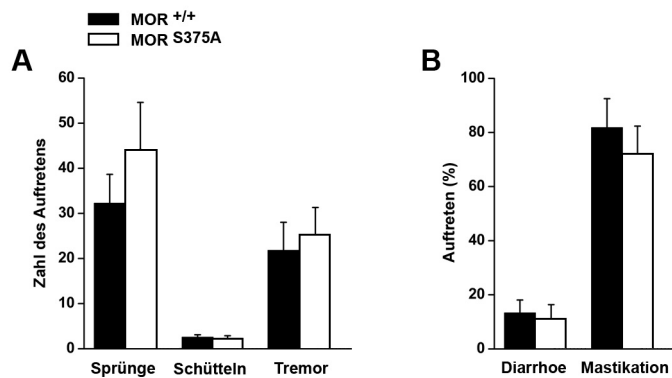


Abb. 4-7: Abhängigkeitsverhalten der MOR^{S375A} Maus. Bei Wildtypen (MOR^{+/+}) und MOR S375A Knockin-Mäusen (MOR^{S375A}) wurde über zehn Tage 2× täglich subkutan Morphin (10-100 µg/kg) injiziert. Akuter Entzug wurde durch Naloxon (0,02, 0,2 und 1 mg/kg) ausgelöst. Die Tiere wurden beobachtet und die Häufigkeit bestimmter Entzugszeichen wie Sprünge, Schütteln (wet dog shakes) und Tremor der Läufe registriert. In beiden Gruppen treten keine signifikanten Unterschiede auf. Die MOR S375A Knockin-Mäuse zeigen ein gegenüber dem Wildtyp unverändertes Entzugsverhalten.

4.2 Bedeutung der MOR Phosphorylierung für die Internalisierung, Downregulierung und Aktivierung des Rezeptors

Um die grundlegende Bedeutung der MOR Phosphorylierung, bzw. die Abhängigkeit bestimmter Prozesse von dieser zu untersuchen, wurden alle elf potentiellen Phosphorylierungsstellen des C-Terms durch Alanin ersetzt (T354A, S355A, S356A, T357A, S363A, T370A, S375A, T376A, T379A, T383A, T394A). Der Einfachheit halber wurde diese total phosphorylierungsdefiziente Mutante MOR T354A-T394A abgekürzt. Um die für die Internalisierung wichtigen Phosphorylierungsstellen zu identifizieren, wurden weitere Rezeptormutanten erzeugt und analog benannt. Entsprechend der Literatur war die Phosphorylierung des Serin 375 bereits bekannt. Als weitere potentielle Phosphorylierungsstellen wurden das benachbarte Threonin 370 und das Serin 363 diskutiert. Ausgehend von der MOR T354A-T394A Mutante wurde der Umfang der gegen Alanin ausgetauschten Serin- und Threoninreste in Richtung dieser drei Phosphorylierungsstellen eingeschränkt. So wurden die Varianten MOR S363A-T383A (S363A, T370A, S375A, T376A, T379A, T383A) und MOR S363A-S375A (S363A, T370A, S375A) generiert.

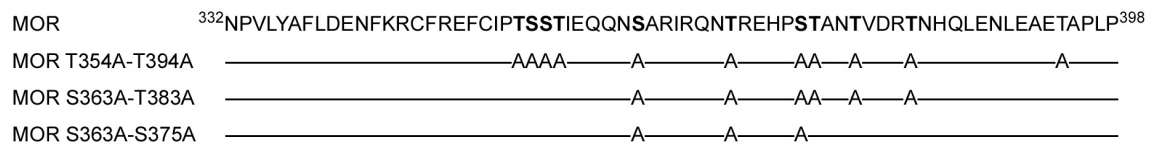


Abb. 4-8: Sequenzänderungen der Rezeptormutanten. Gezeigt ist die abschließende Sequenz (N332-P398) des C-Terminus des MOR. Threonine und Serine sind als potentielle Phosphorylierungsstelle fett hervorgehoben. Zur Erzeugung einer total phosphorylierungsdefizienten Mutante MOR T354A-T394A wurden alle Serine und Threonine gegen Alanin ausgetauscht. Für die beiden anderen Rezeptormutanten MOR S363A-T383A und MOR S363A-S375A wurden nur ausgewählte Serine und Threonine ausgetauscht. Der Umfang der Mutationen wurde dabei bis auf S363A, T370A und S375A eingeschränkt.

4.2.1 Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Internalisierung des Rezeptors

Um das Internalisierungsverhalten der Rezeptormutanten zu untersuchen, wurde die agonistvermittelte Internalisierung in stabil exprimierenden Zellen qualitativ in der Fluoreszenzmikroskopie und quantitativ im Internalisierungs-ELISA bestimmt. In beiden Versuchen wurden die Zellen mit dem Primärantikörper rabbit anti-HA IgG vorinkubiert und dann jeweils 30 min mit den verschiedenen Agonisten stimuliert. Nach Fixieren der Zellen wurde mit dem Sekundärantikörper goat anti-rabbit IgG-Alexa488 (Fluoreszenzmikroskopie) oder goat anti-rabbit IgG-HRP (ELISA) inkubiert.

Die LSM Aufnahmen (Abb. 4-9) zeigen die Lokalisation der Rezeptoren nach Stimulation mit 10 μ M Morphin, 10 μ M DAMGO, 1 μ M Fentanyl und 1 μ M Etonitazen. Morphin führt erwartungsgemäß zu keiner Internalisierung des MOR. Dies ändert sich auch nicht für die mutierten Rezeptoren. Während der wildtypische Rezeptor nach DAMGO, Fentanyl und Etonitazen eine deutliche Internalisierung zeigt, bleibt der mutierte MOR T354A-T394A auch nach Zugabe dieser Agonisten membranständig. Der MOR S363A-T383A verhält sich dabei wie der MOR T354A-T394A und zeigt ebenfalls keine Internalisierung in Gegenwart dieser drei Agonisten. Bei MOR S363A-S375A hingegen weicht das Internalisierungsverhalten vom MOR und den anderen Rezeptormutanten ab. Während Etonitazen eine unvermindert starke Internalisierung des Rezeptors induziert, führt DAMGO zu einer verringerten, aber immer noch erkennbaren Internalisierung. Fentanyl scheint keine erkennbare Wirkung mehr in Bezug auf die Internalisierung zu haben. Da sich bereits auf Stufe des MOR S363A-T383A keine Internalisierung mehr zeigt und sich der MOR S363A-S375A abweichend vom wild-

typischen Rezeptor verhält, deutet dies auf die Bedeutung dieses Sequenzabschnittes für die Internalisierung hin.

In den Zellen, auch bei den Kontrollen, finden sich häufig leuchtende Spots. Möglicherweise zeigt sich hier eine basale Endozytose des Rezeptors, bzw. handelt es sich um ein Relikt der Rezeptorüberexpression in den Zellen. Wesentlich ist jedoch, dass bei einer

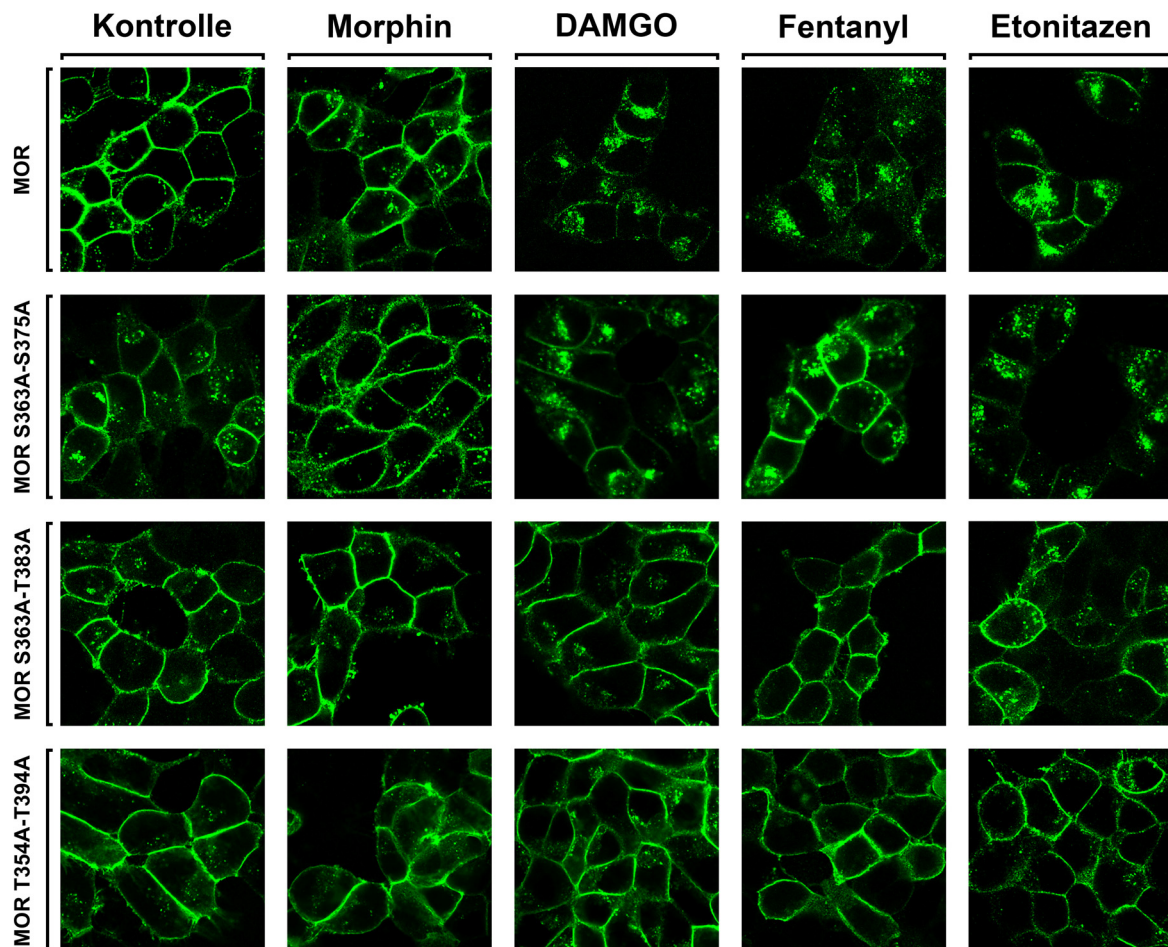


Abb. 4-9: Immunlokalisierung des MOR in HEK 293 Zellen nach Agonistestimulation. MOR (Reihe 1), MOR S363A-S375A (Reihe 2), MOR S363A-T383A (Reihe 3) und MOR T354A-T394A (Reihe 4) in fixierten, stabil exprimierenden Zellen. Die Zellen wurden jeweils 30 min mit 10 μ M Morphin (Spalte 2), 10 μ M DAMGO (Spalte 3), 1 μ M Fentanyl (Spalte 4) oder 1 μ M Etonitazen (Spalte 5) stimuliert. Die Rezeptoren wurden über ihren HA-Tag mit rabbit anti-HA IgG und goat anti-rabbit IgG-Alexa488 im LSM detektiert. Der MOR internalisiert deutlich nach DAMGO, Fentanyl und Etonitazen. Morphin führt zu keiner Internalisierung. MOR S363A-T383A und MOR T354A-T394A bleiben in Gegenwart aller Agonisten membranständig. Bei MOR S363A-S375A zeigen sich auffällige Unterschiede zum MOR und den beiden anderen Rezeptormutanten. Bei DAMGO ist die Internalisierung abgeschwächt, aber immer noch deutlich. Bei Fentanyl ist keine Internalisierung zu erkennen, während die Wirkung des Etonitazens unverändert bleibt.

agonistinduzierten Internalisierung die Membranlokalisation deutlich abnimmt. Bei MOR S363A-S375A treten diese Spots verstärkt auf, daher ist hier die Abnahme der Membranfärbung der wichtigste Indikator einer agonistabhängigen Internalisierung. Nach Fentanyl wirken die Spots bei MOR S363A-S375A zwar stärker, doch die Membranlokalisation scheint weiterhin unverändert.

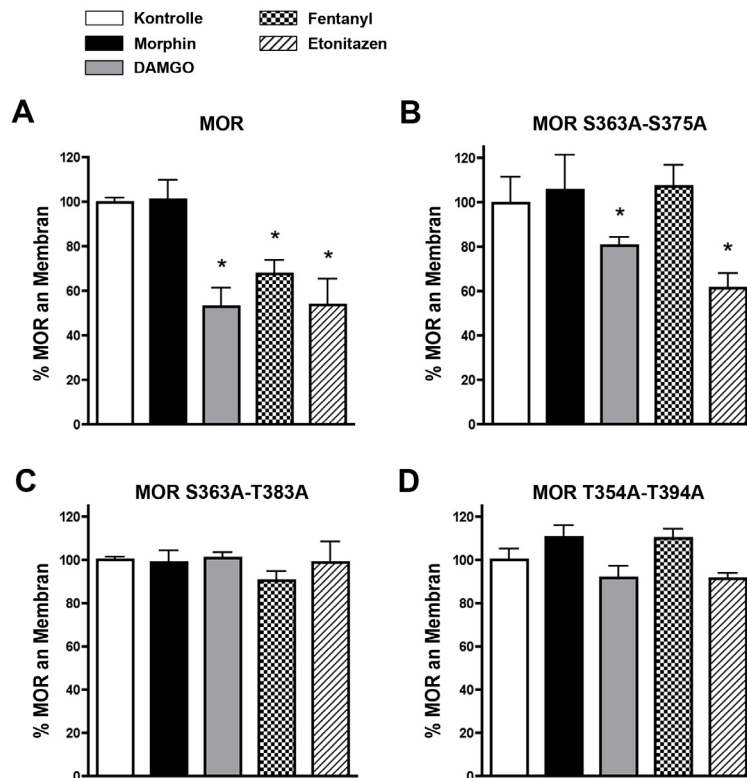


Abb. 4-10: ELISA-Daten, Internalisierung des MOR in HEK 293 Zellen nach Agoniststimulation. MOR, MOR S363A-S375A, MOR S363A-T383A und MOR T354A-T394A wurden in stabil exprimierenden Zellen für jeweils 30 min mit 10 μ M Morphin, 10 μ M DAMGO, 1 μ M Fentanyl oder 1 μ M Etonitazen stimuliert. Die Zellen wurden fixiert und die an der Membran verbliebenen Rezeptoren über ihren HA-Tag mit rabbit anti-HA IgG und goat anti-rabbit IgG-HRP unter Zugabe von ABTS im Plate Reader detektiert. Der MOR (A) zeigt entsprechend der Potenz der jeweiligen Agonisten unterschiedliche Internalisierungsraten. Diese liegen bei Morphin im Bereich des unstimulierten Rezeptors, bei DAMGO um die 50%, bei Fentanyl um die 30% und bei Etonitazen um die 50%. Beim MOR S363A-T383A (C) und MOR T354A-T394A (D) unterscheiden sich die Internalisierungsraten allerdings nicht von den unstimulierten Kontrollen. Beim MOR T354A-T394A schwanken die Werte im Mittel um $\pm 10\%$ weichen aber nicht signifikant ab. Für MOR S363A-S375A (B) zeigen sich auffällige Unterschiede zum MOR bei DAMGO und Fentanyl. Die Internalisierungsrate nach DAMGO ist mit 20% schwach, aber signifikant ($p < 0,05$). Bei Fentanyl liegt die Rate im Bereich des unstimulierten Rezeptors. Für Etonitazen fällt sie im Mittel mit 40% etwas schwächer aus als beim MOR, bleibt aber vergleichbar.

Die Ergebnisse, die über den Internalisierungs-ELISA (Abb. 4-10) gewonnen wurden, bestätigen die Beobachtungen aus der Mikroskopie. Der wildtypische Rezeptor zeigt zu erwartende Internalisierungsraten (ca. 50% bei DAMGO, ca. 30% bei Fentanyl und ca. 50% bei Etonitazen). Zu beachten ist, dass Fentanyl und Etonitazen auf Grund ihrer Potenz gegenüber DAMGO, um eine Zehnerpotenz niedriger konzentriert eingesetzt wurden. Die Raten für MOR T354A-T394A und MOR S363A-T383A liegen auch nach Stimulation mit den verwendeten Agonisten im Bereich des unstimulierten Rezeptors. Für MOR S363A-S375A zeigt sich noch einmal das abweichende Verhalten in Bezug auf DAMGO und Fentanyl. Bei Fentanyl bewegt sich die Internalisierungsrate im Bereich des unstimulierten Rezeptors, bei DAMGO liegt sie bei etwa 20%. Dieser Effekt liegt zwar knapp unterhalb der für diesen Assay typischen Standardabweichung, ist aber dennoch signifikant ($p < 0,05$). Für Etonitazen fällt die Internalisierungsrate mit ca. 40% im Mittel etwas schwächer aus, bleibt aber mit der des wildtypischen Rezeptors vergleichbar.

4.2.2 Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Downregulierung des Rezeptors

Nachdem die Rezeptorinternalisierung untersucht wurde, stellte sich die Frage, ob die nicht internalisierende, phosphorylierungsdefiziente Mutante MOR T354A-T394A ebenso wie der MOR unter anhaltender Agoniststimulation eine Downregulierung erfahren kann. Stabil exprimierende Zellen wurden dafür in einer Zeitreihe (0, 2, 4, 8, 16 und 24 h) unter Zugabe von 10 μ M DAMGO stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen lysiert und die Rezeptoren über Weizenkeim-Lektin aufgereinigt. Für den anschließenden Westernblot wurde weiterhin der rabbit anti-HA Antikörper verwendet, da der oben angeführte anti-MOR {UMB-3} Antikörper nicht in der Lage ist, an MOR T354A-T394A zu binden. Die Blots wurden gestrippt und mit mouse anti-Transferrinrezeptor Antikörper inkubiert. Der Transferrinrezeptor (TFR) dient als Beladungskontrolle für die Gesamtzeptormenge, wobei davon ausgegangen wird, dass dieser Rezeptor keinen versuchsbezogenen Schwankungen unterliegt. Dabei zeigt sich nur beim MOR nach acht Stunden eine leichte Abnahme der Rezeptormenge (Abb. 4-11). Für einen quantitativen Vergleich der Bandenstärken wurde die Chemilumineszenz mit dem Fusion FX7 Imaging Systems detektiert. Für die Auswertung wurden die Werte für den MOR gegen die Werte der TFR-Banden abgeglichen. Die quantitative Aus-

wertung bestätigt die Tendenz bei der Abnahme der MOR Konzentration. Der 24 Stunden Wert weicht dabei von der Kontrolle (0 h) um etwa 20-30% ab. Die Gesamtmenge des MOR T354A-T394A scheint über den untersuchten Zeitraum hingegen unverändert zu bleiben und auch die Bildauswertung lässt keine Abnahme erkennen.

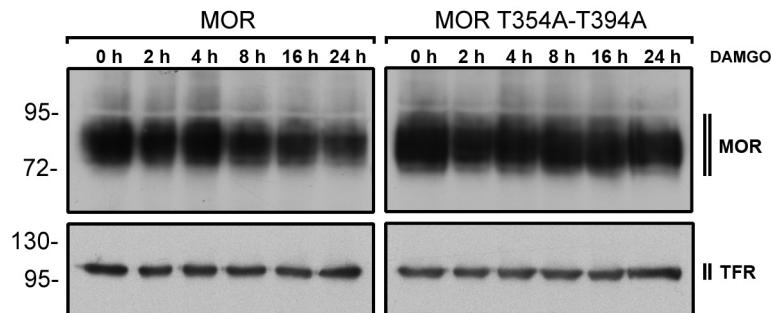


Abb. 4-11: Downregulierung des MOR in HEK 293 Zellen nach Langzeitstimulation. MOR und MOR T354A-T394A wurden in stabil exprimierenden Zellen in einer Zeitreihe (0, 2, 4, 8, 16 und 24 h) mit jeweils 10 μ M DAMGO stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert und über Weizenkeim-Lektin aufgereinigt. Für den Westernblot wurden die Rezeptoren über ihren HA-Tag mit rabbit anti-HA IgG und goat anti-rabbit IgG-HRP detektiert. Die Membranen wurden gestrippt und mit mouse anti-TFR IgG, sowie anti-mouse IgG-HRP erneut inkubiert. Bei MOR zeigt sich nach acht Stunden eine leichte Abnahme der Gesamtrezeptormenge. Die quantitative Auswertung aus den Daten des Imaging Systems bestätigt die tendenzielle Abnahme. Die Rezeptormenge für den 24 Stunden Wert weicht dabei um 20-30% von der Kontrolle (0 h) ab. Eine solche Abnahme der Rezeptormenge, ist bei MOR T354A-T394A nicht zu erkennen. Die quantitative Auswertung ergibt ebenfalls gleich bleibende Werte.

4.2.3 Einfluss des Austausches verschiedener Serin- und Threoninreste am C-Terminus des MOR auf die Rezeptoraktivierung

Um zu zeigen, dass der MOR T354A-T394A trotz der umfangreichen Mutationen am C-Terminus ein funktionaler Rezeptor ist, wurde getestet, ob das Rezeptorsignaling weiterhin funktioniert. Da die Aktivierung des μ -Opioid Rezeptors Einfluss auf den MAPK/ERK-Signalweg nehmen kann, wurde die ERK1/2 Phosphorylierung im Westernblot untersucht. Dafür wurden stabil exprimierende Zellen mit 10 μ M DAMGO stimuliert und zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 2, 5, 10, 20, 30 min) in 1 \times SDS Ladepuffer aufgenommen. Für den anschließenden Westernblot wurde der anti-pERK1/2 Antikörper verwendet. Die Blots

wurden gestrippt und zur Kontrolle mit anti-ERK1/2 Antikörper inkubiert, um die ERK1/2 Gesamtproteinmenge zu zeigen.

Die Westernblots (Abb. 4-12) zeigen, dass das Signaling der Mutanten MOR S363A-S375A und MOR T354A-T394A ebenso wie das des wildtypischen Rezeptors zu einer Phosphorylierung an ERK1/2 führt. Dabei ist der zeitliche Verlauf ähnlich. Die Phosphorylierung ist nach 2 min deutlich zu erkennen, wirkt bei 5 min am stärksten und wird nach 10 min

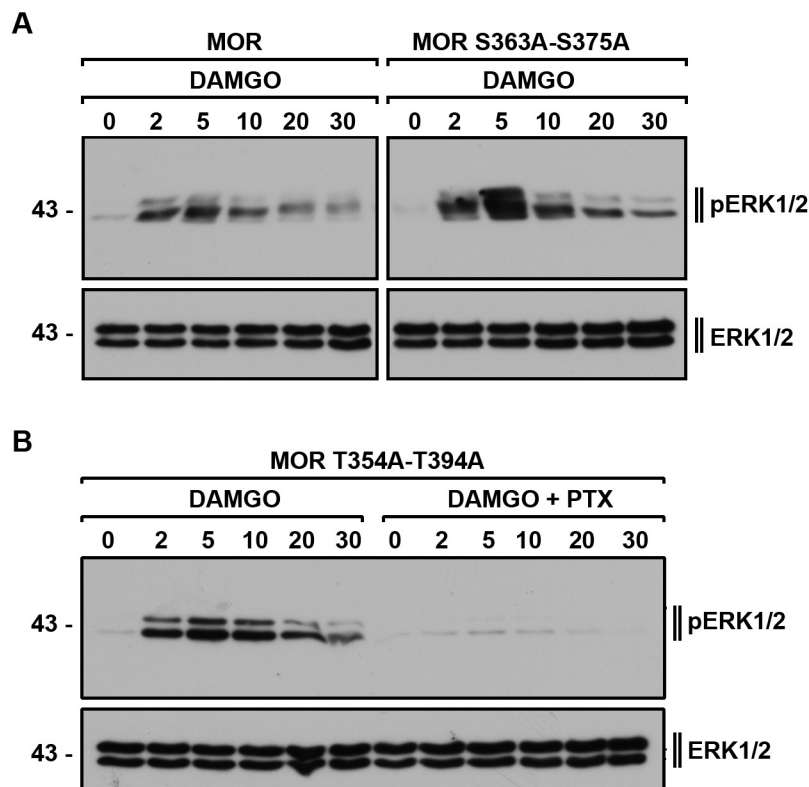


Abb. 4-12: Einfluss des MOR Signalings auf die ERK1/2 Phosphorylierung. MOR, MOR S363A-S375A und MOR T354A-T394A wurden in stabil exprimierenden HEK 293 Zellen für 2, 5, 10, 20 und 30min mit 10 μ M DAMGO stimuliert. Für die Westernblots wurde phosphospezifischer rabbit anti-pERK1/2 IgG und zur Kontrolle der ERK1/2 Gesamtproteinmenge nach Strippen der Membran rabbit anti-ERK1/2 IgG verwendet. **(A)** Das Signaling beider Rezeptormutanten beeinflusst die ERK1/2 Phosphorylierung in ähnlicher Weise, wie der wildtypische Rezeptor. Die Phosphorylierung ist nach 2 min bereits deutlich gestiegen, und scheint bei 5 min am stärksten. Ab 10 min nimmt die Phosphorylierung dann wieder ab. **(B)** Bei MOR T354A-T394A wurde zusätzlich Pertussis Toxin (PTX) als Inhibitor des G_i Signalings zugegeben. Es ist keine Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung in Gegenwart des PTX zu beobachten. Die Phosphorylierung wirkt kaum stärker als bei der Kontrolle. Das an der Phosphorylierung des ERK1/2 beteiligte MOR T354A-T394A Signaling wird wohl ausschließlich über G-Proteine vermittelt.

wieder schwächer. Da besonders für MOR T354A-T394A keine Arrestin 3 Bindung zu erwarten ist, wurden zusätzlich 100 ng/ml Pertussis Toxin (PTX) zugegeben. PTX wirkt als Inhibitor des G_i -Signalings, indem es eine ADP-Ribosylierung des G-Proteines vermittelt, wodurch dieses nicht mehr durch den Rezeptor aktiviert werden kann. Nach Stimulation des MOR T354A-T394A zeigt sich in Gegenwart des PTX keine Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung mehr. Die Phosphorylierung bleibt auf dem Level des unstimulierten Rezeptors. Dies ist ein starkes Indiz für das Signaling des MOR T354A-T394A über G_i -Proteine.

In weiteren Versuchen zur Rezeptoraktivierung wurde im cAMP-Assay die Dosisabhängigkeit der Signalwirkung für den MOR T354A-T394A mit dem wildtypischen Rezeptor verglichen. Dazu wurden stabil exprimierende Zellen unter Verwendung des *Lance Ultra cAMP Kits* untersucht. Da der MOR sein Signaling über $G\alpha_i$ vermittelt und inhibitorisch auf die Adenylylcyclase wirkt, wurde diese durch Zugabe von 15 μ M Forskolin aktiviert, um den cAMP Spiegel der Zelle zu heben. Vorversuche haben gezeigt, dass das cAMP Level ab

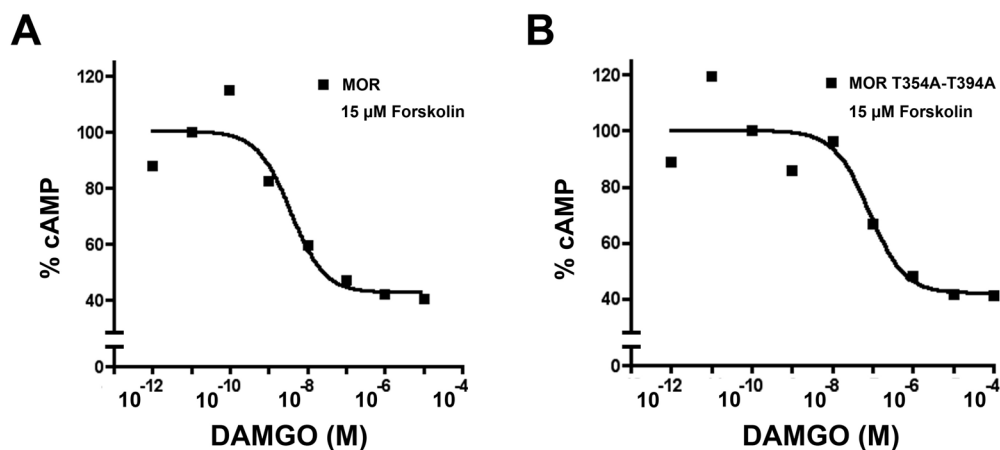


Abb. 4-13: DAMGO-vermittelte Inhibition der durch Forskolin aktivierten cAMP Produktion. Die Änderung des cAMP Levels bei MOR wt (A) und MOR T354A-T394A (B) wurde in stabil exprimierenden HEK 293 Zellen unter Verwendung des *Lance Ultra cAMP Kits* ermittelt. Die Zellen wurden mit 15 μ M Forskolin und DAMGO in steigender Konzentration (1×10^{-12} bis 1×10^{-4} M) stimuliert. MOR T354A-T394A zeigt eine ähnliche Kinetik wie der wildtypische Rezeptor. Der EC_{50} Wert liegt bei MOR T354A-S375A allerdings etwas höher (MOR ca. 10^{-8} M, MOR T354A-T394A ca. 10^{-7} M). Hinsichtlich der DAMGO-vermittelten Aktivierung zeigt der MOR T354A-T394A ein ebenso dosisabhängiges Signaling wie der wildtypische MOR. Die Hemmung der Forskolin aktivierten cAMP Produktion liegt in beiden Fällen bei etwa 50%.

10 μM Forskolin schnell steigt und bei 15 μM in den Sättigungsbereich übergeht. Als Gegenspieler des Forskolins wurde DAMGO in steigender Konzentration (1×10^{-13} bis 1×10^{-4} M) zu den Zellen gegeben, um eine Dosis-Wirkungs-Kurve für diesen Agonisten zu erstellen.

In Abb. 4-13. sind die Dosis-Wirkungs-Kurven für den MOR und MOR T354A-T394A aufgetragen. Die Kurve für den MOR T354A-T394A ist dabei mit der des MOR vergleichbar, der EC_{50} liegt aber etwas höher (MOR ca. 10^{-8} M, MOR T354A-T394A ca. 10^{-7} M) Dieses Ergebnis bestätigt nicht nur das Ergebnis der ERK1/2 Phosphorylierung, dass es sich beim MOR T354A-T394A trotz Austausch der Phosphorylierungsstellen um einen funktionalen Rezeptor handelt, sondern zeigt auch, dass der Rezeptor in ähnlicher Weise eine dosisabhängige Signalwirkung beibehält wie der unveränderte Rezeptor. Im Sättigungsbereich, besonders bei geringen DAMGO Konzentrationen weichen die Messwerte stärker ab. Die Kurven bleiben aber reproduzierbar. In beiden Fällen wird eine Hemmung der forskolin-induzierten cAMP Produktion um etwa 50% erreicht.

4.3 Identifikation einer neuen Phosphorylierungsstelle am MOR

Ausgehend vom MOR S363A-S375A, der nach DAMGO und Etonitazen weiterhin internalisiert werden kann, sowie der Beobachtung, dass dies bereits bei MOR S363A-T383A nicht mehr der Fall ist, wurden phosphospezifische Antikörper für pT376 und pT379 generiert. Diese wurden bei Gramsch (Schwabhausen) gegen die Peptidsequenzen (R371-V380) REHPS(pT)ANTV und (S375-V384) STAN(pT)VDRTV in Auftrag gegeben. Unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper konnten an Serin 363, Threonin 370 und Serin 375 bereits Phosphorylierungen direkt nachgewiesen werden. In Abb. 4-15 sind Westernblots für den MOR mit diesen Antikörpern vergleichend gezeigt. Ergänzend wurde mit den neu generierten Antikörpern im Westernblot auf agonistabhängige Phosphorylierung der verbleibenden potentiellen Phosphorylierungsstellen getestet.

4.3.1 Phosphorylierung des MOR an Serin 363, Threonin 370 und Serin 375

Um die Phosphorylierung des MOR an S363, T370 und S375 in Verbindung mit den in dieser Arbeit verwendeten Agonisten den Ergebnissen mit den neuen phosphospezifischen Anti-

körpern gegenüberstellen zu können, wurden stabil exprimierende Zellen mit 10 μM DAMGO, 10 μM Morphin, 1 μM Etonitazen oder 1 μM Fentanyl für 30 min stimuliert. Im Anschluss wurden die Zellen in RIPA-Puffer unter Zugabe von Phosphataseinhibitoren lysiert und die Rezeptoren für den Westernblot über Weizenkeim-Lektin aufgereinigt.

Der anti-pMOR pS363 Antikörper (Abb.4-15.B) zeigt unter allen getesteten Bedingungen ein gleich bleibendes Signal. Die deutliche, basale Phosphorylierung wird in ihrer Stärke durch die eingesetzten Agonisten offenbar nicht verändert. Die Phosphorylierung an S363 scheint zumindest in HEK 293 Zellen konstitutiv zu sein.

Für den anti-pMOR pT370 Antikörper (Abb. 4-15.C) sind die Banden nach DAMGO und Etonitazen am stärksten. Nach Fentanyl scheint die Phosphorylierung schwächer. Nach Morphin ist eine schwache Bande zu erkennen. Da auch basal eine schwache Bande vorhanden zu sein scheint, ist das Signal nach Morphin wohl auf die basale Phosphorylierung zurückzuführen.

Für den anti-pMOR pT375 Antikörper (Abb. 4-15.D) sind die Banden nach DAMGO, Etonitazen und Fentanyl am stärksten. Nach Morphin fällt das Signal etwas schwächer aus, liegt aber noch deutlich über einer schwachen, basalen Phosphorylierung.

4.3.2 Charakterisierung der phosphospezifischen Antikörper anti-pMOR pT376 und anti-pMOR pT379

Die Selektivität der neuen Antikörper wurde im Dot Blot überprüft (Abb. 4-14). Die vorhandenen Antikörper (0,1 $\mu\text{g/ml}$) wurden gegen absteigende Konzentration in halbierenden Schritten (beginnend bei 2 $\mu\text{g/ml}$) des phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptids aufgetragen. Die anti-pMOR pT376 Antikörper wurden dabei auch gegen das Peptid mit phosphoryliertem S375 getestet, um auszuschließen, dass der Antikörper auch das benachbarte pS375 erkennt. Nur {3676} erkennt das phosphorylierte Peptid. Im Vergleich mit dem nicht phosphorylierten Peptid fällt die Selektivität dabei noch ausreichend aus. Für die anti-pMOR pT379 Antikörper zeigt im Vergleich {3686} die beste Selektivität zwischen dem phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptid. Für die folgenden Versuche wurden entsprechend anti-pMOR pT376 {3676} und anti-pMOR pT379 {3686} verwendet.

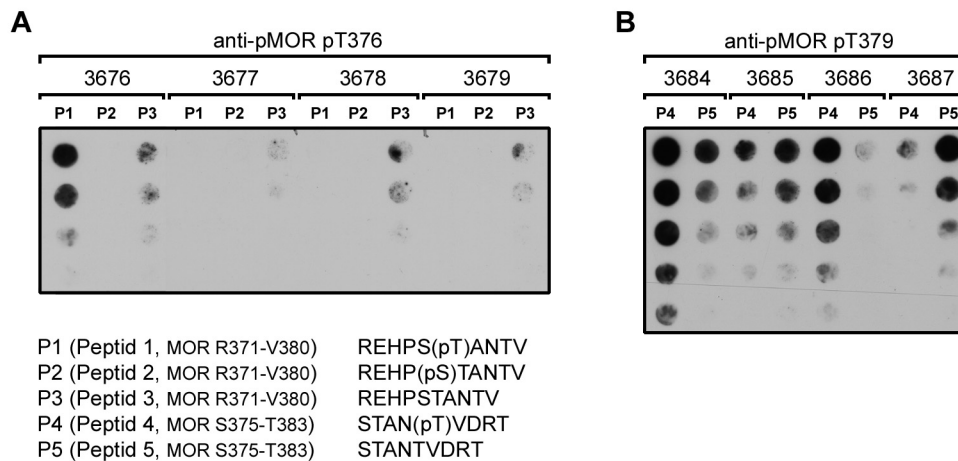


Abb. 4-14 Selektivität der phosphospezifischen Antikörper. Die Antikörper anti-pMOR pT376 {3676}, {3677}, {3678} und {3679}, sowie anti-pMOR pST379 {3684}, {3685}, {3686} und {3687} wurden im Dot Blot gegen absteigende Konzentrationen des phosphorylierten und nicht phosphorylierten Peptids aufgetragen, um auf die Phosphospezifität zu testen. (A) Bei den anti-pMOR pT376 Antikörpern wurde zusätzlich gegen das phosphorylierte S375 (P2) getestet. Das benachbarte pS375 wird nicht erkannt. In Relation zur Detektion des nicht phosphorylierten Peptids (P3), zeigt nur {3676} eine ausreichende Selektivität für das phosphorylierte Peptid (P1). (B) Unter den anti-pMOR pT379 Antikörpern zeigt {3686} die beste Selektivität für das phosphorylierte Peptid (P4) im Vergleich zum nicht phosphorylierten Peptid (P5).

4.3.3 Ligandenabhängige Phosphorylierung des Threonin 379

Um auf eine Liganden abhängige Phosphorylierung des MOR an T376 und T379 zu testen, wurden stabil exprimierende HEK 293 Zellen mit für 30 min mit 10 μ M DAMGO, 10 μ M Morphin, 1 μ M Etonitazen oder 1 μ M Fentanyl stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss in RIPA-Puffer unter Zugabe von Phosphataseinhibitoren lysiert und die Rezeptoren für den Westernblot mit Weizenkeim-Lektin aufgereinigt.

Der verwendete anti-pMOR pT376 Antikörper zeigt beim wildtypischen MOR nach keinem der eingesetzten Agonisten ein Signal (Abb.4-16.B). Der Antikörper erkennt im Dot Blot das phosphorylierte Peptid, eine Phosphorylierung des T376 am Rezeptor kann mit diesem Antikörper aber nicht nachgewiesen werden. Der Gesamtrezeptor wurde mit dem anti-MOR {UMB-3} Antikörper detektiert und zeigt, dass für den Nachweis genügend Rezeptor aufgetragen wurde.

Beim anti-pMOR pT379 Antikörper zeigen sich beim MOR hingegen deutliche Signale (Abb. 4-16.C). Eine basale Phosphorylierung scheint dabei nicht vorhanden. Auch bei

Morphin ist keine Phosphorylierung zu erkennen. Nach DAMGO und Etonitazen zeigt sich eine deutliche Phosphorylierung. Nach Fentanyl zeigt sich ebenfalls eine Phosphorylierung, fällt aber schwächer aus, als nach DAMGO oder Etonitazen.

Für MOR S363A-S375A zeigt sich ein vergleichbares Ergebnis. Allerdings ist nach Morphin eine sehr schwache Phosphorylierung zu erkennen. Der Gesamtrezeptor zeigt, dass hier besonders viel MOR auf das Gel aufgetragen wurde, wodurch im Vergleich eine mögliche, schwache Phosphorylierung sichtbar werden könnte. Das Entfernen der benachbarten Phosphorylierungsstellen S363, T370 und S375 scheint auf die Phosphorylierbarkeit des T379 keinen negativen Einfluss zu haben.

Bei der total phosphorylierungsdefizienten Mutante MOR T354A-T394A zeigt sich erwartungsgemäß kein Signal. Da der anti-MOR {UMB-3} Antikörper den MOR T354A-T394A nicht erkennt, wurde zur Kontrolle der Gesamtrezeptormenge der anti-HA Antikörper verwendet.

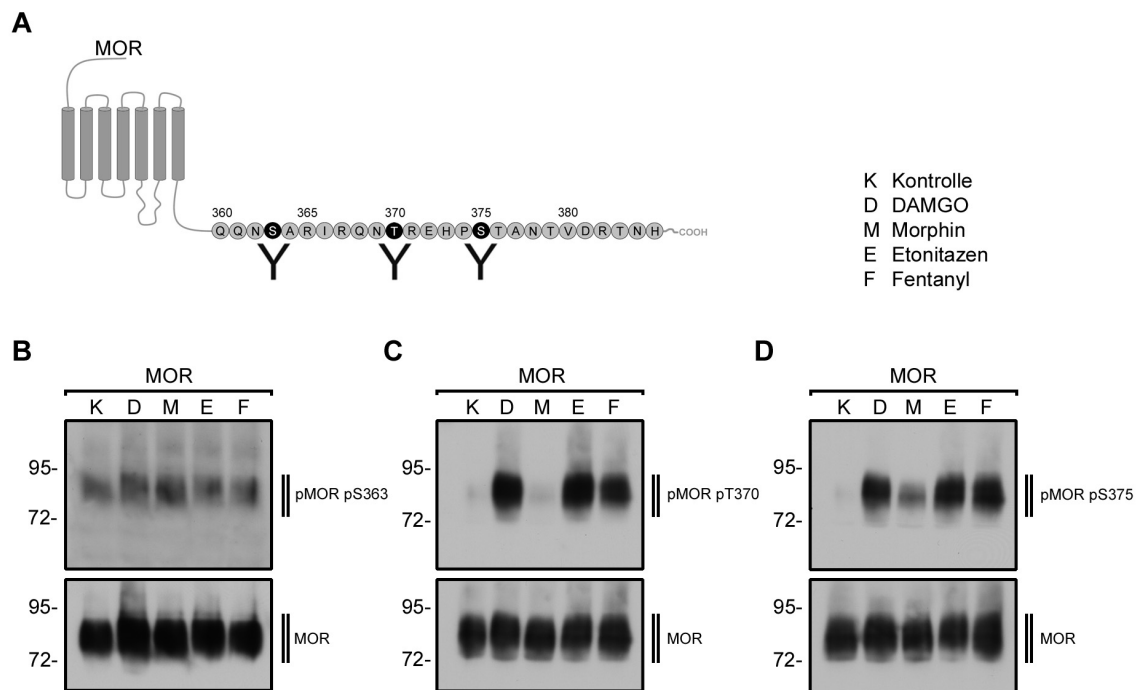


Abb. 4-15: Phosphorylierung des Serin 363, Threonin 370 und Serin 375. Den MOR stabil exprimierende HEK 293 Zellen wurden für 30 min mit 10 μ M DAMGO, 10 μ M Morphin, 1 μ M Etonitazen oder 1 μ M Fentanyl stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Rezeptoren über Weizenkeim-Lektin aufgereinigt. **(B)** Der anti-pMOR pS363 Antikörper zeigt unter allen Versuchsbedingungen ein gleich bleibendes Signal. Die vorhandene basale Phosphorylierung scheint nach Agoniststimulation nicht stärker zu werden. Die Phosphorylierung an S363 scheint zumindest in HEK 293 Zellen konstitutiv. **(C)** Der anti-pMOR pT370 Antikörper zeigt die stärksten Signale nach DAMGO und Etonitazen. Nach Fentanyl scheint es etwas schwächer zu sein. Bei der Kontrolle zeigt sich eine schwache Bande, die auch nach Morphin zu beobachten ist. Wahrscheinlich handelt es sich um eine basale Phosphorylierung des Rezeptors an T370. **(D)** Der anti-pMOR pS375 Antikörper zeigt nach DAMGO, Etonitazen und Fentanyl starke Banden. Bei Morphin fällt sie schwächer aus, liegt aber noch deutlich über der schwachen Bande, die bei der Kontrolle zu sehen ist. Möglicherweise handelt es sich hier um eine schwache, basale Phosphorylierung an S375. Die Gesamt Rezeptormenge wurde mit dem anti-MOR Antikörper {UMB-3} detektiert. **(A)** Schematische Darstellung des C-Terminus des murinen MOR mit Antikörper Epitopen.

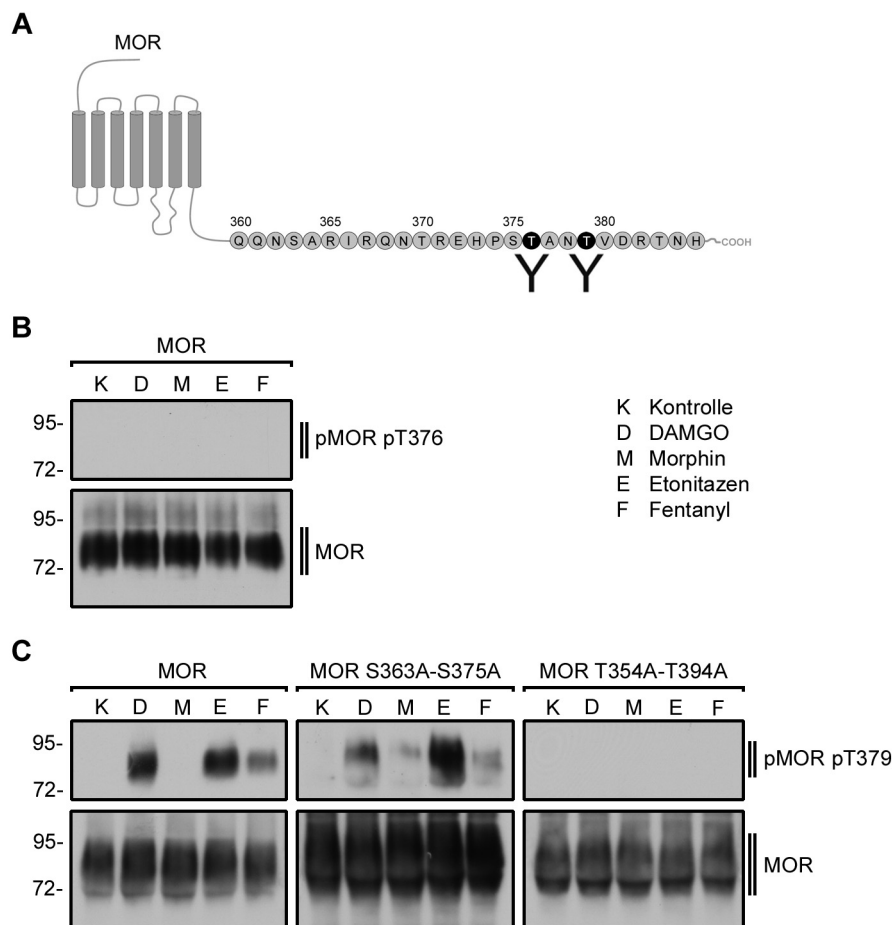


Abb. 4-16: Ligandenabhängige Phosphorylierung des Threonin 379. MOR, MOR S363A-S375A und MOR T354A-T394A wurden in stabil exprimierenden HEK 293 Zellen für 30 min mit 10 μ M DAMGO, 10 μ M Morphin, 1 μ M Etonitazen oder 1 μ M Fentanyl stimuliert. Die Zellen wurden lysiert und die Rezeptoren über Weizenkeim-Lektin aufgereinigt. **(B)** Mit dem phosphospezifischen anti-pMOR pT376 Antikörper lässt sich für keinen der Agonisten ein Signal nachweisen. Die MOR Gesamtmenge wurde mit dem anti-MOR Antikörper {UMB-3} detektiert und zeigt eine ausreichend aufgetragene Menge des MOR. **(C)** Der phosphospezifische anti-pMOR pT379 Antikörper zeigt für MOR und MOR S363A-S375A vergleichbare Ergebnisse. Eine basale Phosphorylierung ist nicht zu beobachten. Nach Morphin zeigt sich bei MOR S363A-S375A allerdings ein schwaches Signal, wobei hier auch mehr Rezeptor aufgetragen wurde. Nach DAMGO und Etonitazen ist die Phosphorylierung deutlich. Nach Fentanyl fällt sie schwächer aus. Wie zu erwarten, zeigt sich bei der total phosphorylierungsdefizienten Mutante MOR T354A-T394A kein Signal. Zur Kontrolle der MOR Gesamtmenge wurde der anti-HA Antikörper verwendet. **(A)** Schematische Darstellung des C-Terminus des murinen MOR mit Antikörper Epitopen.

5 Diskussion

5.1 Charakterisierung der MOR S375A Knockin-Maus

Mit den MOR S375A Knockin-Mäusen stehen nun Modeltiere zur Verfügung, an denen sich der Einfluss der S375 Phosphorylierung auf Schmerz- und Toleranzverhalten der Tiere untersuchen lässt. Dies ist von Interesse, da im heterologen System bereits gezeigt wurde, dass Morphin nur die Phosphorylierung an S375 induziert (Schulz *et al.*, 2004). Über Immunpräzipitation mit {UMB-3} und anschließender Westernblotanalyse mit dem phosphospezifischen Antikörper {GP2} konnte nun gezeigt werden, dass die S375 Phosphorylierung auch *in vivo* im Maushirn statt findet (Abb. 4-4).

In Bezug auf das Schmerzverhalten zeigte sich im Hot Plate Test, dass keine Unterschiede zwischen den Knockin-Tieren und Wildtypen bestehen (Abb. 4-5). Für die chronische Toleranz fanden sich ebenfalls keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen (Abb. 4-6). Diese Ergebnisse waren unerwartet. In Anlehnung an die gängigen Vorstellungen wäre nach Morphininjektion zumindest ein beobachtbarer Unterschied in der analgetischen Wirkung zu erwarten gewesen, da der Rezeptor in den Knockin-Tieren nicht mehr desensibilisieren dürfte.

In neueren Untersuchungen konnte solche Unterschiede gezeigt werden. Allerdings wurden die Dosierungen im Laufe des Experiments gesteigert. Auf diese Weise wurden bei Morphin und Fentanyl signifikante Unterschiede auffällig, wobei bei beiden Agonisten die Knockin-Tiere eine längere Reaktionszeit zeigen. Möglicherweise scheint die Phosphorylierung des S375 doch einen akuten, desensibilisierenden Effekt auf den Rezeptor zu besitzen, der die Schmerzweiterleitung begünstigt und durch die Mutation S375A gehemmt werden kann (Grecksch *et al.*, 2011).

Weiter konnte gezeigt werden, dass eine chronische Toleranzentwicklung nach DAMGO und Etonitazen, nicht aber nach Morphin, in den Knockin-Tieren gegenüber den Wildtypen signifikant abgeschwächt wird. Daraus folgt, dass die S375 Phosphorylierung einen Einfluss bei der Entstehung der DAMGO- und etonitazenvermittelten Toleranz besitzt, nicht aber bei der morphinvermittelten (Grecksch *et al.*, 2011).

Ausgehend von Beobachtungen in HEK 293 Zellen, könnte Morphin auch *in vivo* nur an S375 eine Phosphorylierung induzieren, DAMGO und Etonitazen aber auch an weiteren

Aminosäureresten. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es *in vivo* zu unterschiedlichen, agonistabhängigen Phosphorylierungen des MOR kommen könnte, die wiederum Abläufe vermitteln, welche letztlich die Toleranzentwicklung beeinflussen. Da DAMGO und Etonitazen im Gegensatz zu Morphin starke Internalisierer des MOR sind, bleibt die Internalisierung des Rezeptors zur Hemmung der Toleranzentwicklung daher weiterhin Gegenstand der Diskussion. Ein weiterer Hinweis auf Folgeprozesse, die letztlich von der Phosphorylierung des Rezeptors unbeeinflusst scheinen, ergibt sich aus der Beobachtung, dass die S375 Phosphorylierung nach vier bis acht Stunden deutlich schwächer wird, eine akute Toleranz aber auch nach zwölf Stunden noch gezeigt werden kann (Grecksch *et al.*, 2011)

In weiteren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Morphin und Fentanyl die gleiche analgetische Wirkung im Hot Plate Test bei GRK3 Knockout-Mäusen besitzen wie bei den Wildtypen. Bei der chronischen Toleranzentwicklung unterscheiden sie sich aber darin, dass die Toleranz nach Fentanyl nach spätestens drei Tagen signifikant reduziert ist. Die Toleranz nach Morphin bleibt jedoch gleich. Bei der akuten Toleranz, *in vitro* elektrophysiologisch gemessen an Schnitten des Hippocampus, zeigten die GRK3 Knockout Mäuse über einen Zeitraum von einer Stunde ebenfalls eine deutliche Abnahme der Toleranz. Nach Morphin zeigt sich ebenfalls eine leichte Abnahme, fällt aber im Effekt (ca. 50%) nicht so stark aus, wie nach Fentanyl (ca. 80%) (Terman *et al.*, 2004).

Nach Gabe eines GRK2 Inhibitors (GRK2 Knockout ist lethal) zeigen Mäuse im Tail-Immersion Test in einem Zeitraum von acht Stunden eine Abnahme der Toleranz bei DAMGO, nicht aber bei Morphin und Fentanyl. Die Toleranz bei Morphin und Fentanyl lässt sich aber durch die Gabe eines PKC Inhibitors abschwächen. Bei DAMGO zeigt dieser PKC Inhibitor sowohl alleine, als auch in Kombination mit einem PKA Inhibitor keine Wirkung auf die Toleranz. *In vitro* Patch-Clamp Versuche an Locus Coeruleus (LC) Neuronen zeigen weiter, dass durch den GRK2 Inhibitor, nicht aber durch den PKC Inhibitor, die Desensibilisierung des MOR nach DAMGO gehemmt werden kann (Hull *et al.*, 2010).

Diese Ergebnisse decken sich mit Untersuchungen an LC Neuronen in denen GRK2 dominant negativ exprimiert wird. Hier zeigt sich nach DAMGO eine deutlich abgeschwächte Desensibilisierung des Rezeptors, während die morphininduzierte Desensibilisierung nur sehr leicht abgeschwächt ist. Ein PKC Inhibitor hingegen schwächt die morphininduzierte Desensibilisierung des Rezeptors deutlich ab, während er auf die DAMGO-induzierte Dephosphorylierung keine Wirkung hat (Bailey *et al.*, 2009).

Passend zeigen PKC γ Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtypen im Tail Flick Test ein gleiches basales Schmerzverhalten, eine gleiche analgetische Wirkung des Morphins, jedoch eine Abschwächung der chronischen Morphintoleranz (Zeitze *et al.*, 2001). Immunlokalisation an Schnitten des Dorsalhorns zeigen, dass der MOR und die PKC γ in diesem Gewebe so gut wie nicht in den gleichen Regionen exprimiert werden. MOR findet sich dabei in der Laminae I und der äußeren Laminae II, PKC γ hingegen hauptsächlich in der inneren Laminae II. Eine Kolo-kalisation ist nur schwach in den äußeren Laminae II zu erkennen (Zeitze *et al.*, 2001). Insgesamt wird nur in 5% der MOR exprimierenden Neuronen auch PKC γ exprimiert (Polgár *et al.*, 1999). Dennoch erfolgt eine verstärkte PKC α und γ Expression im Dorsalhorn bei Ratten nach Injektion mit Morphin. Dieser Anstieg, ebenso wie die entstehende Toleranz, lassen sich durch einen PKC-Inhibitor hemmen (Granados-Soto *et al.*, 2000).

Weitere agonistspezifische Unterschiede finden sich bei der ERK1/2 Aktivierung. (Zheng *et al.*, 2008) stellen in ihrer Arbeit die Hypothese auf, dass bei der ERK1/2 Aktivierung ligandenspezifische Signalwege genutzt werden. So würde die ERK1/2 Aktivierung nach Morphinstimulation über einen PKC-Signalweg laufen, während andere Agonisten über einen Arrestin 3 abhängigen Signalweg die ERK1/2 Aktivierung vermitteln. Dabei kommt es zu einer unterschiedlichen Lokalisation des ERK1/2 in der Zelle. Nach Etorphin und DAMGO lässt sich eine Translokation des ERK1/2 in den Nukleus beobachten. In Folge wird die Expression von GRK2 und Arrestin 3 erhöht. Bei Morphin verbleibt ERK1/2 im Cytosol und könnte Transkriptionsfaktoren wie CREB aktivieren. Bei Versuchen zur Morphinabhängigkeit konnte bei Ratten *in vivo* ein Einfluss des Morphins auf das CREP Level in bestimmten Gehirnarealen bereits gezeigt werden (Zhou & Zhu, 2006). In kultivierten Mausneuronen des Striatums führt Fentanyl im Gegensatz zu Morphin zu einer ERK1/2 Phosphorylierung. In MOR Knockout-Mäusen, in GRK3 Knockout-Mäusen, sowie bei der Verwendung von siRNA gegen Arrestin 3 ist die ERK1/2 Phosphorylierung nach Fentanyl nicht mehr zu beobachten. Nach Transfektion einer dominant positiven Form des Arrestin 3 kann allerdings auch Morphin die ERK1/2 Phosphorylierung vermitteln (Macey *et al.*, 2006). Durch Morphin wird bei wiederholter Mikroinjektion in das periaquäduktale Grau bei Ratten die ERK1/2-Phosphorylierung erhöht. Bei gleichzeitiger Gabe des ERK1/2-Inhibitors U0126, wird daraufhin die Morphintoleranz verstärkt. Entsprechend könnte auch die Aktivierung des ERK1/2 der Morphintoleranz entgegen wirken (Macey *et al.*, 2009).

Agonistenvermittelte Unterschiede finden sich auch hinsichtlich des Arrestin 3. Morphin zeigt bei Arrestin 3 Knockout-Mäusen im Hot Plate Test eine stärkere analgetische Wirkung,

wobei die akute Toleranz und die chronische Toleranz deutlich abgeschwächt sind (Bohn *et al.*, 1999; Bohn *et al.*, 2000). Die chronische Toleranz bei Fentanyl bleibt hingegen unverändert (Raehal & Bohn, 2010).

Interessant ist auch, dass unterschiedliche Agonisten die Affinität des MOR zu G-Proteinen mit bestimmter $G\alpha$ Isoform Zusammensetzung zu beeinflussen scheinen (Massotte *et al.*, 2002). Weiter konnte gezeigt werden, dass sich durch chronische Morphingabe *in vivo* ein Unterschied in dieser Präferenz erzielen lässt. Dabei wurde im Striatum, dem Rückenmark, sowie dem periaquäduktalen Grau ein Wechsel des MOR-Signalins via $G\alpha_{i/o}$ auf $G\alpha_s$ gezeigt. Dieser Effekt lässt sich durch gleichzeitige Gabe von sehr geringen Dosen Naloxon inhibieren, was sich letztlich ebenfalls hemmend auf die Entstehung einer Morphintoleranz auswirkt (Wang *et al.*, 2005).

Die Beobachtungen hinsichtlich der GRKs decken sich mit neuen Ergebnissen, bei denen in siRNA knock down Experimenten an GRKs gezeigt werden konnte, dass die morphininduzierte Phosphorylierung hauptsächlich über die GRK5 erfolgt, während bei den potenteren Agonisten hauptsächlich GRK2 und 3 den Rezeptor phosphorylieren (Doll *et al.*, 2011b).

Zusammenfassend lässt sich vermuten, dass Morphin wohl auch *in vivo* eine Rezeptor-phosphorylierung über GRK5 vermittelt, während potentere Agonisten wie DAMGO, Etonitazen oder Fentanyl diese über GRK2/3 zu vermitteln scheinen. Die Toleranzentwicklung scheint dabei auch auf unterschiedlichen Wegen verursacht. Hinsichtlich der Morphintoleranz scheint dabei die PKC als wichtiger Faktor involviert zu sein. Die Vorgänge, die zur Toleranz führen, scheinen komplex und bedürfen, um sie zu identifizieren und gegeneinander abzugrenzen, in Zukunft weitere Untersuchungen *in vivo*.

Das beim naloxoninduzierten Entzug keine Unterschiede zwischen den MOR S375A Mäusen und den Wildtypen zu erkennen sind, passt zu Beobachtungen, die bereits beschrieben wurden. Bei den oben angeführten Arbeiten zur Untersuchung an GRK3 Knockout-Mäusen und Arrestin 3 Knockout-Mäusen wurden zwar Einflüsse auf die Toleranz, nicht aber auf die Abhängigkeit gefunden (Terman *et al.*, 2004; Bohn *et al.*, 2000). Dies zeigt, dass die Abhängigkeit anderen Mechanismen als den untersuchten unterliegt und nicht direkt mit der Rezeptorphosphorylierung in Verbindung zu stehen scheint.

5.2 Phosphorylierung und Internalisierung des MOR

5.2.1 Die Rolle der Phosphorylierungszustände am MOR C-Terminus für die Rezeptor Internalisierung

Weshalb Morphin nicht zur Internalisierung des MOR führt, DAMGO und andere Agonisten aber schon, war in den vergangenen Jahren eine offene Frage. Das bei der Internalisierung des MOR dessen C-Terminus eine bedeutende Rolle spielt, konnte bereits früh gezeigt werden, indem der C-Terminus des murinen MOR komplett durch den des δ -Opioid Rezeptors (DOR) ersetzt wurde. Dieser chimere Rezeptor (μ/δ -tail-OR) wurde in HEK 293 Zellen exprimiert und konnte unter Morphinstimulation internalisieren (Whistler *et al.*, 1999). Auch der Austausch verschiedener Sequenzabschnitte aus dem DOR C-Terminus in den MOR C-Terminus führte zu diesem Ergebnis (Finn & Whistler, 2001). Weiter lässt sich unter den Spleißvarianten des MOR beobachten, dass sich MOR1D mit Morphin internalisieren lässt. Dabei unterscheidet sich MOR1D von MOR1 lediglich in den letzten sieben bzw. zwölf Aminosäureresten (Schulz *et al.*, 2004).

Eine Modifikation, welche der C-Terminus nach Rezeptoraktivierung erfahren kann, ist die Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten (Yu *et al.*, 1997). Um die generelle Abhängigkeit der Internalisierung von der Phosphorylierung des C-Terminus zu zeigen, wurde für die vorliegende Arbeit die MOR T354A-T394A Mutante kreiert. Die Ergebnisse aus dem cAMP-Assay und der ERK1/2 Phosphorylierung zeigen, dass diese Mutante funktional ist. Dennoch kann keiner der getesteten Agonisten eine Internalisierung dieser Rezeptormutante induzieren. Der Mechanismus der Internalisierung des MOR, scheint daher grundlegend von einer entsprechenden Phosphorylierung des Rezeptors am C-Terminus abhängig. In Bezug auf die Rezeptoraktivierung und den abweichenden EC_{50} Wert, wäre es in einem nächsten Schritt relevant, an Hand von Bindungsstudien zu zeigen, ob DAMGO möglicherweise eine andere Affinität zum mutierten Rezeptor besitzt. Die Beobachtung, dass der nicht internalisierende MOR T354A-T394A nach DAMGO Stimulation eine ERK1/2 Phosphorylierung vermittelt, steht dabei im Widerspruch zur Aussage, dass das Blocken der dynaminabhängigen Internalisierung des MOR auch die ERK1/2 Aktivierung hemmt (Ignatova *et al.*, 1999). Der mutierte Rezeptor zeigt, dass eine Internalisierung keine Voraussetzung für die ERK1/2 Phosphorylierung durch das MOR-Signaling ist (Abb. 4-12). Der Westernblot (Abb. 4-11)

gibt einen Hinweis darauf, dass die Internalisierung allerdings bei der Downregulierung des Rezeptors eine Rolle zu spielen scheint.

Ausgehend von der MOR T354A-T394A Mutante wurden für diese Arbeit zwei weitere Rezeptormutanten erzeugt, bei denen verschiedene Serine und Threonine wieder hergestellt, bzw. der Austausch verschiedener Serine und Threonine zu Alanin auf gewisse Bereiche eingeschränkt wurde. Die betreffenden Sequenzabschnitte wurden hinsichtlich bestehender Befunde zur Rezeptorphosphorylierung ausgewählt. So wurde bereits mit Hilfe phosphospezifischer Antikörper gezeigt, dass Morphin zu einer Phosphorylierung des MOR an Serin 375 führt. (Schulz *et al.*, 2004). Für DAMGO gab es Hinweise, dass hier Phosphorylierungen an Serin 363, Threonin 370 und Serin 375 induziert werden (El Kouhen *et al.*, 2001). Daher schien es geboten, dass Augenmerk bei der Herstellung weiterer Rezeptormutanten besonders auf den Sequenzbereich S363 bis S375 zu legen.

Dazu wurden die Mutanten MOR S363A-S375A (S363A, T370A, S375A) und MOR S363A-T383A (S363A, T370A, S375A, T376A, T379A, T383A) hergestellt. Mit diesen sollten über das Internalisierungsverhalten neue Hinweise gefunden werden, an welchen Serinen und Threoninen eine Agonisten abhängige Phosphorylierung induziert werden könnte. Da bei MOR S363A-S375A weiterhin eine Internalisierung nach DAMGO (ca. 20%) und Etonitazen (ca. 40%) zu erkennen ist, diese aber für MOR S363A-T383A bei allen getesteten Agonisten ausbleibt, lag es nahe, dass der Unterschied durch die drei Aminosäurereste T376, T379 und T383 verursacht sein könnte. Um eine Phosphorylierung an diesen Stellen direkt nachweisen zu können, wurde die Herstellung phosphospezifischer Antikörper gegen T376 und T379 in Auftrag gegeben.

Mit dem phosphospezifischen anti-pMOR pT379 Antikörper wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal die Phosphorylierung an T379 gezeigt. Diese Phosphorylierung ist nach DAMGO und Etonitazen deutlich zu beobachten. Nach Fentanyl tritt sie schwächer auf. Nach Morphin könnte eine schwache Phosphorylierung ebenfalls vorhanden sein. In Bezug auf die verwendeten Agonisten korrelieren diese Ergebnisse mit den Beobachtungen aus den Internalisierungsexperimenten.

Mit dem Befund der agonistabhängigen Phosphorylierung an T379 lassen sich zudem zwei umfangreiche Publikationen zur Phosphorylierung des μ -Opioid Rezeptors, ergänzend diskutieren. Dabei lässt sich ein Modell entwickeln, an welchen Stellen des C-Terminus phosphoryliert werden kann und in welcher Weise diese Phosphorylierungen für die Internalisierung entscheidend sind.

(Lau *et al.*, 2011) zeigen Untersuchungen zur Phosphorylierung des MOR in HEK 293 Zellen, die mit Morphin oder DAMGO stimuliert wurden. Die Zellen wurden im Anschluss lysiert, der Rezeptor Affinitäts gereinigt und proteolytisch gespalten, um die entstandenen Peptide in der Massenspektrometrie (MS) auf vorhandene Phosphorylierungen zu untersuchen. Diese Methode scheint dabei geeignet zu sein, zwischen basaler Phosphorylierung und der Stärke agonistinduzierter Phosphorylierungen differenzieren zu können, wobei „Stärke“ hier als Häufigkeit des Phosphorylierungsereignisses in Bezug auf die Rezeptormenge zu verstehen ist. Für den Cluster $^{354}\text{TSST}^{357}$ konnte eine sehr schwache basale Phosphorylierung gezeigt werden, die nach Morphin und besonders nach DAMGO stärker ausfällt. Für S363 wurde eine konstitutive Phosphorylierung gezeigt, da sie basal und nach Agonist Stimulation vergleichbar ist. Auch an T370 wurde eine basale Phosphorylierung festgestellt, die nach Stimulation stärker ausfällt. Auch hier induziert DAMGO die Phosphorylierung stärker als Morphin. Diese Befunde decken sich mit Ergebnissen einer anderen Publikation. Basierend auf Untersuchungen mit phosphospezifischen anti-pMOR pS363 und anti-pMOR pT370 Antikörpern wurde ebenfalls eine konstitutive Phosphorylierung des S363 in HEK 293 Zellen postuliert, sowie eine durch DAMGO und Etonitazen induzierte Phosphorylierung an T370 gezeigt (Doll *et al.*, 2011). Für die Sequenz $^{375}\text{STANT}^{379}$ wurde in der MS ebenfalls eine basale Phosphorylierung gezeigt. Auch hier fällt die Phosphorylierung nach DAMGO stärker aus als nach Morphin. Für T370 in Kombination mit $^{375}\text{STANT}^{379}$ fanden sich in der MS zwei Phosphorylierungen. Auch hier sind diese nach DAMGO stärker als nach Morphin und ähnlich wie bei $^{354}\text{TSST}^{357}$ nach Stimulation deutlich stärker als basal. Von besonderer Bedeutung ist das Auffinden zweier Phosphorylierungen in der Sequenz $^{375}\text{STANT}^{379}$, denn diese zwei Phosphorylierungen zusammen sind basal nicht vorhanden und treten bei DAMGO deutlich stärker auf als bei Morphin. Die Autoren sprechen hier von der einzigen agonistabhängigen Phosphorylierung, die sie in der MS gefunden haben. Das Morphin und DAMGO an S375 eine Phosphorylierung induzieren können, wurde oben bereits erwähnt. Entsprechend dürfte es sich bei der zweiten Phosphorylierungsstelle, um das in dieser Arbeit identifizierte T379 handeln. Das T376 als Phosphorylierungsstelle auszuschließen ist, wird später noch behandelt. Schließlich konnten in der MS in der Sequenz $^{366}\text{IRQNTREZHPSTANTVDR}^{382}$ drei Phosphorylierungen gefunden werden, was noch einmal für T370, S375 und T379 spricht. Für den Rest des C-Terminus ab T383 wurde in der MS keine Phosphorylierung gefunden. Somit sind die beiden verbleibenden Threonine T383 und T394 als potentielle Phosphorylierungsstellen in diesem Fall auszuschließen.

(El Kouhen *et al.*, 2001) zeigt Ergebnisse zur Phosphorylierung des MOR der Ratte, der in HEK 293 Zellen exprimiert wurde. Dafür wurden Rezeptormutanten verwendet, bei denen die zwölf Serine und Threonine des C-Terminus in unterschiedlichen Kombinationen durch Alanin ersetzt wurden. Unter Verwendung radioaktiv markierten Phosphors wurde die Phosphorylierung des Gesamtrezeptors nach Stimulation untersucht. (Es muss angemerkt werden, dass bei den Kombinationen der Punktmutationen das Threonin 379 nicht im Focus der Autoren lag, wohl weil die Phosphorylierung des Gesamtrezeptors bei den Mutanten MOR T354A-T376A (T354A, S355A, S356A, T357A, S363A, T364A, T370A, S375A, T376A) und MOR S363A-T376A (S363A, T364A, T370A, S375A, T376A) nach DAMGO Stimulation nur unwesentlich stärker ausfiel als bei der Totalmutante MOR T354A-T394A (T354A, S355A, S356A, T357A, S363A, T364A, T370A, S375A, T376A, T379A, T383A, T394A). Entsprechend wurde den Threoninen in der Sequenz nach T376 offensichtlich keine weitere Bedeutung zugeschrieben). Mit dem Wissen um die Phosphorylierung des T379 lassen sich die in dieser Arbeit publizierten Daten allerdings neu interpretieren und erhärten mit den Ergebnissen der vorgenannten Publikationen die Möglichkeit eines Phosphorylierungsmotivs, das bei der Internalisierung des Rezeptors eine wichtige Rolle spielt.

(El Kouhen *et al.*, 2001) zeigen, dass die Phosphorylierung des Gesamtrezeptors bei der Mutante MOR T376A nach DAMGO Stimulation unter Berücksichtigung der Standardabweichung im Bereich des wildtypischen Rezeptors liegt. Dies unterstützt die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, da mit dem phosphospezifischen anti-pMOR pT376 Antikörper nach keinem der verwendeten Agonisten eine Phosphorylierung des Rezeptors nachgewiesen werden konnte (Abb. 4-16). Es besteht zwar die Möglichkeit, dass der Antikörper eine mögliche Phosphorylierung nicht erkennt, da neben dem phosphorylierten Peptid keine Positivkontrolle zur Verfügung steht, dennoch legen alle Befunde nahe, dass an T376 wohl keine ligandenabhängige Phosphorylierung stattfindet. Für die Mutanten MOR S363A/T370A und MOR S363A-S375A (S363A, T370A, S375) geben die Autoren an, dass keine basalen Phosphorylierungen gefunden wurden (El Kouhen *et al.*, 2001). In der vorgenannten Arbeit (Lau *et al.*, 2011) wird in der MS zwar auch für den Cluster ³⁵⁴TSST³⁵⁷ eine basale Phosphorylierung gezeigt, möglicherweise ist der Nachweis über markiertes Phosphat zur Bestimmung der Gesamtrezeptorphosphorylierung nicht sensitiv genug, eine schwache basale Phosphorylierung an dieser Stelle erkennen zu lassen. Das innerhalb dieses Clusters phosphoryliert werden kann, zeigen auch die Ergebnisse einer weiteren Arbeit (Wang *et al.*, 2002). In dieser wird mit markiertem Phosphor in HEK 293 Zellen die Abnahme der DAMGO-

induzierten Gesamtrezeptorphosphorylierung an der Doppelmutante MOR S355A/T357A gezeigt. Die in der Massenspektrometrie gefundene Phosphorylierung könnte daher an einer dieser Stellen S355 oder T357 erfolgen. Bei (El Kouhen *et al.*, 2001) zeigt die Doppelmutante MOR T370A/S375A eine vergleichbare basale Phosphorylierung wie der wildtypische Rezeptor. Diese Ergebnisse sprechen ebenfalls für die konstitutive Phosphorylierung des S363. Nach DAMGO Stimulation ist MOR S363A-S375A im Vergleich zum wildtypischen Rezeptor nur noch sehr schwach phosphoryliert. Bei MOR T370A/S375A und MOR S363A/S375A fällt die Phosphorylierung im Vergleich ähnlich, aber stärker als bei MOR S363A-S375A aus. Dies passt gut zu den bereits angeführten Ergebnissen, da bei MOR S363A-S375A nur noch T379 und bei den beiden anderen Mutanten das T379 jeweils in Kombination mit S363 oder T370 phosphoryliert werden könnte. Noch stärker phosphoryliert wird die Mutante MOR S363A/T370A, was sich ebenfalls gut erklären ließe, da neben T379 hier auch S375 phosphoryliert werden dürfte. Die in (El Kouhen *et al.*, 2001) publizierten Daten sprechen also ebenfalls für agonistinduzierte Phosphorylierungen an T370, S375 und T379, sowie der Phosphorylierung an S363.

(El Kouhen *et al.*, 2001) untersuchten die Rezeptormutanten auch hinsichtlich ihrer Internalisierung mittels Fluoreszenz-Durchflusszytometrie. Dabei korrelieren die Ergebnisse mit dem sich andeutenden Phosphorylierungsschema. Fehlen die Phosphorylierungsstellen S363 und T370, so internalisieren die Rezeptoren noch immer vergleichbar mit dem wildtypischen Rezeptor. Fehlt S375 verringert sich die Internalisierungsrate aber deutlich. Fehlen zusätzlich zu S375 das S363 und das T370 scheint die Internalisierungsrate noch etwas schwächer auszufallen (ca. 20%). Diese Ergebnisse untermauern die Daten der vorliegenden Arbeit. Trotz der Mutationen (S363A, T370A, S375A) internalisiert der Rezeptor im Internalisierungs-ELISA in abgeschwächter Form nach Stimulation mit DAMGO (ca.20%) und Etonitazen (ca 40%). Die Internalisierung des MOR S363A-S375A wird dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit über die Phosphorylierung des T379 vermittelt.

Auf Grund der möglichen basalen Phosphorylierung des MOR an mehreren Phosphorylierungsstellen (Lau *et al.*, 2011) scheint die agonistinduzierte Phosphorylierung wohl nicht dem Alles-oder-nichts-Prinzip zu folgen. Ein Teil der Rezeptoren liegt anscheinend bereits im unstimulierten Zustand phosphoryliert vor. Wahrscheinlich begünstigt die Ligandenbindung einen besseren Zugang der Rezeptorkinasen und verschiebt so das Gleichgewicht innerhalb des Rezeptorpool von der Seite der dephosphorylierten auf die Seite der phosphorylierten Rezeptoren. Dazu passt auch die Beobachtung, dass der MOR nicht, wie bisher angenommen,

erst internalisiert werden muss, um dephosphoryliert werden zu können (Doll *et al.*, 2011). Beide Prozesse, Phosphorylierung und Dephosphorylierung, scheinen in gleicher Weise an der Zellmembran stattfinden zu können.

Zusammenfassend könnten sich die zur Internalisierung notwendigen Phosphorylierungsstellen somit auf S375 und T379 einkreisen lassen. Die verstärkte Phosphorylierung an T370 könnte dabei einen begünstigenden Effekt haben. Entsprechend den Ergebnissen dürfte eine vierfach Mutante (S363A, T370A, S375A, T379A) das gleiche Internalisierungsverhalten zeigen wie MOR S363A-T383A und MOR T354A-T394A. Genaueren Aufschluss über die Beteiligung der Phosphorylierungen an S363 und T370 an der Internalisierung, könnte eine Doppelmutante (S375A, T379A) liefern. Wäre bei dieser Mutante nach DAMGO eine Internalisierung zu beobachten, wäre dies ein deutlicher Hinweis auf die Beteiligung des S363 und T370. Die Dreifachmutante MOR S363A-S375A zeigt, dass die Phosphorylierung an T379 nach DAMGO und Etonitazen ausreichend erscheint, eine Internalisierung zu ermöglichen. Um die Gewichtung der Phosphorylierungsstellen S375 und T379 in Hinblick auf die Internalisierung festzustellen, müsste an einer weiteren Dreifachmutante (S363A, T370A, T379A) untersucht werden, ob eine alleinige Phosphorylierung an S375 ebenfalls zur Internalisierung nach DAMGO oder Etonitazen führt. Sollte dies der Fall sein, so wären beide Stellen gleichrangig zu bewerten. Sollte dies nicht der Fall sein, so wäre mit T379 letztlich die entscheidende Phosphorylierungsstelle, die zur Internalisierung des MOR beiträgt, identifiziert.

Die Bedeutung der dieser Phosphorylierungsstellen spiegelt sich möglicherweise auch in ihrer Konservierung (Abb. 5-1). Das murine S363, T370, S375 und T379 findet sich äquivalent in der Sequenz des MOR anderer Spezies stark konserviert. Für den murinen delta Opioidrezeptor (DOR) gibt es Hinweise auf Phosphorylierungen an T385 und S363 nach Stimulation mit dem DOR Agonist DPDPE in HEK 293 Zellen (Guo *et al.*, 2000). Für den kappa Opioidrezeptor (KOR) existiert im Vergleich zum murinen S375 des MOR das S369. Mit einem phosphospezifischen Antikörper konnte in HEK 293 Zellen und *in vivo* bei der Maus nach Stimulation mit dem KOR Agonist U50, 488 eine Phosphorylierung des S396 gezeigt werden (McLaughlin *et al.*, 2003, McLaughlin *et al.*, 2004). Die genannten Phosphorylierungsstellen liegen dabei in vergleichbarer Position zum NP(X)_{2,3}Y-Motiv. Dieses Motiv ist bei GPCRs hoch konserviert und scheint entsprechend seiner Lage innerhalb des Rezeptors eine wichtige, die Struktur determinierende Funktion zu besitzen, wobei es wohl Einfluss auf die Ausbildung aktiver bzw. inaktiver Rezeptorkonformation hat (Barak *et al.*, 1995).

Typ	Spezies	Sequenz	Position
MOR	<i>homo sapiens</i>	³³⁴ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> SNIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰⁰	S365 T372 S377 T381
MOR	<i>rattus norvegicus</i>	³³² NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> STIEQQNSSTRVRQNTIREHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ³⁹⁸	S363 T370 S375 T379
MOR	<i>mus musculus</i>	³³² NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> STIEQQNSSTRIRQNTIREHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ³⁹⁸	S363 T370 S375 T379
MOR	<i>pan troglodytes</i>	³³⁵ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> SNIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰¹	S366 T373 S378 T382
MOR	<i>macaca mulatta</i>	³³⁴ NPVLYAFLDEDFKRCRFREFCIP <u>TS</u> SNIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰⁰	S365 T372 S377 T381
MOR	<i>sus scrofa</i>	³³⁵ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> STIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰¹	S366 T373 S378 T382
MOR	<i>cavia porcellus</i>	³³⁴ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> STIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰⁰	S365 T372 S377 T381
MOR	<i>bos taurus</i>	³³⁵ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP <u>TS</u> STIEQQNSSTRIRQNTIRDHES <u>TAN</u> TVDRTNHQLENLEAETAPLP ⁴⁰¹	S366 T377 S378 T382
MOR	<i>danio rerio</i>	³²⁹ NPVLYAFLDENFKRCRFREFCVPSFSLVLDLQNSSTRSRNPQRDGGSGHTVDRTNQQV ³⁸⁴	S360 S372 T376
DOR	<i>homo sapiens</i>	³¹⁴ NPVLYAFLDENFKRCRFRLCRKPCGRPDPSSFSRAREATARERV <u>TACTP</u> EDGPGGGAAA ³⁷²	T358 S363
DOR	<i>rattus norvegicus</i>	³¹⁴ NPVLYAFLDENFKRCRFRLCRAPCGGQEPGSLRRRPRQATARERV <u>TACTP</u> EDGPGGGAAA ³⁷²	T358 S363
DOR	<i>mus musculus</i>	³¹⁴ NPVLYAFLDENFKRCRFRLCRTPCGRQEPGSLRRRPRQATARERV <u>TACTP</u> EDGPGGGAAA ³⁷²	T358 S363
KOR	<i>homo sapiens</i>	³²⁶ NPVLYAFLDENFKRCFRDFCFPLKMRMERQSTSRVRNVTVDPAEMRDVGGMKNPV ³⁸⁰	S369
KOR	<i>rattus norvegicus</i>	³²⁶ NPVLYAFLDENFKRCFRDFCFPIKMRMERQSTNRVRNVTVDPAEMRDVGGMKNPV ³⁸⁰	S369
KOR	<i>mus musculus</i>	³²⁶ NPVLYAFLDENFKRCFRDFCFPIKMRMERQSTNRVRNVTVDPAEMRDVGGMKNPV ³⁸⁰	S369

Abb. 5-1: Konservierte Serine und Threonine innerhalb des Opioidrezeptor C-Terminus. Die Gegenüberstellung zeigt die Aminosäuresequenzen des C-Terminus für verschiedene Spezies. Für den MOR sind die Serine und Threonine (fett) dabei in relativer Lage zum NP(X)_{2,3}Y-Motiv (unterstrichen) stark konserviert. Die im murinen MOR identifizierten Phosphorylierungsstellen sind farblich markiert. (Die Serine und Threonine äquivalent zum murinen S363 sind grau, die zum T370 hellblau, zum S375 grün und die zum T379 gelb unterlegt). Im unteren Teil sind auch Sequenzen für die beiden Opioidrezeptoren delta (DOR) und kappa (KOR) für *homo sapiens*, *rattus norvegicus* und *mus musculus* aufgelistet. Für den murinen DOR gibt es Hinweise für Phosphorylierungen an T358 (rosa) und S363 (rot) (Guo *et al.*, 2000). Für den murinen KOR wurde eine Phosphorylierung an S369 (grün) mit phosphospezifischem Antikörper gezeigt (McLaughlin *et al.*, 2004).

5.2.2 Bedeutung eines Phosphorylierungsmotives für die Arrestin 3 Bindung

Die Korrelation zwischen Phosphorylierungsstärke und Internalisierung des MOR passt auch zu den beobachteten Bindungseigenschaften des Arrestin 3. Dieses ist unter den Arrestinen am wenigsten selektiv bei der Bindung an phosphoryliert aktive oder phosphoryliert inaktive Formen der GPCRs. Das heißt, eine aktive Rezeptorkonformation, bzw. die Konformation des Rezeptors an sich, ist für die Bindung weniger entscheidend, als der Grad der Phosphorylierung. Dies hängt Möglicherweise damit zusammen, dass sich die Rezeptor-Bindungsstelle des Arrestin 3 wesentlich flexibler an den Bindungspartner anpassen kann. In der Kristallstruktur zeigen Arrestine in der C-Domäne eine β -Faltblatt Struktur, die bei Arrestin 3 aufgelockert ist, womit sich die erhöhte Flexibilität und geringere Selektivität für Rezeptorkonformationen erklären ließe (Zhan *et al.*, 2011).

Für die Aktivierung des Arrestin 3 scheint eine kritische Zahl an Phosphatresten, die durch den Rezeptor in den Komplex eingebracht werden, nötig. An der Phosphatbindestelle des

Arrestins, finden sich positiv geladene Aminosäurereste. Die Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste des Bindungspartners im Bereich der Phosphatbindestelle, scheint die Konformation des Arrestins in weiten Teilen des Proteins zu verändern. Auf Grund dieser Änderungen scheinen dann Interaktionen des Arrestins mit weiteren Bindungspartnern möglich (Vishnivetskiy *et al.*, 2000).

Nach Bindung des Arrestin 3 an den MOR besitzen die Phosphatreste an S375 und T379 wohl den besten Zugang zur Phosphatbindestelle des Arrestin 3. Für phosphoryliertes S363 und T370 kann eine Wechselwirkung mit der Phosphatbindestelle ebenfalls nicht ausgeschlossen werden. Da der Cluster ³⁵⁴TSST³⁵⁷ offensichtlich keinen Einfluss auf die Internalisierung des Rezeptors besitzt, scheint dieser Bereich nicht an einer Interaktion mit Arrestin 3 beteiligt.

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung, dass die Mutation der drei Phosphorylierungsstellen (S363A, T370A, S375A) nach Fentanyl und DAMGO zu einem Wechsel von der Arrestin 3 vermittelten ERK1/2 Aktivierung zu einer PKC-vermittelten ERK1/2 Aktivierung führt, so wie es nach Morphin für den nicht mutierten Rezeptor der Fall ist (Zheng *et al.*, 2011). Dies ist ein weiterer Hinweis dafür, dass mindestens zwei Phosphorylierungen des MOR in diesem Sequenzabschnitt nötig sind, um Arrestin 3 ausreichend zu aktivieren.

5.2.3 Liganden spezifische Phosphorylierung des MOR

Die ligandeninduzierte Phosphorylierung an T370, S375 und T379 scheint entscheidend für die Internalisierung des Rezeptors zu sein. Das unterschiedliche Internalisierungsverhalten der Rezeptormutanten, sowie die Untersuchungen mit phosphospezifischen Antikörpern belegen, dass die verschiedenen Agonisten zu unterschiedlichen Phosphorylierungszuständen des Rezeptors an diesen Aminosäureresten führen.

Für Morphin scheint die Phosphorylierung an S375 mit einer möglichen, schwachen Phosphorylierung an T379 wohl nicht ausreichend, um über Arrestin 3 eine Internalisierung zu vermitteln. Nach DAMGO und Etonitazen sind die Phosphorylierungen an T370, S375 und T379 am stärksten. Nach Fentanyl sind die Phosphorylierungen stärker als nach Morphin, aber zumindest bei T370 und T379 schwächer als bei DAMGO oder Etonitazen. Dies könnte das Internalisierungsverhalten des MOR S363A-S375A erklären. Offensichtlich ist die Phos-

phorylierung des T379 nach DAMGO und Etonitazen noch ausreichend eine Internalisierung zu vermitteln, während sie bei Fentanyl wohl eine kritische Grenze unterschreitet. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die Internalisierungsrate des MOR nicht nur von einer distinkten Phosphorylierung der beteiligten Phosphorylierungsstellen abhängig ist, sondern auch von der Stärke der Phosphorylierung innerhalb dieses Phosphorylierungsmotivs.

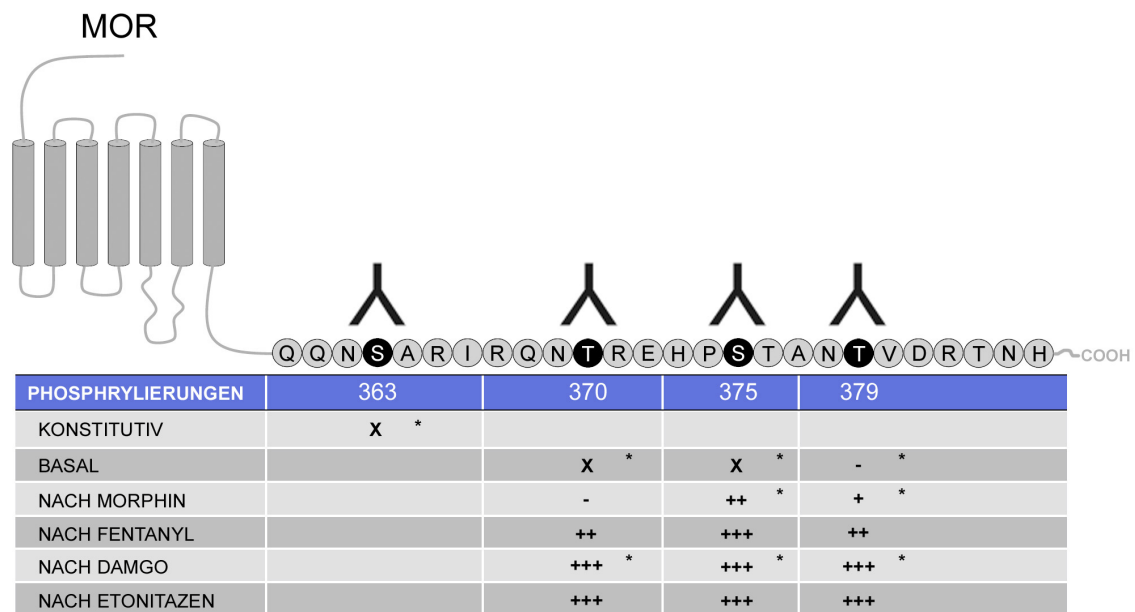


Abb. 5-2: Schema eines für die Internalisierung grundlegenden Phosphorylierungsmotives am MOR C-Terminus. Die Tabelle fasst die derzeitigen Kenntnisse zur Phosphorylierung des MOR in HEK 293 Zellen für die Sequenz S363-T379 zusammen. Zum einen stützen sich die Befunde auf die mit den phosphospezifischen Antikörpern gewonnenen Daten in dieser Arbeit, sowie Publikationen der Arbeitsgruppe (Schulz *et al.*, 2004; Doll *et al.*, 2011). Zum anderen stützen sie sich auf Ergebnisse aus massenspektrometrischen Untersuchungen (Lau *et al.*, 2001). Die Anzahl der Pluszeichen soll die Relation der beobachteten Phosphorylierungsgrade für die einzelnen Agonisten am entsprechenden Aminosäurerest veranschaulichen. Übereinstimmungen bei den Ergebnissen beider Methoden sind mit (*) markiert. Serin 363 scheint konstitutiv phosphoryliert. An T370 und S375 sind basale Phosphorylierungen wahrscheinlich. DAMGO und Etonitazen zeigen an T370, S375 und T379 gleichbleibend die stärksten Phosphorylierungen. Bei Fentanyl scheint die Phosphorylierung zumindest an T370 und T379 im Vergleich schwächer. Bei Morphin scheint die Phosphorylierung zumindest an T370 und T379 im Vergleich schwächer. Bei Morphin findet sich eine Phosphorylierung an S375, die im Vergleich zu den anderen Agonisten allerdings am schwächsten ausfällt. An T379 scheint Morphin ebenfalls eine schwache Phosphorylierung zu vermitteln. In der Massenspektrometrie wird nach Morphin auch eine Phosphorylierung an T370 gezeigt. Im Westernblot ist zur basalen Phosphorylierung allerdings kein Unterschied zu erkennen.

5.2.4 Bedeutung eines Phosphorylierungsmotives für die agonistinduzierte Internalisierung der MOR Spleißvarianten

Der Schluß, dass möglicherweise nicht die Quantität der Phosphorylierung entlang des C-Terminus für die Arrestin 3 vermittelte Internalisierung, sondern die Phosphorylierung spezifischer Serine und Threonine entscheidend ist, könnte auch aus dem Internalisierungsverhalten der MOR Spleißvarianten gezogen werden.

Spleißvariante	Sequenz
MOR1	³⁸⁷ LENLEAETAPLP ³⁹⁸
MOR1B	³⁸⁷ KIDLF ³⁹¹
MOR1C	³⁸⁷ PTLAVSVAQIFTGYPSPTHVEKPCKSCMDRGMRNLLPDDGPRQESGEGQLGR ⁴³⁸
MOR1D	³⁸⁷ RNEEPSS ³⁹³
MOR1E	³⁸⁷ KKKLD ^S QRGCVQHPV ⁴⁰¹

Abb 5-3: Spleißvarianten des murinen MOR. Abgebildet sind die abschließenden Aminosäuresequenzen des C-Terminus, die nach Exon 3 kodiert werden. Serine und Threonine sind fett dargestellt.

Wie bereits erwähnt, lässt sich die Spleißvariante MOR1D durch Morphin internalisieren. Bei MOR1 finden sich in der abschließenden Sequenz (³⁸⁷LENLEAETAPLP³⁹⁸) 12 Aminosäurereste, wobei mit T394 nur eine potentielle Phosphorylierungsstelle vorhanden ist. Bei MOR1D finden sich in (³⁸⁷RNEEPSS³⁹³) mit S392 und S393 hingegen zwei potentielle Phosphorylierungsstellen. Auch für die Spleißvariante MOR1E wurde die morphininduzierte Internalisierung beschrieben, dabei trägt sie in der Sequenz (³⁸⁷KKKLD^SQRGCVQHPV⁴⁰¹) mit S392 wie MOR1 nur eine mögliche Phosphorylierungsstelle. Hingegen bietet MOR1C in der Sequenz (³⁸⁷PTLAVSVAQIFTGYPSPTHVEKPCKSCMDRGMRNLLPDDGPRQESGEGQLGR⁴³⁸) mit T388, S392, T398, S402, T404, S412 und S431 gleich sieben mögliche Phosphorylierungsstellen an, internalisiert nach Morphin aber nicht. Während die morphininduzierte Internalisierung der vier Spleißvarianten also wechselhaft ausfällt, führt DAMGO bei allen Varianten zur Internalisierung. Dabei ist die Bindungsaffinität zu beiden Agonisten bei allen Varianten vergleichbar (Koch *et al.*, 2001). Ein Vergleich der Phosphorylierungsstärke zwischen den Rezeptorvarianten zeigt für MOR1 und MOR1C, dass diese nach Morphin signifikant schwächer ausfällt als nach DAMGO. Für MOR1D und MOR1E ist die Phosphorylierungsstärke nach Morphin und DAMGO hingegen vergleichbar (Koch *et al.*, 2001).

Ähnliche Befunde liefern auch Untersuchungen am MOR der Ratte. Von diesem existieren die beiden Spleißvarianten MOR1 und MOR1B. MOR1B unterscheidet sich dabei nur in den letzten Aminosäureresten, MOR1 (³⁸⁷LENLEAETAPLP³⁹⁸) und MOR1B (³⁸⁷KIDLF³⁹¹). Obwohl MOR1B das T394 fehlt internalisiert er in HEK293 Zellen dennoch stärker nach DAMGO als MOR1 (Koch *et al.*, 1998). Eine Mutation des T394 zu Alanin im MOR1 führt nach DAMGO Stimulation in mouse neuroblastoma Neuro2a Zellen ebenfalls zu einer gesteigerten Internalisierung (Wolf *et al.*, 1999).

Die Quantität an Serinen und Threoninen, die nach Exon 3 als mögliche Phosphorylierungsstellen kodiert werden, scheint für die agonistinduzierte Internalisierung nicht entscheidend zu sein. Vielmehr ist zu vermuten, dass die Unterschiede in der Sequenz der letzten Aminosäurereste unterschiedliche Konformationen des C-Terminus begünstigen. Im Falle des MOR1D und MOR1E scheint nach Bindung des Morphins wohl ein ähnliches Phosphorylierungsmuster möglich, wie nach der DAMGO Bindung. Um diese Hypothese zu überprüfen, wäre es wichtig, die Phosphorylierung am MOR1D bzw. MOR1E mit den vorhandenen phosphospezifischen Antikörpern gegen T370, S375 und T379 nach Morphin und DAMGO Stimulation zu überprüfen und zu vergleichen.

5.3 Schlussfolgerung

Die Fähigkeit eines Agonisten, eine Internalisierung des MOR zu vermitteln, scheint zumindest in HEK 293 Zellen davon abhängig zu sein, dass im Zuge der Agonistbindung bestimmte Aminosäurereste innerhalb der carboxyterminalen Sequenz phosphoryliert werden. Die betreffenden Phosphorylierungsstellen sind das Threonin 370, Serin 375 und Threonin 379.

Hinsichtlich der Agonistwirkung *in vivo* lassen sich diverse Unterschiede bei den einzelnen Agonisten des MOR beobachten. Einige dieser Unterschiede könnten neben dem Zusammenspiel von Rezeptorkonformation und Bindungspartnern, auch auf Basis unterschiedlicher Phosphorylierungen des MOR determiniert werden. So scheint eine ausreichende Phosphorylierung der genannten Aminosäurereste die Interaktion mit Arrestin 3 zu ermöglichen, wodurch weitere Prozesse wie die Internalisierung oder arrestinabhängiges Signaling in Gang gesetzt werden können. Allerdings scheint die spezielle Wirkung eines Agonisten nicht in allen MOR exprimierenden Zelltypen, bzw. Geweben, kongruent zu sein. Offenbar

haben die Ausstattung einer Zelle und deren Umfeld Einfluss auf das Verhalten und die Funktion des MOR *in vivo*.

Dennoch bietet das Wissen um die carboxyterminalen Phosphorylierungsstellen in Verbindung mit den zur Verfügung stehenden phosphospezifischen Antikörpern die Möglichkeit, das Verhalten des MOR ausgehend von Veränderungen am Rezeptor selbst besser verstehen zu lernen. Nach den Arbeiten im heterologen System, wären nun *in vivo* Studien zur agonist- und zellspezifischen MOR Phosphorylierung ein entscheidender Schritt, um heraus zu finden, welche Prozesse mit einer bestimmten Phosphorylierung des Rezeptors am Carboxy-Terminus korreliert sind.

Die aus solchen Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse könnten letztlich dazu beitragen, neue Analgetika bzw. Substanzcocktails zu entwickeln, die bei hohem therapeutischem Nutzen nur geringe Nebenwirkungen zeigen.

Literaturverzeichnis

- [Aghajanian, 1978] Aghajanian GK. **Tolerance of locus coeruleus neurones to morphine and suppression of withdrawal response by clonidine.** *Nature.* 1978;276(5684):186-8
- [Bailey *et al.*, 2009] Bailey CP, Oldfield S, Llorente J, Caunt CJ, Teschemacher AG, Roberts L, McArdle CA, Smith FL, Dewey WL, Kelly E, Henderson G. **Involvement of PKC alpha and G-protein-coupled receptor kinase 2 in agonist-selective desensitization of mu-opioid receptors in mature brain neurons.** *Br J Pharmacol.* 2009;158(1):157-64
- [Barak *et al.*, 1995] Barak LS, Ménard L, Ferguson SS, Colapietro AM, Caron MG. **The conserved seven-transmembrane sequence NP(X)2,3Y of the G-protein-coupled receptor superfamily regulates multiple properties of the beta 2-adrenergic receptor.** *Biochemistry.* 1995; 34(47):15407-14
- [Benovic *et al.*, 1986] Benovic JL, Strasser RH, Caron MG, Lefkowitz RJ. **Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986; 83(9):2797-801
- [Bohn *et al.*, 1999] Bohn LM, Lefkowitz RJ, Gainetdinov RR, Peppel K, Caron MG, Lin FT. **Enhanced morphine analgesia in mice lacking beta-arrestin 2.** *Science.* 1999;286(5449):2495-8
- [Bohn *et al.*, 2000] Bohn LM, Gainetdinov RR, Lin FT, Lefkowitz RJ, Caron MG. **Mu-opioid receptor desensitization by beta-arrestin-2 determines morphine tolerance but not dependence.** *Nature.* 2000;408(6813):720-3
- [Bozarth & Wise, 1981] Bozarth MA, Wise RA. **Intracranial self-administration of morphine into the ventral tegmental area in rats.** *Life Sci.* 1981;28(5):551-5
- [Buntin-Mushock *et al.*, 2005] Buntin-Mushock C, Phillip L, Moriyama K, Palmer PP. **Age-dependent opioid escalation in chronic pain patients.** *Anesth Analg.* 2005;100(6):1740-5
- [Calebiro *et al.*, 2010] Calebiro D, Nikolaev VO, Persani L, Lohse MJ. **Signaling by internalized G-protein-coupled receptors.** *Trends Pharmacol Sci.* 2010;31(5):221-8
- [Członkowski *et al.*, 1983] Członkowski A, Costa T, Przewlocki R, Pasí A, Herz A. **Opiate receptor binding sites in human spinal cord.** *Brain Res.* 1983;267(2):392-6
- [Delfs *et al.*, 1994] Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF. **Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level.** *J Comp Neurol.* 1994;345(1):46-68
- [Doll *et al.*, 2011] Doll C, Konietzko J, Pöll F, Koch T, Höllt V, Schuls S. **Agonist-selective patterns of μ -opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies.** *Br J Pharmacol.* 2011; 164(2):298-307
- [Doll *et al.*, 2011b] Doll C, Pöll F, Schulz S. **Deciphering μ -opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation.** *Traffic* in revision

- [El Kouhen *et al.*, 2001] El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang CY, Law PY, Loh HH. **Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differ-entially regulates mu-opioid receptor internalization.** *J Biol Chem.* 2001;276(16):12774-80
- [Finn & Whistler, 2001] Finn AK, Whistler JL. **Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal.** *Neuron.* 2001;32(5):829-39
- [Foord *et al.*, 2005] Foord SM, Bonner TI, Neubig RR, Rosser EM, Pin JP, Davenport AP, Spedding M, Harmar AJ. **International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list.** *Pharmacol Rev.* 2005;57(2):279-88.
- [Fredriksson *et al.*, 2003] Fredriksson R, Lagerström MC, Lundin LG, Schiöth HB. **The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints.** *Mol Pharmacol.* 2003;63(6):1256-72
- [Gardner *et al.*, 2001] Gardner B, Liu ZF, Jiang D, Sibley DR. **The role of phosphorylation/dephosphorylation in agonist-induced desensitization of D1 dopamine receptor function: evidence for a novel pathway for receptor dephosphorylation.** *Mol Pharmacol.* 2001; 59(2):310-21
- [Grandos-Soto *et al.*, 2000] Granados-Soto V, Kalcheva I, Hua X, Newton A, Yaksh TL. **Spinal PKC activity and expression: role in tolerance produced by continuous spinal morphine infusion.** *Pain.* 2000;85(3):395-404
- [Grecksch *et al.*, 2006] Grecksch G, Bartzsch K, Widera A, Becker A, Höllt V, Koch T. **Development of tolerance and sensitization to different opioid agonists in rats.** *Psychopharmacology (Berl).* 2006;186(2):177-84
- [Grecksch *et al.*, 2011] Grecksch G, Just S, Pierstorff C, Imhof AK, Glück L, Doll C, Lupp A, Becker A, Koch T, Stumm R, Höllt V, Schulz S. **Analgesic Tolerance to High-Efficacy Agonists But Not to Morphine Is Diminished in Phosphorylation-Deficient S375A {micro}-Opioid Receptor Knock-In Mice.** *J Neurosci.* 2011;31(39):13890-6
- [Gudermann *et al.*, 1996] Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. **Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction.** *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1996;36:429-59
- [Guo *et al.*, 2000] Guo J, Wu Y, Zhang W, Zhao J, Devi LA, Pei G, Ma L. **Identification of G protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated delta-opioid receptor phosphorylation.** *Mol Pharmacol.* 2000;58(5):1050-6
- [Handa *et al.*, 1981] Handa BK, Land AC, Lord JA, Morgan BA, Rance MJ, Smith CF. **Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors.** *Eur J Pharmacol.* 1981;70(4):531-40
- [Hopkins & Groom, 2002] Hopkins AL, Groom CR. **The druggable genome.** *Nat Rev Drug Discov.* 2002;1(9):727-30
- [Hull *et al.*, 2010] Hull LC, Llorente J, Gabra BH, Smith FL, Kelly E, Bailey C, Henderson G, Dewey WL. **The effect of protein kinase C and G protein-coupled receptor kinase inhibition on tolerance induced by mu-opioid agonists of different efficacy.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2010;332(3):1127-35

- [Ignatova *et al.*, 1999] Ignatova EG, Belcheva MM, Bohn LM, Neuman MC, Coscia CJ. **Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence.** *J Neurosci.* 1999;19(1):56-63
- [Keith *et al.*, 1996] Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M. **Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization.** *J Biol Chem.* 1996;271(32):19021-4
- [Keith *et al.*, 1998] Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Montelliet-Agius G, Stewart PL, Evans CJ, von Zastrow M. **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(3):377-84
- [Kelly 2006] Kelly E. **G-protein-coupled receptor dephosphorylation at the cell surface.** *Br J Pharmacol.* 2006;147(3):235-6
- [Koch *et al.*, 1998] Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, Höllt V. **Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization.** *J Biol Chem.* 1998;273(22):13652-7
- [Koch *et al.*, 2001] Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schröder H, Kahl E, Höllt V. **C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization.** *J Biol Chem.* 2001;276(33):31408-14
- [Lau *et al.*, 2011] Lau EK, Trester-Zedlitz M, Trinidad JC, Kotowski SJ, Krutchinsky AN, Burlingame AL, von Zastrow M. **Quantitative encoding of the effect of a partial agonist on individual opioid receptors by multisite phosphorylation and threshold detection.** *Sci Signal.* 2011;4(185):ra52
- [Lefkowitz & Shenoy, 2005] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. **Transduction of receptor signals by beta-arrestins.** *Science.* 2005;308(5721):512-7
- [Lupp *et al.*, 2011] Lupp A, Richter N, Doll C, Nagel F, Schulz S. **UMB-3, a novel rabbit monoclonal antibody, for assessing μ -opioid receptor expression in mouse, rat and human formalin-fixed and paraffin-embedded tissues.** *Regul Pept.* 2011;167(1):9-13
- [Macey *et al.*, 2006] Macey TA, Lowe JD, Chavkin C. **Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons.** *J Biol Chem.* 2006 Nov 10;281(45):34515-24
- [Macey *et al.*, 2009] Macey TA, Bobeck EN, Hegarty DM, Aicher SA, Ingram SL, Morgan MM. **Extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation counteracts morphine tolerance in the periaqueductal gray of the rat.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2009;331(2):412-8
- [Maekawa *et al.*, 1994] Maekawa K, Minami M, Yabuuchi K, Toya T, Katao Y, Hosoi Y, Onogi T, Satoh M. **In situ hybridization study of mu- and kappa-opioid receptor mRNAs in the rat spinal cord and dorsal root ganglia.** *Neurosci Lett.* 1994;168(1-2):97-100
- [Mansour *et al.*, 1994] Mansour A, Fox CA, Burke S, Meng F, Thompson RC, Akil H, Watson SJ. **Mu, delta, and kappa opioid receptor mRNA expression in the rat CNS: an in situ hybridization study.** *J Comp Neurol.* 1994;350(3):412-38

- [Marker *et al.*, 2005] Marker CL, Luján R, Loh HH, Wickman K. **Spinal G-protein-gated potassium channels contribute in a dose-dependent manner to the analgesic effect of mu- and delta- but not kappa-opioids.** *J Neurosci.* 2005;25(14):3551-9
- [Massotte *et al.*, 2002] Massotte D, Brillet K, Kieffer B, Milligan G. **Agonists activate Gi1 alpha or Gi2 alpha fused to the human mu opioid receptor differently.** *J Neurochem.* 2002;81(6):1372-82
- [Matthes *et al.*, 1996] Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, Valverde O, Slowe S, Kitchen I, Befort K, Dierich A, Le Meur M, Dollé P, Tzavara E, Hanoune J, Roques BP, Kieffer BL. **Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the mu-opioid-receptor gene.** *Nature.* 1996;383(6603):819-23
- [McLaughlin *et al.*, 2003] McLaughlin JP, Xu M, Mackie K, Chavkin C. **Phosphorylation of a carboxyl-terminal serine within the kappa-opioid receptor produces desensitization and internalization.** *J Biol Chem.* 2003;278(36):34631-40
- [McLaughlin *et al.*, 2004] McLaughlin JP, Myers LC, Zarek PE, Caron MG, Lefkowitz RJ, Czyzyk TA, Pintar JE, Chavkin C. **Prolonged kappa opioid receptor phosphorylation mediated by G-protein receptor kinase underlies sustained analgesic tolerance.** *J Biol Chem.* 2004;279(3):1810-8
- [Mitrovic *et al.*, 2003] Mitrovic I, Margeta-Mitrovic M, Bander S, Stoffel M, Jan LY, Basbaum AI. **Contribution of GIRK2-mediated postsynaptic signaling to opiate and alpha 2-adrenergic analgesia and analgesic sex differences.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(1):271-6
- [Moises *et al.*, 1994] Moises HC, Rusin KI, Macdonald RL. **Mu- and kappa-opioid receptors selectively reduce the same transient components of high-threshold calcium current in rat dorsal root ganglion sensory neurons.** *J Neurosci.* 1994;14(10):5903-16
- [Oldham & Hamm, 2008] Oldham WM, Hamm HE. **Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors.** *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9(1):60-71
- [Paing *et al.*, 2002] Paing MM, Stutts AB, Kohout TA, Lefkowitz RJ, Trejo J. **beta -Arrestins regulate protease-activated receptor-1 desensitization but not internalization or Down-regulation.** *J Biol Chem.* 2002;277(2):1292-300
- [Pan, 2005] Pan YX. **Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters.** *DNA Cell Biol.* 2005;24(11):736-50
- [Pitcher *et al.*, 1992] Pitcher J, Lohse MJ, Codina J, Caron MG, Lefkowitz RJ. **Desensitization of the isolated beta 2-adrenergic receptor by beta-adrenergic receptor kinase, cAMP-dependent protein kinase, and protein kinase C occurs via distinct molecular mechanisms.** *Biochemistry.* 1992;31(12):3193-7
- [Polgár *et al.*, 1999] Polgár E, Fowler JH, McGill MM, Todd AJ. **The types of neuron which contain kinase C gamma in rat spinal cord.** *Brain Res.* 1999;833(1):71-80
- [Premont & Gainetdinov, 2007] Premont RT, Gainetdinov RR. **Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins.** *Annu Rev Physiol.* 2007;69:511-34
- [Progozheva *et al.*, 1998] Progozheva ID, Lomize AL, Mosberg HI. **Opioid receptor three-dimensional structures from distance geometry calculations with hydrogen bonding constraints.** *Biophys J.* 1998;75(2):612-34

- [Raehal & Bohn, 2011] Raehal KM, Bohn LM. **The role of beta-arrestin2 in the severity of antinociceptive tolerance and physical dependence induced by different opioid pain therapeutics.** *Neuropharmacology*. 2011;60(1):58-65
- [Raingo *et al.*, 2007] Raingo J, Castiglioni AJ, Lipscombe D. **Alternative splicing controls G protein-dependent inhibition of N-type calcium channels in nociceptors.** *Nat Neurosci*. 2007; 10(3):285-92
- [Rosenbaum *et al.*, 2009] Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. **The structure and function of G-protein-coupled receptors.** *Nature*. 2009;459(7245):356-63
- [Rusin & Moises, 1995] Rusin KI, Moises HC. **mu-Opioid receptor activation reduces multiple components of high-threshold calcium current in rat sensory neurons.** *J Neurosci*. 1995;15(6):4315-27
- [Schulz *et al.*, 2004] Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Höllt V. **Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375.** *EMBO J*. 2004;23(16):3282-9
- [Simon *et al.*, 1991] Simon MI, Strathmann MP, Gautam N. **Diversity of G proteins in signal transduction.** *Science*. 1991;252(5007):802-8
- [Sternini *et al.*, 1996] Sternini C, Spann M, Anton B, Keith DE Jr, Bunnett NW, von Zastrow M, Evans C, Brecha NC. **Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo.** *Proc Natl*
- [Terman *et al.*, 2004] Terman GW, Jin W, Cheong YP, Lowe J, Caron MG, Lefkowitz RJ, Chavkin C. **G-protein receptor kinase 3 (GRK3) influences opioid analgesic tolerance but not opioid withdrawal.** *Br J Pharmacol*. 2004;141(1):55-64
- [Trujillo & Akil, 1981] Trujillo KA, Akil H. **Inhibition of morphine tolerance and dependence by the NMDA receptor antagonist MK-801.** *Science*. 1991;251(4989):85-7
- [Vishnivetskiy *et al.*, 2000] Vishnivetskiy SA, Schubert C, Climaco GC, Gurevich YV, Velez MG, Gurevich VV. **An additional phosphate-binding element in arrestin molecule. Implications for the mechanism of arrestin activation.** *J Biol Chem*. 2000;275(52):41049-57
- [Wang *et al.*, 2002] Wang HL, Chang WT, Hsu CY, Huang PC, Chow YW, Li AH. **Identification of two C-terminal amino acids, Ser(355) and Thr(357), required for short-term homologous desensitization of mu-opioid receptors.** *Biochem Pharmacol*. 2002;64(2):257-66
- [Wang *et al.*, 2005] Wang HY, Friedman E, Olmstead MC, Burns LH. **Ultra-low-dose naloxone suppresses opioid tolerance, dependence and associated changes in mu opioid receptor-G protein coupling and Gbetagamma signaling.** *Neuroscience*. 2005;135(1):247-61
- [Whistler *et al.*, 1999] Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M. **Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis implications for the biology of opiate tolerance and addiction.** *Neuron*. 1999;23(4):737-46
- [Wolf *et al.*, 1999] Wolf R, Koch T, Schulz S, Klutzny M, Schröder H, Raulf E, Bühling F, Höllt V. **Replacement of threonine 394 by alanine facilitates internalization and resensitization of the rat mu opioid receptor.** *Mol Pharmacol*. 1999;55(2):263-8

-
- [Wu *et al.*, 2004] Wu ZZ, Chen SR, Pan HL. **Differential sensitivity of N- and P/Q-type Ca²⁺ channel currents to a mu opioid in isolectin B4-positive and -negative dorsal root ganglion neurons.** *J Pharmacol Exp Ther.* 2004;311(3):939-47
- [Yu *et al.*, 1997] Yu Y, Zhang L, Yin X, Sun H, Uhl GR, Wang JB. **Mu opioid receptor phosphorylation, desensitization, and ligand efficacy.** *J Biol Chem.* 1997;272(46):28869-74
- [Zeitz *et al.*, 2001] Zeitz KP, Malmberg AB, Gilbert H, Basbaum AI. **Reduced development of tolerance to the analgesic effects of morphine and clonidine in PKC gamma mutant mice.** *Pain.* 2001;94(3):245-53
- [Zhan *et al.*, 2011] Zhan X, Gimenez LE, Gurevich VV, Spiller BW. **Crystal structure of arrestin-3 reveals the basis of the difference in receptor binding between two non-visual subtypes.** *J Mol Biol.* 2011;406(3):467-78
- [Zheng *et al.*, 2008] Zheng H, Loh HH, Law PY. **Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G protein-dependent ERK activation.** *Mol Pharmacol.* 2008;73(1):178-90
- [Zheng *et al.*, 2011] Zheng H, Chu J, Zhang Y, Loh HH, Law PY. **Modulating micro-opioid receptor phosphorylation switches agonist-dependent signaling as reflected in PKCepsilon activation and dendritic spine stability.** *J Biol Chem.* 2011;286(14):12724-33
- [Zhou & Zhu, 2006] Zhou LF, Zhu YP. **Changes of CREB in rat hippocampus, prefrontal cortex and nucleus accumbens during three phases of morphine induced conditioned place preference in rats.** *J Zhejiang Univ Sci B.* 2006;7(2):107-13

Danksagung

Dank für Zeit und Arbeit rund um die Promotion gilt:

Herrn **Prof. Dr. Stefan Schulz** für die Bereitstellung des Themas, das Erstgutachten, sowie seine unerschütterlich ruhige Art, die zuweilen unheimlich anmutet, dem an Material und Methoden verzweifelnden Mitarbeiter aber stets ein zuversichtliches Gefühl für die Zukunft schenkt.

Herrn **Prof. Dr. Oliver Werz** für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Herrn **PD Dr. Thomas Koch** für die Bereitschaft zur Übernahme des externen Gutachtens und **Prof. Dr. Hermann Ammer** für das schnelle Einspringen als Ersatzgutachter.

Den Arbeitskollegen **Florian Pöll, Christian Doll, Falko Nagel, Stefan Jacobs** und **Thomas Fischer** für die entspannte und lustige Arbeitsatmosphäre während unserer Zeit in Würzburg. Dolli insbesondere für die Ausrichtung der WG-Parties, die sicherlich mit „Helden der Kindheit“ einen stimmungsvollen Höhepunkt erreichten.

Heidrun Guder und **Marita Wunder** für die hervorragende technische Unterstützung im Labor. Heidrun für die leckeren Kuchen und Essen zwischendurch.

Frau **PD Dr. Amelie Lupp** und **Anne Imhof** für die großartige Unterstützung bei den Mäusversuchen. Beiden für ihre Frohnatur. Frau Lupp für ihre geniale Art, Wissenschaft zu leben, und Anne für ihre Fähigkeit berufliches Engagement und soziale Kompetenz harmonisch zu vereinen.

Wiebke Müller und **Christine Anders** für die Kaffeepausen und die Falsifikation der engelsreinen Weiblichkeit. Wiebke besonders für das akribische Korrekturlesen dieser Arbeit. Christine für die abendliche Ablenkung bei Pizza, Fernsehserien und Katzenknuddeln.

Den Mitarbeitern des Institutes, die den Betrieb am Laufen halten. **Birgit Lange** und **Heike Stadler** für besonders verständigen und kollegialen Umgang. Den Mitarbeitern des IMSID für die gute Zusammenarbeit bei der Verwaltung des Netzbetriebes.

Bernd Przygoda, Andreas Pompl und **Felix Stark** für die gemeinsamen Streifzüge durch die Weiten Europas, die es erlaubten, den Blick weiter schweifen zu lassen, als vom Arbeitsplatz über die Fensterbank bis zum Nachbargebäude.

Meiner Mutter **Karin Just** für beschauliche Weihnachtsaufenthalte, die Erkenntnis, wohl nie erwachsen zu werden, und die Möglichkeit auf eigenen Rädern zu stehen.