

Charakterisierung des neu entwickelten  
monoklonalen Antikörpers UMB-3 gegen  
den  $\mu$ -Opioidrezeptor

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

**von Nadine Richter  
geboren am 01.10.1985 in Eisenhüttenstadt**

## **Gutachter**

1. PD Dr. med. Amelie Lupp, Jena
2. Prof. Dr. rer. nat. Ferdinand von Eggeling, Jena
3. PD Dr. med. Michael Kretzschmar, Gera

**Tag der öffentlichen Verteidigung:** 03.04.2012

# Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AEC	Aminoethylcarbazol
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARS	aktivierendes retikuläres System
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Cy3	Indocarbocyanin
DAMGO	[D-Ala <sup>2</sup> , N-MePhe <sup>4</sup> , Gly-ol]-enkephalin
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	$\delta$ -Opioidrezeptor
ECL	verstärkende Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunosorbent-Assay
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinase
Fab-Fragment	antigenbindendes Fragment
Fc-Fragment	kristallisierbares Fragment
FCS	Fetales Kälberserum
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GDP	Guanosindiphosphat
GRKs	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen
GTP	Guanosintriphosphat
HAT	Hypoxanthin, Aminopterin, Thymidin
HEK-Zellen	humane embryonale Nieren-Zellen
IRS	immunoreaktiver Score
kDa	Kilodalton
KOR	$\kappa$ -Opioidrezeptor
MAP	Mitogen-aktiviertes Protein

MG	Molekulargewicht
min	Minute
MMP	Magermilchpulver
MOR	$\mu$ -Opioidrezeptor
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure / Boten-Ribonukleinsäure
Ncl.	Nucleus / Kern
NGS	Normales Ziegen-Serum
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
N-Terminus	Amino-Terminus
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PB-T	Phosphat-Puffer + 0,1% Triton
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
PKC	Proteinkinase C
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RIPA	Radio-Immuno-Präzipitations-Assay
RSA	Rinderserumalbumin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
UMB-3	monoklonaler Antikörper gegen den $\mu$ -Opioidrezeptor
WGA	Weizenkeimagglutinin
WHO	Weltgesundheitsorganisation

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	1
<b>2. Einleitung</b> .....	3
2.1 Opioide.....	3
2.2 Struktur und Vorkommen der Opioidrezeptoren.....	4
2.3 Signaltransduktion und deren Effekte auf die Zielorgane.....	6
2.4 Toleranz und pronozizeptive Systeme.....	8
2.5 Antikörper.....	9
2.6 Herstellung monoklonaler Antikörper.....	11
<b>3. Ziele der Arbeit</b> .....	13
<b>4. Material und Methoden</b> .....	14
4.1 Material.....	14
4.1.1 Untersuchungsmaterial.....	14
4.1.1.1 Tiermaterial.....	14
4.1.1.2 Menschliches Material.....	14
4.1.2 Puffer und Lösungen.....	15
4.1.2.1 Western-Blot-Analysen.....	15
4.1.2.2 Immuncytochemie.....	16
4.1.2.3 Immunhistochemie.....	16
4.1.3 Chemikalien.....	17
4.1.4 Antikörper und Kits.....	18
4.1.5 Medikamente.....	19
4.2 Methoden.....	19
4.2.1 Western-Blot-Analysen.....	19
4.2.1.1 Rezeptorisolation aus Zellen.....	19
4.2.1.1.1 Zellaufbereitung.....	19
4.2.1.1.2 Rezeptorisolation aus Zellen mit WGA-Beads.....	19
4.2.1.2 Rezeptorisolation aus dem Gewebe.....	20
4.2.1.2.1 Gewebeaufbereitung.....	20
4.2.1.2.2 Rezeptorisolation aus dem Gewebe mit Protein-A-Beads.....	20

4.2.1.3 Darstellung der Rezeptorproteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot.....	21
4.2.1.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	21
4.2.1.3.2 Western-Blot.....	21
4.2.1.3.3 Antikörperbehandlung.....	22
4.2.1.3.4 Peptidneutralisation.....	22
4.2.1.3.5 Entwicklung.....	23
4.2.2. Immuncytochemie.....	23
4.2.2.1 Zellaufbereitung.....	23
4.2.2.2 Stimulation der Zellen.....	23
4.2.2.3 Fixierung der Zellen und Vorbereitung auf die Antikörperbehandlung.....	24
4.2.2.4 Antikörperbehandlung.....	24
4.2.3 Immunhistochemie.....	24
4.2.3.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials.....	24
4.2.3.2 Vorbereitung der Paraffinschnitte.....	25
4.2.3.3 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode).....	25
4.2.3.4 Gegenfärbung und Eindecken.....	26
4.2.3.5 Peptidneutralisation.....	27
4.2.4 Auswertung.....	27
<b>5. Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
5.1 Western-Blot-Analysen.....	28
5.1.1 Western-Blot-Analyse an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen.....	28
5.1.2 Western-Blot-Analyse am Hirngewebe der Maus.....	29
5.2 Immunzytochemische Färbungen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen.....	30
5.3 Immunhistochemie.....	31
5.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Geweben der Ratte.....	31
5.3.2 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Geweben der Maus.....	37
5.3.3 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen humanen Geweben.....	42
5.3.4 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen humanen Tumorgeweben....	42
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>44</b>
6.1 Western-Blot-Analysen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und am.....	44
Hirngewebe der Maus	
6.2 Immunzytochemische Färbungen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen.....	46

6.3 Immunhistochemische Färbungen an verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies... 48	48
6.4 Immunhistochemische Färbungen an verschiedenen Tumorgeweben des Menschen..... 59	59
<b>7. Schlussfolgerungen.....</b>	<b>62</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>9. Anhang.....</b>	<b>74</b>
9.1 Lebenslauf und Publikation.....	74
9.2 Ehrenwörtliche Erklärung .....	75
9.3 Danksagung.....	76

# 1. Zusammenfassung

Opioide gehören zu den wirkungsvollsten Medikamenten bei der Therapie akuter und chronischer Schmerzen. Sie vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an supraspinalen, spinalen und peripheren Opioidrezeptoren, welche zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Auf der Grundlage pharmakologischer Untersuchungen werden die drei Opioidrezeptorhaupttypen  $\mu$  (MOR),  $\delta$  (DOR) und  $\kappa$  (KOR) unterschieden. Der überwiegende Teil der im medizinischen Alltag verwendeten Opiode (z.B. Morphin) bindet jedoch an den  $\mu$ -Opioidrezeptor. Neben dem therapeutisch genutzten analgetischen Effekt werden über den MOR auch Nebenwirkungen wie Obstipation, Euphorie, Bradykardie, Atemdepression, Hypothermie und die Entwicklung von Toleranz und Abhängigkeit vermittelt.

Die Lokalisation des MOR im Gehirn von Nagern konnte in der Vergangenheit bereits in zahlreichen Studien mit Hilfe polyklonaler Antikörper untersucht werden. Schwierigkeiten bereitete bisher die Herstellung von geeigneten Antikörpern für die Immunpräzipitation und das Immunoblotting von  $\mu$ -Opioidrezeptoren aus nativem Gewebe. Ursächlich hierfür ist die geringe Menge an MOR *in vivo*. Die biochemische Analyse von MOR-Signalwegen ist dementsprechend erschwert und das Wissen über Proteininteraktionen und posttranslationale Modifikationen von  $\mu$ -Opioidrezeptoren ist begrenzt. Darüberhinaus sind die bisherigen immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisation des MOR im Hirn von Nagern auf Gefrierschnitte beschränkt gewesen. Dies liegt größtenteils an der begrenzten kommerziellen Verfügbarkeit von Anti-MOR-Antikörpern, die in der Lage sind, den labilen  $\mu$ -Opioidrezeptor in in Paraffin eingebetteten Geweben nachzuweisen. Die Verwendung von Gefrierschnitten geht jedoch mit einer beeinträchtigten Morphologie und folglich einer schlechteren Zuordnung der Gewebestrukturen zu der immunhistochemischen Färbung einher.

In der vorliegenden Arbeit sollte der neu entwickelte monoklonale Antikörper UMB-3, welcher gegen den Carboxy-Terminus des  $\mu$ -Opioidrezeptors der Ratte, der Maus und des Menschen gerichtet ist, hinsichtlich seiner Spezifität untersucht werden. Hierzu wurden Western-Blot-Analysen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und Gehirnen von MOR-Wildtyp- und MOR-Knockout-Mäusen, immunzytochemische Studien an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen sowie immunhistochemische Färbungen am Gehirn, Rückenmark und Darm von MOR(+/-)-, MOR(-/-)-Mäusen, Ratten und Menschen (nur Darm und Rückenmark) durchgeführt. Die Western-Blot-Analyse am Gehirn von Wildtyp- und MOR-Knockout-Mäusen sollte zudem nachweisen, ob der UMB-3 in der Lage ist, den labilen  $\mu$ -Opioidrezeptor aus nativen Gewebekomplexen zu präzipitieren. Bei einer vergleichenden immunhistochemischen Studie an formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten gesunden



Organen von Ratten, Wildtyp- und MOR-Knockout-Mäusen sowie humanen Tumorgeweben sollte ein mögliches Vorkommen von  $\mu$ -Opioidrezeptoren eruiert werden.

Die Spezifität des monoklonalen Anti-MOR-Antikörpers UMB-3 konnte durch folgende Ergebnisse demonstriert werden:

- 1) Die Detektion einer breiten Bande im Bereich von 70-80kDa bei den MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und in den Immunpräzipitaten aus MOR(+/-)-, nicht jedoch aus MOR(-/-)-Mäusehirnen.
- 2) Eine membranständige Färbung von unstimulierten MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen sowie die Translokation des Fluoreszenzsignals ins Cytosol der Zellen nach der Behandlung mit einem MOR-Agonisten.
- 3) Die spezifische Markierung von Nervenzellkörpern und -fortsätzen in den Regionen des zentralen und enterischen Nervensystems von Ratten, Wildtyp-Mäusen und Menschen, in denen typischerweise  $\mu$ -Opioidrezeptoren exprimiert werden. Hierzu zählen das Striatum, der Hippocampus, der Nucleus accumbens, der Thalamus, die Colliculi superiores und inferiores, der Nucleus tractus solitarii, die Substantia gelatinosa des Rückenmarks sowie die Ganglien des Magen-Darm-Traktes.
- 4) Die Abwesenheit einer solchen Färbung in den MOR-Knockout-Mäusen bzw. nach der Neutralisation des UMB-3 mit seinem Peptidantigen.

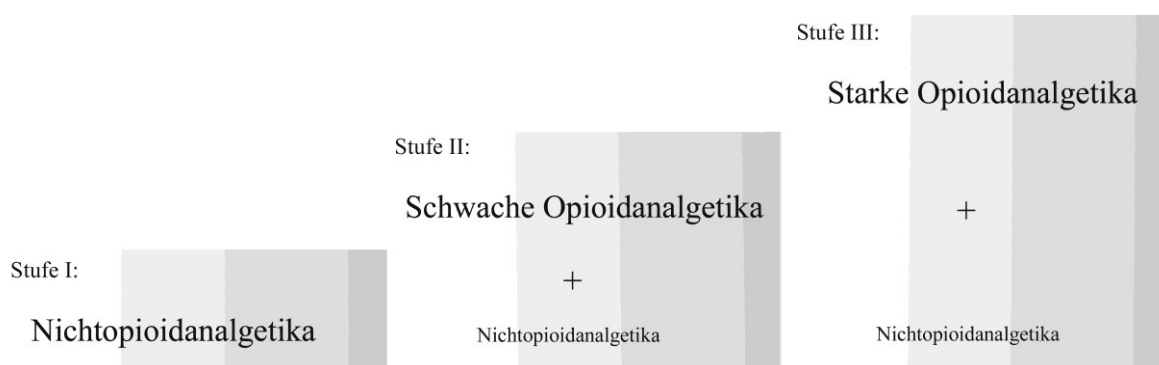
Bei der immunhistochemischen Untersuchung der Organe von Ratten und Wildtyp-Mäusen, konnten MOR-positive Zellen in der Adenohypophyse, in der Retina und in den Hinterwurzelganglien sowie im Nebennierenmark, im Ovar und in der Gallenblase detektiert werden. Diese Markierungen fehlten sowohl bei den MOR-Knockout-Mäusen als auch bei den Ratten nach der Peptidneutralisation. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der immunhistochemischen Färbung der menschlichen Tumorgewebe keine spezifische MOR-Expression. In der Zusammenschau mit den Ergebnissen anderer Autoren scheint der MOR, im Gegensatz zum DOR und KOR, in humanen Tumoren eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. Dementsprechend erscheint hier eine Diagnostik hinsichtlich des MOR-Besatzes mittels UMB-3 wenig sinnvoll.

Anhand der vorliegenden Studie konnte insgesamt gezeigt werden, dass sich der neu entwickelte monoklonale Antikörper UMB-3 sowohl für die Immunpräzipitation und das Immunoblotting des MOR aus nativem Gewebe als auch für dessen Detektion in Paraffinschnitten von Geweben aus Nagern und Menschen eignet. Diese Fähigkeiten könnten in der Zukunft die Erforschung von in vivo stattfindenden MOR-Signalwegen und ihrer Regulation erleichtern.

## 2. Einleitung

### 2.1 Opioide

Der Begriff „Opioide“ umfasst alle Substanzen, die an Opioidrezeptoren binden. Dazu gehören die natürlichen Alkaloide des Opiums (Opiate), die endogenen Opioide sowie halb- oder vollsynthetisch hergestellte Substanzen mit morphinähnlichen Eigenschaften (Rosenblum et al. 2008). Im Jahr 1805 gelang dem deutschen Apotheker Sertürner die Isolation von Morphin aus Opium, dem getrockneten Saft des Schlafmohns. Zu den Bestandteilen des Opiums gehören neben Morphin (10-15%) auch Codein, Noscapin, Papaverin und Thebain (Zöllner und Schäfer 2008). Obwohl die analgetische Wirkung der Opioide schon seit Jahrtausenden bekannt ist, gelten sie auch heute noch als die wirkungsvollsten Medikamente bei der Behandlung von Schmerzen (Rosenblum et al. 2008). Sie nehmen innerhalb des WHO-Stufenschemas zur Therapie von mäßigen bis schweren chronischen Schmerzen eine zentrale Stellung ein (siehe Abb. 1).



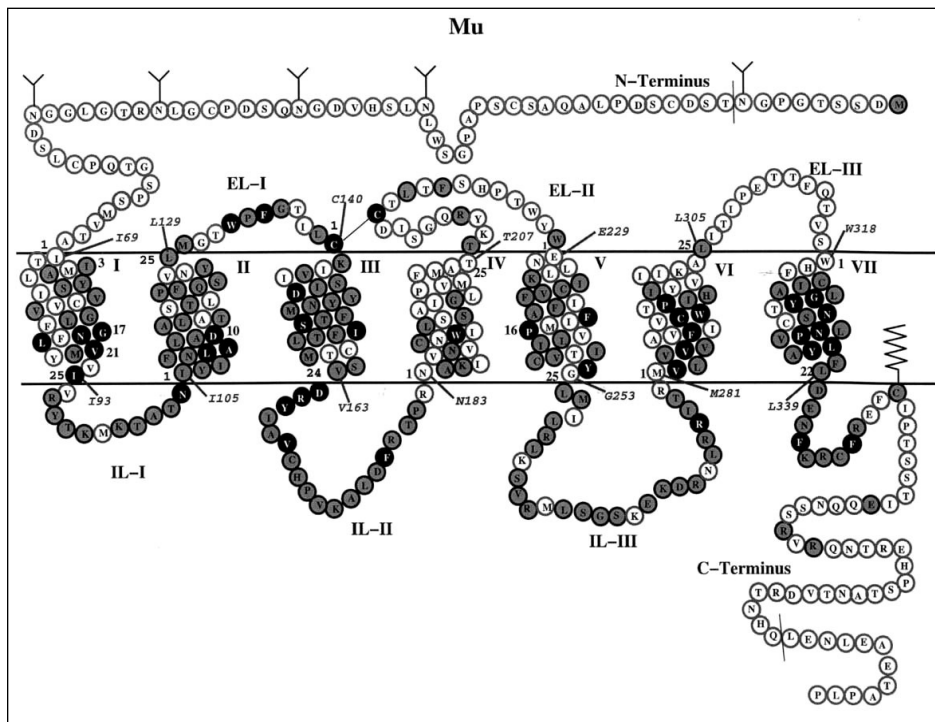
**Abb. 1:** WHO-Stufenschema zur Therapie von Tumorschmerzen. Bei leichteren Schmerzen (Stufe I) kommt es zum Einsatz von Nichtopioidanalgetika wie z.B. Diclofenac, Ibuprofen oder Paracetamol. Bei nicht ausreichender Analgesie wird zusätzlich ein schwaches Opioid verabreicht (z.B.: Tramadolol, Tilidin/Naloxon). Reicht auch diese Kombination nicht mehr aus, wird ein starkes Opioid, wie Morphin oder Fentanyl, eingesetzt (Stufe III) (Neuburger und Schmelz 2007).

Endogene Opioide sind natürliche Liganden der Opioidrezeptoren und werden unterteilt in Enkephaline, Endorphine und Dynorphine. Diese körpereigenen Peptide werden in Stress-situationen oder bei Schmerzen vermehrt ausgeschüttet und wirken u.a. antinozizeptiv (Freye 2009). Als halbsynthetisch hergestellte Opioide bezeichnet man Medikamente, welche ausgehend von natürlich vorkommenden Opiaten synthetisiert werden (z.B. Heroin aus Morphin). Zu den vollsynthetischen Substanzen zählt man z.B. Fentanyl und Methadon (Rosenblum et al. 2008). Opioide werden hinsichtlich ihrer Wirkung an den drei Rezeptorhaupttypen  $\mu$ ,  $\kappa$  und  $\delta$  in folgende Gruppen eingeteilt: reine Agonisten, gemischte

Agonisten/Antagonisten, partielle Agonisten und Antagonisten (Klaschik und Clemens 2005). Viele der im medizinischen Alltag verwendeten Opioide (z.B. Fentanyl) gehören zu den reinen Agonisten. Diese aktivieren vor allem  $\mu$ -Opioidrezeptoren und besitzen diesbezüglich eine hohe Affinität (Bindungsstärke) und intrinsische Aktivität (biologische Wirksamkeit). Reine Antagonisten (Naloxon, Naltrexon) verfügen zwar über keine intrinsische Aktivität, sind aber in der Lage, Agonisten kompetitiv von der Bindungsstelle zu verdrängen und damit deren Wirkungen aufzuheben. Zu den gemischten Agonisten/Antagonisten zählt man diejenigen Substanzen, die z.B. als Antagonist am  $\mu$ -Opioidrezeptor und als Agonist am  $\kappa$ - und  $\delta$ -Rezeptor wirken. Als partieller Agonist hat Buprenorphin eine niedrige Wirkstärke und besitzt ebenso wie die Agonisten/Antagonisten einen Ceiling-Effekt (Sättigungseffekt) (Rosenblum et al. 2008, Zöllner und Schäfer 2008). Dieser beschreibt das Phänomen, dass nach Erreichen einer maximalen analgetischen Wirkung eine weitere Dosissteigerung keine Wirkungsverstärkung mehr nach sich zieht (Klaschik und Clemens 2005).

## 2.2 Struktur und Vorkommen der Opioidrezeptoren

Opioide vermitteln ihre Wirkung über die Bindung an membranständigen Opioidrezeptoren, welche zur Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und zur Subfamilie der Rhodopsinrezeptoren gehören. Diese sind gekennzeichnet durch einen extrazellulären N-Terminus, 7 transmembranäre Domänen, drei intra- und drei extrazelluläre Schleifen, sowie einen intrazellulären C-Terminus (Law et al. 2000) (siehe Abb. 2). Nachdem 1973 der Nachweis von spezifischen Bindungsstellen für Opioide gelang (Pert und Snyder 1973, Simon et al. 1973, Terenius 1973), konnte Anfang der 90er Jahre erstmals die cDNA von unterschiedlichen Opioidrezeptoren kloniert werden (Evans et al. 1992, Kieffer et al. 1992, Chen et al. 1993). Es existieren drei Gene, die für den  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioid-Rezeptor (MOR, DOR und KOR) codieren und auf den Chromosomen 6, 1 und 8 lokalisiert sind (Minami und Satoh 1995). Die Rezeptorproteine bestehen aus 370-400 Aminosäuren, haben ein durchschnittliches Molekulargewicht von 60kDa und sind zu über 60% identisch. Besonders die transmembranären Domänen und die intrazellulären Schleifen weisen eine große Homologie auf. Im N-Terminus, welcher in die Ligandenbindung involviert ist, im C-Terminus, welcher wichtig für die Kopplung an die Second-messenger-Systeme ist, und in den extrazellulären Schleifen konnten dahingegen die größten Unterschiede gefunden werden (Loh und Smith 1990, Minami und Satoh 1995, Jordan und Devi 1998).



**Abb. 2:** Darstellung der Struktur des  $\mu$ -Opioidrezeptors, welcher aus 400 Aminosäuren besteht und auf dem Chromosom 6q24-q25 lokalisiert ist. IL= intrazelluläre Schleifen; EL= extrazelluläre Schleifen; Y= Glykosylierungsstellen. Schwarze Kreise zeigen Aminosäuren, die in allen drei Rezeptortypen identisch sind. Graue Kreise stellen Übereinstimmungen in den Aminosäuren des MOR mit dem DOR oder KOR dar. Weiße Kreise markieren keine Übereinstimmung (nach Minami und Satoh 1995).

Neben den drei genannten Rezeptorhauptgruppen existieren jeweils mehrere Subtypen, für die allerdings keine zusätzlichen Gene identifiziert werden konnten. Mögliche Erklärungen für die Entstehung dieser Subpopulationen wären alternatives Splicing sowie eine Heterodimerisierung. Beim Letztgenannten kommt es zur Bildung eines Komplexes aus zwei verschiedenen Opioidrezeptoren mit der Folge funktioneller Veränderungen (Corbett et al. 2006). Über Rezeptorbindungsstudien konnte herausgefunden werden, dass zwei unterschiedliche Affinitätszustände des  $\mu$ -Opioidrezeptors existieren. Demnach gibt es eine hochaffine ( $\mu 1$ ) und eine niedrigaffine ( $\mu 2$ ) Bindungsseite, über die unterschiedliche Effekte vermittelt werden. Zudem wurden etliche Splicevarianten des klonierten  $\mu$ -Opioidrezeptors entdeckt (Pasternak 2005). Bezüglich der verschiedenen Subtypen konnte ein genetischer Polymorphismus nachgewiesen werden. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die interindividuellen Unterschiede bei der Opioidtherapie liefern (Freye 2009).

Die Rezeptoren kommen sowohl im zentralen als auch im peripheren Nervensystem vor und konnten vor allem mit dem sensorischen (Schmerzleitung/-verarbeitung), dem limbischen und dem neuroendokrinen System in Verbindung gebracht werden (Atweh und Kuhar 1983). Im ZNS befinden sich besonders hohe Dichten an Opioidbindungsstellen im Kortex, Thalamus,

Striatum, Hypothalamus, in bestimmten Regionen des limbischen Systems und des Hirnstamms sowie im Hinterhorn des Rückenmarkes (Snyder und Pasternak 2003, Zöllner und Schäfer 2008). Periphere Opioidrezeptoren konnten in den zentralen Endigungen der primär afferenten Neurone (Spinalganglien), den myenterischen und submucösen Plexus des Magen-Darm-Traktes sowie in den peripheren sensorischen Nervenfasern mit ihren Endigungen nachgewiesen werden (Stein 1995, Bagnol et al. 1997).

## 2.3 Signaltransduktion und deren Effekte auf die Zielorgane

Wenn ein Ligand an den Opioid-Rezeptor bindet, kommt es zu einer Konformationsänderung. Diese bewirkt die Aktivierung eines G-Proteins, welches als Signalumwandler und -verstärker agiert (Gudermann et al. 1996). Das G-Protein besteht aus den Untereinheiten  $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ , wobei die  $\alpha$ -Untereinheit im Ruhezustand GDP gebunden hat. Im Erregungszustand löst sich GDP jedoch und die frei gewordene Bindungsstelle wird von GTP eingenommen. Der  $\alpha$ -GTP-Komplex spaltet sich daraufhin von der  $\beta\gamma$ -Untereinheit ab und kann nun entweder mit Enzymen oder Ionenkanälen interagieren (Lüllmann et al. 2002, Trescot et al. 2008). Zu den Effektorproteinen gehören u.a. die Adenylatcyclase, spannungsabhängige Calcium-Kanäle und verschiedene Kalium-Kanäle (Law et al. 2000). Da die an die Opioid-Rezeptoren gekoppelten G-Proteine hauptsächlich inhibitorisch auf die Adenylatcyclase wirken, kommt es zum Abfall von intrazellulärem cAMP. Hieraus resultiert schließlich eine verminderte Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und Substanz P (Koppert 2005). Des Weiteren können vor allem über  $\mu$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren Kalium-Kanäle aktiviert werden. Dies führt zur Hyperpolarisation an der postsynaptischen Membran und verhindert damit die Entstehung von Aktionspotentialen (Knapp et al. 1995, Law et al. 2000). Unter Vermittlung der G-Proteine kommt es zur Hemmung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle mit nachfolgend verminderter Erregbarkeit der Zelle und reduzierter Neurotransmitterfreisetzung (Koppert 2005). Diese Vorgänge finden schon an der ersten Stelle der Schmerzverarbeitung und -weiterleitung, d.h. im Hinterhorn des Rückenmarkes, statt. Über dort befindliche prä- und postsynaptische Opioidrezeptoren können die Liganden ihre hemmende Wirkung auf ankommende Schmerzimpulse ausüben. Des Weiteren wirken Opiode aktivierend auf die deszendierenden serotonergen und noradrenergen Bahnen. Diese wiederum hemmen über enkephalinerge Interneurone und Relayzellen die Übertragung von Schmerzimpulsen im Bereich der Substantia gelatinosa (Freye 2009). Außerdem können über Opioidrezeptoren N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und Mitogen-aktivierte Protein (MAP)-Kinase-Kaskaden beeinflusst werden (Law et al. 2000).

Die indirekte Aktivierung von glutaminergen NMDA-Rezeptoren ist ein entscheidender Mechanismus bei der Toleranzentwicklung und wird unter 2.4 näher beschrieben. Eine Interaktion mit den MAP-Kinasen ERK1/2 spielt vermutlich eine Rolle bei der Mitogenese, bei immunmodulatorischen und -suppressiven Wirkungen an Lymphozyten sowie bei der Internalisierung und Desensibilisierung der Opioidrezeptoren (Law et al. 2000).

Neben dem therapeutisch genutzten analgetischen Effekt sind Opioide in der Lage, eine Reihe von Nebenwirkungen auszulösen. Diese betreffen vor allem das zentrale Nervensystem und den Gastrointestinaltrakt (Strumpf et al. 2006). Die häufigste unerwünschte Nebenwirkung ist die Obstipation. Über im Magen-Darm-Trakt befindliche  $\mu$ -Opioidrezeptoren kommt es zur verzögerten Magenentleerung, zur Motilitätsstörung des Darmes und zur verminderten Sekretion von Wasser und Elektrolyten (Chappell und Conzen 2009). Nicht selten treten zu Beginn der Opioidtherapie Übelkeit und Erbrechen auf. Ursächlich hierfür sind exzitatorische Chemorezeptoren in der Area postrema (Breachzentrum) (Klaschik und Clemens 2005). Eine gefürchtete Nebenwirkung ist die dosisabhängige Atemdepression. Vermittelt über  $\mu$ - und  $\delta$ -Rezeptoren im Atemzentrum, kommt es zur verminderten Empfindlichkeit gegenüber  $\text{CO}_2$  (Zöllner und Schäfer 2008). Der oftmals zu Therapiebeginn auftretende und im Verlauf wieder verschwindende sedierende Effekt wird über  $\kappa$ -Rezeptoren des aktivierenden retikulären Systems (ARS) der Formatio reticularis ausgelöst (Klaschik und Clemens 2005, Freye 2009). Einen Überblick über bereits erwähnte und weitere Wirkungen einer Opioidtherapie vermittelt die folgende Tabelle (siehe Tab. 1):

**Tab. 1:** Darstellung der über die einzelnen Rezeptortypen und -subtypen vermittelten Wirkungen der Opioide (Freye 2009).

$\mu 1$	$\mu 2$	K	$\delta$
Supraspinale/spinale Analgesie	Spinale Analgesie	Spinale Analgesie	Spinale Analgesie
Euphorie	Atemdepression	Dysphorie	Atemdepression
Niedriges Abhängigkeitspotential	Hohes Abhängigkeitspotential	Niedriges Abhängigkeitspotential	Hohes Abhängigkeitspotential
Bradykardie	Ausgeprägte Obstipation	Miosis	Geringgradige Obstipation
Hypothermie		Hyperthermie	Harnretention
Harnretention		Diurese	

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass es zwischen den einzelnen Rezeptortypen bzw. -subtypen Unterschiede hinsichtlich des Vorkommens, der vermittelten Wirkung, der Ligandenselektivität und der Signaltransduktion gibt (Law und Loh 1999).

## 2.4 Toleranz und pronozizeptive Systeme

Werden Opioide über einen längeren Zeitraum verabreicht, kann man gelegentlich eine Toleranzentwicklung beobachten (Freye und Latasch 2003). Der Begriff Toleranz beschreibt das Phänomen, dass trotz unveränderter Dosierung die Wirkung der Opioide nach wiederholter Gabe abnehmen kann (Rosenblum et al. 2008). Dies kann z.B. bei Morphin eine 10-20fache Dosiserhöhung erforderlich machen, um den gleichen Therapieeffekt zu erzielen (Haen 2007). Man spricht auch von einer selektiven Toleranzentwicklung, da nicht alle Wirkungen gleich stark betroffen sind. Symptome wie Übelkeit, Erbrechen und Sedierung sind dadurch gekennzeichnet, dass sie am Anfang einer Therapie auftreten und meist nach wenigen Tagen wieder verschwinden (Klaschik und Clemens 2005). Dahingegen konnte bezüglich der Obstipation und der Miosis keine Toleranzentwicklung nachgewiesen werden (Haen 2007). Die Ursachen für diese Vorgänge konnten bisher nicht abschließend geklärt werden und sind Bestandteil aktueller Forschungen. Diskutiert werden Anpassungsvorgänge auf der Ebene der Opioidrezeptoren und der sich anschließenden Signaltransduktion. Abhängig von der verabreichten Opioids substanz scheinen dabei verschiedene Mechanismen, von denen hier nur einige näher beschrieben werden, unterschiedlich stark involviert zu sein (Koppert 2005).

Eine mögliche Erklärung liefert die für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannte Desensibilisierung. Nach Aktivierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors wird dieser an seinem C-terminalen Ende über die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) und/oder die Proteinkinase C (PKC) phosphoryliert und damit inaktiviert (Koppert 2005, Doll et al. 2011). Die Phosphorylierung findet hierbei hauptsächlich an den Serin- und Threonin-Resten S375 und T370 statt (Doll et al. 2011). Durch die darauffolgende Bindung des zellulären Proteins Arrestin an den Opioidrezeptor wird schließlich dessen Internalisierung eingeleitet. Die Endozytose führt nun entweder zum Abbau des Rezeptors oder aber zu seiner Reexpression auf der Zelloberfläche (Recycling). Es konnte gezeigt werden, dass das Recycling von Rezeptoren einer Toleranzentwicklung entgegenwirkt (Koppert 2005). Interessanterweise bewirkt Morphin am  $\mu$ -Opioidrezeptor - im Gegensatz zu endogenen Opioidpeptiden - zwar eine Desensibilisierung, aber keine Endozytose. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass Morphin am C-terminalen Ende des MOR zu einem anderen Phosphorylierungsmuster

führt, als beispielsweise das synthetisch hergestellte Opioidpeptid DAMGO (Doll et al. 2011). Diese Beobachtungen könnten eine mögliche Erklärung für die erhöhte Toleranzentwicklung bei der Verabreichung von Morphin liefern.

Eine längerfristige Verabreichung von Opioiden kann eine pronozizeptive Wirkung hervorrufen. Entscheidend ist hier vor allem die Beeinflussung von NMDA-Rezeptoren, welche sowohl bei der Schmerzsensibilisierung und -chronifizierung als auch bei der Toleranzentwicklung eine Rolle spielen. In beiden Fällen wird der NMDA-Rezeptor durch die bereits erwähnte PKC phosphoryliert und aktiviert. Die daraus resultierende Wirkungsverstärkung exzitatorischer Neurotransmitter führt zur gesteigerten Weiterleitung von Schmerzimpulsen. Der vermehrte Einstrom von Calcium-Ionen setzt wiederum intrazelluläre Vorgänge in Gang, die zur Chronifizierung von Schmerzen beitragen. Im Rahmen der Toleranzentwicklung bewirkt die Aktivierung des NMDA-Rezeptors eine gesteigerte Bildung von erregenden Rezeptoren und von Stickstoffmonoxid (NO). Dieser Neurotransmitter wirkt als funktioneller Antagonist anti-opioid (Freye und Latasch 2003).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die  $\beta/\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins die Adenylatcyclase aktivieren kann. Der cAMP-Spiegel steigt und exzitatorische Neurotransmitter wie Glutamat und Substanz P werden vermehrt freigesetzt.

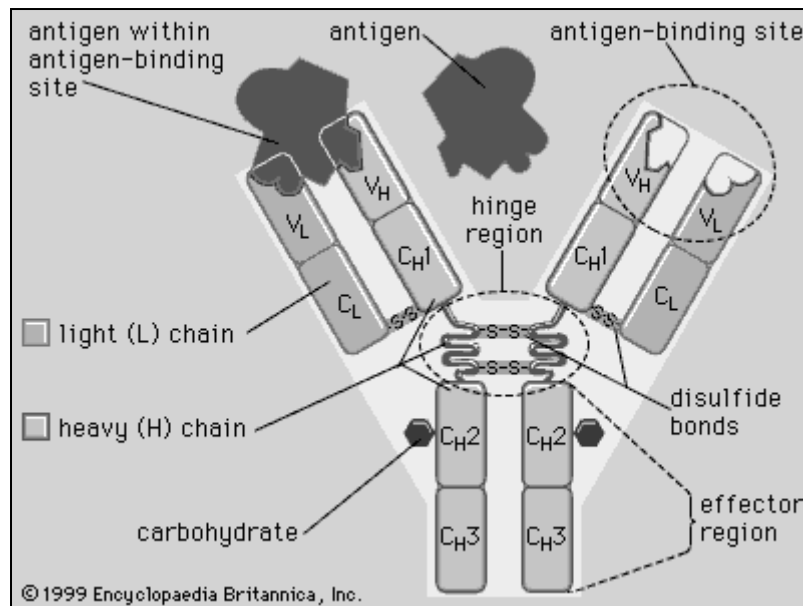
Letztlich geht man davon aus, dass die Toleranzentwicklung ein Zeichen des Ungleichgewichts zwischen antinozizeptiven und pronozizeptiven Mechanismen ist (Koppert 2005).

## 2.5 Antikörper

Antikörper (Immunglobuline) sind Bestandteile der spezifischen humoralen Immunantwort von Wirbeltieren. Sie sind in der Lage, körperfremde pathogene Substanzen (Antigene) spezifisch zu binden und eine Reihe unterschiedlicher Abwehrmechanismen auszulösen (Hahn et al. 2005). Es existieren fünf verschiedene Immunglobulinklassen (IgG, IgM, IgA, IgD, IgE), die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation und Funktion unterscheiden (Dübel et al. 2004). Allen gemeinsam ist eine Y-förmige Grundstruktur (siehe Abb. 3) aus zwei identischen leichten und zwei identischen schweren Polypeptidketten. Diese sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Bei den Polypeptidketten können variable von konstanten Regionen unterschieden werden. Die variablen Bereiche befinden sich an den Enden der beiden identischen Fab-Fragmente, welche die Arme des Ypsilon bilden. Dort befinden sich auch die Antigen-Bindungsstellen, die für jeden Antikörper spezifisch sind. Das Fc-Fragment bildet die Basis des Y-förmigen Grundmodells und besteht



aus konstanten Bereichen der schweren Ketten. Es dient der Aktivierung des Immunsystems (Harlow und Lane 1998). Zwischen den beiden Fragmenten befindet sich die Scharnier-Region, die dem Antikörper eine große Flexibilität bei der Bindung von Antigenen verleiht (Dübel et al. 2004).



**Abb. 3:** Schematische Darstellung eines Immunglobulins der Klasse IgG, welches 75% des Gesamt-Igs ausmacht (Hahn et al. 2005). Der Antikörper besteht aus zwei identischen leichten (L) und zwei identischen schweren (H) Ketten, welche über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind (S-S). Zudem kann man variable (V) von konstanten (C) Regionen unterscheiden.  $V_H$ : variable Bereiche der schweren Ketten.  $V_L$ : variable Bereiche der leichten Ketten.  $C_H^{1-3}$ ,  $C_L$ : konstante Bereiche der schweren und leichten Ketten. Die beiden Arme der Y-förmigen Grundstruktur werden durch das Fab-Fragment ( $V_L$ ,  $C_L$ ,  $V_H$  und  $C_H^1$ ) gebildet. An dessen Enden befinden die Antigen-Bindungsstellen. Die Basis des Ypsilon wird vom Fc-Fragment ( $C_H^2$  und  $C_H^3$  bzw. effector region) gebildet, welches für die Aktivierung des Immunsystems verantwortlich ist. Hinge region: Scharnierregion (Dübel et al. 2004, Encyclopædia Britannica, Inc., 1999).

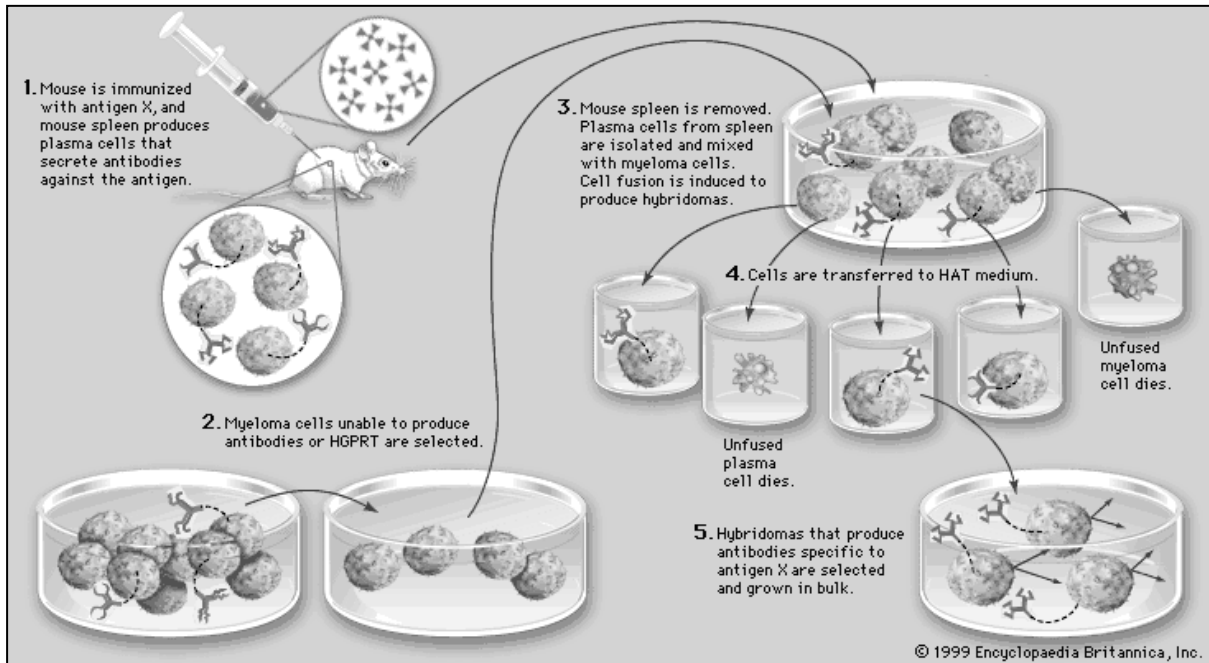
Antikörper werden von differenzierten B-Lymphozyten (Plasmazellen) produziert, nachdem diese durch ein Antigen stimuliert wurden. Eine Plasmazelle und ihre Klone bilden Immunglobuline *einer* Spezifität und *einer* Klasse. Ausgehend davon kann man monoklonale von polyklonalen Antikörpern unterscheiden. Immunglobuline erkennen und binden nur einen kleinen Bereich des Antigens, das Epitop. Ein Antigen wiederum verfügt über mehrere Epitope (Hahn et al. 2005). Bei der physiologischen Immunreaktion gegen *ein* Antigen entstehen dadurch Antikörper unterschiedlicher Spezifität aus unterschiedlichen B-Lymphozytenklonen. Man spricht von einem polyklonalen Antikörpergemisch. Im Gegensatz dazu stammen monoklonale Antikörper von einer Plasmazelle ab und besitzen die gleiche Spezifität (Dübel et al. 2004).

## 2.6 Herstellung monoklonaler Antikörper

Im Jahre 1975 entwickelten Köhler und Milstein die Hybridom-Technik zur Herstellung monoklonaler Antikörper. Bei diesem Verfahren (siehe Abb. 4) werden Antikörperproduzierende Plasmazellen mit unsterblichen Myelomzellen fusioniert (Harlow und Lane 1998).

Zunächst wird ein Versuchstier (z.B. Kaninchen oder Maus) durch mehrmalige Injektion des Antigens, gegen welches der monoklonale Antikörper gerichtet sein soll, immunisiert. Bei ausreichend hohen Antikörpertitern werden schließlich sämtliche Lymphozyten aus der zuvor entnommenen Milz isoliert (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Aufgrund der begrenzten Lebensdauer der Lymphozyten soll nun die Fusion mit den Myelomzellen erfolgen. Hierbei handelt es sich um maligne entartete Zellen der B-Zell-Reihe, welche über ein unbegrenztes Wachstum verfügen und selbst keine Immunglobuline mehr herstellen. Um eine Zellverschmelzung zu erreichen, werden die Lymphozyten und Myelomzellen in eine Polyethylenglykol-Lösung gegeben (Ganten und Ruckpaul 2008). Da nur einige der so entstandenen Hybridomzellen den gesuchten Antikörper produzieren, müssen diese noch selektiert werden. Hierzu überführt man die Zellen zunächst in das sogenannte HAT-Medium, welches Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin enthält (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Da die un-/fusionierten Myelomzellen einen Enzymdefekt und die un-/fusionierten Plasmazellen eine begrenzte Lebensdauer haben, überleben nur die fusionierten Plasmazell-Myelomzell-Hybride. Anschließend müssen die gesuchten Antikörperproduzierenden Hybridomzellen noch mit Hilfe eines Enzym-gekoppelten Immunosorbent-Assays (ELISA) isoliert werden (Ganten und Ruckpaul 2008). Nachdem die gesuchten Hybridome identifiziert werden konnten, erfolgt deren Vermehrung (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Da nur wenige der kultivierten Hybridomzellen genetisch stabil sind, sollten diese so früh wie möglich kloniert werden. Ein Teil der so etablierten stabilen Klone wird in flüssigem Stickstoff eingefroren, um eine dauerhafte Verfügbarkeit gewährleisten zu können. Der andere Teil wird in Kulturflaschen weiter vermehrt. Aus dem jeweiligen Kulturüberstand können schließlich die monoklonalen Antikörper mit Hilfe einer Immunaффinitätschromatographie isoliert werden (Ganten und Ruckpaul 2008).

Der in diesem Fall hergestellte monoklonale Antikörper UMB-3, welcher gegen den Carboxy-Terminus des  $\mu$ -Opioidrezeptors gerichtet ist, kann nun einer ausführlichen Charakterisierung zugeführt werden.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der Herstellung von monoklonalen Antikörpern. 1. Immunisierung des Versuchstieres mit dem gewünschten Antigen. Daraufhin werden in der Milz Plasmazellen produziert, die den gewünschten Antikörper sezernieren. 2. Gleichzeitig werden unsterbliche Myelomzellen kultiviert, welche selbst keine Antikörper herstellen. 3. Nach ausreichend hohen Antikörpertitern wird die Milz der Versuchstiere entfernt und deren Plasmazellen isoliert. Anschließend erfolgt die Fusion der Myelom- mit den Plasmazellen zu den sogenannten Hybridomzellen. 4. Die Zellen werden in ein HAT-Medium überführt und somit selektiert. 5. Die B-Zellhybridome, welche den gewünschten Antikörper herstellen, können nun kultiviert werden (Encyclopædia Britannica, Inc., 1999).

### 3. Ziele der Arbeit

Mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen das C-terminale Ende des  $\mu$ -Opioidrezeptors konnte bereits in der Vergangenheit dessen Lokalisation im Gehirn von Ratten und Mäusen intensiv untersucht werden (Arvidsson et al. 1995, Mansour et al. 1995, Schulz et al. 1998, Gray et al. 2006). Aufgrund der geringen Menge an  $\mu$ -Opioidrezeptoren in vivo erwies es sich bisher jedoch als schwierig, geeignete monoklonale Antikörper für die Immunpräzipitation und das Immunoblotting von MOR aus nativem Gewebe zu entwickeln (Huang und Liu-Chen 2009). Dementsprechend ist die biochemische Analyse von MOR-Signalkaskaden erschwert und das Wissen über Proteininteraktionen und posttranslationale Modifikationen ist begrenzt (Lupp et al. 2011). Desweiteren sind die o.g. immunhistochemischen Untersuchungen zur Lokalisation des MOR auf Gefrierschnitte von perfusionsfixierten Nagerhirnen beschränkt gewesen. Dies liegt zum größten Teil an der begrenzten kommerziellen Verfügbarkeit von Anti-MOR-Antikörpern, die in der Lage sind, den labilen  $\mu$ -Opioidrezeptor in in Paraffin eingebetteten Geweben nachzuweisen (Lupp et al. 2011). Gefrierschnitte gehen jedoch, aufgrund von Zellmembranschädigungen und Chromatolysen, mit einer beeinträchtigten Morphologie einher. Dadurch wird die Zuordnung der Gewebestrukturen zu der immunhistochemischen Färbung erschwert (Remmele 1999, Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Ausgehend von der geschilderten Problematik wurde der monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB-3, welcher gegen das C-terminale Ende des  $\mu$ -Opioidrezeptors von Ratten, Mäusen und Menschen gerichtet ist, entwickelt. Ziel dieser Arbeit war die ausführliche Charakterisierung des UMB-3 anhand folgender Fragestellungen:

- 1) Mit welcher Spezifität bindet der neu entwickelte monoklonale Antikörper UMB-3 sein Antigen, den  $\mu$ -Opioidrezeptor?
- 2) Ist der monoklonale Antikörper UMB-3 in der Lage, endogene  $\mu$ -Opioidrezeptoren aus nativem Gewebe zu präzipitieren, so dass sie dann im Western-Blot nachgewiesen werden können?
- 3) Eignet sich der monoklonale Antikörper UMB-3 zum effektiven Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben von Ratten, Mäusen und Menschen?

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Untersuchungsmaterial

##### 4.1.1.1 Tiermaterial

Als Versuchsmaterial dienten 60 Tage alte HAN:Wistar-Ratten (n=6, männlich, 220-250g) sowie 60 Tage alte C57BL/6-Mäuse (MOR(+/+)) und MOR-Knockout-Mäuse (MOR(-/-)), jeweils n=6, männlich und weiblich. Die MOR-Knockout-Mäuse wurden von H.H. Loh (Department of Pharmacology, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, Minnesota) bezogen und nach einem Standard-Zuchtprotokoll gezüchtet. Die HAN:Wistar-Ratten stammten aus institutseigener Zucht. Die Haltung erfolgte in Plastikschalen mit Metallgitter unter folgenden standardisierten Bedingungen:

- Raumtemperatur: 22 +/- 2°C bei einem 12h/12h Hell/Dunkel-Rhythmus,
- Luftfeuchtigkeit: 50 +/- 10%,
- Futter: Altromin 1316 (Altromin, Lage),
- Trinkwasser: ad libitum.

Nach der Tötung der Mäuse und der HAN:Wistar-Ratten in Ethernarkose erfolgte die rasche Entnahme nachfolgender Organe:

Gehirn, Rückenmark, Hinterwurzelganglien (nur Maus), Hypophyse, Auge, Parotis und andere Speicheldrüsen, Lunge, Thymus, Herz, Magen, Darm, Leber, Gallenblase (nur Maus), Pankreas, Milz, Niere, Nebenniere, Harnblase (nur Maus), Ovar (nur Maus), Uterus (nur Maus), Hoden, Nebenhoden und Samenblase.

Diese Organe wurden für die immunhistochemischen Untersuchungen in 10%igem gepufferten Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

Für die Immunpräzipitation und das Immunblotting wurden die Gehirne von drei MOR(+/-)- und drei MOR(-/-)-Mäusen in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

##### 4.1.1.2 Menschliches Material

Insgesamt standen 91 Schnitte von unterschiedlichen humanen Tumorproben, welche in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet worden waren, zur Verfügung. Diese stammten aus den Instituten für Pathologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, der Charité-Universitätsmedizin Berlin und des Kaiserin-Elisabeth-Spitals, Wien.

Folgende Karzinome wurden mitsamt der angrenzenden tumorfreien Areale analysiert: Glioblastom (n=8), Hypophysenadenom (n=6), medulläres Schilddrüsenkarzinom (n=5), duktales Mammakarzinom (n=17), duktales Adenokarzinom des Pankreas (n=6), Insulinom (n=2), neuroendokrine Tumoren der Lunge und des Darmes (n=11), klarzelliges Nierenkarzinom (n=10), Phäochromozytom (n=8), Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri (n=6), Adenokarzinom der Prostata (n=12).

Zusätzlich wurden Paraffinschnitte von folgenden gesunden menschlichen Geweben untersucht: Rückenmark, Hinterwurzelganglion, Gallenblase und Darm.

## 4.1.2 Puffer und Lösungen

### 4.1.2.1 Western-Blot-Analysen

Blotpuffer (1x)	3,03g Tris + 11,25g Glycin + 100ml Methanol mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.
Elektrophoresepuffer (10x)	30,3g Tris + 144g Glycin + 10g SDS.
RIPA-Puffer	8,8g NaCl + 6,0g Tris-HCl + 0,9g EDTA + 10ml 1% Igepal (Nonidet P-40) + 5,0g Na-Desoxycholat + 5ml SDS mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen. NaCl, EDTA und Tris ansetzen und den pH auf 7,4 einstellen. Anschließend restliche Inhaltsstoffe hinzufügen. Dem fertigen Puffer jeweils vor Gebrauch noch Protease-Inhibitoren („Complete mini“) und Phosphorylierungshemmer („Phospho-Stop“) zufügen.
Sammelgelpuffer	2g SDS + 30,28g Tris mit Aqua bidest. auf 500ml auffüllen.
Sammelgel 4%	1ml 30% Acrylamid + 4,7ml Aqua bidest. + 1,8ml Sammelgelpuffer + 9µl Tetramethylethylendiamin (TEMED) + 24µl 10% Ammoniumpersulfat (APS).
SDS-Probenpuffer pH 6,8	3,94g Tris-HCl + 7,5ml Natriumdodecylsulfat (SDS) + 30ml Glycerol + 1ml Mercaptoethanol + 0,25ml Bromphenolblau.
10x TBS	500ml Tris-HCl + 87g NaCl mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.

TBS-Tween	200ml 10x Tris-gepufferte Salzlösung (TBS) + 2ml Tween 20 mit Aqua bidest. auf 1800ml auffüllen.
15x T-PBS pH 7,4	18,16g Tris + 135g NaCl in 700ml Phosphatpuffer lösen und mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen. <u>Phosphatpuffer:</u> Lösung A: 27,6g $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ auf 1000ml Aqua bidest. Lösung B: 35,63g $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ auf 1000ml Aqua bidest. <u>Gebrauchslösung:</u> 132,8ml Lösung A + 566,7ml Lösung B mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen. Einstellung des pH-Wertes mit reiner 37%iger HCl.
Trenngelpuffer	4g SDS + 181,72g Tris mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.
Trenngel 7,5%	4ml 30% Acrylamid + 8ml Aqua bidest. + 4ml Trenngelpuffer + 20 $\mu\text{l}$ TEMED + 80 $\mu\text{l}$ 10% APS.

#### 4.1.2.2 Immuncytochemie

DMEM (+)	Dulbecco's modified Eagle Medium + 50ml Fetales Kälberserum (FCS) (10%) + 5ml L-Glutamin + 5ml PenStrept (Endkonzentration: Penicillin: 100 U/ml und Streptomycin: 0,1 mg/ml).
Zamboni-Fixierlösung	350ml gesättigte Pikrinsäure + 80g Paraformaldehyd (PFA) in 500ml Flasche auf 60°C erwärmen. Tropfenweise 2,5% NaOH dazugeben bis PFA gelöst ist. In 2l-Flasche filtrieren und mit Phosphatpuffer auf 2l auffüllen.

#### 4.1.2.3 Immunhistochemie

Ammoniaklösung (25%)	1,4ml Ammoniak in 250ml Aqua bidest.
Avidin-Biotin-Enzym-Komplex	5ml PBS + 100 $\mu\text{l}$ Reagenz A (Avidin) + 100 $\mu\text{l}$ Reagenz B (biotinylierte Peroxidase).
Citrat-Puffer 10mM, pH 6,0	<u>Stammlösung A (0,1M):</u> 21,01g Zitronensäure mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.

Stammlösung B (0,1M):

29,41g Natriumcitrat mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.

Gebrauchslösung (0,01M):

18ml A + 82ml B + 900ml Aqua bidest. Einstellung des pH-Wertes mit 2N NaOH auf 6,0.

Färbelösung

10ml Aqua bidest. + 2,5ml 5xH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Puffer + 5 Tropfen Aminoethylcarbazol (AEC).

10x PBS, pH 4,0

80g NaCl + 2g KCl + 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> mit Aqua bidest. auf 1000ml auffüllen.

### 4.1.3 Chemikalien

30% Acrylamid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Aminoethylcarbazol (AEC)	BioGenex, San Ramon, CA, USA
Ammoniak	MERCK, Darmstadt
Ammoniumpersulfat 10%	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Complete-mini EDTA free	Roche, Mannheim
p-Cumarsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Nordbrand, Nordhausen
Formalin (10%ig gepuffert)	J.T. Baker, Deventer, Niederlande
Glycerol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Glycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Igepal	Fluka, Buchs, Schweiz
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Luminol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver (MMP)	Sucofin, TSI, Zeven
Mayer`s Haematoxylin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mercaptoethanol	MERCK, Darmstadt
Methanol	MERCK, Darmstadt
Natriumchlorid	MERCK, Darmstadt
Natriumcitrat	MERCK, Darmstadt
Na-Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim



Natriumdihydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	MERCK, Darmstadt
Natriumhydroxid	MERCK, Darmstadt
Paraffin (Tissuewax)	Medite, Burgdorf
Paraformaldehyd	Riedel-de Haën, Seelze
PhosphoStop	Roche, Mannheim
Pikrinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-A-Beads	Invitrogen, Karlsruhe
Rinderserumalbumin (RSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
SDS-Lösung 20%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tris-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
Wasserstoffperoxid 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
WGA-Beads	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim
Xylol	MERCK, Darmstadt
Zitronensäure	MERCK, Darmstadt

#### 4.1.4 Antikörper und Kits

##### UMB-3

- Monoklonaler Kaninchen-Antikörper gegen den Carboxy-Terminus (Aminosäuren 386-398) des  $\mu$ -Opioidrezeptors
- Antigene Sequenz des Peptids, welches zur Immunisierung des Kaninchens verwendet worden ist und bei Mäusen, Ratten und Menschen identisch ist: NH<sub>2</sub>-LENLEAETAPLP-COOH
- Eptomics, Burlingame, USA

##### Anti-MOR-Antiserum {3677}

- Polyklonales Serum, welches zur Zeit der Splenektomie aus dem immunisierten Kaninchen entnommen worden ist
- Gramsch Laboratories, Schwabhausen

Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6}

- Polyklonales, affinitätsgereinigtes Antiserum gegen den  $\mu$ -Opioidrezeptor
- Gramsch Laboratories, Schwabhausen

Cy3-Anti-Rabbit IgG	Dianova, Hamburg
ECL-Anti-Rabbit IgG	Amersham Bioscience, Freiburg
Vectastain ABC Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA

**4.1.5 Medikamente**

Etonitazen	Novartis Pharma, Basel, Schweiz
Naloxon	ratiopharm GmbH, Ulm

**4.2 Methoden****4.2.1 Western-Blot-Analysen****4.2.1.1 Rezeptorisolation aus Zellen****4.2.1.1.1 Zellaufbereitung**

Die MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen sowie die MOR(-/-)-HEK-293-Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten 50mm-Platten bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Vor Beginn des Experimentes wurden die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach erfolgte eine 10-minütige Behandlung mit 0,8ml eiskaltem RIPA-Puffer inklusive des Proteaseinhibitors "Complete mini EDTA-free" auf Eis. Der Puffer sorgte für die Desintegration der Zellen und der Proteaseinhibitor verhinderte die Zerstörung des Rezeptors. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von den Platten geerntet und jeweils in ein Eppendorf-Gefäß (1,5ml) überführt. Um Zelltrümmer und Zellkerne abtrennen zu können, wurden die Gefäße für 30 min bei 14000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand enthielt nun die gesuchten Proteine.

**4.2.1.1.2 Rezeptorisolation aus Zellen mit WGA-Beads**

Die Weizenkeimagglutinin-Agarose-Kügelchen (WGA-Beads) wurden in einem großen Volumen RIPA-Puffer verdünnt (40 $\mu$ l/ml), um dann exakter auf die einzelnen Eppendorf-Gefäße (je 1ml des Gemisches) verteilt werden zu können. Anschließend wurden die WGA-Beads bei 150g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. In die Gefäße mit je

40µl WGA-Beads wurde nun jeweils 700µl Überstand, welcher die gesuchten Rezeptorproteine enthielt (siehe Kapitel 4.2.1.1.1), pipettiert. Das Gemisch wurde für 2-3 Stunden bei 4°C invertiert. Dadurch konnte das WGA an den Glykosylierungsstellen des Rezeptorproteins binden und es isolieren.

Um den Komplex aus WGA-Bead und Rezeptorprotein von den anderen Bestandteilen absetzen zu können, wurde dreimal nach folgendem Schema gewaschen:

- 1 min bei 500g zentrifugieren
- Überstand absaugen
- 1ml eiskalten RIPA-Puffer applizieren
- kurz vortexen

Nachdem beim dritten Mal Waschen der Überstand abgenommen worden war, konnte 70µl aufgewärmter 1xSDS-Probenpuffer pro Gefäß dazugegeben und für 20 min bei 60°C inkubiert werden. Dadurch wurden die WGA-Beads von den Rezeptoren gelöst. SDS diente zudem der Denaturierung der Proteine und versah sie mit einer negativen Ladung, so dass diese bei der folgenden Gelelektrophorese nur nach dem Molekulargewicht getrennt werden konnten (Geckeler und Eckstein 2000). Um die WGA-Beads von den Rezeptoren absetzen zu können, wurde für 5 min bei 14000g zentrifugiert. Damit befanden sich im Überstand die gesuchten Proteine.

#### **4.2.1.2 Rezeptorisolation aus dem Gewebe**

##### **4.2.1.2.1 Gewebeaufbereitung**

Nach Entnahme des Hirngewebes aus MOR(+/-)- und MOR(-/-)-Mäusen wurde dieses portioniert in Eppendorf-Gefäße überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren, um autolytische Vorgänge zu verhindern. Die Proben wurden mit jeweils 500µl RIPA-Puffer plus Proteaseinhibitor aufgetaut und anschließend mit Hilfe eines Ultraschallstabes (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, USA) homogenisiert. Zur Verdünnung des dickflüssigen Gewebegemisches wurde 1ml RIPA-Puffer + Inhibitoren hinzugegeben. Das Homogenat wurde für 45 min bei 4°C geschüttelt und anschließend für 30 min bei 14000g gekühlt zentrifugiert. Der Überstand mit den Rezeptorproteinen wurde vorsichtig abpipettiert.

##### **4.2.1.2.2 Rezeptorisolation aus dem Gewebe mit Protein-A-Beads**

Die Protein-A-Beads (50µl/ml) wurden mit 1ml RIPA-Puffer gemischt und für 2 min bei 150g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Es folgte eine zweistündige Inkubation

mit dem Primärantikörper UMB-3 (2ml) bei 4°C und eine erneute Zentrifugation mit Verwerfen des Überstandes. Während der Inkubation bindet Protein A, welches an inerte Sepharosekügelchen (Beads) gekoppelt ist, den Antikörper (Geckeler und Eckstein 2000). Anschließend wurden 900µl des Überstandes, welcher die gesuchten Rezeptorproteine enthielt (siehe Kapitel 4.2.1.2.1), hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 2 Stunden bei 4°C geschüttelt. In dieser Zeit konnte der Protein-A-Antikörperkomplex das Rezeptorprotein binden. Um diese Verbindung von den anderen Bestandteilen absetzen zu können, wurde bei 14000g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Mit je einem ml RIPA-Puffer wurde dreimal gewaschen. Pro Gefäß wurde 50µl 1xSDS-Probenpuffer dazugegeben und für 20 min bei 60°C inkubiert. Dadurch konnten die Rezeptoren von den Protein-A-Beads getrennt werden. Anschließend wurde für 2 min zentrifugiert, so dass sich die gesuchten Proteine im Überstand befanden.

### **4.2.1.3 Darstellung der Rezeptorproteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot**

#### **4.2.1.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen. Hierzu wurde ein grobporiges Sammelgel (4%) und ein feinporiges Trenngel (7,5%) mit Hilfe eines Gießrahmens, eines Gießstandes und eines Probenkammes (Bio-Rad, München) hergestellt. Der Gießrahmen wurde in einen Puffer-Tank, welcher mit Elektrophoresepuffer aufgefüllt wurde, gestellt. In die entstandenen Geltaschen wurden jeweils 15-20µl der Überstände aus 4.2.1.1.2 und 4.2.1.2.2 sowie in eine Tasche 5µl Größenmarker aufgetragen. Durch Anlegen einer Spannung von 90V für ca. 20 min wanderten die negativ geladenen Proteine aus den Taschen in das Gel und sammelten sich an der Grenze zum Trenngel. Anschließend wurde die Spannung auf 130V für ca. 60 min erhöht, so dass die Trennung nach dem Molekulargewicht erfolgen konnte. Die kleinen Proteine wanderten schneller und weiter als die großen Proteine. Nachdem die blaue Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, konnten die Gele aus ihren Haltevorrichtungen entfernt werden. Das Sammelgel wurde vom Trenngel getrennt und verworfen.

#### **4.2.1.3.2 Western-Blot**

Zur Vorbereitung wurden zwei Whatmanpapiere (Bio-Rad, Hercules, USA) und das Gel für 2 min in Blotpuffer inkubiert. Eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) wurde für 2 min in Methanol aktiviert und im Blotpuffer gewaschen. Die

Blotkammer (Bio-Rad, München) wurde folgendermaßen luftblasenfrei bestückt (von unten (Anode) nach oben (Kathode)):

- Whatmanpapier
- PVDF-Membran
- Gel
- Whatmanpapier

Die Einstellung des Gerätes auf 200mA pro Gel für eine Stunde bewirkte die Wanderung der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran. Dadurch entstand eine exakte Kopie des Gels auf der Membran, die nun für die folgenden Schritte zugänglich war.

#### **4.2.1.3.3 Antikörperbehandlung**

Die PVDF-Membran wurde für 30 min in 10ml Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween 20 (TBS-T) + 5% Magermilchpulver (MMP) gelegt, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Anschließend erfolgte die Inkubation dieser PVDF-Membran im monoklonalen Antikörper UMB-3 bzw. im Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6} mit einer Verdünnung von 1:200 bzw. 1:5000 in TBS-T + 5% MMP über Nacht bei 4°C. Diese Antikörper sollten spezifisch an die Rezeptorproteine (MOR) binden und sie als Bande auf der PVDF-Membran darstellbar machen. Der in der vorliegenden Arbeit verwendete Verdünnungsgrad des UMB-3 von 1:200 ist im Vergleich zu denen anderer Western-Blot-Analysen mit ähnlichen monoklonalen Antikörpern als üblich einzustufen (Fischer et al. 2008a, Fischer et al. 2008b). Dies konnte als Hinweis auf eine ausreichend hohe Sensitivität des Antikörpers UMB-3 gesehen werden. Am nächsten Morgen wurde die Membran für 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen. Anschließend wirkte der Meerrettichperoxidase-gekoppelte Sekundärantikörper ECL-Ziegen-Anti-Kaninchen IgG in einer Verdünnung von 1:5000 in 10ml TBS-T + 5% MMP für 2 Stunden ein. Danach wurde für 2 x 5 min mit TBS-T gewaschen.

#### **4.2.1.3.4 Peptidneutralisation**

Zur Kontrolle der Spezifität der Antikörper wurde eine Peptidneutralisation durchgeführt. Das Peptid (10µg/ml) wurde zusammen mit dem Antikörper UMB-3 (1:200) bzw. dem Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6} (1:5000) in 10ml TBS-T + 5% MMP für 2 Stunden bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend gab man das Gemisch laut Protokoll (siehe Kapitel 4.2.1.3.3) auf die PVDF-Membran.

#### **4.2.1.3.5 Entwicklung**

Zwei Gefäße mit jeweils 12,5ml 0,1M Tris (pH 8,3) wurden vorbereitet. In eines dieser Gefäße kam 15µl Wasserstoffperoxid (30%), in das andere Luminol und p-Cumarsäure. Die Ansätze wurden zusammengemischt, so dass darin die PVDF-Membran für 2 min inkubieren konnte. Anschließend wurde die Membran zusammen mit einem Röntgenfilm in eine Filmkassette (Amersham Biosciences, Freiburg) gelegt. Die Peroxidase des Sekundärantikörpers katalysierte die Oxidation von Luminol, so dass Energie in Form von Licht frei wurde (Chemilumineszenz). Diese sorgte für die Belichtung des Röntgenfilmes. In einer Entwicklungsmaschine (Agfa-Gevaert AG, Mortsel, Belgien) konnte der Film entwickelt werden.

### **4.2.2. Immuncytochemie**

#### **4.2.2.1 Zellaufbereitung**

Die MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% aus einer 50ml-Zellkulturflasche mit 5ml DMEM(+) abgelöst und in ein Gefäß überführt. Um eine Haftgrundlage für die Zellen zu schaffen, wurden vier Deckgläschen mit jeweils 200µl Poly-L-Lysin (1:1000 in Aqua bidest.) beschichtet. Dieser Vorgang dauerte 20 min und wurde durch dreimaliges Waschen mit Aqua bidest. beendet. Die getrockneten Deckgläschen sowie jeweils 400µl Nährmedium (DMEM(-)) wurden in die Vertiefungen einer 12-Well-Zellkulturplatte (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) gegeben. Anschließend wurden die Zellen ausgesät (1ml/Kavität). Diese wuchsen über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank (Heraeus, Hanau).

#### **4.2.2.2 Stimulation der Zellen**

Das Nährmedium vom Vortag wurde entfernt. In die vier Vertiefungen wurde jeweils 1ml DMEM(-) pipettiert. Um die Regulation des  $\mu$ -Opioidrezeptors auf zellulärer Ebene darzustellen, erfolgte die dreißigminütige Stimulation mit einem Agonisten, einem Antagonisten sowie einem Agonist/Antagonisten-Gemisch. In vergangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulationsdauer von 30 min als auch die Wahl der jeweiligen Substanz-Konzentration zu einer effektiven Internalisierung von  $\mu$ -Opioidrezeptoren bzw. deren Antagonisierung führt (Keith et al. 1998, Schulz et al. 2004b, Koch et al. 2005, Doll et al. 2011). Die Substanzen wurden wie folgt pipettiert:

- 1. Vertiefung: Negativkontrolle (DMEM(-))
- 2. Vertiefung: Etonitazen (Agonist): 25nM
- 3. Vertiefung: Naloxon (Antagonist): 1mM
- 4. Vertiefung: Agonist + Antagonist: 25nM + 1mM

Nach der dreißigminütigen Stimulation wurde dreimal mit kaltem PBS gespült, um die Substanzen auszuwaschen.

#### **4.2.2.3 Fixierung der Zellen und Vorbereitung auf die Antikörperbehandlung**

Die Behandlung mit ZAMBONI-Fixierlösung erfolgte für 40 min. Dann wurde für 3 x 5 min mit PB-Puffer + 0,1% Triton (PB-T) gespült. Zum Permeabilisieren der Zellen sowie zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen wurde ein Gemisch aus PB-T + 3% Normales Ziegenserum (NGS) für 2 Stunden auf die Zellen gegeben.

#### **4.2.2.4 Antikörperbehandlung**

Die Inkubation im Primärantikörper UMB-3 mit einer Verdünnung von 1:100 in PB-T + 3% NGS erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Morgen wurde für 3 x 5 min mit PB-T gewaschen. Wie schon bei den Western-Blot-Analysen handelte es sich hier um einen üblichen Verdünnungsgrad, der auf eine ausreichend hohe Sensitivität des monoklonalen Antikörpers UMB-3 hinwies (Fischer et al. 2008a, Fischer et al. 2008b). Zur Darstellung der Lokalisation des  $\mu$ -Opioidrezeptors nach Stimulation der Zellen (siehe Kapitel 4.2.2.2) wurde ein Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter sekundärer Antikörper (Carbocyanin 3-Ziegen-Anti-Kaninchen IgG) verwendet. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:750 in PB-T + 3% NGS für 2 Stunden in die Vertiefungen gegeben. Anschließend wurden die Objektträger für 3 x 5 min mit PB-T gewaschen und mit VectaMount™-Eindeckmedium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

### **4.2.3 Immunhistochemie**

#### **4.2.3.1 Aufbereitung des Untersuchungsmaterials**

Im Anschluss an die Gewebeentnahme erfolgte zum Schutz vor Autolyse eine Fixierung in 10%igem gepufferten Formalin über 3 Tage. Nach dem Zuschneiden wurden die Präparate mittels aufsteigender Alkoholreihe entwässert, um in Xylol und letztlich in Paraffin überführt werden zu können. Dies wurde vollautomatisch durch einen Einbettautomaten (Jung-Histokinette, Leica, Solms) übernommen. Die Gewebestücke wurden mit Hilfe von

Einbettkassetten zu Paraffinblöcken verarbeitet. Waren diese ausgehärtet, konnten durch ein Mikrotom (Rotationsmikrotom HM 335 E, Microm, Walldorf) Schnitte von 4µm Dicke hergestellt werden, welche auf Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger (Superfrost Plus, Menzel, Braunschweig) aufgebracht wurden.

#### 4.2.3.2 Vorbereitung der Paraffinschnitte

Die in Paraffin eingebetteten Schnitte wurden für 3 mal 20 min in Xylol und für 2 x 10 min in 100% Ethanol entparaffiniert und entfettet. Anschließend wurden die Präparate 45 min in Methanol + 0,3% Wasserstoffperoxid inkubiert, um endogene Peroxidasen zu blockieren und damit eine unspezifische Reaktion mit dem Chromogen AEC zu verhindern (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). In einer absteigenden Alkoholreihe (90%/ 80%/ 70%/ Aqua bidest. - jeweils 10 min) fand die Rehydrierung statt. Die hitzeinduzierte Antigendemaskierung in Citratpuffer diente der Aufhebung von Proteinvernetzungen, welche die Erkennung des spezifischen Epitops behindern können (Noll und Schaub-Kuhnen 2000).

Dabei wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

- in Citratpuffer bei ca. 700 Watt in der Mikrowelle kochen:  
8 min kochen, 4 min abkühlen, 4 min kochen, 4 min abkühlen, 4 min kochen
- 20 min abkühlen lassen
- 5 min in Aqua bidest. stellen
- 5 min in PBS/1%RSA waschen
- Einsortieren in Sequenza-Färbesysteme (Thermo Scientific, Waltham, USA)
- 2 mal mit 1ml PBS/1%RSA waschen

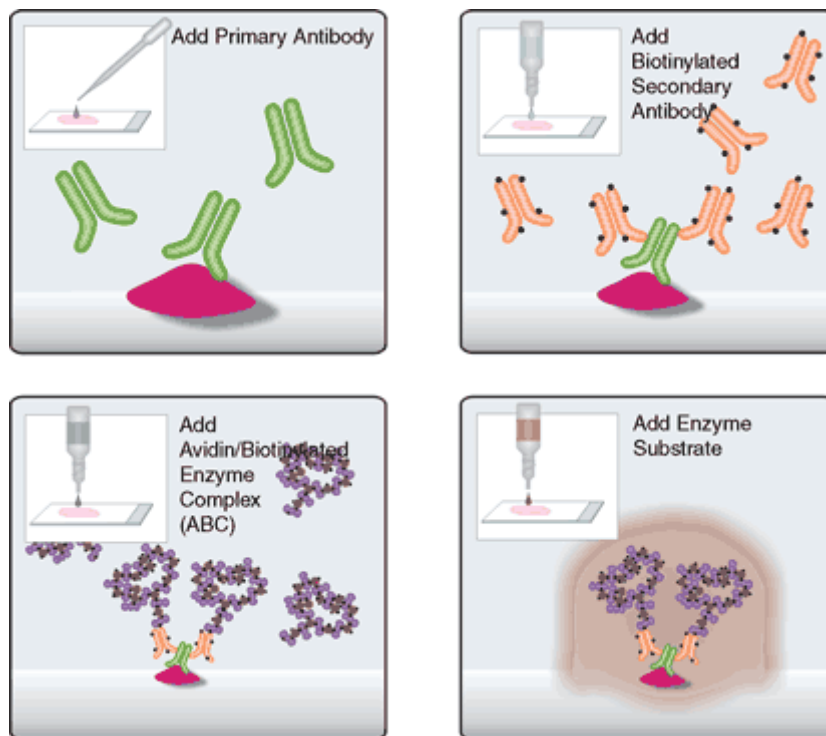
#### 4.2.3.3 Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode)

Für die immunhistochemische Darstellung des µ-Opioid-Rezeptors wurde die Avidin-Biotin-Komplex-Methode verwendet. Es handelt sich um eine doppelt indirekte Nachweisttechnik, welche auf einer chemischen Reaktion zwischen dem Primärantikörper, dem biotinylierten Brückenantikörper, dem Avidin-Biotin-Enzymkomplex und dem Chromogen AEC beruht (siehe Abb. 5).

Die Schnitte wurden im Primärantikörper UMB-3 in einer Verdünnung von 1:10 in PBS/1%RSA bei 4°C über Nacht inkubiert. Zum Vergleich erfolgte parallel die Inkubation von Schnitten von Gehirnen und Rückenmarken aus Ratten im Anti-MOR-Antiserum {3677} (1:10000). Der Verdünnungsgrad von 1:10 wurde bereits in anderen immunhistochemischen Arbeiten mit vergleichbaren monoklonalen Antikörpern verwendet. Auch in diesem Fall



deutete dies auf eine ausreichend hohe Sensitivität des Antikörpers UMB-3 hin (Fischer et al. 2008a, Fischer et al. 2008b). Am nächsten Tag wurde der Brückenantikörper (biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG) in einer Verdünnung von 1:200 für 30 min hinzugegeben. Die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidasekomplex (1:25) dauerte nochmals 30 min. Zwischen den einzelnen Schritten erfolgte eine Spülung mit 1,5ml PBS/1%RSA, um nicht bzw. unspezifisch gebundene Antikörper abzuwaschen. Anschließend wurde die Färbelösung, welche das Substratchromogen AEC enthielt, für 2 x 15 min à 150µl auf die Präparate gegeben. Die Peroxidase bewirkte durch Zersetzen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> eine Sauerstofffreisetzung. Dieser wiederum reagierte mit dem Chromogen AEC, so dass ein rotes Endprodukt entstand. Um die Reaktion zu beenden, wurden die Präparate mit 1,5ml Aqua bidest. gespült, anschließend aus dem Färbesystem (Thermo Scientific, Waltham, USA) entnommen und in Glas-Färbeküvetten einsortiert.



**Abb. 5:** Prinzip der Avidin-Biotin-Komplex-Methode (www.vectorlabs.com).

#### 4.2.3.4 Gegenfärbung und Eindecken

Es folgte eine Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin für 5 min, dreimaliges Spülen mit Aqua bidest. sowie fünfmaliges Eintauchen in Ammoniaklösung zur Bläuung der Färbung.

Die Präparate wurden dreimal mit Aqua bidest. gespült und mit VectaMount™-Eindeckmedium (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

#### 4.2.3.5 Peptidneutralisation

Zur Spezifitätskontrolle des Primärantikörpers UMB-3 und des Anti-MOR-Antiserums {3677} wurde eine immunhistochemische Färbung mit Peptidneutralisation durchgeführt. Das Peptid, welches ursprünglich zur Immunisierung der Kaninchen und somit zur Herstellung sowohl des Anti-MOR-Antiserums {3677} als auch des Antikörpers UMB-3 verwendet worden war, sollte diese nun blockieren und ihre Bindung am  $\mu$ -Opioidrezeptor verhindern. Die Durchführung folgte dem oben geschilderten Protokoll, unterschied sich jedoch in folgendem Punkt: Zusammen mit dem Primärantikörper UMB-3 (1:10) bzw. dem Anti-MOR-Antiserum {3677} (1:10000) inkubierte das Peptid (10 $\mu$ g/ml) in PBS/1%RSA für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Erst danach wurde das Gemisch auf die Schnitte gegeben.

#### 4.2.4 Auswertung

Die semiquantitative Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskopes (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena). Die Färbung wurde hinsichtlich der Lokalisation in der Zelle und im Gewebe, der Intensität und dem prozentualen Anteil positiver Zellen/Fasern beurteilt. Dabei diente folgendes Schema, welches eine modifizierte Form des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner darstellt, als Grundlage (Thomas 2007):

Prozentsatz positiver Zellen/Fasern	Färbeintensität positiver Zellen/Fasern
< 10% positive Zellen/Fasern	0 = keine
10-50% positive Zellen/Fasern	(+) = schwach
51-80% positive Zellen/Fasern	(++) = mäßig
> 80% positive Zellen/Fasern	(+++)= stark

Mittels eines Konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopes (Leica, Solms) konnte die Analyse der immunzytochemischen Färbungen durchgeführt werden. Hierbei wurde die Lokalisation des  $\mu$ -Opioidrezeptors in MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen abhängig von der Stimulation mit einem Agonisten, Antagonisten oder beidem beurteilt.

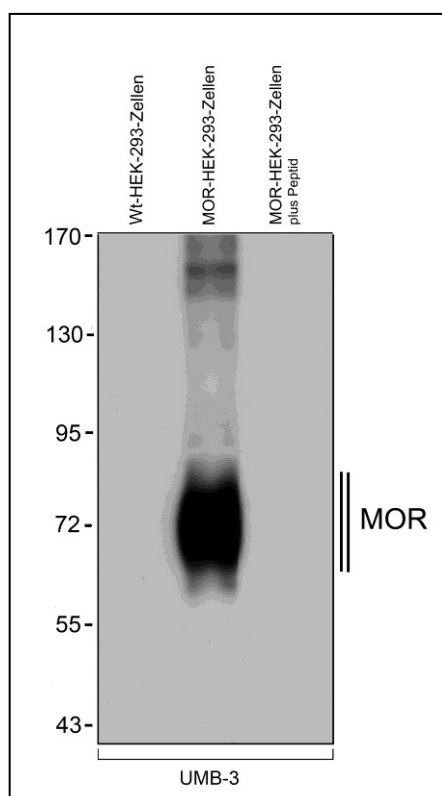
## 5. Ergebnisse

Zur Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers UMB-3 wurden mehrere Experimente durchgeführt. Ziel dieser Untersuchungen war die Kontrolle der Spezifität des Antikörpers, mit welcher er sein Antigen, den  $\mu$ -Opioidrezeptor, bindet.

### 5.1 Western-Blot-Analysen

#### 5.1.1 Western-Blot-Analyse an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen

Um die Spezifität des Antikörpers UMB-3 nachzuweisen, wurde eine Western-Blot-Analyse an stabil transfizierten MOR-HEK-293-Zellen und Wildtyp-HEK-293-Zellen durchgeführt. Die Rezeptorproteine wurden mit Hilfe von WGA-Beads isoliert, über eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis mit dem Antikörper UMB-3 erfolgte in einer Verdünnung von 1:200. Zur weiteren Spezifitätskontrolle wurde parallel eine Peptidneutralisation durchgeführt. Hierzu wurde der Antikörper mit seinem Antigenpeptid (10 $\mu$ g/ml) für zwei Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert. Der Antikörper UMB-3 konnte den isolierten  $\mu$ -Opioidrezeptor im Bereich von 60-80kDa als breite Bande nachweisen. Zusätzlich detektierte er eine Bande zwischen 150-160kDa. Bei den Wildtyp-HEK-293-Zellen und der Peptidneutralisation zeigten sich keine Banden (siehe Abb. 6).

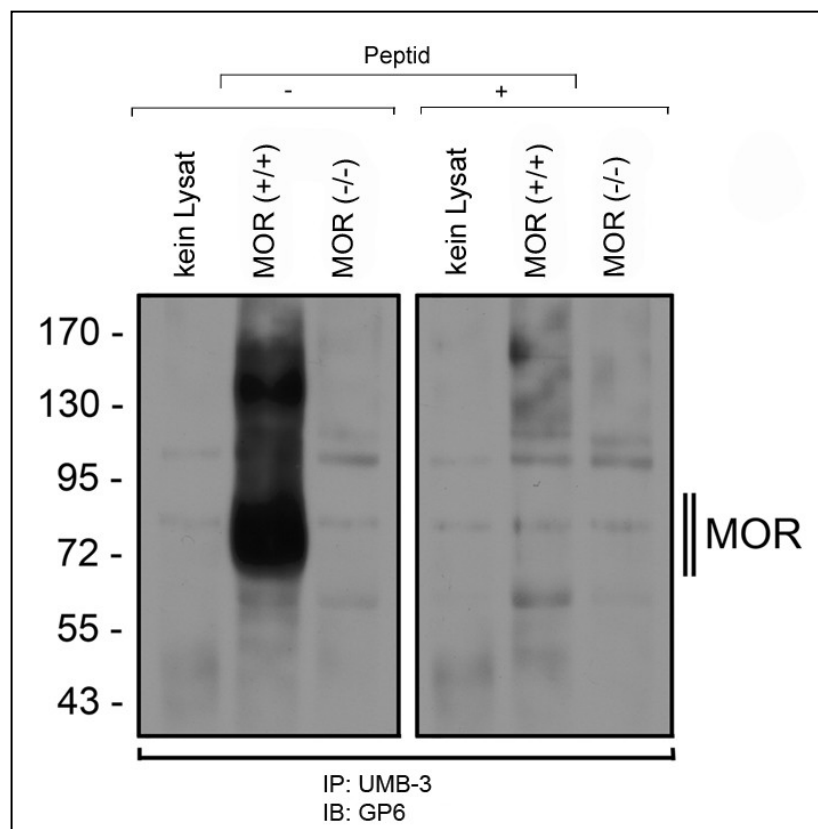


**Abb. 6:** Western-Blot-Analyse der Spezifität des Antikörpers UMB-3 an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und Wildtyp-HEK-293-Zellen. Das Lysat der MOR-HEK-293-Zellen wies eine breite Bande zwischen 60-80kDa auf. Zudem zeigte sich eine Bande zwischen 150-160kDa. Bei den Wildtyp-HEK-293-Zellen und der Peptidneutralisation zeigten sich keine Banden.

### 5.1.2 Western-Blot-Analyse am Hirngewebe der Maus

Zusätzlich wurde eine Western-Blot-Analyse am Hirngewebe von MOR(+/-)- und MOR(-/-)-Mäusen durchgeführt. Hierzu wurde das Gewebe homogenisiert und der Rezeptor mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 isoliert (Immunpräzipitation). Anschließend wurden die Rezeptorproteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse an den HEK-293-Zellen erfolgte der Nachweis (Immunoblot) der Rezeptoren durch das Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6} (1:5000). Zur Kontrolle wurde auch hier eine Peptidneutralisation (10µg/ml) durchgeführt.

Der  $\mu$ -Opioidrezeptor konnte nach seiner Isolation aus dem Gewebe als breite Bande zwischen 70-80kDa nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Zusätzlich fiel eine Bande zwischen 135-150kDa auf. Bei fehlendem Lysat und beim MOR-Knockout-Maus-Gewebe wurden keine Banden sichtbar. Nach der Peptidneutralisation konnten auch beim MOR(+/-)-Maus-Gewebe die Rezeptoren nicht mehr detektiert werden.

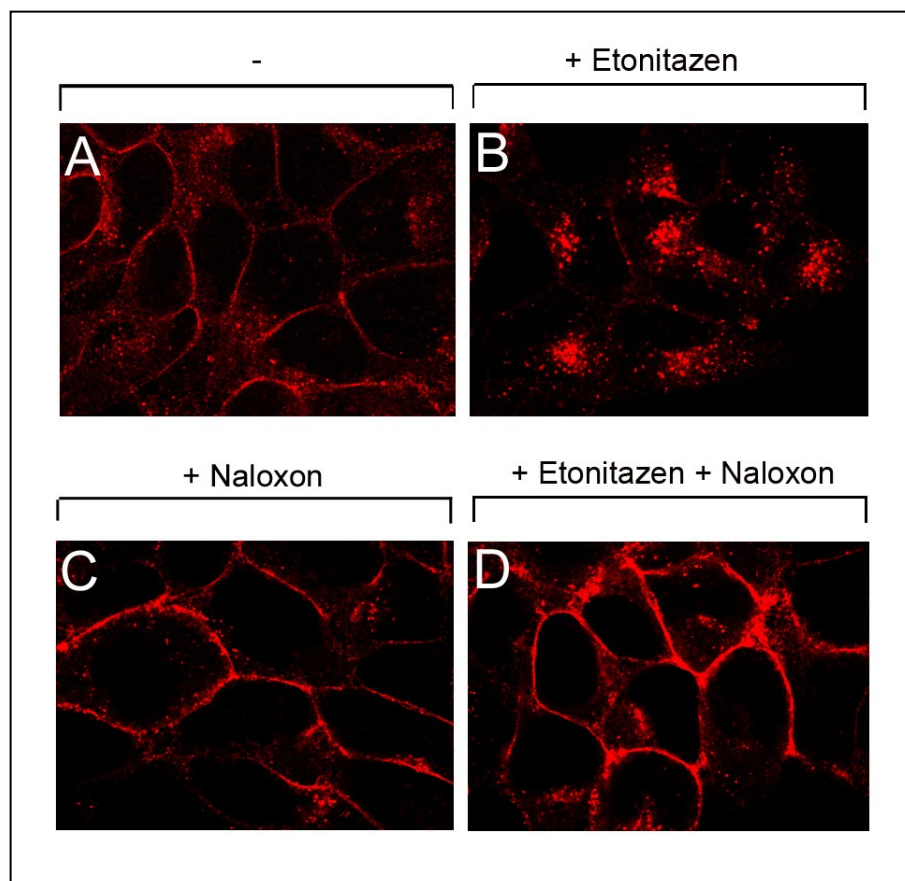


**Abb. 7:** Western-Blot-Analyse am Hirngewebe der Maus. Der  $\mu$ -Opioidrezeptor wurde mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 aus dem Gewebe isoliert (IP: Immunpräzipitation). Anschließend konnte das Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6} im MOR(+/-)-Hirngewebe eine breite Bande zwischen 70-80kDa nachweisen (IB: Immunoblot). Zusätzlich zeigte sich eine Bande zwischen 135-150kDa. Bei fehlendem Lysat, MOR(-/-)-Mäuse-Gewebe und der Peptidneutralisation konnten keine Rezeptorproteine nachgewiesen werden.

## 5.2 Immunzytochemische Färbungen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen

Mit Hilfe des Antikörpers UMB-3 (1:100) wurde die Lokalisierung des MOR in stabil transfizierten HEK-293-Zellen untersucht. Dies erfolgte an unstimulierten Zellen und an Zellen, die zuvor für jeweils 30 min mit einem Rezeptoragonisten, -antagonisten oder beidem behandelt worden waren. Die immunzytochemische Färbung der Zellen mit einem fluoreszierenden Sekundärantikörper diente der Visualisierung der  $\mu$ -Opioidrezeptoren auf subzellulärer Ebene.

Die unstimulierten HEK-293-Zellen zeigten eine membranständige Immunfluoreszenz (siehe Abb. 8 A). Nach dreißigminütiger Stimulation mit dem Agonisten Etonitazen kam es zur Verlagerung des Leuchtsignals ins Zytoplasma der Zellen (siehe Abb. 8 B). Bei der Behandlung mit dem Antagonisten Naloxon und dem Agonisten/Antagonisten-Gemisch blieb die Membranständigkeit der Rezeptoren bestehen (siehe Abb. 8 C, D).



**Abb. 8:** Immunzytochemie an stabil transfizierten MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen. **A.** Unstimulierte Zellen mit membranständigen  $\mu$ -Opioidrezeptoren. **B.** Nach 30-minütiger Stimulation mit dem Agonisten Etonitazen (25nM) verlagerte sich das Signal ins Zytoplasma. **C, D.** Nach 30-minütiger Behandlung mit dem Antagonisten Naloxon (1mM) und dem Agonisten/Antagonisten-Gemisch blieb der Rezeptor membranständig.

## 5.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe des Antikörpers UMB-3 wurden Paraffinschnitte von unterschiedlichen Geweben der Ratte, der Maus und des Menschen hinsichtlich des Vorhandenseins bzw. der Lokalisation des  $\mu$ -Opioidrezeptors untersucht. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbungen wurden MOR-exprimierende und MOR-Knockout-Mäuse analysiert bzw. bei den Ratten und den humanen Geweben zusätzliche Peptidneutralisationen durchgeführt.

Zum Vergleich wurden weiterhin Gehirne und Rückenmarke von Ratten mit dem Anti-MOR-Antiserum {3677} (1:10000) inkubiert. Dieses polyklonale Serum wurde während der Splenektomie aus jenem Kaninchen gewonnen, dessen B-Zellen zur Herstellung des UMB-3 verwendet wurden. Zur Kontrolle erfolgte auch hier eine Peptidneutralisation.

Für die immunhistochemische Färbung wurden die Schnitte entparaffiniert und entfettet, in Citratpuffer gekocht und mit dem UMB-3 (1:10) bzw. dem Anti-MOR-Antiserum {3677} (1:10000) behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation im Sekundärantikörper (biotinylierter Anti-Kaninchen-IgG / 1:200) und im Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex. Durch die Behandlung mit dem Chromogen AEC entstand das rote Endprodukt. Bei der semiquantitativen Auswertung (siehe Kapitel 4.2.4) wurde die Färbung hinsichtlich der Verteilung im Gewebe, der Lokalisation auf subzellulärer Ebene und der Intensität beurteilt. Zusätzlich wurde der Prozentsatz positiver Zellen/Fasern in der untersuchten Region ermittelt.

### 5.3.1 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Geweben der Ratte

Die Auswertung des *Hirngewebes* erfolgte in Bezug auf die unterschiedlichen Regionen.

Im *Striatum* (siehe Abb. 9 A), bestehend aus dem Nucleus (Ncl.) Caudatus und dem Putamen, zeigte sich eine Immunreaktivität im Bereich der sogenannten „Patches“. Diese, auch als Striosomen bezeichneten Neuronenzellverbände, sind vereinzelt in die striatale Matrix eingestreut (Trepel 2008). Hierbei waren über 80% der Nervenzellkörper mäßig (++) und mehr als 80% der Fortsätze stark (+++) positiv gefärbt.

Eine mäßige (++) bis starke (+++) Markierung bei über 80% der neuronalen Zellkörper und Fortsätze zeigte sich innerhalb der „Patches“ des *Nucleus accumbens* (siehe Abb. 9 B). Dieser stellt die Verbindung zwischen dem Ncl. Caudatus und dem Putamen dar.

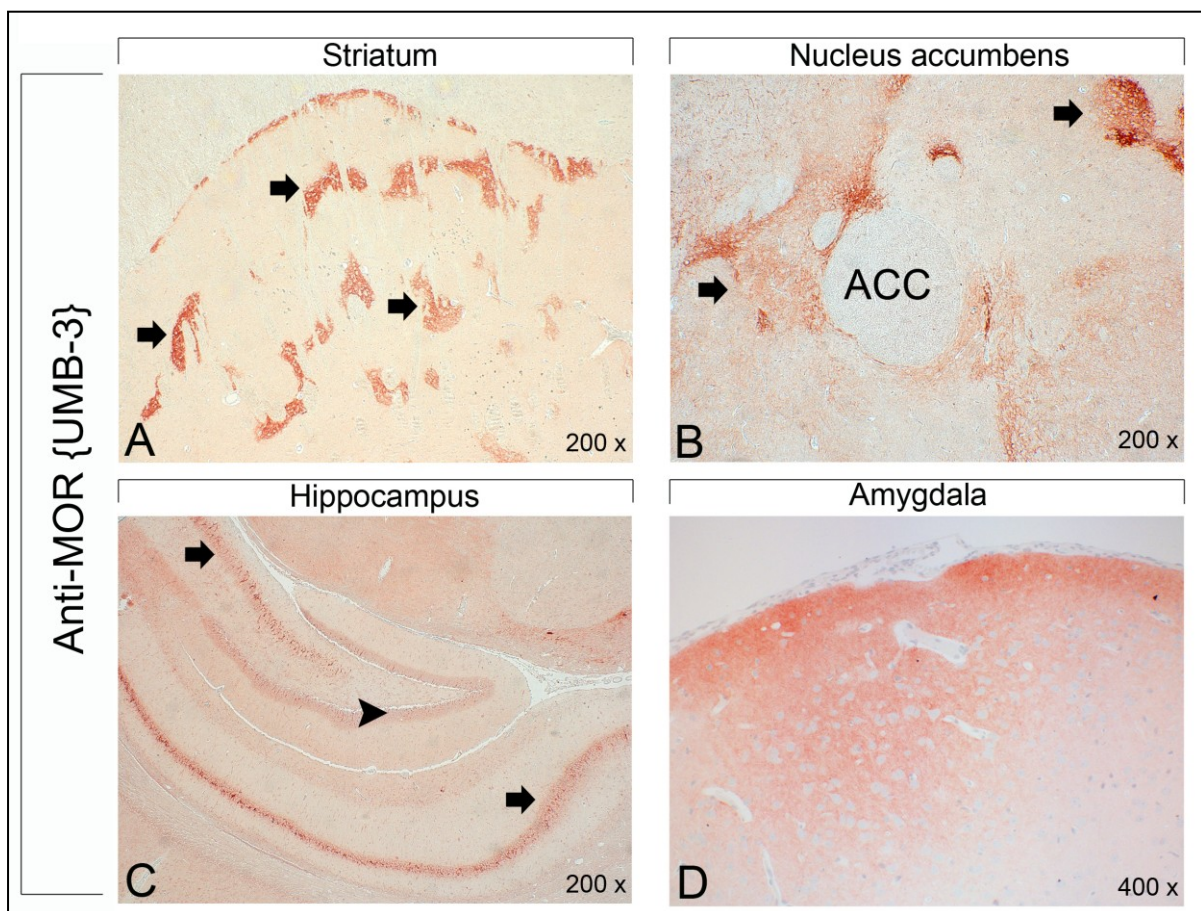
Die Nervenzellen der Pyramidenzellschicht des *Hippocampus* (siehe Abb. 9 C) waren in einem Prozentsatz von über 80 stark (+++) positiv. Dahingegen erschienen die Zellen der



Körnerzellschicht des Gyrus dentatus zu über 80% leicht (+) bis mäßig (++) gefärbt. In beiden Fällen zeigte sich die Immunreaktivität an den Nervenzellmembranen und -fortsätzen.

Im *Cortex* waren mehr als 80% der Dendriten und Axone in der Molekularschicht mäßig (++) bis kräftig (+++) markiert. Im Gegensatz dazu fiel bei über 80% der Perikaryen und Fortsätze in der äußeren Pyramiden- und der inneren Körnerzellschicht eine lediglich schwache (+) MOR-Positivität auf.

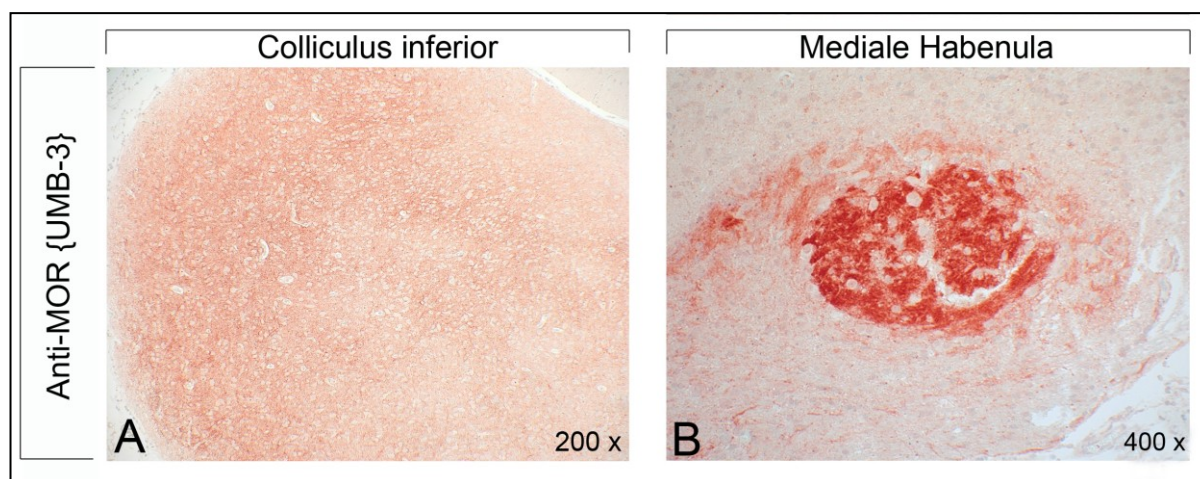
Im Bereich der *Amygdala* (siehe Abb. 9 D), der *Colliculi inferiores* (siehe Abb. 10 A) **und superiores** sowie des *Thalamus* (dorsomediale, centromediale und lateroposteriore Kerne sowie Corpus geniculatum laterale und mediale) wiesen über 80% der Zellkörper eine schwache (+) bis mäßige (++) und mehr als 80% der Fortsätze eine starke (+++) Immunreaktivität auf.



**Abb. 9:** Darstellung der Immunhistochemie mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an verschiedenen Hirnregionen der Ratte. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am jeweiligen rechten unteren Bildrand. **A.** Die „Patches“ (➡) des Striatums zeigten eine starke (+++) MOR-Expression. **B.** Im Bereich des Nucleus accumbens (ACC) fielen die „Patches“ (➡) durch eine mäßige (++) bis kräftige (+++) Immunreaktivität auf. **C.** Die Pyramidenzellschicht (➡) des Hippocampus erschien stark (+++) und die Körnerzellschicht (➤) schwach (+) bis mäßig (++) rot gefärbt. **D.** Die Zellkörper der Amygdala waren leicht (+) bis mäßig (++) und deren Fortsätze stark (+++) positiv.

Bei der Betrachtung des *Ncl. tractus solitarii*, *Ncl. interpeduncularis*, *Ncl. parabrachialis*, *Locus coeruleus*, *Fasciculus retroflexus* und der *medialen Habenula* (siehe Abb. 10 B) stellten sich mehr als 80% der neuronalen Fortsätze kräftig (+++) und über 80% der Perikaryen mäßig (++) positiv dar.

Bei der Analyse der *Rückenmarke* zeigte sich eine kräftige (+++) Farbreaktion bei über 80% der Nervenzellkörper und -fortsätze im Bereich der Substantia gelatinosa des Hinterhorns.



**Abb. 10:** Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an unterschiedlichen Hirnregionen der Ratte. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am jeweiligen rechten unteren Bildrand. **A.** Die Perikaryen des Colliculus inferior zeigten eine leichte (+) bis mittlere (++) Markierung. Die neuronalen Fortsätze waren stark (+++) gefärbt. **B.** Bei der Betrachtung der medialen Habenula waren die Dendriten und Axone kräftig (+++) und die Perikaryen mäßig (++) gefärbt.

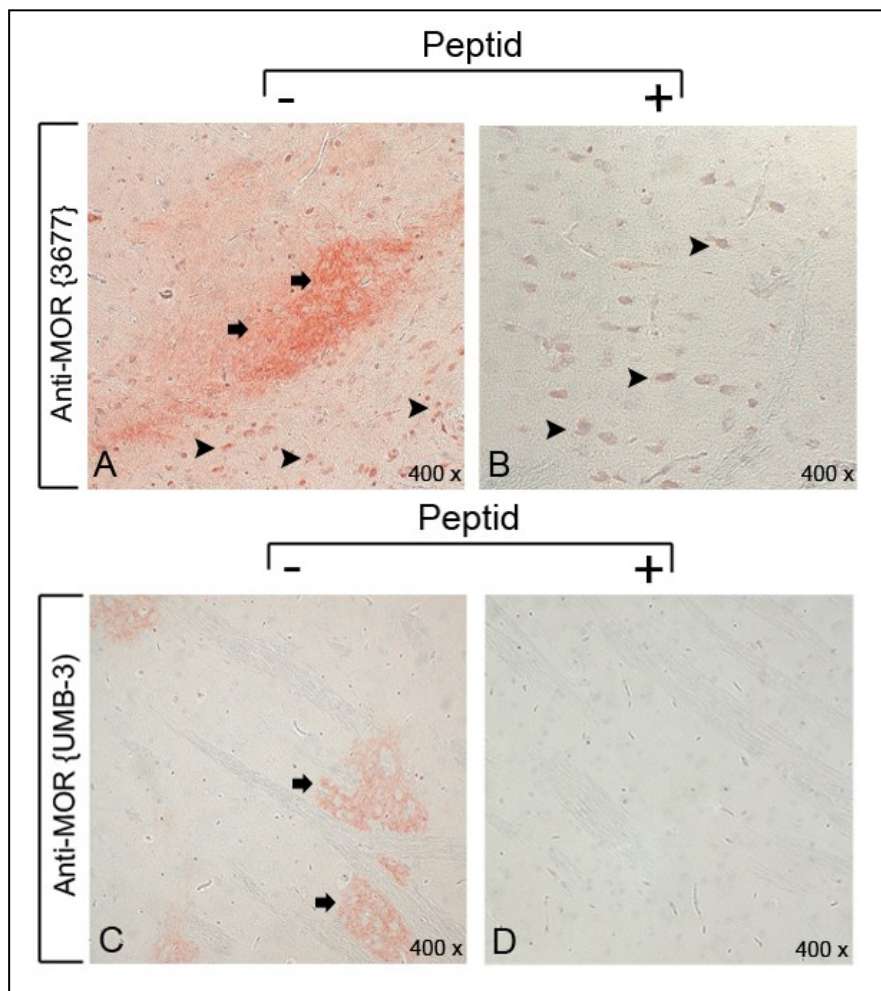
Eine zur Kontrolle durchgeführte Peptidneutralisation bestätigte, dass es sich bei allen Markierungen um spezifische Färbungen handelte, die somit die Verteilung des  $\mu$ -Opioidrezeptors im Hirngewebe und Rückenmark der Ratte widerspiegeln.

Zur weiteren Spezifitätskontrolle wurde zudem eine vergleichende immunhistochemische Untersuchung am Rückenmark und Gehirn mit Hilfe des *polyklonalen Anti-MOR-Antiserums {3677}* und des *monoklonalen Antikörpers UMB-3* durchgeführt.

Zum Vergleich der Färbeargebnisse im *Gehirn* wurde exemplarisch das Striatum untersucht. Nach der Immunhistochemie mit dem *Anti-MOR-Antiserum {3677}* (siehe Abb. 11 A, B) zeigte sich eine Markierung im Bereich der Striosomen. Hierbei waren über 80% der Nervenzellkörper mäßig (++) und mehr als 80% der Fortsätze kräftig (+++) positiv. Zudem zeigte sich eine starke (+++) nukleäre Immunreaktivität bei 50 bis 80% der Nervenzellen in der Matrix. Durch die Peptidneutralisation konnte nur die spezifische Färbung der Striosomen aufgehoben werden.



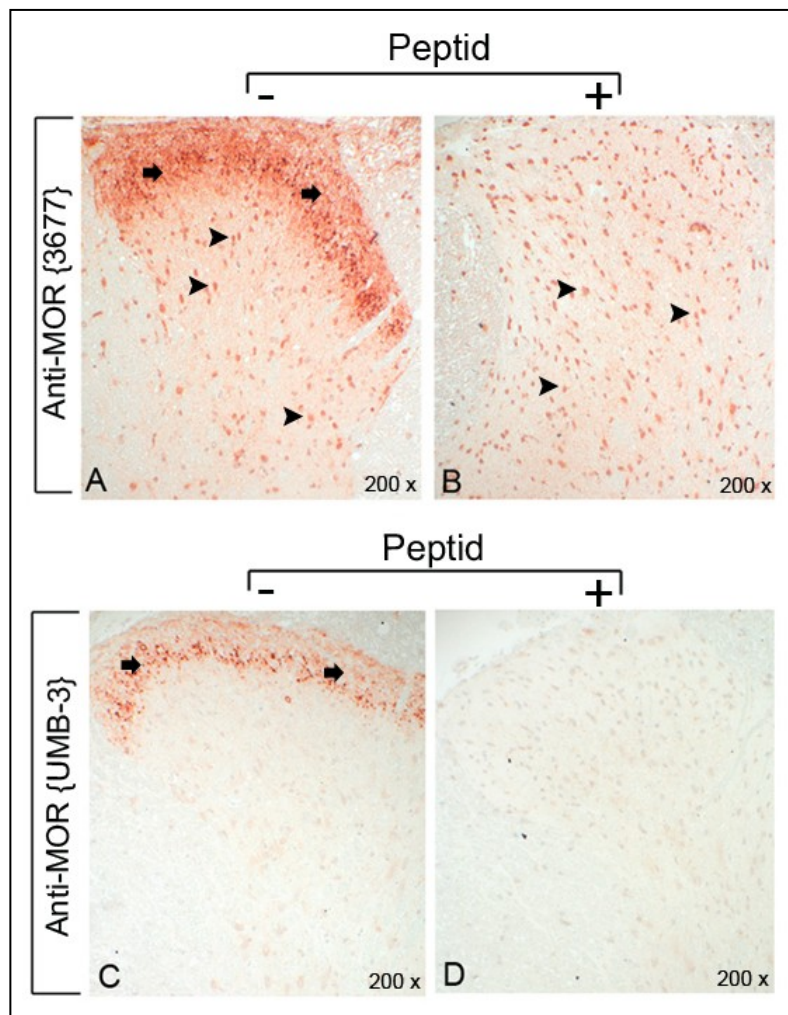
Bei der Verwendung des *monoklonalen Antikörpers UMB-3* (siehe Abb. 11 C, D) konnte ebenfalls eine Immunreaktivität im Bereich der „Patches“ nachgewiesen werden. Über 80% der Nervenzellkörper waren schwach (+) und mehr als 80% der Fortsätze mäßig (++) markiert. Im Gegensatz zum polyklonalen Anti-MOR-Antiserum fanden sich in der striatalen Matrix keine unspezifisch gefärbten Nervenzellen. Die Markierung innerhalb der „Patches“ wurde durch die Behandlung mit dem Peptid vollständig neutralisiert.



**Abb. 11:** Darstellung der Immunhistochemie unter Verwendung des polyklonalen Anti-MOR-Antiserums {3677} und des monoklonalen Antikörpers UMB-3 am Gehirn (Striatum) der Ratte. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A, B.** Das Antiserum markierte die „Patches“ (➡) des Striatums positiv. Zusätzlich wurden auch Nervenzellen (▶) der Matrix gefärbt. Diese unspezifische Immunreaktion verschwand im Gegensatz zur Färbung der Striosomen nach der Peptidneutralisation nicht. **C, D.** Der Antikörper UMB-3 detektierte die „Patches“ (➡) ohne weitere Nervenzellen nachzuweisen. Die spezifische Markierung der Striosomen konnte durch die Peptidneutralisation komplett beseitigt werden.

Nach der immunhistochemischen Färbung der *Rückenmarke* mit Hilfe des *Anti-MOR-Antiserums {3677}* (siehe Abb. 12 A, B) waren die Nervenzellkörper, -kerne und -fortsätze der Substantia gelatinosa des Hinterhorns zu über 80% stark (+++) positiv. Zudem zeigte sich in der restlichen grauen Substanz eine mäßige (++) bis starke (+++) intrazelluläre und eine

starke (+++) nukleäre unspezifische Färbung von mehr als 80% der Nervenzellen. Nach der Peptidneutralisation verschwand die spezifische Färbung der Substantia gelatinosa, die der restlichen Nervenzellen und ihrer Fortsätze blieb jedoch bestehen. Wie schon zuvor beschrieben, fiel bei der Untersuchung mit dem *monoklonalen Antikörper UMB-3* (siehe Abb. 12 C, D) eine auf die Perikaryen und Fortsätze (>80%) der Substantia gelatinosa begrenzte starke (+++) Immunreaktivität auf. Nach der Peptidneutralisation war diese Färbung nicht mehr vorhanden.



**Abb. 12:** Darstellung der immunhistochemischen Untersuchung mit Hilfe des Anti-MOR-Antiserums {3677} und des monoklonalen Antikörpers UMB-3 am Rückenmark der Ratte. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A, B.** Bei der Verwendung des Antiserums zeigte sich zusätzlich zur spezifischen Färbung der Substantia gelatinosa (■) des Hinterhorns eine Immunreaktivität bei den restlichen Nervenzellen (►) der grauen Substanz. Diese unspezifische Markierung blieb auch nach der Peptidneutralisation bestehen. **C, D.** Im Gegensatz dazu detektierte der Antikörper UMB-3 nur den Bereich der Substantia gelatinosa (■). Durch die Peptidneutralisation konnte diese spezifische Färbung komplett aufgehoben werden.

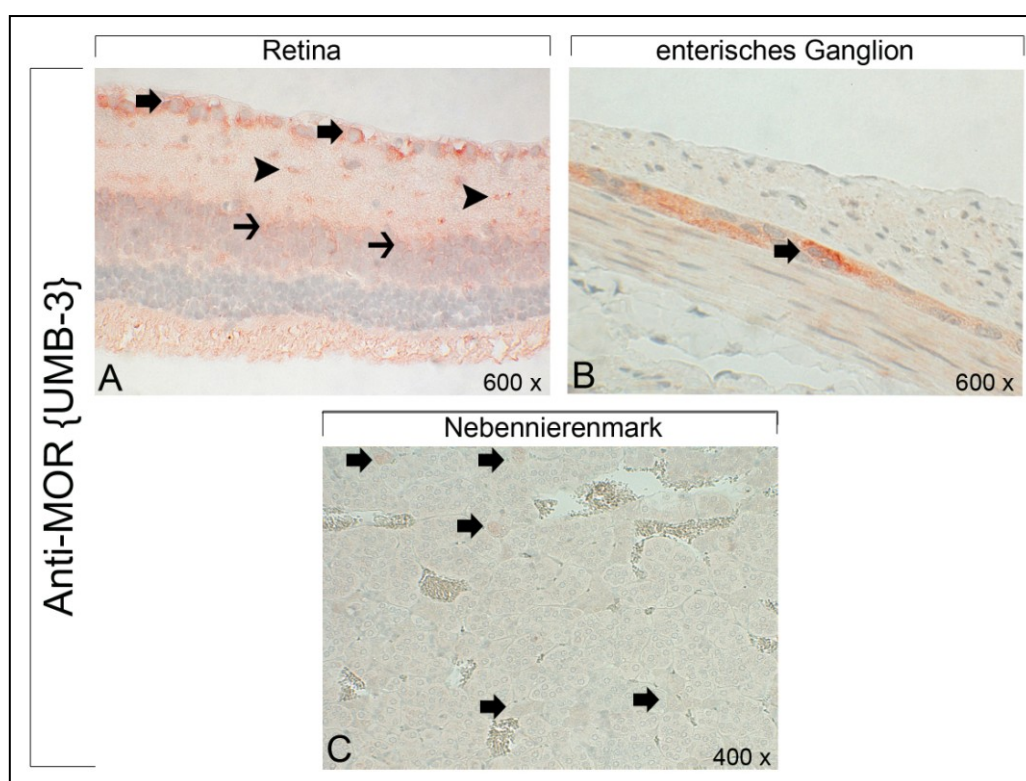
Im *Hypophysenvorderlappen* (Adenohypophyse) waren 10-50% der Zellen gering (+) und weniger als 10% stark (+++) intrazellulär gefärbt. Da man die einzelnen Zelltypen nur durch

spezielle Färbemethoden differenzieren kann, konnten an dieser Stelle die positiven und morphologisch unterschiedlichen Zellen nicht eindeutig zugeordnet werden.

Der Antikörper UMB-3 detektierte in der Retina des *Auges* (siehe Abb. 13 A) eine mäßige (++) bis starke (+++) intrazelluläre Positivität von über 80% der Ganglienzellen in der Ganglienzellschicht des Nervus opticus. In der inneren plexiformen Schicht, welche die Synapsenzone zwischen den bipolaren Zellen und den Ganglienzellen bildet, waren 10 bis 50% der Fortsätze mäßig (++) bis kräftig (+++) gefärbt. Eine leichte (+) bis mittlere (++) Immunreaktivität bei 10 bis 50% der Zellkörper und Fasern konnte im ersten Drittel der inneren Körnerzellschicht festgestellt werden.

Im *Darm* (siehe Abb. 13 B) und im *Magen* fiel eine mäßige (++) bis starke (+++) zytoplasmatische Färbung von über 80% der Ganglienzellen auf.

Bei der Betrachtung der *Nebennieren* (siehe Abb. 13 C) zeigten sich zwischen den nicht markierten chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks schwach (+) intrazellulär positive Ganglienzellen.



**Abb. 13:** Darstellung der Immunhistochemie unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an peripheren Organen der Ratte. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A.** In der Retina des Auges fiel eine mäßige (++) bis starke (+++) Immunreaktivität von Ganglienzellen (➡) und von Fortsätzen (▶) in der inneren plexiformen Schicht auf. Die Zellkörper und Fasern (➔) des ersten Drittels der inneren Körnerzellschicht wiesen nur eine schwache (+) bis durchschnittliche (++) Markierung auf. **B.** Bei der Betrachtung des Darmes zeigten sich mäßig (++) bis stark (+++) gefärbte Zellen in den Ganglien (➡). **C.** Im Nebennierenmark konnten ebenfalls Ganglienzellen (➡) als leicht (+) positiv dargestellt werden.

Eine zur Kontrolle durchgeführte Peptidneutralisation zeigte, dass es sich bei den Markierungen in den peripheren Organen der Ratte um spezifische Färbungen handelte.

In allen anderen analysierten Organen dieser Spezies (Parotis und andere Speicheldrüsen, Lunge, Thymus, Herz, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Harnblase, Hoden, Nebenhoden, Samenblase) konnte keine  $\mu$ -Opioidrezeptor-Expression festgestellt werden.

### 5.3.2 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen Geweben der Maus

Die im Folgenden beschriebenen Färbungen in den unterschiedlichen Regionen des Gehirns der Maus wurden ausschließlich in den MOR(+/-)-Tieren detektiert. Die dazugehörigen Knockout-Mäuse zeigten in diesen Bereichen dementsprechend keine Immunreaktivität. Insgesamt fiel allerdings eine gegenüber der Ratte schwächere spezifische Markierung bestimmter Regionen (z.B. Striatum, Hippocampus, Ncl. accumbens) auf.

Innerhalb der Striosomen des *Striatums* (siehe Abb. 14 A, B) erschienen über 80% der Nervenzellkörper gering (+) und mehr als 80% der dazugehörigen Fortsätze schwach (+) bis mäßig (++) gefärbt.

Mehr als 80% der Perikaryen und Fortsätze der Patches im Bereich des *Ncl. accumbens* wiesen eine leichte (+) MOR-Positivität auf.

Im *Hippocampus* (siehe Abb. 14 C, D) waren über 80% der Nervenzellmembranen und -fortsätze in der Pyramidenzellschicht mäßig (++) und in der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus schwach (+) markiert.

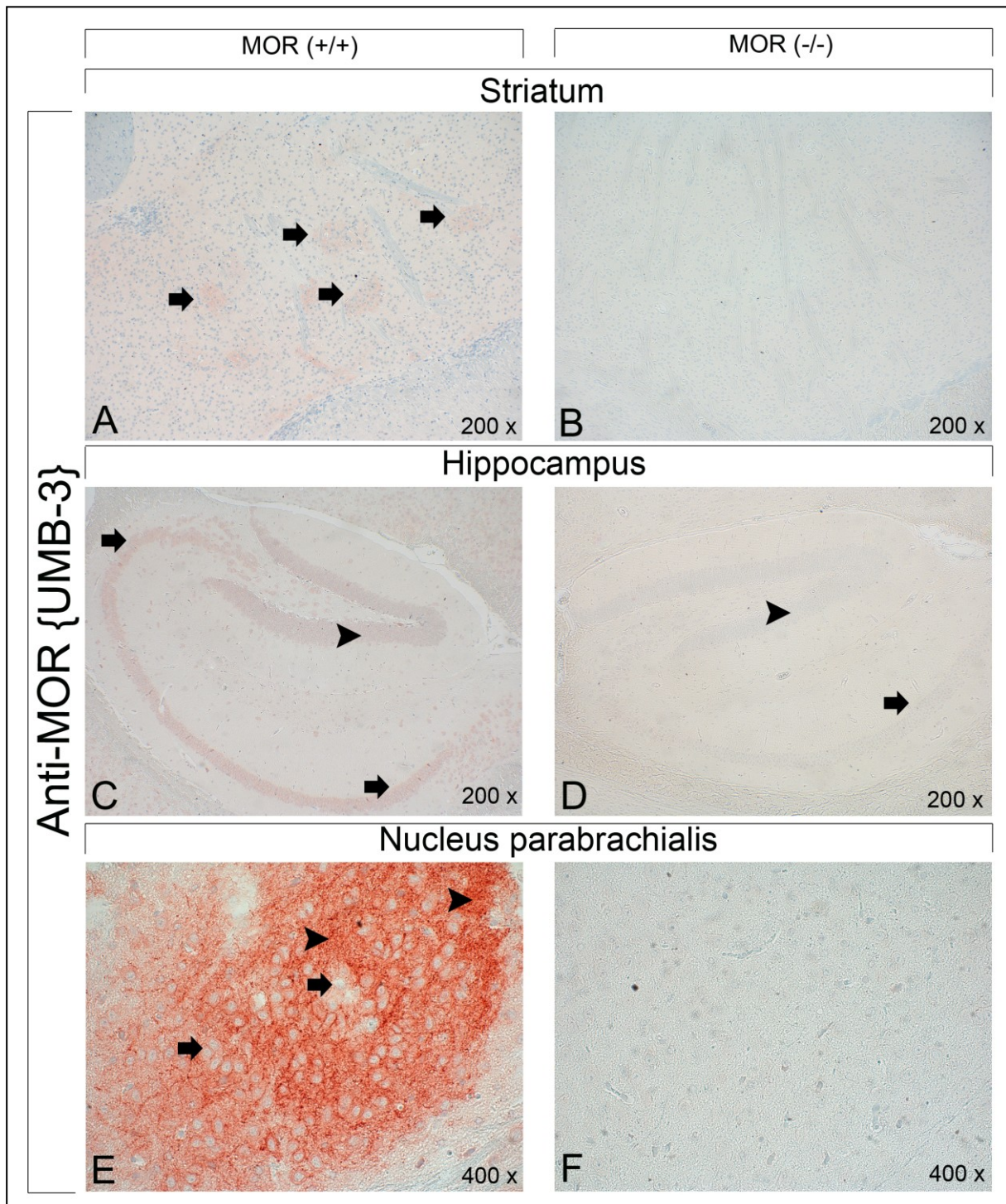
Bei der Betrachtung der *Colliculi superiores und inferiores* stellten sich die Perikaryen und Fortsätze in einem Prozentsatz von über 80 leicht (+) positiv dar.

Im *Thalamus* ließ sich der MOR an mehr als 80% der Nervenzellkörper und -fortsätze seiner dorsomedialen, centromedialen und lateroposterioren Kerne sowie der lateralen und medialen Genuculatae mäßig (++) bis stark (+++) nachweisen.

Eine schwach- (+) bis mittelgradige (++) Rotfärbung von über 80% der Perikaryen und eine starke (+++) Immunreaktion bei mehr als 80% der neuronalen Fortsätze lag innerhalb des *Ncl. tractus solitarii*, *Ncl. parabrachialis* (siehe Abb. 14 E, F), *Ncl. interpeduncularis* (siehe Abb. 15 A, B), *Fasciculus retroflexus* (siehe Abb. 15 C, D) und der *medialen Habenula* vor.

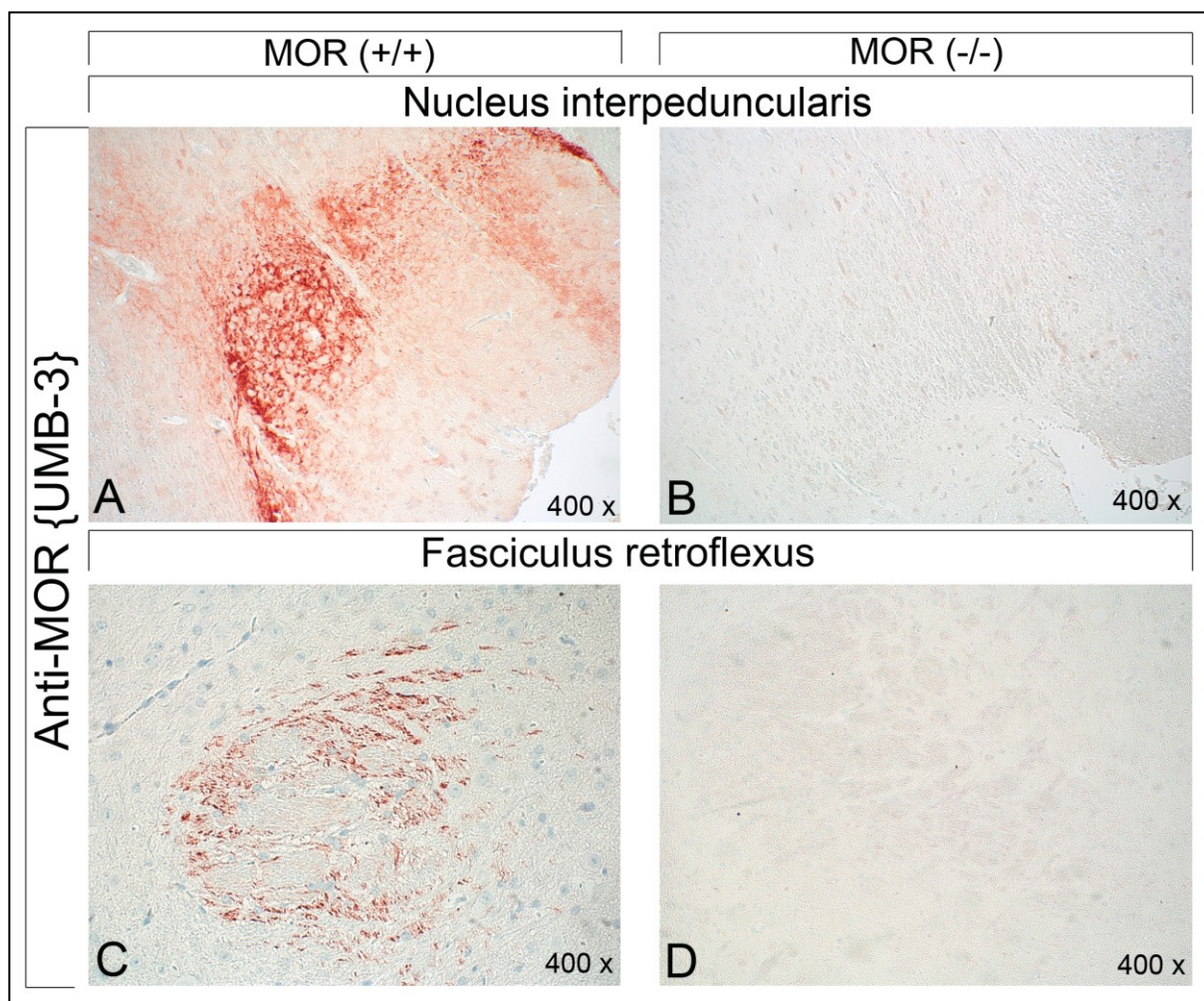
Im Gegensatz zu den Befunden an den Gehirnen der Ratte, konnte in den Mäusen keine MOR-Expression im Bereich des *Locus coeruleus*, der *Amygdala* und des *Cortex* registriert werden.





**Abb. 14:** Darstellung der immunhistochemischen Färbungen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an Hirngewebe von Wildtyp (MOR(+/-))- und Knockout (MOR(-/-))-Mäusen. Die beschriebenen Färbungen wurden ausschließlich in den MOR(+/-)-Hirnen festgestellt. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A, B.** Im Striatum zeigte sich eine schwache (+) bis mäßige (++) spezifische Markierung im Bereich der „Patches“ (➡). **C, D.** Bei der Betrachtung des Hippocampus erschien die Pyramidenzellschicht (➡) mäßig (++) und die Körnerzellschicht (➤) des Gyrus dentatus schwach (+) positiv. **E, F.** Innerhalb des Ncl. parabrachialis waren die Perikaryen (➡) mäßig (++) und die Nervenzellfortsätze (➤) kräftig (+++) gefärbt.



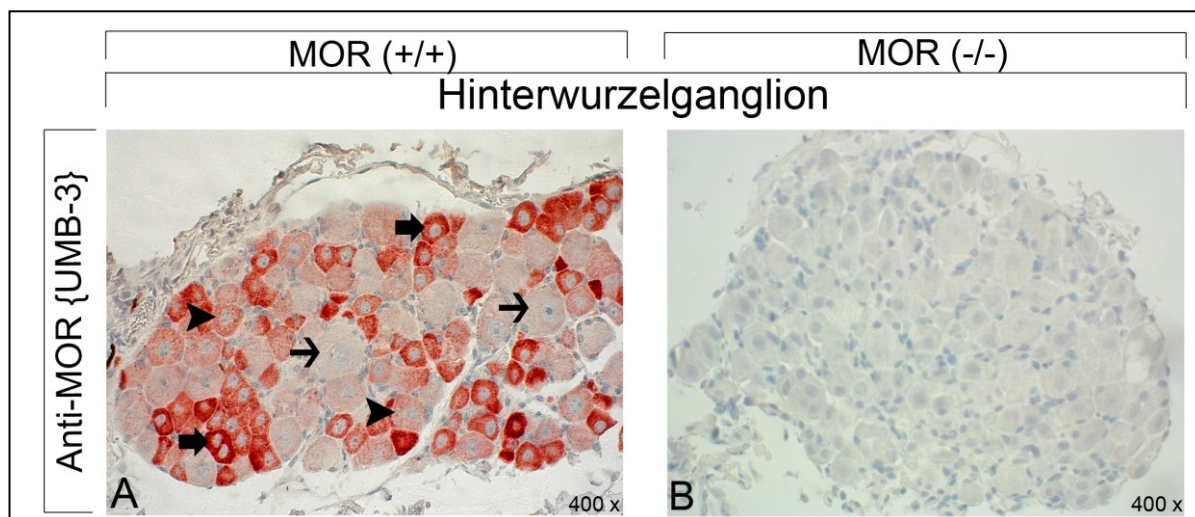


**Abb. 15:** Darstellung der Immunfärbung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an verschiedenen Hirnregionen von Wildtyp (MOR(+/-))- und MOR-Knockout (MOR(-/-))-Mäusen. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. Die beschriebenen Färbungen wurde ausschließlich in den MOR(+/-)-Mäusen gesehen. **A, B, C, D.** Im Bereich des Ncl. interpeduncularis und des Fasciculus retroflexus erschienen die Perikaryen schwach (+) bis mäßig (++) und die Fortsätze stark (+++) markiert.

Das **Rückenmark** zeigte nur in den Wildtyp-Mäusen eine starke (+++) Immunreaktion bei mehr als 80% der Nervenzellkörper und -fortsätze in der Substantia gelatinosa des Hinterhorns. Eine leichte (+) Markierung von Nervenzellen der restlichen grauen Substanz ließ sich sowohl in den MOR(+/-)- als auch in den MOR-Knockout-Tieren feststellen und war somit als unspezifisch einzuordnen.

Bei der Untersuchung der **Hinterwurzelganglien** (siehe Abb. 16 A, B) erschienen ausschließlich in den Wildtyp-Mäusen die großen Nervenzellen leicht (+), die mittelgroßen mäßig (++) und die kleinen stark (+++) positiv.

Bei der Darstellung der **Adenohypophyse** waren weniger als 10% der Zellen stark (+++) und zwischen 10-50% der Zellen schwach (+) zytoplasmatisch gefärbt. Auch in diesem Fall waren die Zellen morphologisch unterschiedlich und nicht eindeutig identifizierbar.



**Abb. 16:** Darstellung der Immunhistochemie mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an den Hinterwurzelganglien von MOR-positiven und MOR-Knockout-Mäusen. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A, B.** Ausschließlich in den Wildtyp-Mäusen waren die kleinen (➡) Nervenzellen kräftig (+++), die mittleren (▶) mäßig (++) und die großen (➔) leicht (+) gefärbt.

In der Retina des *Auges* (siehe Abb. 17 A, B) konnte der Antikörper UMB-3 eine kräftige (+++) zytoplasmatische Rotfärbung von über 80% der Ganglienzellen der Ganglienzellschicht detektieren. 10 bis 50% der Zellkörper und Fortsätze des ersten Drittels der inneren Körnerzellschicht zeigten eine mäßige (++) bis starke (+++) MOR-Positivität. In beiden Fällen kam die Immunreaktion nur in den MOR(+/-)-Tieren vor. Im Gegensatz zu den Befunden an der Retina der Ratte waren die neuronalen Fortsätze in der inneren plexiformen Schicht nicht gefärbt.

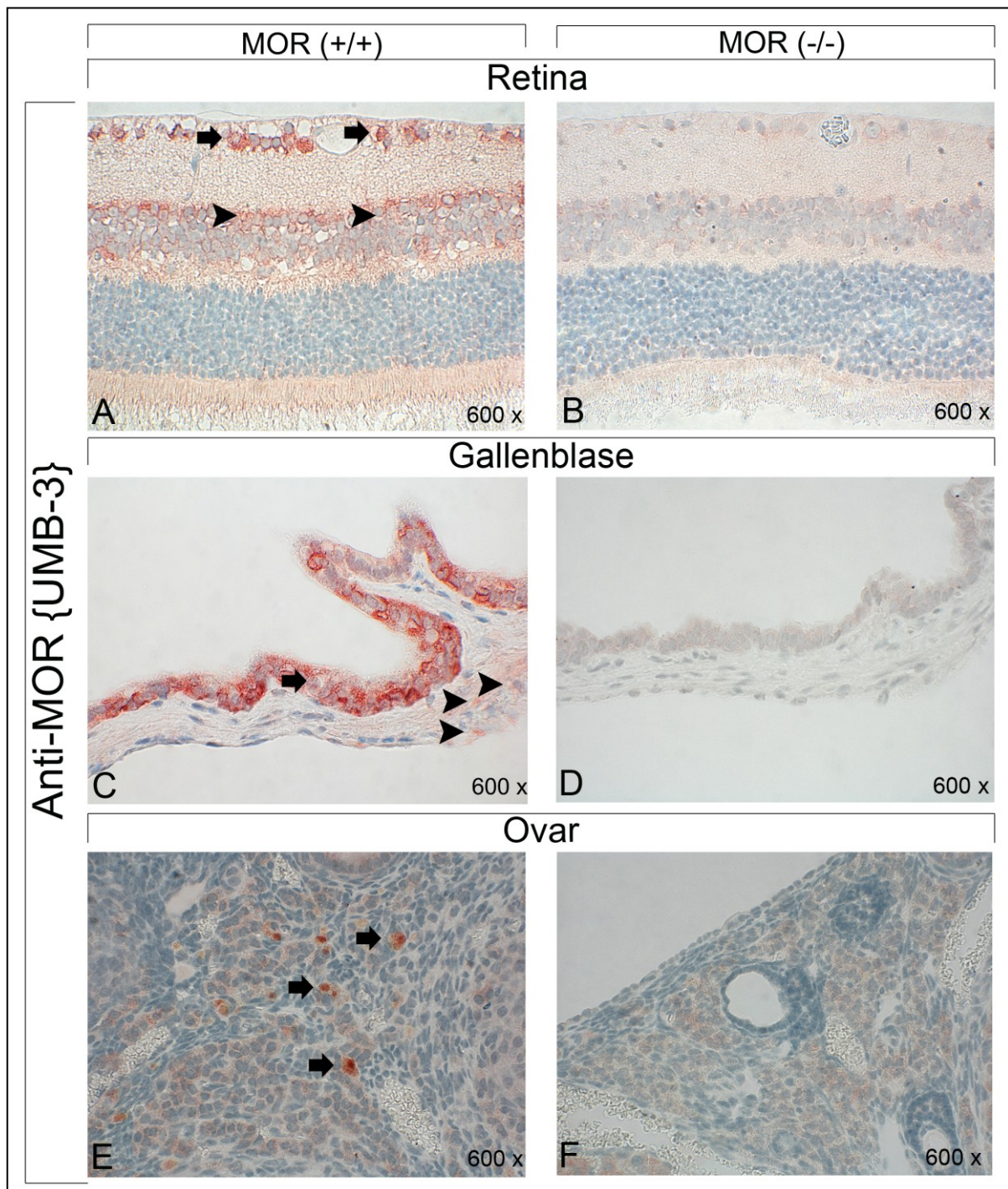
Über 80% der im *Darm* und *Magen* befindlichen Ganglienzellen wiesen eine mäßige (++) bis starke (+++) intrazelluläre Markierung, die auf die Wildtyp-Mäuse beschränkt war, auf.

Bei der Betrachtung der *Gallenblase* (siehe Abb. 17 C, D) der Wildtyp-Mäuse fiel eine kräftige (+++) intrazelluläre Rotfärbung von mehr als 80% der Epithelzellen auf. Zudem zeigte sich eine schwache (+) Expression von MOR in weniger als 10% der Muskelzellen. Vereinzelt fielen mäßig (++) gefärbte kleine und polymorphe Zellen auf. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den Knockout-Tieren keine vergleichbare Markierung.

Die zwischen den chromaffinen Zellen des *Nebennierenmarks* befindlichen Ganglienzellen erschienen ausschließlich in den MOR(+/-)-Tieren schwach (+) zytoplasmatisch positiv. Hierbei waren über 80% der Zellen gefärbt.

Die Primordialfollikel sowie die Granulosazellen der Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel des *Ovars* (siehe Abb. 17 E, F) zeigten ausschließlich in den Wildtypen eine mäßige (++) bis kräftige (+++) zytoplasmatische Immunreaktion.





**Abb. 17:** Darstellung der immunohistochemischen Färbung unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an der Retina, Gallenblase und am Ovar von MOR(+/-)- und MOR(-/-)-Mäusen. Die im Folgenden beschriebenen Markierungen wurden ausschließlich in den Wildtyp-Tieren beobachtet. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A, B.** In der Retina waren die Ganglienzellen (➡) der Ganglienzellschicht sowie die Perikaryen und Fortsätze (➤) der inneren Körnerzellschicht gefärbt. **B, C.** Weiterhin stellten sich die Epithelzellen (➡), 10% der Muskelzellen und kleine polymorphe Zellen (➤) der Gallenblase positiv dar. **E, F.** Im Ovar konnte eine Immunreaktivität bei den Primordialfollikeln (➡) sowie den Granulosazellen der Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel (hier nicht sichtbar) gezeigt werden.



Bei allen anderen untersuchten Regionen der Maus (Parotis und andere Speicheldrüsen, Lunge, Thymus, Herz, Leber, Pankreas, Milz, Niere, Harnblase, Uterus, Hoden, Nebenhoden, Samenblase) konnte der Antikörper UMB-3 keine Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren detektieren.

Im Gegensatz zu den Befunden bei der Ratte fiel in vielen dieser peripheren Organe eine leichte (+) Färbung von Epithelzellen auf, die sowohl in den MOR(+/-)- als auch in den MOR(-/-)-Tieren vorkam und somit als unspezifisch aufzufassen war.

### 5.3.3 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen humanen Geweben

Bei der Betrachtung der Ganglien des menschlichen *Darmes* konnte eine schwache (+) bis mäßige (++) intrazelluläre Markierung von über 80% der Zellen festgestellt werden (siehe Abb. 18 A).

Wie schon bei den Befunden der Ratte und der Maus, zeigte sich auch in der menschlichen *Adenohypophyse* bei 10-50% der Zellen eine leichte (+) und bei weniger als 10% eine starke (+++) intrazelluläre MOR-Positivität (siehe Abb. 18 B).

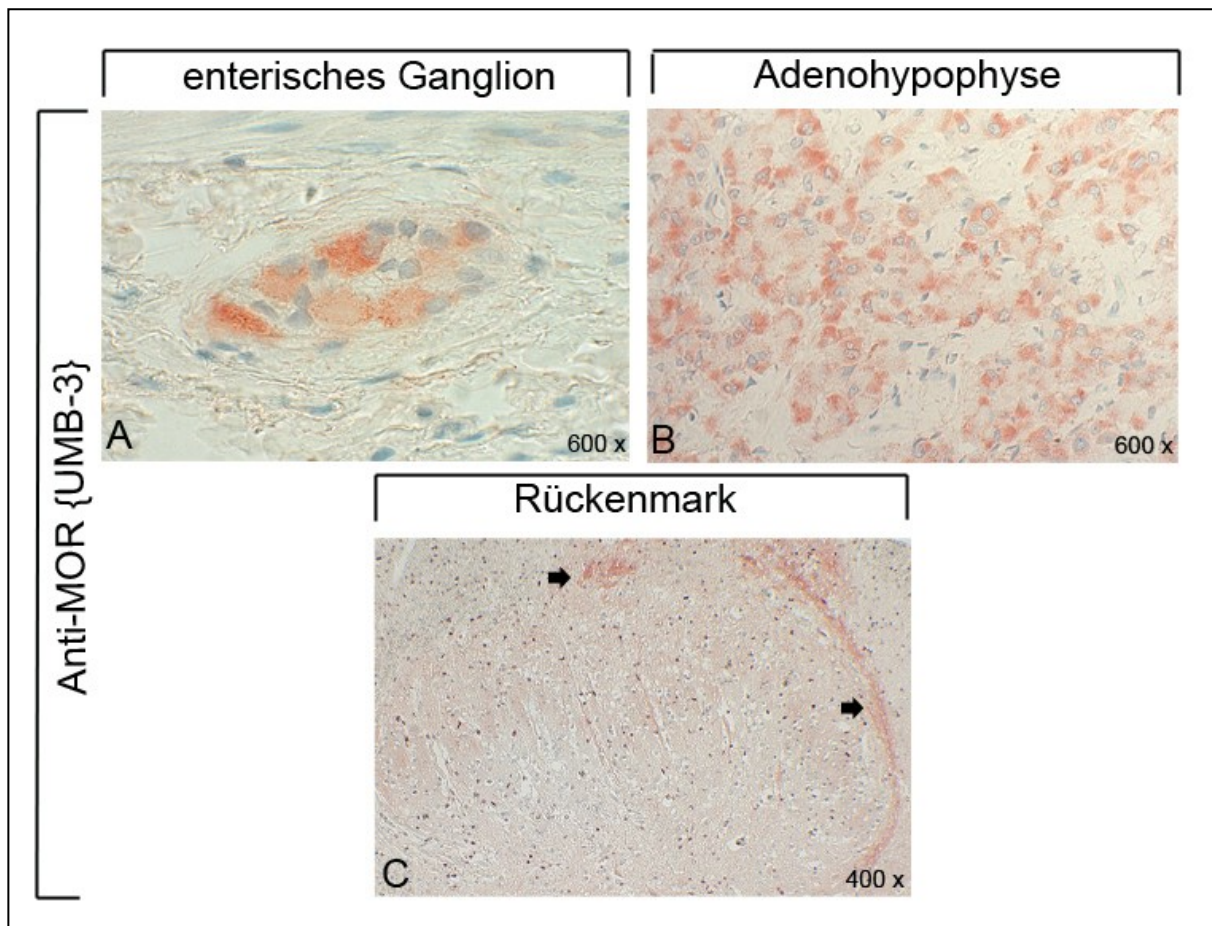
Über 80% der Nervenzellkörper und -fortsätze der Substantia gelatinosa des *Rückenmarks* erschienen mäßig (++) gefärbt (siehe Abb. 18 C).

Die Analyse der *Gallenblase* ergab eine im Vergleich zur Maus deutlich schwächere (+) intrazelluläre Färbung des Epithels.

Die zur Kontrolle durchgeführte Peptidneutralisation zeigte, dass es sich bei den hier beschriebenen Färbungen um spezifische Markierungen handelte.

### 5.3.4 Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen humanen Tumorgeweben

In den immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitten von Glioblastomen, Hypophysenadenomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, duktalem Mammakarzinomen, duktalem Adenokarzinomen des Pankreas, Insulinomen und neuroendokrinen Tumoren der Lunge und des Darmes, klarzelligen Nierenkarzinomen, Phäochromozytomen, Plattenepithelkarzinomen der Cervix uteri sowie von Adenokarzinomen der Prostata konnte der Antikörper UMB-3 keine  $\mu$ -Opioidrezeptorexpression detektieren. Allenfalls zeigte sich, wie auch schon bei den peripheren Organen der Maus, eine unspezifische intrazelluläre Färbung von Epithelzellen.



**Abb. 18:** Darstellung der Immunfärbung mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 an verschiedenen menschlichen Geweben. Gegenfärbung mit Hämatoxylin. Originalvergrößerung am rechten unteren Bildrand. **A.** Die Zellen der enterischen Ganglien zeigten eine schwache (+) bis mäßige (++) Positivität. **B.** Im Bereich des Hypophysenvorderlappens konnte bei 10-50% der Zellen eine geringe (+) und bei weniger als 10% eine kräftige (+++) Markierung festgestellt werden. **C.** In der Substantia gelatinosa (➡) des Rückenmarks waren die Nervenzellkörper und -fortsätze mäßig (++) gefärbt.

## 6. Diskussion

Der neue monoklonale Kaninchen-Antikörper UMB-3 wurde mit dem Ziel entwickelt, einen Antikörper zu Verfügung zu stellen, der für die Immunpräzipitation und den Immunoblot von  $\mu$ -Opioidrezeptoren aus nativem Gewebe und bei immunhistochemischen Färbungen von Paraffinschnitten eingesetzt werden kann. Hierzu erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des UMB-3 mit Hilfe von Western-Blot-Analysen sowie immunzytochemischen und immunhistochemischen Färbungen an unterschiedlichen Geweben und Zellen.

### 6.1 Western-Blot-Analysen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und am Hirngewebe der Maus

Zur Kontrolle der Spezifität des neu entwickelten monoklonalen Antikörpers UMB-3 wurden Western-Blot-Analysen an stabil transfizierten MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen und Wildtyp-HEK-293-Zellen durchgeführt. Der Antikörper wies bei den stabil transfizierten HEK-293-Zellen eine breite Bande im Bereich von 60-80kDa nach. Zudem fiel eine zusätzliche Bande im Bereich von 150-160kDa auf. Bei den Wildtyp-HEK-293-Zellen zeigten sich keine Banden. Ebenso konnten nach der Peptidneutralisation bei den MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen keine Banden mehr detektiert werden.

In der Literatur sind zwei unterschiedliche Arten von MOR-Banden im Rahmen von SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen beschrieben worden. Auf der einen Seite wiesen Forscher breite und diffuse Banden mit hohen relativen Molekulargewichten (MG) zwischen 58-97kDa und auf der anderen Seite scharfe Banden mit geringeren MGs zwischen 40-60kDa nach. Ursächlich hierfür ist der Aufbau des Opioidrezeptors als Glykoprotein (Huang und Liu-Chen 2009). Dieser verfügt über mehrere Glykosylierungsstellen im Bereich seines extrazellulären N-Terminus (Law et al. 2000). Liu-Chen et al. konnten zeigen, dass sich das Molekulargewicht der MORs nach der enzymatischen Entfernung kovalent gebundener Kohlehydratgruppen (Glykane) verändert. So wurden aus breiten und diffusen MOR-Banden, die je nach Spezies und Zelllinie unterschiedlich hohe MGs hatten, scharfe Rezeptorprotein-Banden mit ähnlichen Molekulargewichten (Liu-Chen et al. 1993).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte breite Bande zwischen 60-80kDa passt zum MG glykosylierter  $\mu$ -Opioidrezeptoren und wurde bereits in Untersuchungen anderer Autoren beobachtet. Beispielsweise wiesen Schmidt et al. den MOR zwischen 65-80kDa nach. Zudem fiel schon in dieser Studie eine zusätzliche Bande zwischen 140-160kDa auf, welche

möglicherweise einen  $\mu$ -Opioidrezeptor-Dimer repräsentiert (Schmidt et al. 2000). Einen weiteren Hinweis dafür, dass der Antikörper UMB-3 sein Antigen, den MOR, spezifisch erkennt, liefert der fehlende Nachweis von Banden in den MOR-negativen Wildtyp-HEK-293-Zellen. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen anderer Autoren (Arden et al. 1995, Whistler et al. 1999, Schmidt et al. 2000). Zuletzt spricht auch das Ergebnis der Peptidneutralisation, welche ein etabliertes Verfahren zur weiteren Spezifitätskontrolle von neu entwickelten Antikörpern darstellt (Schulz et al. 2004a, Schulz et al. 2006, Huang und Liu-Chen 2009), für die Spezifität des UMB-3. Hierbei wurde der Antikörper UMB-3 zusammen mit dem MOR-Peptid, welches zuvor zur Generierung des Antikörpers verwendet worden war, inkubiert und folglich blockiert. Dadurch sollte die Bindung des Antikörpers an sein Antigen, den MOR, verhindert werden. Eine spezifische Immunreaktion wäre dementsprechend durch eine Peptidneutralisation aufgehoben worden. Dies war bei der vorliegenden Untersuchung der Fall.

In der Vergangenheit erwies es sich als schwierig, geeignete Antikörper für die Immunpräzipitation und das Immunblotting von endogenen 7-Transmembranrezeptoren, wie dem MOR, zu entwickeln. Ursächlich hierfür sind die geringe Menge der  $\mu$ -Opioidrezeptoren *in vivo* und die bereits erwähnten mannigfaltigen Glykosylierungsvorgänge (Huang und Liu-Chen 2009). Die biochemische Analyse von *in vivo* stattfindenden MOR-Signalkaskaden war dementsprechend erschwert und das Wissen über Proteininteraktionen oder posttranslationale Modifikationen von MOR *in vivo* ist begrenzt.

Um im Rahmen dieser Arbeit zu zeigen, dass der monoklonale Antikörper UMB-3 in der Lage ist, endogene  $\mu$ -Opioidrezeptoren aus nativem Gewebe zu präzipitieren, wurden Western-Blot-Analysen an Hirngewebe der Maus durchgeführt. Hierbei sollten auch mögliche Kreuzreaktionen zwischen dem Antikörper und anderen Proteinen aufgedeckt werden. Der MOR wurde hierzu aus frisch entnommenen und anschließend homogenisierten Gehirnen von MOR(+/+)- und MOR(-/-)-Mäusen isoliert. Den Knockout-Mäusen fehlte das Gen für die Expression des  $\mu$ -Opioidrezeptors, so dass diese eine eindeutige Identifizierung von MOR-spezifischen Banden ermöglichten (Huang und Liu-Chen 2009).

Zum Nachweis der  $\mu$ -Opioidrezeptoren wurde das Meerschweinchen-Anti-MOR-Antiserum {GP6} verwendet, da der Einsatz des UMB-3 für die Immunpräzipitation *und* das Immunblotting zu Interaktionen und damit zur Darstellung unspezifischer Banden (vermutlich durch Kaninchen IgG) geführt hätte (Lupp et al. 2011). Das Anti-MOR-Antiserum {GP6} wies im MOR(+/+)-Hirngewebe eine breite Bande zwischen 70-80kDa nach. Zudem fiel, wie schon bei den MOR-HEK-293-Zellen, eine zusätzliche Bande zwischen 135-150kDa auf. Bei

fehlendem Lysat und bei den MOR(-/-)-Tieren zeigten sich keinerlei Banden. Nach der Peptidneutralisation konnten auch in den MOR-exprimierenden Mäusehirnen keine Rezeptoren mehr nachgewiesen werden.

Die nachgewiesene Bande zwischen 70-80kDa entspricht, wie schon bei den MOR-HEK-293-Zellen, dem Molekulargewicht glykosylierter  $\mu$ -Opioidrezeptoren. Huang und Liu-Chen untersuchten ebenfalls das Hirn von MOR(+/-)- und MOR(-/-)-Mäusen auf endogene  $\mu$ -Opioidrezeptoren. Allerdings waren diese Untersuchungen nur auf bestimmte Regionen (Striatum, Thalamus, frontaler Cortex, Kleinhirn) beschränkt. Zudem fand eine zusätzliche Präparierung der Zellmembranen statt. Für die unterschiedlichen Regionen konnte ein mittleres MG von 58-84kDa beobachtet werden. Die leichten Abweichungen bei den ermittelten MGs beider Arbeiten könnten sowohl auf die Art der Rezeptorisolierung als auch auf verschiedene Untersuchungsmaterialien (Proteinmarker, Puffer, Gelkonzentrationen) zurückzuführen sein (Huang und Liu-Chen 2009). Die zusätzliche Bande zwischen 135-150kDa wird vermutlich, wie schon bei den MOR-HEK-293-Zellen, auf ein  $\mu$ -Opioidrezeptor-Dimer zurückzuführen sein (Schmidt et al. 2000). Das Fehlen der Banden in den MOR-Knockout-Mäusen zeigte ebenfalls, dass es sich hier um einen spezifischen Nachweis handeln musste. Zudem spricht das Verschwinden beider Banden in den MOR(+/-)-Tieren nach der Peptidneutralisation für die Spezifität des Antikörpers UMB-3. Da sich beim Vergleich der MOR(+/-)- und MOR(-/-)-Mäuse keine unspezifischen Banden zeigten, konnte keine Kreuzreaktivität des Antikörpers mit anderen Proteinen festgestellt werden.

## **6.2 Immunzytochemische Färbungen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen**

Zur Darstellung der  $\mu$ -Opioidrezeptoren auf subzellulärer Ebene wurden stabil transfizierte MOR-exprimierende HEK-293-Zellen mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers UMB-3 immunzytochemisch gefärbt. Diese Untersuchung sollte zeigen, ob der Antikörper sein an der Zelloberfläche befindliches Antigen, den MOR, spezifisch erkennt. Zusätzlich wurden MOR-HEK-293-Zellen, welche zuvor mit einem Agonisten (Etonitazen), einem Antagonisten (Naloxon) oder beidem behandelt worden waren, analysiert. An dieser Stelle sollte begutachtet werden, ob und inwiefern sich die Lokalisierung der Rezeptoren in Abhängigkeit von der Interaktion mit verschiedenen Liganden verändert.

Bei der Betrachtung der nativen Zellen zeigte sich eine membranständige Verteilung der  $\mu$ -Opioidrezeptoren. Dies wurde in der Vergangenheit schon durch andere Autoren, die ebenfalls immunzytochemische Untersuchungen an MOR-exprimierenden HEK-293-Zellen durchgeführt hatten, beschrieben (Sternini et al. 1996, Whistler et al. 1999, Pfeiffer et al. 2002).

Nach einer 30-minütigen Stimulation der MOR-HEK-293-Zellen mit dem Agonisten Etonitazen verlagerte sich das Fluoreszenzsignal von der Zelloberfläche ins Zellinnere. Ursächlich hierfür kann eine schnelle, durch den Agonisten induzierte, Internalisierung des Rezeptors gesehen werden. In der Literatur ist beschrieben worden, dass es in Abhängigkeit vom verwendeten Agonisten (z.B. endogene Opioide und Etorphin) zur Endozytose von Opioidrezeptoren kommen kann (Arden et al. 1995, Keith et al. 1998, Arttamangkul et al. 2000). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Analgetikum Etonitazen gehört dabei zu den potentesten Agonisten. Koch et al. konnten bei Untersuchungen an MOR-HEK-293-Zellen zeigen, dass schon geringe Mengen dieses Liganden genügen, um eine maximale Rezeptorinternalisierung auszulösen (Koch et al. 2005).

Die Membranständigkeit der  $\mu$ -Opioidrezeptoren blieb nach der 30-minütigen Inkubation der Zellen mit Naloxon bestehen. Als kompetitiver Antagonist band diese Substanz zwar an den Rezeptor, löste aber typischerweise keine Internalisierung aus (Trescot et al. 2008).

Nach der Behandlung mit dem Agonisten/Antagonisten-Gemisch lag ebenfalls eine membranständige Färbung vor. Eine weitere Eigenschaft von kompetitiven Antagonisten ist die Fähigkeit, einen gleichzeitig anwesenden Agonisten vom Rezeptor zu verdrängen und somit dessen Wirkung aufzuheben. Allerdings geschieht dieser Vorgang abhängig vom jeweiligen Mengenverhältnis und der Affinität der verwendeten Substanzen (Zöllner 2007). Dementsprechend wurde in diesem Fall die Konzentration an Naloxon so gewählt, dass Etonitazen effektiv antagonisiert werden konnte. In der Literatur finden sich zwar vergleichbare Untersuchungen an MOR-HEK-293-Zellen, allerdings sind diese mit Hilfe anderer Agonisten (Etorphin, DAMGO) durchgeführt worden (Keith et al. 1998, Finn und Whistler 2001). Keith et al. zeigten zum Beispiel, dass Naloxon in der Lage ist, die durch den Agonisten Etorphin ausgelöste Rezeptorendozytose vollständig zu blockieren. In dieser Studie wurde zudem eine Durchflusszytometrie an MOR-SF-293-Zellen durchgeführt, um die Internalisierung der MORs in Abhängigkeit von verschiedenen Liganden zu analysieren. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl Etorphin als auch Etonitazen zu den Substanzen gehören, die eine schnelle Internalisierung auslösen. Folglich kann man diese Liganden als vergleichbar ansehen (Keith et al. 1998).

### 6.3 Immunhistochemische Färbungen an verschiedenen Geweben unterschiedlicher Spezies

Durch die Verwendung von polyklonalen Antisera konnte die immunhistochemische Lokalisation des MOR in Gehirnen von Ratten schon in vergangenen Studien umfassend geklärt werden (Arvidsson et al. 1995, Mansour et al. 1995, Schulz et al. 1998). Allerdings beschränkten sich diese Untersuchungen bisher auf Gefrierschnitte, die mittels Perfusion fixiert waren. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun ein immunhistochemisches Protokoll entwickelt werden, welches den Nachweis von MOR in Formalin-fixierten Paraffinschnitten von Nager- und Menschengewebe erlaubt. Standardisierte Protokolle sind bei der Durchführung immunhistochemischer Färbungen von besonderer Bedeutung, da viele verschiedene Faktoren die Reproduzierbarkeit und Qualität der Ergebnisse beeinflussen können (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). So sollte zum Beispiel die Art der Fixierung und Gewebeaufbereitung sowie die Detektionsmethode gleichbleibend sein (Fritschy 2008). Da in der vorliegenden Arbeit mehrere Färbeserien notwendig waren, wurde jeweils eine Positivkontrolle vom Gehirn der Ratte mitgeführt. Diese sollte eventuelle Unterschiede zu vorangegangenen Immunfärbungen aufdecken und die Vergleichbarkeit der Färbungen ermöglichen.

Neben den experimentellen Variablen spielt auch die Analyse der Färbeergebnisse eine entscheidende Rolle für die Qualität und Reproduzierbarkeit. Die Interpretation der Resultate differiert aufgrund subjektiver Beurteilungsmaßstäbe von Betrachter zu Betrachter. Um dies zu umgehen, hat man sich in der Vergangenheit bemüht, standardisierte Bewertungsschemata zu entwickeln. Da trotz dieser semiquantitativen Auswertungen interindividuelle Unterschiede nicht gänzlich ausgeschlossen werden können, werden computergestützte und automatisierte Analysen als mögliche Alternative für die Zukunft diskutiert (Seidal et al. 2001). Um die Auswertung in der vorliegenden Arbeit so objektivierbar wie möglich zu gestalten, wurde eine modifizierte Form des Immunreaktiven Scores (IRS) von Remmele und Stegner angewendet (Thomas 2007). Zudem erfolgte die Bewertung der Ergebnisse durch *einen* Untersucher, um mögliche interindividuelle Unterschiede zu vermeiden.

Zur weiteren Charakterisierung des Antikörpers UMB-3 wurden die immunhistochemischen Färbungen an verschiedenen Organen unterschiedlicher Spezies (Maus, Ratte, Mensch) durchgeführt. Diese wurden dann hinsichtlich des Vorkommens und der Lokalisation von  $\mu$ -Opioidrezeptoren untersucht. Wie schon bei den Western-Blot-Analysen wurden MOR-

Knockout-Mäuse als Negativkontrolle verwendet. Diese sollten eine eindeutige Aussage über die Spezifität der Färbung ermöglichen. Da bei den anderen Spezies (Ratte, Mensch) diese Art der Spezifitätskontrolle nicht möglich war, wurden dort Peptidneutralisationen durchgeführt.

Bei der Betrachtung der immunhistochemisch gefärbten **Gehirne** und **Rückenmarke** von MOR(+/-)-Mäusen und Ratten, nicht jedoch von MOR(-/-)-Mäusen, fiel in verschiedenen Regionen eine deutliche Immunreaktivität von Nervenzellkörpern und -fortsätzen auf. So konnte in den Gehirnen eine Färbung des Striatums, Ncl. accumbens, Hippocampus, Thalamus (dorsomediale, centromediale, lateroposteriore Kerne sowie Corpus geniculatum laterale und mediale), Ncl. tractus solitarii, Ncl. interpeduncularis, Ncl. parabrachialis, Fasciculus retroflexus, der Colliculi superiores und inferiores und der medialen Habenula festgestellt werden. In den Rattenhirnen wurde zusätzlich eine MOR-Expression im Bereich der Amygdala, des Locus coeruleus und des Cortex registriert. Das Rückenmark zeigte in der Substantia gelatinosa des Hinterhorns eine Markierung. Bei der immunhistochemischen Untersuchung der **Hinterwurzelganglien** (Spinalganglien) von Wildtyp-Mäusen fiel eine spezifische Färbung der kleinen und mittelgroßen Nervenzellen auf, wobei deren Intensität mit zunehmender Größe der Neurone schwächer wurde. Da diese Färbungen in den Knockout-Mäusen nicht nachgewiesen werden konnten bzw. nach der Peptidneutralisation der Rattenhirne und -rückenmarke verschwanden, konnte man von einem spezifischen Nachweis des Rezeptors ausgehen. Die Ergebnisse stimmen mit denen anderer Autoren überein. So konnten die  $\mu$ -Opioidbindungsstellen bereits in gleicher Weise in Rezeptorbindungsstudien (Pert und Snyder 1973, Członkowski et al. 1983), Rezeptorautoradiographien (Mansour et al. 1988, Sharif und Hughes 1989), In-situ-Hybridisierungs-Histochemien (Delfs et al. 1994, Arvidsson et al. 1995) und Immunhistochemien mit polyklonalen Antikörpern gegen das C-terminale Ende des Rezeptors (Arvidsson et al. 1995, Mansour et al. 1995, Schulz et al. 1998, Gray et al. 2006) nachgewiesen werden. Die Verteilung des MORs erklärt die bereits beschriebenen charakteristischen Wirkungen der Opiode. Beispielsweise sind die Rezeptoren der Substantia gelatinosa des Rückenmarks für die Hemmung der aufsteigenden Schmerzleitung verantwortlich. Auf der supraspinalen Ebene wird die Weiterleitung des Schmerzes über Opioidbindungsstellen u.a. im Thalamus gehemmt. In Teilen des limbischen Systems (z.B. Amygdala) wird wiederum das Schmerzerleben modifiziert (Klaschik und Clemens 2005). In den Hinterwurzelganglien, in denen sich die Perikaryen der afferenten (sensorischen) Neurone



befinden, werden  $\mu$ -Opioidrezeptoren synthetisiert und dann entlang des Axons sowohl zum zentralen als auch zum peripheren Nervenende transportiert. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der peripher gerichtete axonale Transport von Opioidrezeptoren im Rahmen einer lokalen Entzündung zunimmt. Dadurch steigt schließlich auch die analgetische Wirksamkeit lokal applizierter Opioide (Zöllner und Schäfer 2008). Die hohe Dichte an  $\mu$ -Opioidbindungsstellen im Striatum, welches einen modifizierenden Einfluss auf motorische Impulse hat, wird für die Vermittlung der Muskelsteife (Rigidität) verantwortlich gemacht (Freye 2009). Das Vorkommen in den afferenten Fasern des Nervus vagus und seiner Hirnnervenkerne (Ncl. tractus solitarii) sowie im Locus coeruleus spielt eine entscheidende Rolle bei den Opioid-induzierten autonomen Reaktionen, wie z.B. der Hypotension, der Atemdepression oder der antitussiven Wirkung (Atweh und Kuhar 1983, Freye 2009). Beim Vergleich der immunhistochemischen Färbungen der Hirne und Rückenmarke der Ratten und Mäuse fiel bei den Mäusen eine schwächere Markierung bestimmter Regionen (z.B. Striatum, Hippocampus, Ncl. accumbens, Rückenmark) auf. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung sowie für das Fehlen der Immunreaktivität im Bereich der Amygdala, des Locus coeruleus und des Cortex könnte die unterschiedliche Verteilung der Rezeptorhaupttypen  $\mu$ ,  $\kappa$  und  $\delta$  in beiden Spezies sein. So fanden Mansour et al. beim Vergleich verschiedener Spezies heraus, dass  $\mu$ -Opioidrezeptoren im Gehirn der Ratte mit einem Anteil von 41% deutlich häufiger vorkommen als im Gehirn der Maus (25%) (Mansour et al. 1988).

Zur weiteren Spezifitätskontrolle wurde eine vergleichende immunhistochemische Untersuchung am Rückenmark und Gehirn der Ratte mit Hilfe des *polyklonalen Anti-MOR-Antiserums* {3677} und des *monoklonalen Antikörpers UMB-3* durchgeführt. Das polyklonale Antikörpergemisch wurde während der Splenektomie aus jenem Kaninchen gewonnen, dessen B-Zellen zur Herstellung des monoklonalen Antikörpers UMB-3 dienten. Bei der immunhistochemischen Untersuchung des *Striatums* mit Hilfe des Anti-MOR-Antiserums {3677} zeigte sich zusätzlich zur spezifischen Färbung der „Patches“ eine *unspezifische* Immunreaktivität von Nervenzellen der Matrix mit einer rötlichen Hintergrundfärbung. Im Gegensatz dazu detektierte der UMB-3 ausschließlich die „Patches“. Eine ähnliche Beobachtung konnte bei der vergleichenden Analyse der Färbeergebnisse des *Rückenmarks* gemacht werden. Bei der Verwendung des polyklonalen Antiserums zeigte sich neben der spezifischen Markierung der Substantia gelatinosa eine *unspezifische* Immunreaktion der restlichen Nervenzellen der grauen Substanz mit einer rötlichen

Hintergrundfärbung. Im Gegensatz dazu markierte der monoklonale Antikörper nur die Substantia gelatinosa.

Diese Ergebnisse waren aufgrund der Zusammensetzung des Anti-MOR-Antiserums aus verschiedenen Antikörpern, welche gegen *diverse* Epitope gerichtet sind, zu erwarten. Zu den bekannten Nachteilen bei der Verwendung von polyklonalen Antikörpergemischen gehören Kreuzreaktionen mit anderen ähnlichen Antigenen sowie unspezifische Hintergrundfärbungen. Letztere kommen durch die oftmals fehlende chromatografische Aufreinigung von polyklonalen Antiseren zustande. Die dadurch noch enthaltenen tierischen Serumproteine können mit dem jeweils verwendeten Farbstoff (hier AEC) reagieren und eine unspezifische Hintergrundfärbung verursachen (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Im Gegensatz dazu zeigte sich an dieser Stelle die hohe Spezifität des monoklonalen Antikörpers UMB-3 ohne störenden Hintergrund oder Kreuzreaktivität.

In der *Adenohypophyse* aller drei Spezies (Maus, Ratte, Mensch) fiel eine spezifische Färbung nicht eindeutig identifizierbarer Zellen unterschiedlicher Morphologie auf. Schon seit Ende der 70er Jahre ist der Einfluss von Opioiden auf die Produktion von Hypophysenhormonen bekannt. So kann die Aktivierung des  $\mu$ -Opioidrezeptors auf der einen Seite zur Stimulation der Prolactin- und Wachstumshormonsekretion und auf der anderen Seite zur Hemmung der LH (Luteinisierendes Hormon)-Sekretion führen. Ursprünglich ging man hierbei lediglich von einer indirekten Wirkung über die Freisetzung von Hormonen des Hypothalamus (GnRH, Dopamin, Somatostatin) aus (Bruni et al. 1977, Taché et al. 1977, Gudelsky und Porter 1980, Wilkes und Yen 1981, Leong et al. 1983, McCann et al. 1984, Carretero et al. 1991). Anfang der 80er Jahre gelang dann erstmals der autoradiographische Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Hypophyse von Affen (Atweh und Kuhar 1983). Mittlerweile existieren einige Hinweise darauf, dass Opioide über hypophysäre Bindungsstellen einen direkten Einfluss auf die Hormonsekretion nehmen können (Carretero et al. 2004). Die in dieser Arbeit festgestellte MOR-Expression im Vorderlappen der Hirnanhangsdrüse der *Ratte* passt zu den Ergebnissen anderer Autoren. So wiesen Carretero et al. bei immunhistochemischen Untersuchungen an *Rattenhypophysen* ebenfalls  $\mu$ -Opioidrezeptoren in morphologisch unterschiedlichen Zellen des Vorderlappens nach (Carretero et al. 2004). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen von Autoradiographien an *menschlichen* Adenohypophysen keine MOR-Expression festgestellt werden (Jordan et al. 1996). Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der Autoradiographien und der vorliegenden Immunhistochemie könnte auf methodenspezifische Unterschiede

zurückzuführen sein. So ist z.B. der Nachweis niedrig-affiner Rezeptoren eher immunologisch als autoradiographisch möglich (Hiller et al. 1994). Da zur Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Hypophyse der *Maus* bisher keine Daten vorliegen, ist an dieser Stelle von einer Erstbeschreibung des dortigen Vorkommens auszugehen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der in dieser Arbeit erfolgte Nachweis einer MOR-Expression *in allen drei Spezies* als weiterer Anhaltspunkt für eine direkte Wirkung von Opioiden auf die Hormonsekretion der Hypophyse gesehen werden kann.

Bei der Untersuchung der immunhistochemischen Färbung der **Retina** von Ratten und MOR(+/-)-Mäusen fiel eine Markierung von Ganglienzellen der Ganglienzellschicht und von Zellkörpern und -fasern des äußeren Viertels der inneren Körnerzellschicht auf. Bei der Retina der Ratte waren zudem die Fortsätze der inneren plexiformen Schicht gefärbt. Wamsley et al. gelang bereits Anfang der 80er Jahre der autoradiographische Nachweis von Opioidrezeptoren in der Ganglienzellschicht und der inneren plexiformen Schicht der Retina der Ratte. Ein Vorkommen in den äußeren Zellschichten der inneren Körnerzellschicht wurde damals nicht beschrieben (Wamsley et al. 1981). Eine immunhistochemische Untersuchung an der Retina der Ratte mit Hilfe eines  $\mu$ -selektiven Primärantikörpers und eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers ergab wiederum eine ausschließliche MOR-Expression in der Ganglienzellschicht (Husain et al. 2009). Vermutlich sind diese zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse methodisch bedingt. So ist die in der vorliegenden Arbeit verwendete ABC-Methode von höherer Sensitivität als die Autoradiographie und die Immunfluoreszenz (Remmele 1999). Wahrscheinlich ist deshalb der Nachweis von, selbst in dieser Arbeit nur schwach bis mäßig markierten,  $\mu$ -Opioidrezeptoren in der inneren plexiformen Schicht und der inneren Körnerzellschicht in den vorangegangenen Arbeiten nicht oder nur zum Teil gelungen. Zum Vorkommen von MOR in der Retina der Spezies *Maus* liegen bisher keine Untersuchungen vor. Da die Detektion von MOR ausschließlich in den MOR(+/-)-Tieren gelang, handelt es sich um einen spezifischen Nachweis. Die im Vergleich zur Ratte stärkere Färbung der Ganglienzellschicht und der inneren Körnerzellschicht sowie die fehlende Markierung von Fortsätzen der inneren plexiformen Schicht könnten auf Speziesunterschiede zurückzuführen sein.

In den Präparaten der **Speicheldrüsen** beider Spezies konnten keine  $\mu$ -Opioidrezeptoren nachgewiesen werden. In der Literatur finden sich hierzu allerdings keine Untersuchungen zur vergleichenden Beurteilung.

In den *Lungen* der Ratten und Mäuse konnte mit Hilfe der immunhistochemischen Färbung keine spezifische Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren festgestellt werden. Eine Rezeptorbindungsstudie am Lungengewebe von Ratten kam zu dem Ergebnis, dass hauptsächlich  $\delta$ - und  $\kappa$ - und nur wenige  $\mu$ -Opioidrezeptoren exprimiert werden (Bhargava et al. 1997). Es existieren jedoch Hinweise darauf, dass diese  $\mu$ -Opioidbindungsstellen nicht dem klassischen MOR des Gehirns entsprechen (Cabot et al. 1994, Cabot et al. 1996). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass in der vorliegenden Arbeit keine  $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Lunge der Ratte nachgewiesen werden konnten. Zum Vorkommen von MOR in der Spezies Maus existieren nach meinem Kenntnisstand keine vergleichbaren Untersuchungen.

In den immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitten des *Thymus* und der *Milz* von Ratten und Mäusen konnte kein Vorkommen von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen festgestellt werden. Schon seit längerem ist bekannt, dass Opioide in der Lage sind, einen Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen (Bidlack 2000). Die immunmodulatorische Wirkung wird hierbei u.a. über eine Interaktion mit Opioidrezeptoren, welche sich auf unterschiedlichen Populationen von Immunzellen befinden, vermittelt (McCarthy et al. 2001). Chuang et al. wiesen in einer Genexpressionsanalyse an *menschlichen* Immunzellen  $\mu$ -Opioidrezeptor-mRNA in T- und B-Zelllinien, CD4-positiven T-Zellen, Monozyten, Makrophagen und Granulozyten nach (Chuang et al. 1995). Aufgrund deutlicher Unterschiede zwischen der Immunologie von Nagetieren und Menschen kann jedoch nicht automatisch von einer gleichartigen Expression ausgegangen werden (Bidlack et al. 2006). Mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien, Genexpressionsanalysen und immunzytochemischen Untersuchungen an murinen Thymozyten und Splenozyten konnten in der Vergangenheit insbesondere  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (Sharp 2006). Im Gegensatz dazu findet sich zum Vorkommen von MOR in den Immunzellen von Ratten und Mäusen nur wenig Literatur. Bei einer Genexpressionsanalyse an der Milz von Ratten konnten  $\mu$ -Opioidrezeptor-Transkripte detektiert werden (Wittert et al. 1996). In mehreren Studien zeigte sich jedoch, dass eine RNA- nicht mit einer Protein-Expression gleichgesetzt werden kann (Anderson und Seilhammer 1997, Gygi et al. 1999). Hierfür werden Veränderungen der Proteine nach der Transkription und Translation, wie sie beispielsweise durch Splicing entstehen, verantwortlich gemacht (Brendel 2009). Bindungsstudien an murinen Lymphozyten führten zudem zu der Vermutung, dass Morphin an Rezeptoren bindet, die nicht dem klassischen MOR des Gehirns entsprechen (Bidlack 2000). Diese Beobachtung könnte ein

Grund für den fehlenden Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in den Lymphozyten des Thymus und der Milz der vorliegenden Arbeit sein.

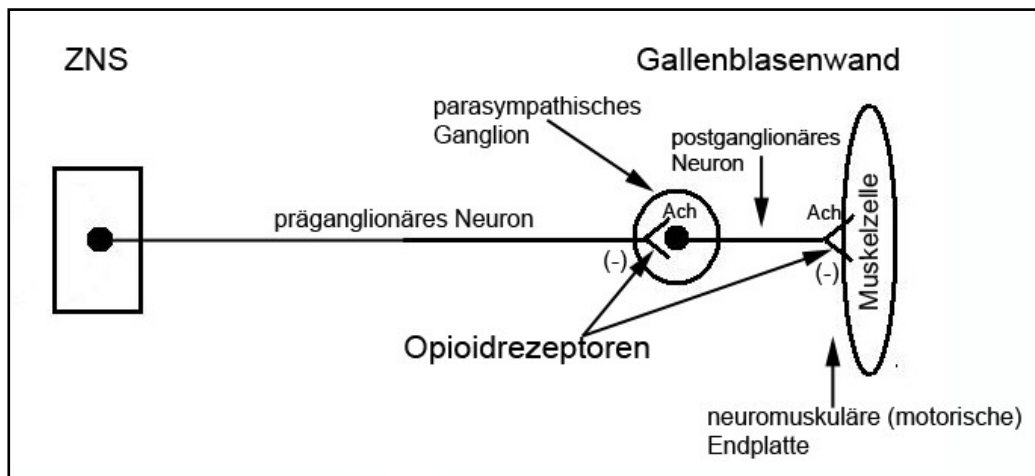
In der immunhistochemisch gefärbten **Herzmuskulatur** der Ratten und Mäuse zeigte sich keine  $\mu$ -Opioidrezeptor-Expression. Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein. So konnten sowohl in einer Genexpressionsanalyse (Wittert et al. 1996) als auch in einer Rezeptorbindungsstudie (Zimlichman et al. 1996) an Rattenherzen ausschließlich  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren nachgewiesen werden. Auf der anderen Seite gelang in einer Positronen-Emissions-Tomographie (PET) des menschlichen Herzens mit Hilfe von MOR-selektiven Radiotracern der Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptoren (Villemagne et al. 2002). Vermutlich handelt es sich hierbei um speziesspezifische Unterschiede bei der kardialen MOR-Expression.

Ein spezifischer Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptoren gelang in den Ganglienzellen der enterischen Plexus des **Darmes** und des **Magens** von Wildtyp-Mäusen, Ratten und Menschen (nur Darm untersucht). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren überein und liefert eine Erklärung für die bekannten opioidinduzierten Effekte auf den Gastrointestinaltrakt, wie z.B. die Hemmung der Motilität (Holzer 2009). So gelang bereits in der Vergangenheit der immunhistochemische Nachweis von MOR in den myenterischen und submucösen Plexus der Ratte (Bagnol et al. 1997) und des Menschen (Sternini et al. 2004). Zur immunhistochemischen Lokalisation von MOR im Magen-Darm-Trakt der Maus liegen bisher keine Untersuchungen zum Vergleich vor. Die sowohl in den Ratten als auch in den Mäusen registrierte *unspezifische* starke Markierung der Becherzellen ist vermutlich methodisch bedingt. So ist bereits an anderer Stelle beschrieben worden, dass der Avidin-Biotin-Komplex zu einer unspezifischen Färbung des Becherzellenschleimes führen kann (Nyhlin et al. 1997).

Die immunhistochemische Färbung der **Leber** von Ratten und Mäusen ergab keine spezifische Expression von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen. In einer Genexpressionsanalyse am hepatischen Gewebe von Ratten gelang der Nachweis von MOR-Transkripten (Wittert et al. 1996). Allerdings konnten auch in einer anderen immunhistochemischen Untersuchung an Rattenlebern keine  $\mu$ -Opioidrezeptoren nachgewiesen werden (De Minicis et al. 2008). Dies führt zu der Vermutung, dass die Genexpressionsebene nicht mit der Proteinebene übereinstimmt (Anderson und Seilhammer 1997, Gygi et al. 1999). Bei Untersuchungen an

der Leber der Spezies Maus wurden unterschiedliche Beobachtungen gemacht. Während einer Forschungsgruppe der Nachweis von MOR-Transkripten gelang (Chakass et al. 2007), konnte eine andere keine derartige Expression registrieren (Jaume et al. 2004). Nach meinem Wissen existieren in der Literatur keine vergleichbaren immunhistochemischen Untersuchungen an der Leber von Mäusen.

In der **Gallenblase** von MOR(+/-)-Mäusen konnte eine starke spezifische Färbung der Epithelzellen beobachtet werden. Zudem zeigte sich eine schwache Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in weniger als 10% der Muskelzellen. Vereinzelt fielen mäßig gefärbte kleine und polymorphe Zellen auf. In der Literatur finden sich bisher vor allem Untersuchungen zur opioidinduzierten Hemmung der Relaxation des Sphincter Oddi (Wood und Galligan 2004). Dieser Schließmuskel befindet sich im Bereich des gemeinsamen Ausführungsganges des Ductus choledochus und des Ductus pancreaticus in das Duodenum und reguliert den Transport von Galle- und Pankreassekret (Waldeyer 2003). Bei der Verabreichung von Morphin und anderen Opioidpeptiden konnte allerdings auch eine Abnahme der Motilität der Gallenblase beobachtet werden (Wood und Galligan 2004). Guarraci et al. wiesen in ihrer immunhistochemischen Studie mit einem Antiserum gegen das N-terminale Ende des MOR sowohl in den Ganglien als auch in interganglionären Nervenfasern der Gallenblasenwand von Meerschweinchen  $\mu$ -Opioidrezeptoren nach. Zudem führte diese Arbeitsgruppe elektrophysiologische Untersuchungen an Neuronen, glatten Muskelzellen, Ganglien und neuromuskulären Junctionen der Gallenblase mit Hilfe von Opioidrezeptor-Agonisten durch. Aus den Resultaten konnte geschlussfolgert werden, dass die Stimulation von Opioidbindungsstellen an den Endigungen präganglionärer und postganglionärer Neurone des Parasympathikus zur Hemmung der Acetylcholinfreisetzung und damit zur Abnahme der Gallenblasenkontraktilität führt (siehe Abb. 19) (Guarraci et al. 2002, Wood und Galligan 2004). Bei den in der vorliegenden Arbeit gezeigten MOR-positiven polymorphen Zellen könnte es sich durchaus auch um Ganglienzellen der Gallenblase mit den dort befindlichen  $\mu$ -Opioidrezeptoren handeln. Dafür sprechen die Lokalisation der Zellen zwischen der Serosa und der darunterliegenden Muskelschicht sowie deren irreguläres Aussehen (Mawe et al. 1997). Die Färbung im Bereich der Muskelzellen könnte wiederum auf Rezeptoren der postganglionären Nervenendigungen zurückzuführen sein, da eine lichtmikroskopische Differenzierung zwischen der präsynaptischen Endigung und der postsynaptischen Membran der Muskelfaser nicht möglich war.



**Abb. 19:** Vereinfachte schematische Darstellung der Lokalisation von  $\mu$ -Opioidrezeptoren entlang der neuromuskulären Achse der Gallenblase von Meerschweinchen. Die Opioidbindungsstellen befinden sich an den Endigungen der prä- und postganglionären Neurone des Parasympathikus. Eine Stimulation dieser Rezeptoren führt zur verminderten Freisetzung des exzitatorischen Neurotransmitters Acetylcholin. Die Folge ist eine Abnahme der Motilität der Gallenblasenwand (Guarraci et al. 2002, Schünke et al. 2009).

Ein Vorkommen von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in den Epithelzellen der Gallenblasenwand wurde nach meinen Erkenntnissen bisher nicht beschrieben. Da es sich um eine stark positive Markierung handelte, welche ausschließlich in den MOR(+/-)-Mäusen vorkam, konnte man von einem spezifischen Nachweis ausgehen. In der Gallenblase erfolgt die Eindickung der von der Leber produzierten Galle. Hierzu resorbieren die Epithelzellen Ionen, denen dann das Wasser aufgrund ihrer osmotischen Wirksamkeit folgt (Junqueira und Carneiro 2004). In einer Untersuchung von Jivegard et al. konnte gezeigt werden, dass die Verabreichung von Morphin im Rahmen einer experimentellen Cholezystitis zur Reduktion der entzündungsbedingten Flüssigkeitssekretion führt (Jivegård et al. 1985). Das Antidiarrhoikum Loperamid soll wiederum einen hemmenden Einfluss auf die epitheliale Bikarbonat-Sekretion in der Gallenblase des Meerschweinchens haben. Da sich dieser Effekt nicht durch Naloxon antagonisieren ließ, ist jedoch von einer Opioidrezeptor-unabhängigen Wirkung auszugehen (Wehner et al. 1990). Welche Rolle die in dieser Arbeit nachgewiesenen  $\mu$ -Opioidbindungsstellen für die Gallenblase im Allgemeinen sowie für deren Flüssigkeitssekretion im Speziellen spielen, sollte aufgrund der unzureichenden Studienlage Gegenstand weitergehender Untersuchungen werden.

Bei der Analyse der immunhistochemischen Färbung der *Bauchspeicheldrüsen* von Ratten und Mäusen zeigte sich keine MOR-Expression. Zu vergleichbaren Ergebnissen kamen auch andere Autoren. In einer Rezeptorbindungsstudie an isolierten Inselzellmembranen von Ratten konnten nur  $\delta$ - und  $\kappa$ -Opioidbindungsstellen nachgewiesen werden (Khawaja et al.

1990). Zudem zeigte sich bei Untersuchungen zur opioidinduzierten Hemmung der exokrinen Pankreassekretion von Meerschweinchen eine Beteiligung des  $\delta$ -, nicht jedoch des  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioidsystems (Linari et al. 2006).

Die immunhistochemische Untersuchung der *Nieren* von Ratten und Mäusen ergab keine spezifische Expression von  $\mu$ -Opioidrezeptoren. In den Nieren der Wildtyp- und Knockout-Mäuse fiel jedoch eine *unspezifische* Färbung der Epithelzellen der Nierenrinde und der Außenzonen des Nierenmarks auf. In der Literatur finden sich widersprüchliche Ergebnisse zur renalen MOR-Expression. Bei einer autoradiographischen Untersuchung am Nierengewebe von Ratten konnten keine  $\mu$ -Opioidbindungsstellen nachgewiesen werden (Dissanayake et al. 1991). Auf der anderen Seite ergaben Genexpressionsanalysen an Ratten und Mäusen ein Vorkommen von MOR in den Nieren (Wittert et al. 1996, Weber et al. 2008). Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte unspezifische Färbung in den Nieren der Mäuse ist vermutlich auf eine Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers UMB-3 zurückzuführen. Dieser scheint demnach in der Niere an ein Antigen zu binden, dessen Epitop der eigentlichen Zielstruktur sehr ähnlich ist (Noll und Schaub-Kuhnen 2000). Über die Ursachen für den fehlenden immunhistochemischen Nachweis von MOR bei positiven Genexpressionsanalysen kann nur spekuliert werden. Zum einen könnte die Kreuzreaktivität die Beurteilung einer spezifischen Färbung beeinträchtigt haben. Auf der anderen Seite geht der Nachweis von  $\mu$ -Opioidrezeptor-Transkripten nicht zwangsläufig mit einer MOR-Expression auf der Proteinebene einher (siehe Diskussion Milz/Thymus) (Anderson und Seilhammer 1997, Gygi et al. 1999).

Eine schwache  $\mu$ -Opioidrezeptor-Expression konnte in den Ganglienzellen des *Nebennierenmarks* von Ratten, nicht jedoch von Mäusen, festgestellt werden. Bei den Wildtyp- und Knockout-Mäusen zeigte sich allerdings eine *unspezifische* Färbung der Nebennierenrinde und damit eine Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers UMB-3. Bei früheren autoradiographischen Untersuchungen an den Nebennieren von Ratten konnten keine  $\mu$ -Opioidbindungsstellen detektiert werden (Quirion et al. 1983, Bunn et al. 1988). In einer Genexpressionsanalyse an Ratten konnte hingegen ein Vorkommen von MOR beobachtet werden (Wittert et al. 1996). Da niedrig-affine Rezeptoren eher immunologisch als autoradiographisch nachgewiesen werden können, ist die Ursache für die differierenden Ergebnisse vermutlich auf methodenspezifische Unterschiede zurückzuführen (Hiller et al. 1994). Zum Vorkommen von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in der Spezies Maus liegen nach meinem



Wissen keine Untersuchungen zur vergleichenden Beurteilung vor. Der fehlende Nachweis von MOR in den Ganglienzellen des Nebennierenmarks der Mäuse könnte jedoch auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen sein.

Die immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte der *Harnblasen* beider Spezies waren frei von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen. Bei der Schmerztherapie mit Opioiden können passagere Blasenentleerungsstörungen auftreten, welche jedoch größtenteils über spinale und supraspinale  $\mu$ -Opioidrezeptoren ausgelöst werden (de Groat und Yoshimura 2001, Klaschik und Clemens 2005). Es gibt einige Hinweise darauf, dass auch periphere Mechanismen eine Rolle bei der Vermittlung der Harnblasendysfunktion spielen (Mercadante et al. 2011). In einer Studie von Craft et al. an Harnblasen von Ratten, bei der lokal  $\mu$ -,  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioidrezeptor-Agonisten verabreicht wurden, konnte jedoch nur für die  $\delta$ -Agonisten ein peripherer Effekt nachgewiesen werden (Craft et al. 1995).

Bei der immunhistochemischen Untersuchung des *Ovars* von MOR(+/-)-Mäusen zeigte sich eine kräftige Färbung der Primordialfollikel sowie eine mäßige Markierung der Granulosazellen der Primär-, Sekundär- und Tertiärfollikel. Diese Immunfärbungen konnten in den Knockout-Mäusen nicht nachgewiesen werden und waren somit als spezifisch einzuordnen. Mit Hilfe von Genexpressionsanalysen konnte bereits in vergangenen Studien gezeigt werden, dass der  $\mu$ -Opioidrezeptor in den Oozyten, Cumuluszellen und Granulosazellen von Rindern, Menschen, Kaninchen, Pferden und Hunden vorkommt (Dell'Aquila et al. 2002, Dell'Aquila et al. 2003, Dalbiès-Tran und Mermillod 2003, Dell'Aquila et al. 2008, Pavone et al. 2008, Iorga et al. 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmalig ein gleichartiges Vorkommen in der Spezies Maus beschrieben. Opioide beeinflussen das reproduktive System hauptsächlich über eine Modulation der GnRH- und LH-Sekretion. In den letzten Jahren konnte jedoch auch eine direkte Beteiligung an der ovariellen Funktion gezeigt werden. So geht man mittlerweile davon aus, dass die endogenen Opioidpeptide über die  $\mu$ -Opioidrezeptoren der Follikel einen hemmenden Einfluss auf die meiotische Reifung der Oocyten auslösen können (Dell'Aquila et al. 2008).

Bei der Analyse der immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte der nicht schwangeren *Uteri* von Mäusen konnte keine MOR-Expression registriert werden. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Zhu und Pintar mit Hilfe der In-Situ-Hybridisierungs-Technik. Demnach werden im Uterus erst *nach* der Implantation einer befruchteten Eizelle  $\mu$ -Opioidrezeptoren

exprimiert. Es wird vermutet, dass die Opioidbindungsstellen und deren Liganden eine Rolle bei der Adaptation des mütterlichen Organismus an die Schwangerschaft sowie beim embryonalen und fetalen Wachstum spielen (Zhu und Pintar 1998).

Bei der immunhistochemischen Färbung der *Hoden, Nebenhoden und Samenblasen* der Ratten und Mäuse konnte keine spezifische Markierung beobachtet werden. Zum Vorkommen von Opioidrezeptoren in diesen Abschnitten des männlichen reproduktiven Systems liegen bisher nur wenige Untersuchungen vor. Im Rahmen einer Opioidrezeptor-Genexpressionsanalyse gelang der Nachweis von MOR im Hoden von Ratten (Wittert et al. 1996). Vor wenigen Jahren wurde dann mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen erstmals ein Vorkommen von  $\mu$ -Opioidrezeptoren in den Spermien von Fischen, Pferden und Menschen gezeigt (Agirregoitia et al. 2006, Albrizio et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit war eine verlässliche Beurteilung der Färbung der Spermien aufgrund von Verklumpungen nicht möglich. Da im restlichen Testikelgewebe keine  $\mu$ -Opioidrezeptoren nachgewiesen werden konnten, ist der MOR-Nachweis in der Genexpressionsanalyse wohl nur auf im Hoden befindliche Spermien zurückzuführen. Zum Vorkommen von Opioidrezeptoren im Nebenhoden und in den Samenblasen findet sich nach meinem Kenntnisstand keine Literatur.

Im Gegensatz zu den immunhistochemischen Färbungen an den peripheren Organen der Ratte, fiel bei den Mäusen und humanen Geweben eine unspezifische Färbung von Epithelzellen auf. In der Literatur findet sich diesbezüglich keine hinreichende Erklärung. Vermutlich ist diese Beobachtung auf speziesspezifische Unterschiede zurückzuführen.

#### **6.4. Immunhistochemische Färbungen an verschiedenen Tumorgeweben des Menschen**

In der Vergangenheit konnten sowohl endogene Opioide als auch deren Bindungsstellen in unterschiedlichen menschlichen Neoplasien und Tumorzelllinien identifiziert werden. In einem Großteil der Studien zeigte sich, dass Opioidpeptide einen hemmenden Einfluss auf das Wachstum von Tumorzellen haben. Von einigen Autoren wurde allerdings auch eine Stimulation der Tumorentwicklung beschrieben (Fichna und Janecka 2004). Die molekularen Mechanismen dieser Effekte scheinen sehr komplex zu sein und über eine alleinige Vermittlung durch Opioidrezeptoren hinaus zu gehen (Tegeger und Geisslinger 2004).

Das Vorkommen von Opioidbindungsstellen in humanen Tumoren wurde bisher in erster Linie mit Hilfe von Rezeptorbindungsstudien untersucht (Maneckjee et al. 1990, Thomas et al. 1990, Hatzoglou et al. 1996, Kampa et al. 1997, Kampa et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit sollte nun erstmalig eine immunhistochemische Analyse der MOR-Expression an Paraffinschnitten von ausgewählten menschlichen Tumoren durchgeführt werden.

Die immunhistochemische Analyse von insgesamt acht **Glioblastomen** zeigte keine Expression von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen. In einer Rezeptorbindungsstudie an menschlichen Hirntumoren zeigte sich ebenfalls, dass in Glioblastomen ausschließlich  $\kappa$ - und keine  $\mu$ -Opioidrezeptoren vorkommen (Thomas et al. 1990).

Bei der immunhistochemischen Färbung der menschlichen duktaalen **Mammakarzinome** konnte in den 17 untersuchten Fällen keine MOR-Expression registriert werden. In einer Rezeptorbindungsstudie an T47D-Mammakarzinom-Zellen wurden ebenfalls keine  $\mu$ -, sondern nur  $\kappa$ - und  $\delta$ -Opioidbindungsstellen nachgewiesen (Hatzoglou et al. 1996). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Untersuchungen an der MCF7-Mammakarzinom-Zelllinie ein Vorkommen von  $\mu$ - und  $\kappa$ -Opioidrezeptoren (Maneckjee et al. 1990). Diese voneinander abweichenden Ergebnisse sind vermutlich durch unterschiedliche biologische Charakteristika der Zelllinien oder aber durch methodische Unterschiede der Rezeptorbindungsstudien bedingt (Hatzoglou et al. 1996). Eine Studie von Zagon et al. an primären menschlichen Adenokarzinomen der Brust zeigte wiederum nur in einem Fall ein Vorkommen von MOR (Zagon et al. 1987). Das Ergebnis der vorliegenden Arbeit spricht ebenfalls dafür, dass  $\mu$ -Opioidrezeptoren nicht in allen Mammakarzinomen exprimiert werden.

Die immunhistochemisch gefärbten Paraffinschnitte von insgesamt acht humanen **Phäochromozytomen**, bei denen es sich um katecholaminproduzierende Tumoren des Nebennierenmarks oder der Paraganglien handelt (Reisch et al. 2009), waren frei von  $\mu$ -Opioidrezeptoren. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits in einer Studie zum Vorkommen der jeweiligen Opioidrezeptor-Subtypen in menschlichen Phäochromozytomen gemacht werden. Hierbei zeigte sich eine hohe Bindungskapazität für  $\kappa$ -Agonisten, wohingegen ein Vorkommen von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen sehr gering bzw. in 6 von 14 Fällen gar nicht feststellbar war (Kampa et al. 1999).

Bei der immunhistochemischen Analyse von Adenokarzinomen der menschlichen *Prostata* zeigte sich in allen sechs Fällen kein spezifisches Vorkommen von  $\mu$ -Opioidbindungsstellen. Bei der Untersuchung fiel jedoch eine mäßige Färbung der Tumorzellen auf, welche auch noch nach der Peptidneutralisation bestand und dementsprechend als Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers UMB-3 gewertet werden musste. In einer Bindungsstudie an drei humanen Prostatakarzinom-Zelllinien (LNCaP, PC3 und DU145), welche sich u.a. im Differenzierungsgrad und Hormonrezeptorstatus unterschieden, wurde das Vorkommen der Opioidrezeptor-Subtypen untersucht. Hierbei konnte der MOR bei den DU145- und PC3-Zellen in geringer Konzentration sowie bei den LNCaP-Zellen gar nicht detektiert werden (Kampa et al. 1997). Inwiefern die einzelnen Zelllinien mit den Adenokarzinomen der Prostata der vorliegenden Arbeit vergleichbar sind, bleibt fraglich. Ebenso muss beachtet werden, dass die Kreuzreaktivität des Antikörpers die Beurteilung einer spezifischen Färbung beeinträchtigt haben könnte.

Bei der immunhistochemischen Untersuchung von *Hypophysenadenomen, medullären Schilddrüsenkarzinomen, Pankreaskarzinomen, Insulinomen, neuroendokrinen Tumoren der Lunge und des Darmes, klarzelliger Nierenkarzinomen und Cervixkarzinomen* konnten keine  $\mu$ -Opioidbindungsstellen detektiert werden. Zum Vorkommen von Opioidrezeptoren in diesen Tumoren liegen jedoch keine Untersuchungen zur vergleichenden Beurteilung vor. Insgesamt lässt sich festhalten, dass der MOR in menschlichen Tumorgewebe wohl eher eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint, so dass eine Diagnostik hinsichtlich seines Vorkommens mittels UMB-3 hier wenig sinnvoll erscheint.

## 7. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine ausführliche Charakterisierung des neu entwickelten monoklonalen Kaninchen-Antikörpers UMB-3, welcher gegen das C-terminale Ende des  $\mu$ -Opioidrezeptors der Ratte, der Maus und des Menschen gerichtet ist.

In Bezug auf die Ziele der Arbeit ergeben sich folgende Schlussfolgerungen:

- 1) Der monoklonale Antikörper UMB-3 weist sein Antigen, den  $\mu$ -Opioidrezeptor, mit einer hohen Spezifität nach.
- 2) Darüberhinaus ist der monoklonale Antikörper UMB-3 in der Lage, den  $\mu$ -Opioidrezeptor aus nativen Gewebehomogenaten zu präzipitieren und per Immunoblot nachzuweisen.
- 3) Mit Hilfe des Anti-MOR-Antikörpers UMB-3 ist es möglich,  $\mu$ -Opioidrezeptoren in formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Geweben von Mäusen, Ratten und Menschen nachzuweisen. Dadurch kann eine, im Vergleich zu Gefrierschnitten, bessere Zuordnung der immunhistochemischen Färbung zu Gewebestrukturen erreicht werden.

Diese Fähigkeiten könnten in der Zukunft die Erforschung von in vivo stattfindenden MOR-Signalwegen und ihrer Regulation erleichtern.

## 8. Literaturverzeichnis

- Agirregoitia E, Valdivia A, Carracedo A, Casis L, Gil J, Subiran N, Ochoa C, Irazusta J. 2006. Expression and localization of delta-, kappa-, and mu-opioid receptors in human spermatozoa and implications for sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab*, 91(12):4969-4975.
- Albrizio M, Guaricci AC, Calamita G, Zarrilli A, Minoia P. 2006. Expression and immunolocalization of the mu-opioid receptor in human sperm cells. *Fertil Steril*, 86(6):1776-1779.
- Anderson L, Seilhamer J. 1997. A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis*, 18(3-4):533-537.
- Arden JR, Segredo V, Wang Z, Lamah J, Sadée W. 1995. Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells. *J Neurochem*, 65(4):1636-1645.
- Arttamangkul S, Alvarez-Maubecin V, Thomas G, Williams JT, Grandy DK. 2000. Binding and internalization of fluorescent opioid peptide conjugates in living cells. *Mol Pharmacol*, 58(6):1570-1580.
- Arvidsson U, Riedl M, Chakrabarti S, Lee JH, Nakano AH, Dado RJ, Loh HH, Law PY, Wessendorf MW, Elde R. 1995. Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord. *J Neurosci*, 15(15 Pt 1):3328-3341.
- Atweh SF, Kuhar MJ. 1983. Distribution and physiological significance of opioid receptors in the brain. *Br Med Bull*, 39(1):47-52.
- Bagnol D, Mansour A, Akil H, Watson SJ. 1997. Cellular localization and distribution of the cloned mu and kappa opioid receptors in rat gastrointestinal tract. *Neuroscience*, 81(2):579-591.
- Bhargava HN, Villar VM, Cortijo J, Morcillo EJ. 1997. Binding of [3H][D-Ala<sup>2</sup>, MePhe<sup>4</sup>, Gly-ol<sup>5</sup>] enkephalin, [3H][D-Pen<sup>2</sup>, D-Pen<sup>5</sup>]enkephalin, and [3H]U-69,593 to airway and pulmonary tissues of normal and sensitized rats. *Peptides*, 18(10):1603-1608.
- Bidlack JM. 2000. Detection and function of opioid receptors on cells from the immune system. *Clin Diagn Lab Immunol*, 7(5):719-723.

- Bidlack JM, Khimich M, Parkhill AL, Sumagin S, Sun B, Tipton CM. 2006. Opioid receptors and signaling on cells from the immune system. *J Neuroimmune Pharmacol*, 1(3):260-269.
- Brendel M. 2009. Etablierung einer cDNA-Microarray-Technologie zur Genexpressionsanalyse bei akuter und chronischer allogener Lungenschädigung nach Lungentransplantation [Dissertation]. München: Ludwig-Maximilians-Universität.
- Bruni JF, Van Vugt D, Marshall S, Meites J. 1977. Effects of naloxone, morphine and methionine enkephalin on serum prolactin, luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, thyroid stimulating hormone and growth hormone. *Life Sci*, 21(3):461-466.
- Bunn SJ, Marley PD, Livett BG. 1988. The distribution of opioid binding subtypes in the bovine adrenal medulla. *Neuroscience*, 27(3):1081-1094.
- Cabot PJ, Dodd PR, Cramond T, Smith MT. 1994. Characterization of non-conventional opioid binding sites in rat and human lung. *Eur J Pharmacol*, 268(2):247-255.
- Cabot PJ, Cramond T, Smith MT. 1996. Quantitative autoradiography of peripheral opioid binding sites in rat lung. *Eur J Pharmacol*, 310(1):47-53.
- Carretero J, Sánchez F, Blanco E, Montero M, Riesco JM, González R, Vázquez R. 1991. Estrogenic modulation of met-enkephalin-induced prolactin secretion in rats. *Anat Embryol (Berl)*, 183(5):455-459.
- Carretero J, Bodego P, Rodríguez RE, Rubio M, Blanco E, Burks DJ. 2004. Expression of the mu-opioid receptor in the anterior pituitary gland is influenced by age and sex. *Neuropeptides*, 38(2-3):63-68.
- Chakass D, Philippe D, Erdual E, Dharancy S, Malapel M, Dubuquoy C, Thuru X, Gay J, Gaveriaux-Ruff C, Dubus P, Mathurin P, Kieffer BL, Desreumaux P, Chamailard M. 2007. Micro-Opioid receptor activation prevents acute hepatic inflammation and cell death. *Gut*, 56(7):974-981.
- Chappell D, Conzen P. 2009. Methylnaltrexon. Ein neuer Ansatz zur Therapie der opioidinduzierten Obstipation. *Schmerz*, 23(5):471-478.
- Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. 1993. Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. *Mol Pharmacol*, 44(1):8-12.
- Chuang TK, Killam KF, Chuang LF, Kung HF, Sheng WS, Chao CC, Yu L, Chuang RY. 1995. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 216(3):922-930.

- Corbett A, Henderson G, McKnight AT, Paterson SJ. 2006. 75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail. *Br J Pharmacol*, 147 Suppl 1:S153-162.
- Craft RM, Henley SR, Haaseth RC, Hruby VJ, Porreca F. 1995. Opioid antinociception in a rat model of visceral pain: systemic versus local drug administration. *J Pharmacol Exp Ther*, 275(3):1535-1542.
- Członkowski A, Costa T, Przewłocki R, Pasí A, Herz A. 1983. Opiate receptor binding sites in human spinal cord. *Brain Res*, 267(2):392-396.
- Dalbiès-Tran R, Mermillod P. 2003. Use of heterologous complementary DNA array screening to analyze bovine oocyte transcriptome and its evolution during in vitro maturation. *Biol Reprod*, 68(1):252-261.
- de Groat WC, Yoshimura N. 2001. Pharmacology of the lower urinary tract. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 41:691-721.
- Delfs JM, Kong H, Mestek A, Chen Y, Yu L, Reisine T, Chesselet MF. 1994. Expression of mu opioid receptor mRNA in rat brain: an in situ hybridization study at the single cell level. *J Comp Neurol*, 345(1):46-68.
- Dell'Aquila ME, Casavola V, Reshkin SJ, Albrizio M, Guerra L, Maritato F, Minoia P. 2002. Effects of beta-endorphin and Naloxone on in vitro maturation of bovine oocytes. *Mol Reprod Dev*, 63(2):210-222.
- Dell'Aquila ME, Cho YS, Albrizio M, Guaricci AC, Maritato F, Minoia P. 2003. Immunofluorescence detection of the mu-opioid receptor in human oocytes. *Human Reprod*, 18:180.
- Dell'Aquila ME, Albrizio M, Guaricci AC, De Santis T, Maritato F, Tremoleda JL, Colenbrander B, Guerra L, Casavola V, Minoia P. 2008. Expression and localization of the mu-opioid receptor (MOR) in the equine cumulus-oocyte complex and its involvement in the seasonal regulation of oocyte meiotic competence. *Mol Reprod Dev*, 75(8):1229-1246.
- De Minicis S, Candelaresi C, Marzioni M, Saccomano S, Roskams T, Casini A, Risaliti A, Salzano R, Cautero N, di Francesco F, Benedetti A, Svegliati-Baroni G. 2008. Role of endogenous opioids in modulating HSC activity in vitro and liver fibrosis in vivo. *Gut*, 57(3):352-364.
- Dissanayake VU, Hughes J, Hunter JC. 1991. Opioid binding sites in the guinea pig and rat kidney: radioligand homogenate binding and autoradiography. *Mol Pharmacol*, 40(1):93-100.



- Doll C, Konietzko J, Pöll F, Koch T, Höllt V, Schulz S. 2011. Agonist-selective patterns of  $\mu$ -opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *Br J Pharmacol*, "Accepted Article"; doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01382.x.
- Dübel S, Rohrbach P, Schmiedl A. 2004. Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper. *Biol Unserer Zeit*, 34(6):372-379.
- Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH. 1992. Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science*, 258(5090):1952-1955.
- Fichna J, Janecka A. 2004. Opioid peptides in cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 23(3-4):351-366.
- Finn AK, Whistler JL. 2001. Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron*, 32(5):829-839.
- Fischer T, Doll C, Jacobs S, Kolodziej A, Stumm R, Schulz S. 2008a. Reassessment of sst2 somatostatin receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-1. *J Clin Endocrinol Metab*, 93:4519-4524.
- Fischer T, Nagel F, Jacobs S, Stumm R, Schulz S. 2008b. Reassessment of CXCR4 chemokine receptor expression in human normal and neoplastic tissues using the novel rabbit monoclonal antibody UMB-2. *PLoS One*, 3:e4069.
- Freye E, Latasch L. 2003. Toleranzentwicklung unter Opioidgabe - Molekulare Mechanismen und klinische Bedeutung. *Anästhesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 38(1):14-26.
- Freye E. 2009. *Opiode in der Medizin*. Achte Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Fritschy JM. 2008. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *Eur J Neurosci*, 28(12):2365-2370.
- Ganten D, Ruckpaul K. 2008. *Grundlagen der Molekularen Medizin*. Dritte Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Geckeler KE, Eckstein H. 2000. *Bioanalytische und biochemische Labormethoden*. Erste Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Gray AC, Coupar IM, White PJ. 2006. Comparison of opioid receptor distributions in the rat central nervous system. *Life Sci*, 79(7):674-685.
- Guarraci FA, Pozo MJ, Palomares SM, Firth TA, Mawe GM. 2002. Opioid agonists inhibit excitatory neurotransmission in ganglia and at the neuromuscular junction in Guinea pig gallbladder. *Gastroenterology*, 122(2):340-351.

- Gudelsky GA, Porter JC. 1980. Release of dopamine from tuberoinfundibular neurons into pituitary stalk blood after prolactin or haloperidol administration. *Endocrinology*, 106(2):526-529.
- Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. 1996. Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 36:429-459.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. 1999. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol*, 19(3):1720-1730.
- Haen E. 2007. Klinische Pharmakologie der Analgetika. *Orthopäde*, 36:17-22.
- Hahn H, Falke D, Kaufmann SHE, Ullmann U. 2005. *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. Fünfte Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Harlow E, Lane D. 1998. *Using Antibodies: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hatzoglou A, Bakogeorgou E, Castanas E. 1996. The antiproliferative effect of opioid receptor agonists on the T47D human breast cancer cell line is partially mediated through opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 296(2):199-207.
- Hiller JM, Zhang Y, Bing G, Gioannini TL, Stone EA, Simon EJ. 1994. Immunohistochemical localization of mu-opioid receptors in rat brain using antibodies generated against a peptide sequence present in a purified mu-opioid binding protein. *Neuroscience*, 62(3):829-841.
- Holzer P. 2009. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul Pept*, 155(1-3):11-17.
- Huang P, Liu-Chen LY. 2009. Detecting the mu opioid receptor in brain following SDS-PAGE with multiple approaches. *Front Biosci (Elite Ed)*, 1:220-227.
- Husain S, Potter DE, Crosson CE. 2009. Opioid receptor-activation: retina protected from ischemic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50(8):3853-3859.
- Iorga AI, Valentini L, De Santis T, Ambruosi B, Albrizio M, Guaricci AC, Caira M, Dell'Aquila M. 2009. Expression of the mu opioid receptor and effects of the opioid antagonist naloxone on in vitro maturation of oocytes recovered from anoestrous bitches. *Reprod Domest Anim*, 44 Suppl 2:263-268.
- Jaume M, Jacquet S, Cavallès P, Macé G, Stephan L, Blanpied C, Demur C, Brousset P, Dietrich G. 2004. Opioid receptor blockade reduces Fas-induced hepatitis in mice. *Hepatology*, 40(5):1136-1143.

- Jivegård L, Thornell E, Björck S, Svanvik J. 1985. The effects of morphine and enkephaline on gallbladder function in experimental cholecystitis. Inhibition of inflammatory gallbladder secretion. *Scand J Gastroenterol*, 20(9):1049-1056.
- Jordan B, Devi LA. 1998. Molecular mechanisms of opioid receptor signal transduction. *Br J Anaesth*, 81(1):12-19.
- Jordan D, Tafani JA, Ries C, Zajac JM, Simonnet G, Martin D, Kopp N, Allard M. 1996. Evidence for multiple opioid receptors in the human posterior pituitary. *J Neuroendocrinol*, 8(11):883-887.
- Junqueira LC, Carneiro J. 2004. *Histologie*. Sechste Aufl. Berlin: Springer-Verlag.
- Kampa M, Bakogeorgou E, Hatzoglou A, Damianaki A, Martin PM, Castanas E. 1997. Opioid alkaloids and casomorphin peptides decrease the proliferation of prostatic cancer cell lines (LNCaP, PC3 and DU145) through a partial interaction with opioid receptors. *Eur J Pharmacol*, 335(2-3):255-265.
- Kampa M, Margioris AN, Hatzoglou A, Dermitzaki I, Denizot A, Henry JF, Oliver C, Gravanis A, Castanas E. 1999. Kappa1-opioid binding sites are the dominant opioid binding sites in surgical specimens of human pheochromocytomas and in a human pheochromocytoma (KAT45) cell line. *Eur J Pharmacol*, 364(2-3):255-262.
- Keith DE, Anton B, Murray SR, Zaki PA, Chu PC, Lissin DV, Monteillet-Agius G, Stewart PL, Evans CJ, von Zastrow M. 1998. Mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain. *Mol Pharmacol*, 53(3):377-384.
- Khawaja XZ, Green IC, Thorpe JR, Titheradge MA. 1990. The occurrence and receptor specificity of endogenous opioid peptides within the pancreas and liver of the rat. Comparison with brain. *Biochem J*, 267(1):233-240.
- Kieffer BL, Befort K, Gaveriaux-Ruff C, Hirth CG. 1992. The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(24):12048-12052.
- Klaschik E, Clemens K. 2005. Opiode in der Tumorschmerztherapie. Wirksamkeit und Nebenwirkungen. *Schmerz*, 19(5):395-403.

- Knapp R, Malatynska E, Collins N, Fang L, Wang JY, Hruby VJ, Roeske WR, Yamamura HI. 1995. Molecular biology and pharmacology of cloned opioid receptors. *FASEB J*, 9(7):516-525.
- Koch T, Widera A, Bartzsch K, Schulz S, Brandenburg LO, Wundrack N, Beyer A, Grecksch G, Höllt V. 2005. Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol Pharmacol*, 67(1):280-287.
- Koppert W. 2005. Opioidvermittelte Analgesie und Hyperalgesie. *Schmerz*, 19(5):386-394.
- Law PY, Loh HH. 1999. Regulation of opioid receptor activities. *J Pharmacol Exp Ther*, 289(2):607-624.
- Law PY, Wong YH, Loh HH. 2000. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40:389-430.
- Leong DA, Frawley LS, Neill JD. 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu Rev Physiol*, 45:109-127.
- Linari G, Agostini S, Broccardo M, Petrella C, Improta G. 2006. Regulation of pancreatic secretion in vitro by nociceptin/orphanin FQ and opioid receptors: a comparative study. *Pharmacol Res*, 54(5):356-360.
- Liu-Chen LY, Chen C, Phillips CA. 1993. Beta-[3H]funaltrexamine-labeled mu-opioid receptors: species variations in molecular mass and glycosylation by complex-type, N-linked oligosaccharides. *Mol Pharmacol*, 44(4):749-756.
- Loh HH, Smith AP. 1990. Molecular characterization of opioid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 30:123-147.
- Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. 2002. *Pharmakologie und Toxikologie*. 15. Aufl. Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag.
- Lupp A, Richter N, Doll C, Nagel F, Schulz S. 2011. UMB-3, a novel rabbit monoclonal antibody, for assessing  $\mu$ -opioid receptor expression in mouse, rat and human formalin-fixed and paraffin-embedded tissues. *Regul Pept*, 167(1):9-13.
- Maneckjee R, Biswas R, Vonderhaar BK. 1990. Binding of opioids to human MCF-7 breast cancer cells and their effects on growth. *Cancer Res*, 50(8):2234-2238.
- Mansour A, Khachaturian H, Lewis ME, Akil H, Watson SJ. 1988. Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci*, 11(7):308-314.

- Mansour A, Fox CA, Burke S, Akil H, Watson SJ. 1995. Immunohistochemical localization of the cloned mu opioid receptor in the rat CNS. *J Chem Neuroanat*, 8(4):283-305.
- Mawe GM, Talmage EK, Cornbrooks EB, Gokin AP, Zhang L, Jennings LJ. 1997. Innervation of the gallbladder: structure, neurochemical coding, and physiological properties of guinea pig gallbladder ganglia. *Microsc Res Tech*, 39(1):1-13.
- McCann SM, Lumpkin MD, Mizunuma H, Khorram O, Otlecz A, Samson WK. 1984. Peptidergic and dopaminergic control of prolactin release. *Trends Neurosci*, 7(4):127-131.
- McCarthy L, Wetzel M, Sliker JK, Eisenstein TK, Rogers TJ. 2001. Opioids, opioid receptors, and the immune response. *Drug Alcohol Depend*, 62(2):111-123.
- Mercadante S, Ferrera P, Casuccio A. 2011. Prevalence of opioid-related dysuria in patients with advanced cancer having pain. *Am J Hosp Palliat Care*, 28(1):27-30.
- Minami M, Satoh M. 1995. Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions. *Neurosci Res*, 23(2):121-145.
- Neuburger M, Schmelz M. 2007. Schmerzchronifizierung. Ursachen und Therapieoptionen. *Trauma Berufskrankh*, 9:103-106.
- Noll S, Schaub-Kuhnen S. 2000. *Praxis der Immunhistochemie*. München, Jena: Urban & Fischer-Verlag.
- Nyhlin N, el-Salhy M, Sandström O, Suhr O. 1997. Evaluation of immunohistochemical staining of human duodenal endocrine cells after microwave antigen retrieval. *Histochem J*, 29(2):177-181.
- Pasternak GW. 2005. Molecular biology of opioid analgesia. *J Pain Symptom Manage*, 29(5 Suppl):2-9.
- Pavone L, Albrizio M, Minoia R. 2008. Expression and localization of mu-opioid receptor in canine oocytes. *Reprod Fertil Dev*, 20:185.
- Pert CB, Snyder SH. 1973. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. *Science*, 179(77):1011-1014.
- Pfeiffer M, Koch T, Schröder H, Lausch M, Höllt V, Schulz S. 2002. Heterodimerization of somatostatin and opioid receptors cross-modulates phosphorylation, internalization, and desensitization. *J Biol Chem*, 277(22):19762-19772.
- Quirion R, Finkel MS, Mendelsohn FA, Zamir N. 1983. Localization of opiate binding sites in kidney and adrenal gland of the rat. *Life Sci*, 33 Suppl 1:299-302.

- Reisch N, Walz MK, Erlic Z, Neumann HPH. 2009. Das Phäochromozytom – noch immer eine Herausforderung. *Internist*, 50:27-35.
- Remmele W. 1999. *Pathologie Bd. 1. Zweite Aufl.* Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Rosenblum A, Marsch L, Joseph H, Portenoy RK. 2008. Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions. *Exp Clin Psychopharmacol*, 16(5):405-416.
- Schmidt H, Schulz S, Klutzny M, Koch T, Händel M, Höllt V. 2000. Involvement of mitogen-activated protein kinase in agonist-induced phosphorylation of the mu-opioid receptor in HEK 293 cells. *J Neurochem*, 74(1):414-422.
- Schünke M, Schulte E, Schumacher U, Voll M, Wesker K. 2009. *Prometheus. Lernatlas der Anatomie. Innere Organe. Zweite Aufl.* Stuttgart: Georg-Thieme-Verlag.
- Schulz S, Schreff M, Koch T, Zimprich A, Gramsch C, Elde R, Höllt V. 1998. Immunolocalization of two mu-opioid receptor isoforms (MOR1 and MOR1B) in the rat central nervous system. *Neuroscience*, 82(2):613-622.
- Schulz S, Röcken C, Mawrin C, Weise W, Höllt V. 2004a. Immunocytochemical identification of VPAC1, VPAC2, and PAC1 receptors in normal and neoplastic human tissues with subtype-specific antibodies. *Clin Cancer Res*, 10(24):8235-8242.
- Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T, Höllt V. 2004b. Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J*, 23(16):3282-3289.
- Schulz S, Röcken C, Schulz S. 2006. Immunocytochemical localisation of plasma membrane GHRH receptors in human tumours using a novel anti-peptide antibody. *Eur J Cancer*, 42(14):2390-2396.
- Seidal T, Balaton AJ, Battifora H. 2001. Interpretation and quantification of immunostains. *Am J Surg Pathol*, 25(9):1204-1207.
- Sharif NA, Hughes J. 1989. Discrete mapping of brain mu and delta opioid receptors using selective peptides: quantitative autoradiography, species differences and comparison with kappa receptors. *Peptides*, 10(3):499-522.
- Sharp BM. 2006. Multiple opioid receptors on immune cells modulate intracellular signaling. *Brain Behav Immun*, 20(1):9-14.

- Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. 1973. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70(7):1947-1949.
- Snyder SH, Pasternak GW. 2003. Historical review: Opioid receptors. *Trends Pharmacol Sci*, 24(4):198-205.
- Stein C. 1995. The control of pain in peripheral tissue by opioids. *N Engl J Med*, 332(25):1685-1690.
- Sternini C, Spann M, Anton B, Keith DE, Bunnett NW, von Zastrow M, Evans C, Brecha NC. 1996. Agonist-selective endocytosis of mu opioid receptor by neurons in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(17):9241-9246.
- Sternini C, Patierno S, Selmer IS, Kirchgessner A. 2004. The opioid system in the gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 2:3-16.
- Strumpf M, Willweber-Strumpf A, Zenz M. 2006. Opiode - moderne Konzepte der Schmerztherapie. *Med Klin*, 101(2):139-145.
- Taché Y, Lis M, Collu R. 1977. Effects of thyrotropin-releasing hormone on behavioral and hormonal changes induced by beta-endorphin. *Life Sci*, 21(6):841-846.
- Tegeder I, Geisslinger G. 2004. Opioids as modulators of cell death and survival - unraveling mechanisms and revealing new indications. *Pharmacol Rev*, 56(3):351-369.
- Terenius L. 1973. Characteristics of the "receptor" for narcotic analgesics in synaptic plasma membrane fraction from rat brain. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 33(5):377-384.
- Thomas GE, Szücs M, Mamone JY, Bem WT, Rush MD, Johnson FE, Coscia CJ. 1990. Sigma and opioid receptors in human brain tumors. *Life Sci*, 46(18):1279-1286.
- Thomas L. 2007. Labor und Diagnose. Indikation und Bewertung von Laborbefunden für die medizinische Diagnostik. Siebte Aufl. Frankfurt am Main: TH-Books.
- Trepel M. 2008. Neuroanatomie. Struktur und Funktion. Vierte Aufl. München: Elsevier.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. 2008. Opioid pharmacology. *Pain Physician*, 11(2 Suppl):133-153.
- Villemagne PS, Dannals RF, Ravert HT, Frost JJ. 2002. PET imaging of human cardiac opioid receptors. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 29(10):1385-1388.
- Waldeyer A. 2003. Anatomie des Menschen. 17. Aufl. Berlin, New York: De Gruyter.

- Wamsley JK, Palacios JM, Kuhar MJ. 1981. Autoradiographic localization of opioid receptors in the mammalian retina. *Neurosci Lett*, 27(1):19-24.
- Weber ML, Farooqui M, Nguyen J, Ansonoff M, Pintar JE, Hebbel RP, Gupta K. 2008. Morphine induces mesangial cell proliferation and glomerulopathy via kappa-opioid receptors. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(6):F1388-1397.
- Wehner F, Winterhager JM, Petersen KU. 1990. Naloxone-insensitive transport effects of loperamide in guinea-pig gallbladder epithelium. *Eur J Pharmacol*, 178(3):333-342.
- Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M. 1999. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron*, 23(4):737-746.
- Wilkes MM, Yen SS. 1981. Augmentation by naloxone of efflux of LRF from superfused medial basal hypothalamus. *Life Sci*, 28(21):2355-2359.
- Wittert G, Hope P, Pyle D. 1996. Tissue distribution of opioid receptor gene expression in the rat. *Biochem Biophys Res Commun*, 218(3):877-881.
- Wood JD, Galligan JJ. 2004. Function of opioids in the enteric nervous system. *Neurogastroenterol Motil*, 16 Suppl 2:17-28.
- Zagon IS, McLaughlin PJ, Goodman SR, Rhodes RE. 1987. Opioid receptors and endogenous opioids in diverse human and animal cancers. *J Natl Cancer Inst*, 79(5):1059-1065.
- Zhu Y, Pintar JE. 1998. Expression of opioid receptors and ligands in pregnant mouse uterus and placenta. *Biol Reprod*, 59(4):925-932.
- Zimlichman R, Gefel D, Eliahou H, Matas Z, Rosen B, Gass S, Ela C, Eilam Y, Vogel Z, Barg J. 1996. Expression of opioid receptors during heart ontogeny in normotensive and hypertensive rats. *Circulation*, 93(5):1020-1025.
- Zöllner C. 2007. Molekulare Mechanismen der Schmerzinhibition durch Opioide beim Entzündungsschmerz [Habilitationsschrift]. Berlin: Charité Universitätsmedizin.
- Zöllner C, Schäfer M. 2008. Opioide in der Anästhesie. *Anaesthesist*, 57(7):729-742.





## 9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Frau PD Dr. med. A. Lupp, Prof. Dr. S. Schulz,

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,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Nadine Richter

### **9.3 Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. S. Schulz und Frau PD Dr. med. habil. A. Lupp für die Vergabe des Dissertationsthemas.

Mein besonderer Dank gilt an dieser Stelle Frau PD Dr. med. habil. A. Lupp für die hervorragende und herzliche Betreuung.