

Aus dem
Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Univ.-Prof. Dr. R. Schulz

Arbeit angefertigt unter der Leitung von
Univ.-Prof. Dr. H. Ammer

**Sensibilisierung von δ -Opioidrezeptoren nach
chronischer Morphinbehandlung**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
an der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Alexandra I. Giesen
aus
München

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. H. Ammer
Korreferent:	Priv.-Doz. Dr. Dr. R. G. Erben

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

Für Mami

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1	Opioiderge Wirkmechanismen	1
1.1.1	Opioidrezeptoren.....	1
1.1.2	G-Proteine.....	2
1.1.3	Effektorsysteme	4
1.1.3.1	Adenylylzyklasen.....	4
1.1.3.2	Phospholipase C	6
1.1.3.3	Mitogen-aktivierte Proteinkinase	6
1.2	Mechanismen der chronischen Opioidwirkung.....	7
1.2.1	Toleranz	7
1.2.1.1	Rezeptorphosphorylierung	8
1.2.1.2	Rezeptorendozytose	9
1.2.1.3	Rezeptorrecycling und -degradation.....	9
1.2.2	Abhängigkeit	10
1.2.3	Hypersensibilisierung	12
1.3	Fragestellung	12
2.	Material und Methoden	14
2.1	Zellmodell.....	14
2.2	Verwendete Plasmide	14
2.3	Kultivierung der Zellen.....	15
2.3.1	Materialien.....	15
2.3.2	Durchführung	16
2.4	Transiente Expression von Plasmid-DNA in COS-7 Zellen	17
2.4.1	Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	17

Inhaltsverzeichnis

2.4.1.1	Materialien.....	17
2.4.1.2	Durchführung	19
2.4.2	Restriktionsverdau.....	20
2.4.2.1	Materialien.....	20
2.4.2.2	Durchführung	21
2.4.3	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.4.3.1	Materialen	21
2.4.3.2	Durchführung	22
2.4.4	Transfektion von COS-7 Zellen	22
2.4.4.1	Materialien.....	22
2.4.4.2	Durchführung	23
2.5	Behandlung der Zellen mit Opioiden	23
2.5.1	Verwendete Substanzen	23
2.5.2	Durchführung	23
2.6	Bestimmung von δ -Opioidrezeptoren	24
2.6.1	Membranpräparation.....	24
2.6.1.1	Materialien.....	24
2.6.1.2	Durchführung	25
2.6.2	Radioligandenbindung.....	25
2.6.2.1	Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d).....	25
2.6.2.1.1	Prinzip	25
2.6.2.1.2	Materialien.....	27
2.6.2.1.3	Durchführung	27
2.6.2.2	Bestimmung der Rezeptorendichte (B_{max}).....	28
2.6.2.2.1	Prinzip	28
2.6.2.2.2	Materialien.....	28
2.6.2.2.3	Durchführung	29
2.6.3	Bestimmung hochaffiner δ -Opioidrezeptoren	29
2.6.3.1	Prinzip	29
2.6.3.2	Materialien.....	30

Inhaltsverzeichnis

2.6.3.3	Durchführung	30
2.7	Proteinbestimmung nach Lowry	30
2.7.1	Materialien.....	30
2.7.2	Durchführung	31
2.8	Intrazelluläre cAMP Akkumulation.....	32
2.8.1	Prinzip	32
2.8.2	Materialien.....	32
2.8.3	Durchführung	33
2.9	Bestimmung von cAMP im ELISA	33
2.9.1	Prinzip	33
2.9.2	Materialien.....	34
2.9.3	Durchführung	35
2.10	Bestimmung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase) .	36
2.10.1	Prinzip	36
2.10.2	Materialien.....	37
2.10.3	Durchführung	37
2.11	Umverteilung von GRK2 und β -Arrestin 1	37
2.11.1	Prinzip	37
2.11.2	Durchführung	38
2.12	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.12.1	Prinzip	38
2.12.2	Materialien.....	38
2.12.3	Durchführung	39
2.13	Bestimmung von Proteinen im Westernblot	40
2.13.1	Prinzip	40
2.13.2	Elektrophoretischer Proteintransfer	40
2.13.2.1	Materialien.....	40
2.13.2.2	Durchführung	41
2.13.3	Antikörperdetektion	41
2.13.3.1	Materialien.....	42

Inhaltsverzeichnis

2.13.3.2	Durchführung	42
2.13.4	Chemilumineszenz	42
2.13.4.1	Prinzip	42
2.13.4.2	Materialien.....	43
2.13.4.3	Durchführung	43
2.14	Statistische Auswertung.....	43
3.	Ergebnisse	44
3.1	Bestimmung der Affinität von ³ H-Diprenorphin am δ-Opioidrezeptor.....	44
3.2	Charakterisierung des Zellmodels	44
3.2.1	Transfektionseffizienz.....	44
3.2.1.1	Bestimmung der optimalen Menge an Plasmid-DNA	44
3.2.1.2	Zeitverlauf der Expression des δ-Opioidrezeptors.....	46
3.2.1.3	Co-Expression von δ-Opioidrezeptoren zusammen mit einer Adenylylzyklase	47
3.2.2	Induktion chronischer Opioideffekte in COS-7 Zellen.....	49
3.2.2.1	Agonist vermittelte Internalisierung des δ-Opioidrezeptors	49
3.2.2.2	Sensibilisierung der Adenylylzyklase.....	50
3.3	Einfluss einer chronischen Morphinbehandlung auf die Internalisierung des δ-Opioidrezeptors.....	52
3.3.1	Internalisierung des δ-Opioidrezeptors in Abwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase	52
3.3.2	Regulation des δ-Opioidrezeptors in Anwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase	53
3.3.3	Blockade der verstärkten Internalisierung des δ-Opioidrezeptors mit Naloxon	55
3.4	Sensibilisierung von δ-Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung.....	56
3.4.1	Regulation von ERK-1 und -2 Aktivität	56
3.4.2	Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Interaktion.....	59

Inhaltsverzeichnis

3.5	Regulation der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit weiterer Adenylylzyklase-Isoformen	61
3.5.1	Co-Expression der Adenylylzyklase vom Typ VI	61
3.5.1.1	Sensibilisierung der Adenylylzyklase.....	61
3.5.1.2	Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung.....	62
3.5.2	Co-Expression der Adenylylzyklase vom Typ II	64
3.5.2.1	Regulation der Aktivität der Adenylylzyklase.....	64
3.5.2.2	Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung.....	65
3.5.3	Co-Expression eines funktionell inaktiven Konstrukts der Adenylylzyklase vom Typ V.....	67
3.5.3.1	Überprüfung der Proteinexpression.....	67
3.5.3.2	Regulation des C ₁ -Fragments der Adenylylzyklase vom Typ V durch Morphin	68
3.5.3.3	Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung.....	70
3.6	Untersuchungen zum Mechanismus der verstärkten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinexposition	71
3.6.1	Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2.....	71
3.6.2	Umverteilung von β -Arrestin 1	74
4.	Diskussion	77
5.	Zusammenfassung	85
6.	Summary	87
7.	Literaturverzeichnis	89
8.	Danksagung	103

Inhaltsverzeichnis

Anhang: Bezugsquellen	104
Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Geräte	104

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine	2
Abb. 2: Struktur von Adenylylzyklasen	5
Abb. 3: Mechanismus der Agonist vermittelten Desensibilisierung und Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren	10
Abb. 4: Repräsentatives Sättigungsexperiment an NG108-15 Zellen mit Scatchard-Plot.....	45
Abb. 5: Überprüfung der Transfektionseffizienz	46
Abb. 6: Zeitverlauf der Expression von δ -Opioidrezeptoren	47
Abb. 7: Bestimmung der Proteinexpression im Westernblot.....	48
Abb. 8: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in COS-7 Zellen	49
Abb. 9: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase in COS-7 Zellen	51
Abb. 10: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Behandlung mit Morphin in Abwesenheit einer regulierbaren Adenylylzyklase	52
Abb. 11: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Behandlung mit Morphin in Anwesenheit einer regulierbaren Adenylylzyklase	54
Abb. 12: Blockade des chronischen Morphineffektes auf die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors durch Naloxon.....	55
Abb. 13: Regulation der MAP-Kinase Aktivität in COS-7 Zellen	57
Abb. 14: Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in COS-7 Zellen	60
Abb. 15: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase vom Typ VI in COS-7 Zellen	61
Abb. 16: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit von AC VI	63
Abb. 17: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase vom Typ II in COS-7 Zellen.....	65
Abb. 18: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors bei Anwesenheit der funktionell regulierbaren Adenylylzyklase vom Typ II	66
Abb. 19: Expression des HA-markierten C ₁ -Konstrukts der ACV	68
Abb. 20: Chronische Regulation des C ₁ -Fragments der ACV durch Morphin.....	69

Abbildungsverzeichnis

Abb.21: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung in Anwesenheit des HA-ACV-C1 Fragments	70
Abb.22: Umverteilung der GRK2 in COS-7 Zellen.....	73
Abb.23: Umverteilung von β -Arrestin 1 in COS-7 Zellen	75

Abkürzungsverzeichnis

Abb	-	Abbildung
AC	-	Adenylylzyklase
ACII	-	Adenylylzyklase vom Typ II
ACV	-	Adenylylzyklase vom Typ V
ACVI	-	Adenylylzyklase vom Typ VI
APS	-	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	-	zweifach destilliertes Wasser
ATP	-	Adenosintriophosphat
BBS	-	BES-buffered saline
BES	-	N'N-bis-Aminoethansulfonsäure
BSA	-	bovines Serumalbumin
cAMP	-	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	-	komplementäre DNA
Ci	-	Curie
CTC	-	Kupfersulfat-Tartrat-Natiumcarbonat
D	-	DADLE
DADLE	-	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]Enkephalin
DAG	-	Diacylglycerol
DMEM	-	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DOR	-	δ-Opioidrezeptor
DTT	-	Dithiothreitol
e	-	Exponent
<i>E.coli</i>	-	<i>Escherichia coli</i>
ECL	-	Enhanced-Chemilumineszenz
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure

Abkürzungsverzeichnis

EGTA	-	Ethylen-Glycol-bis- β -Aminoethylether N,N,N',N'-Tetraessigsäure
ELISA	-	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	-	extrazellulär-Signal regulierte Kinase
FKS	-	Fötales Kälberserum
G _i	-	inhibitorisches G-Protein
G-Protein	-	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRK	-	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
GRK2	-	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase Typ 2
G _s	-	stimulierendes G-Protein
h	-	Stunde
HA	-	Hämagglutinin
HCl	-	Salzsäure
HEPES	-	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2- ethansulfonsäure]
IBMX	-	3-Isobutyl-1-methylxanthin
IC ₅₀	-	halbmaximale Hemmkonzentration
IP ₃	-	Inositoltrisphosphat
K _d	-	Dissoziationskonstante
kDa	-	Kilodalton
K _i	-	Inhibitorische Konstante
LB-Medium	-	Luria-Bertani-Medium
M	-	mol/l
m/v	-	Masse-Volumen-Prozent
MAP-Kinase	-	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	-	Minute
Mor	-	Morphin
Nal	-	Naloxon
NMDA	-	N-Methyl-D-Aspartat
PAA	-	Polyacrylamid

Abkürzungsverzeichnis

PBS	-	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PKA	-	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PKC	-	Proteinkinase C
PLC	-	Phospholipase C
PTX	-	Pertussis Toxin
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SEM	-	Standardfehler des Mittelwertes
SV40	-	Simian Virus 40
TAE-Puffer	-	Tris-Azetat-EDTA-Puffer
T-Antigen	-	Tumor-Antigen
TEMED	-	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	-	Tetramethylbenzidin
Tris	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	-	Volumen-Volumen-Prozent

1. Einleitung

Morphin und seine Derivate sind stark wirksame Analgetika, die ihre Funktion über spezifische Rezeptoren vermitteln. Obwohl Opioide in Medizin wie Tiermedizin seit Jahrzehnten zur Behandlung starker Schmerzzustände unerlässlich sind, kann ihr therapeutischer Nutzen nach längerfristiger Anwendung durch die Ausbildung chronischer Opioidwirkungen wie Toleranz und Abhängigkeit erheblich gemindert werden. Auf zellulärer Ebene geht Toleranz oftmals mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Rezeptoren einher, wohingegen die Entstehung von Abhängigkeit mit kompensatorischen Veränderungen auf Ebene der den Rezeptoren nachgeschalteten Signalmechanismen in Verbindung gebracht wird. Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung möglicher Auswirkungen intrazellulärer Adaptationen im Stadium der Abhängigkeit auf die Agonist vermittelte Regulation der Rezeptorfunktion unter definierten experimentellen Bedingungen in einem rekonstituierten Zellsystem.

1.1 Opioiderge Wirkmechanismen

Analgetika vom Morphintyp vermitteln ihre Wirkung über Interaktion mit Rezeptoren der endogenen, peptidergen Opioidsysteme. Diese umfassen die Endorphine, Dynorphine und Endomorphine (Hughes et al., 1975; Pasternak et al., 1976; Zadina et al., 1999).

1.1.1 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren werden in spezifischen Neuronen des zentralen und peripheren Nervensystems exprimiert und sind an der Schmerzrezeption sowie -transmission maßgeblich beteiligt (Reisine und Bell, 1993). Auf molekularer Ebene stellen sie typische G-Protein gekoppelte Rezeptoren dar, die durch sieben transmembrane Domänen, einem extrazellulär gelegenen N-Terminus und einem zytosolischen C-Terminus charakterisiert sind (Law et al., 2000b). Anhand ihrer Primärstruktur werden Opioidrezeptoren in μ -, δ - und κ -Typen eingeteilt (Evans et al., 1992; Chen

1. Einleitung

et al., 1993; Yasuda et al., 1993), denen auf pharmakologischer Ebene mit Hilfe selektiver Liganden wiederum mehrere Subtypen zugeordnet werden können (Goldstein und Naidu, 1989; Standifer und Pasternak, 1997). Neben den für die Ligandenbindung verantwortlichen extrazellulären Domänen unterscheiden sich die unterschiedlichen Rezeptortypen vor allem im Bereich der dritten intrazellulären Schleife und des distalen C-Terminus, die großen Einfluss auf die Regulation der Rezeptorfunktion nach Aktivierung durch einen Agonisten besitzen (Law et al., 2000b; Waldhoer et al., 2004).

1.1.2 G-Proteine

Opioidrezeptoren übertragen ihre Informationen auf intrazelluläre Effektorsysteme über Guaninnukleotid-bindende Proteine, die so genannten G-Proteine (Gilman, 1987). Diese stellen heterotrimere Polypeptide dar, die aus einer G_α -Untereinheit

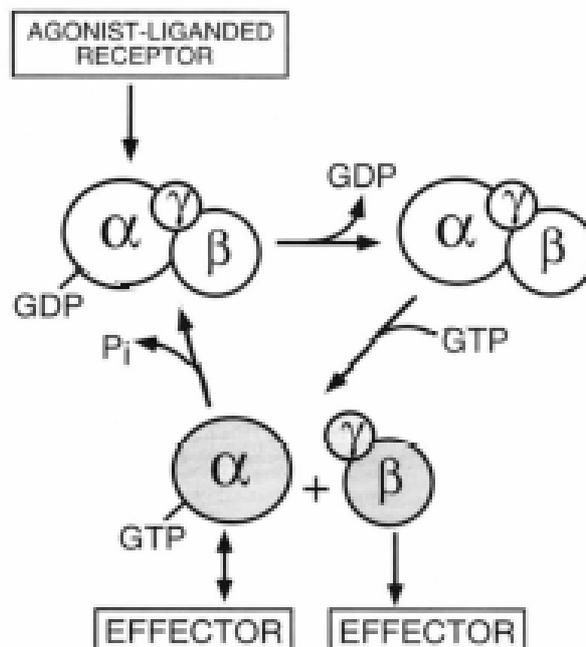


Abb. 1: Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine (Neer, 1994).

1. Einleitung

und einem funktionellen $G_{\beta\gamma}$ -Dimer bestehen. Im inaktiven Zustand bindet die G_{α} -Untereinheit Guanosindiphosphat (GDP), das nach Aktivierung durch einen Rezeptor gegen Guanosintriphosphat (GTP) ausgetauscht wird. Durch die mit dem Nukleotidaustausch einhergehende Konformationsänderung dissoziiert die aktivierte G_{α} -Untereinheit vom $G_{\beta\gamma}$ -Dimer ab, die nun beide ihre jeweiligen Effektorsysteme regulieren können (Neer, 1994; Harrison et al., 1998). Die Signalübertragung wird nach Hydrolyse von GTP zu GDP durch die intrinsische GTPase Aktivität der G_{α} -Untereinheit und Reassoziaton zum Heterotrimer wieder beendet (Abb. 1). Die G-Proteine stehen nun wieder für einen neuen Aktivierungszyklus zur Verfügung (Neer, 1994). Der G-Proteinzyklus kann durch Interaktion der GTP-beladenen G_{α} -Untereinheit mit so genannten „G protein activating proteins“ (GAP-Proteine) oder auch „regulators of G protein signaling“ (RGS-Proteine) erheblich beschleunigt werden, was zu einer Verkürzung der Signalübertragung führt (Hollinger und Heppler, 2002).

Auf molekularer Ebene zeichnet sich die Familie der heterotrimeren G-Proteine durch eine ausgesprochene Vielfalt aus, wobei derzeit 23 unterschiedliche G_{α} -, 5 G_{β} - und 10 G_{γ} -Untereinheiten bekannt sind (Gudermann et al, 1996). Anhand der funktionellen Eigenschaften ihrer G_{α} -Untereinheiten werden G-Proteine in 4 Familien eingeteilt:

Familie	G-Proteine
G_s	$G_{s\alpha}$, $G_{olf\alpha}$
G_i	$G_{i\alpha 1-3}$, $G_{o\alpha}$, $G_{z\alpha}$
G_q	$G_{q/11\alpha}$, $G_{16\alpha}$
G_{12}	$G_{12\alpha}$, $G_{13\alpha}$

Tabelle 1: G-Protein Einteilung (Gudermann et al., 1996).

1. Einleitung

Je nach Ausstattung einer Zelle mit G-Proteinen können Opioidrezeptoren ihre Funktion sowohl über inhibitorische G-Proteine als auch über Mitglieder der G_q -Familie vermitteln (Laugwitz et al., 1993; Lee et al., 1998; Ho et al., 2001). Die Signalübertragung durch inhibitorische G-Proteine, mit Ausnahme von G_z , kann durch Pertussis Toxin katalysierte ADP-Ribosylierung blockiert werden (Ho und Wong, 2001).

1.1.3 Effektorsysteme

1.1.3.1 Adenylylzyklase

Die Adenylylzyklase (AC; EC 4.6.1.1) stellt ein integrales Membranprotein dar, das die Umwandlung von ATP in den intrazellulären „second messenger“ zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (*cAMP*) katalysiert (Taussig und Gilman, 1995). In Säugerzellen wurden derzeit neun verschiedene Isoformen (ACI - ACIX) identifiziert, die sich in ihrem Verhalten gegenüber sekundären Regulatoren wie inhibitorische G_α -Untereinheiten, $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten, Proteinkinasen A, C (*PKA*, *C*) und Raf-1 sowie Calcium/Calmodulin unterscheiden (Hanoune und Defer, 2001; Sunahara und Taussig, 2002). Adenylylzyklasen sind pseudosymmetrische Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 120-180 kDa, die aus zwei hydrophoben Plasmamembrandomänen (M_1 und M_2) und zwei zytoplasmatischen Abschnitten (C_1 und C_2) aufgebaut sind (Abb.2). Das katalytische Zentrum wird dabei von der Kontaktstelle zwischen der C_1 - und C_2 -Domäne gebildet (Tesmer und Sprang, 1998). Aufgrund der pseudosymmetrischen Struktur und der Lage des katalytischen Zentrums erklärt sich die bimodale Regulation der enzymatischen Aktivität nach Bindung verschiedener Regulatoren an die C_1 - und C_2 -Domäne (Taussig und Gilman, 1995).

Die Aktivität aller Adenylylzyklasen wird durch aktivierte $G_s\alpha$ -Untereinheiten sowie durch das Diterpen Forskolin stimuliert, wobei die Effekte bei ACIX nur schwach ausgebildet sind (Insel und Ostrom, 2003). Die Regulation des intrazellulären *cAMP*-Gehaltes durch Opioide ist äußerst komplex und wird von der Anwesenheit einzelner AC-Isoformen in einem Zellsystem bestimmt. In der Regel hemmen

1. Einleitung

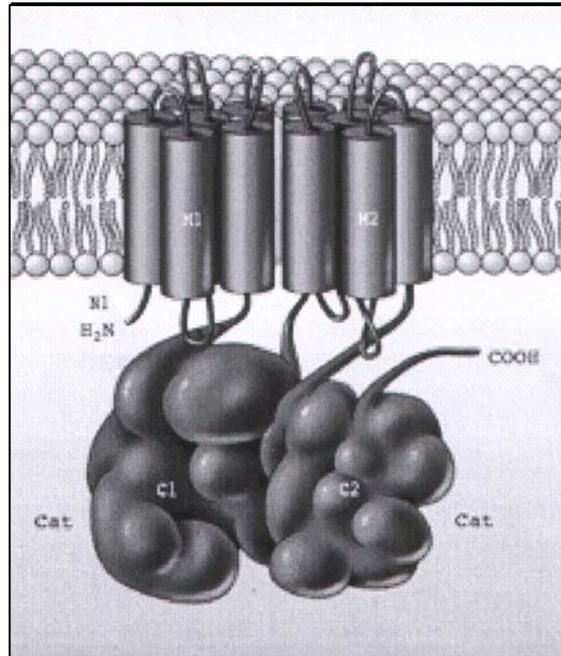


Abb. 2: Struktur von Adenylzyklasen (Ferguson und Storm, 2004).

Opioidrezeptoren durch direkte Bindung inhibitorischer G_{α} -Untereinheiten an die intrazelluläre C_1 -Domäne die Aktivität der Isoformen ACI, V und VI (Dessauer et al., 1998). Des Weiteren können die von inhibitorischen G-Proteinen freigesetzten $G_{\beta\gamma}$ -Dimere in Anwesenheit von $G_s\alpha$ die Aktivität der Isoformen ACII und IV stimulieren (Gao und Gilman, 1991; Taussig et al., 1993a), während die Produktion von cAMP durch ACI zusätzlich gehemmt wird (Taussig et al., 1993b). Die G-Protein regulierte enzymatische Aktivität kann in Abhängigkeit der vorliegenden Isoform darüber hinaus durch eine Reihe zusätzlicher Faktoren weiter moduliert werden, wodurch eine Kommunikation mit anderen Effektorsystemen ermöglicht wird (Sunahara et al., 1996; Tan et al., 2001). So hemmt die PKA vermittelte Phosphorylierung die Aktivität von ACV (Premont et al., 1992), während die von ACVI stimuliert wird (Chen et al., 1997). Eine PKC vermittelte Phosphorylierung stimuliert dagegen die Aktivität der ACV (Zimmermann und Taussig, 1996). Als einzig bekannte Isoform unterliegt die ACIX keinerlei Regulation durch Opiode (Avidor-Reiss et al., 1996).

Das gebildete cAMP reguliert als klassischer „second messenger“ über PKA

1. Einleitung

vermittelte Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten die Funktion einer Vielzahl von Proteinen wie Rezeptoren, intrazelluläre Signalproteine und Transkriptionsfaktoren (Pierce et al., 2002).

1.1.3.2 Phospholipase C

Die Phospholipase C (*PLC*) kann durch die direkte Bindung aktivierter G_{α} - und freier $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten PTX sensitiver G-Proteine aktiviert werden (Miyamae et al., 1993; Tsu et al., 1995; Ueda et al., 1995a). Sie katalysiert die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat in zwei Signalmoleküle, dem Inositoltrisphosphat (IP_3) und dem Diacylglycerol (DAG). IP_3 steigert die Freisetzung von Calcium aus dem Endoplasmatischen Retikulum, während DAG die enzymatische Aktivität der PKC reguliert. Durch Calcium/Calmodulin abhängige Prozesse können wiederum indirekt Opioidrezeptoren selbst als auch assoziierte intrazelluläre Signalkaskaden moduliert werden (Berridge, 1993; Chakrabarti et al., 1998; Ueda et al., 1995b).

1.1.3.3 Mitogen-aktivierte Proteinkinase

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) wird von extrazellulär Signal-regulierte Kinasen (*ERKs*), Stress-aktivierten Proteinkinasen (*SAPKs*) und p-38 Kinasen gebildet, wobei in einer einzelnen Zelle mehrere alternative Signalwege bestehen können. Am besten studiert ist die Phosphorylierung und damit Aktivierung von ERK-1 (p44^{MAPK}; 44 kDa) und ERK-2 (p42^{MAPK}; 42 kDa), an der von Opioidrezeptoren freigesetzte $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten maßgeblich beteiligt sind (Burt et al., 1996). Über mehrere redundante Signalwege (PKC, c-SRC, Transaktivierung von Thyrosinkinase Rezeptoren) wird zunächst das kleine G-Protein *Ras* aktiviert, das seine Information über die Proteinkinasen Raf-1, MEK und MEKK weiterleitet und letztendlich die Phosphorylierung von ERK-1 und -2 bedingt (Davis, 1993; Crespo et al., 1994). Die aktivierten MAP-Kinasen greifen als klassische Transkriptionsfaktoren in die Genregulation ein und nehmen somit

1. Einleitung

Einfluss auf Zelldifferenzierung und -proliferation (Seger und Krebs, 1995). Darüber hinaus konnten neuere Untersuchungen den MAP-Kinasen weitere Funktionen zuschreiben, wie der direkten Phosphorylierung von Opioidrezeptoren (Kramer et al., 2000; Schmitt et al., 2000) und dem an der Rezeptorinternalisierung beteiligten β -Arrestin 1 (Lin et al., 1997).

1.2 Mechanismen der chronischen Opioidwirkung

Die chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren führt zu Adaptationen in der Rezeptorfunktion selbst sowie auf Ebene der nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden, welche beide an der Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit beteiligt sind.

1.2.1 Toleranz

Unter Toleranz versteht man die Abschwächung der akuten Wirkung eines Pharmakons nach seiner längerfristigen Verabreichung. Damit muss die Dosis ständig erhöht werden, um den ursprünglichen Effekt aufrecht zu erhalten (Collier, 1984). Auf zellulärer Ebene wird Toleranz gegenüber Opioiden hauptsächlich durch eine verminderte Sensibilität der Rezeptoren vermittelt (Desensibilisierung), die oftmals mit einer Abnahme der Oberflächenrezeptoren (Internalisierung) einhergeht (Johnson und Fleming, 1989). Unter physiologischen Bedingungen ist die Zahl der Oberflächenrezeptoren Ausdruck eines dynamischen Gleichgewichts zwischen kontinuierlich ablaufenden Mechanismen der Endozytose und des Recyclings von Rezeptoren (Szekeres et al., 1998), das nach längerfristiger Einwirkung eines Agonisten in Richtung Endozytose verschoben werden kann und zur Abnahme der Zahl von Oberflächenrezeptoren führt. Dieser als Rezeptorinternalisierung bezeichnete Prozess wurde ursprünglich am Beispiel des β_2 -Adrenozeptors studiert und nachfolgend auf andere G-Protein gekoppelte Rezeptoren übertragen (Ferguson et al., 1996a; Hausdorff et al., 1990). Für Opioidrezeptoren zeigten sich dabei bedeutende Unterschiede im Internalisierungsverhalten der einzelnen Rezeptortypen. Während δ -Opioidrezeptoren und κ -Rezeptoren des Menschen

1. Einleitung

bereits nach kurzzeitiger Agonistexposition mit einer ausgeprägten Internalisierung antworten (Li et al., 1999; Zhang et al., 1999), führt eine längerfristige Aktivierung von μ -Opioidrezeptoren und κ -Rezeptoren der Ratte selbst mit hoch effizienten Liganden nur zu einer geringfügigen Abnahme an Oberflächenrezeptoren (Koch et al., 1998; Zhang et al., 2002). Darüber hinaus können verschiedene Agonisten am gleichen Rezeptor eine unterschiedliche starke Internalisierung des Rezeptors auslösen. So besitzen z.B. Etorphin und Opioidpeptide eine ausgeprägte intrinsische Aktivität den δ - und μ -Rezeptor zu internalisieren, während Morphin die Rezeptoren lediglich aktivieren aber nicht desensibilisieren und internalisieren kann (Keith et al., 1996; Whistler und von Zastrow, 1998; Eisinger et al., 2002). Somit nimmt Morphin eine Sonderstellung ein, die neben der Rezeptordesensibilisierung auf die Existenz weiterer alternativer zellulärer Mechanismen der Toleranzentstehung schließen lässt (Whistler et al., 1999). Die wesentlichen an der Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung beteiligten Schritte werden nachfolgend am Beispiel des δ -Opioidrezeptors beschrieben (Abb. 3).

1.2.1.1 Rezeptorphosphorylierung

Die Bindung eines Agonisten an den δ -Opioidrezeptor führt zur Aktivierung und Dissoziation seiner assoziierten G-Proteine. Die aktivierte Rezeptorkonformation wird dadurch zugänglich für spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), die eine schnelle Phosphorylierung des δ -Opioidrezeptors an definierten Serin- (Ser 363) und Threoninresten (Thr 358) im Bereich des dritten intrazellulären Loops und des C-Terminus bewirken (Kouhen et al., 2000). Von den Rezeptorkinasen sind derzeit sind 6 verschiedene Isoformen bekannt (Pitcher et al., 1998), wobei GRK2 und 3 an der Phosphorylierung des δ -Opioidrezeptors maßgeblich beteiligt sind (Pei et al., 1995; Guo et al., 2000; Lowe et al., 2002). Die Umverteilung der primär zytosolischen Proteine hin zur Zellmembran wird über eine so genannte *Pleckstrin homologe* (PH) Domäne vermittelt, die an freie $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten aktivierter G-Proteine bindet (Touhara et al., 1994). Der phosphorylierte Rezeptor koppelt von seinen nachgeschalteten G-Proteinen ab,

1. Einleitung

wodurch einerseits die Signalweiterleitung unterbrochen und andererseits der Rezeptor als Substrat für weitere regulatorische Schritte zugänglich wird.

1.2.1.2 Rezeptorendozytose

Der aktivierte und phosphorylierte δ -Opioidrezeptor rekrutiert weitere zytosolische Proteine an die Plasmamembran, β -Arrestin 1 und 2, die den Rezeptor über Vermittlung mit dem Adapterprotein AP2 an Clathrin reiche Membrandomänen anlagern (Ferguson et al., 1996b; Koo et al., 1997; Lowe et al., 2002). Daraufhin bilden sich spezielle Membranausbuchtungen aus, die so genannten „clathrin coated pits“, die sich mit Hilfe eines weiteren zytosolischen Proteins, dem Dynamin, von der Plasmamembran abschnüren und als frühe Endosomen in das Zellinnere transportiert werden (Goodman et al., 1996; Chu et al., 1997).

1.2.1.3 Rezeptorrecycling und -degradation

In den frühen Endosomen entscheidet sich das weitere Schicksal der endozytierten δ -Opioidrezeptoren. Bei kurzzeitiger Agonisteinwirkung werden die Rezeptoren aufgrund des sich in den frühen Endosomen einstellenden Abfalls des pH-Wertes und der damit einher gehenden Konformationsänderung von sauren Phosphatasen dephosphoryliert (Pitcher et al., 1995). Die Rezeptoren können darauf hin in so genannten „recycling endosomes“ wieder zur Plasmamembran zurückgebracht werden (Rezeptorrecycling), wodurch eine Resensibilisierung der Rezeptorfunktion erfolgt (Trapaidze et al., 2000). Hält der Stimulus dagegen länger an, können spezielle „sorting proteins“ an den zytosolisch zugänglichen C-Terminus des δ -Opioidrezeptors binden (Ko et al., 1999; Whistler et al., 2002). Diese vermitteln die Verschmelzung der Endosomen mit Lysosomen zu so genannten Endolysosomen, in denen die Rezeptoren schließlich durch lysosomale Proteasen degradiert werden (Sibley et al., 1986; Tanowitz und von Zastrow, 2003).

1. Einleitung

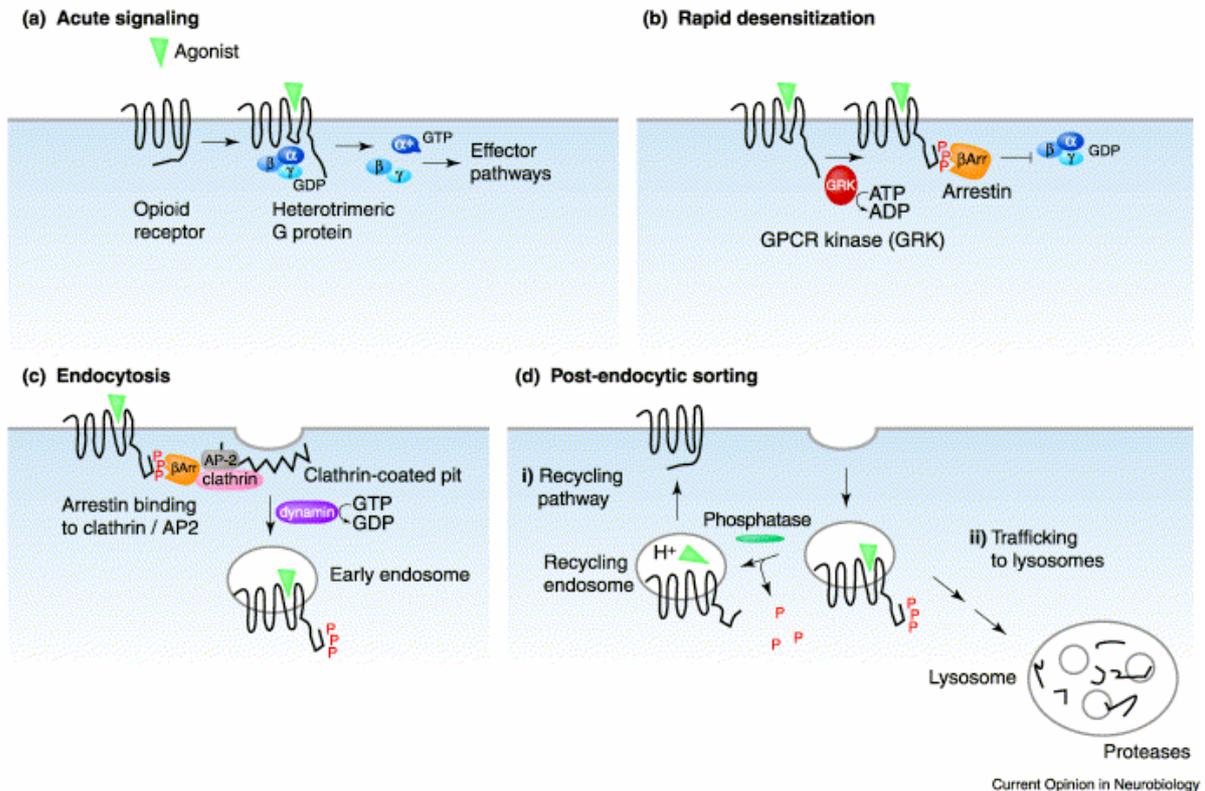


Abb. 3: Mechanismus der Agonist vermittelten Desensibilisierung und Internalisierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (von Zastrow et al., 2003).

1.2.2 Abhängigkeit

Die Eigenschaft von Morphin die Rezeptorinternalisierung zu umgehen resultiert in einer permanenten inhibitorischen Signaltransduktion, die zur Ausbildung kompensatorischer Adaptationen auf intrazellulärer Ebene führt (Wang et al., 2003). Diese sind einerseits an der Entstehung von Toleranz gegenüber Morphin beteiligt, andererseits gehen sie mit der Ausbildung von Abhängigkeit einher (Whistler und von Zastrow, 1998; Taylor und Fleming, 2001; Williams et al., 2001). Das am besten studierte zelluläre Korrelat für Abhängigkeit stellt die Sensibilisierung der Adenylylzyklase dar, die sich nach dem Entzug des Opioids in einer überschießenden cAMP-Produktion manifestiert (Thomas und Hoffman, 1987;

1. Einleitung

Johnston und Watts, 2003). Dieses auch als Supersensitivität der Adenylylzyklase bezeichnete Phänomen wurde ursprünglich an δ -Opioidrezeptor tragenden Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) Hybridzellen beobachtet (Sharma et al., 1975) und in der Folge für eine Vielzahl inhibitorischer Rezeptoren (α_2 -Adrenozeptoren, CB₁ Cannabinoidrezeptoren, muskarinerge Acetylcholinrezeptoren) beschrieben (Thomas und Hoffman, 1996; Nevo et al., 1998; Rhee et al., 2000). Die Adaptation auf Ebene der Adenylylzyklase wird durch eine kontinuierliche Hemmung G_i α regulierter Isoformen ausgelöst (AC I, V, VI und VIII) und kann durch Unterbrechung der Signalkaskade mit Pertussis Toxin bzw. Blockade der Reassoziaton heterotrimerer G-Proteine durch Komplexierung freier G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten verhindert werden (Avidor-Reiss et al., 1996 und 1997; Ammer und Christ, 2002; Sunahara und Taussig, 2002). Dagegen ist der Mechanismus der überschießenden cAMP-Produktion nach Opioidenzug noch weitgehend unbekannt. Diskutiert werden eine verstärkte Bindung aktivierter G_s α - Untereinheiten an die Adenylylzyklase (Ammer und Schulz, 1995, 1996, 1998), eine verstärkte Expression von AC I und VIII (Matsuoka et al., 1994; Nestler und Aghajanian, 1997) sowie eine veränderte Kopplung inhibitorischer Opioidrezeptoren an stimulatorische Signalkaskaden im Stadium der Abhängigkeit (Szücs et al., 2004). Die Erhöhung intrazellulärer cAMP-Konzentrationen greift über die Expression cAMP regulierter Transkriptionsfaktoren (cAMP response element binding protein; CREB) in die Genregulation ein und trägt so zur Ausbildung von Langzeiteffekten nach chronischer Opioidexposition bei (Lane-Ladd et al., 1997; Nestler und Aghajanian, 1997).

Neben der Adenylylzyklase wurden in jüngster Zeit weitere chronisch Morphin induzierte Adaptationen auf Ebene der den Opioidrezeptoren nachgeschalteten Signalmechanismen identifiziert. Diese betreffen sowohl Phospholipase C vermittelte Stoffwechselwege als auch eine veränderte Phosphorylierung intrazellulärer Signalproteine (Chakrabarti et al., 2001; 2003). So kann eine chronische Morphinbehandlung durch Phosphorylierung der G _{β} -Untereinheit in den G-Proteinzyklus und von GRK2 in den Mechanismus der Rezeptorinternalisierung

1. Einleitung

eingreifen. An HEK293 und NG108-15 Zellen konnte in der Tat kürzlich eine Blockade der Agonist vermittelten Rezeptorinternalisierung nach einer chronischen Morphinbehandlung gezeigt werden, die als weiteres zelluläres Korrelat für Abhängigkeit interpretiert wurde (Eisinger et al., 2002).

1.2.3 Hypersensibilisierung

Neben der Ausbildung von Toleranz können auf Rezeptorebene auch gegenteilige Adaptationsphänomene in Folge einer chronischen Opioidexposition ausgelöst werden. So wurde in Morphin abhängigen Ratten eine paradoxe Sensibilisierung der LH- und Prolaktinantwort auf Naloxon beschrieben (Almeida et al., 1985). Des weiteren kann nach wiederholter, systemischer Gabe von Opioiden ein vermehrtes Schmerzempfinden gegenüber mechanischen und thermischen Reizen beobachtet werden (Célèrier et al, 2000). Dieses als Hyperalgesie oder Allodynie bezeichnete Phänomen wird als eine mögliche Form der Gegenregulierung zu Toleranz interpretiert und durch vermehrte Aktivierung spinaler N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren vermittelt (Woolf und Thompson, 1991; Koppert, 2004). Die Wechselwirkung zwischen NMDA und Opioidrezeptoren wird durch eine gesteigerte Aktivität der PKC nach chronischer Opioidbehandlung erklärt (Célèrier et al., 2000; Guo et al., 2002).

1.3 Fragestellung

Die chronische Aktivierung von Opioidrezeptoren mit Morphin führt zur Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit, die im Vergleich zu hoch effizienten Agonisten ohne Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors einhergeht. Vielmehr provoziert die uneingeschränkte inhibitorische Signaltransduktion kompensatorische Adaptationen auf Ebene der den Rezeptoren nachgeschalteten intrazellulären Signalmechanismen, die einerseits der akuten Opioidwirkung entgegenwirken und andererseits mit dem Stadium der Abhängigkeit assoziiert werden. Die Sensibilisierung der Adenylylzyklase stellt den bisher einzigen zellulären Marker der

1. Einleitung

Abhängigkeit dar, neuere Untersuchungen weisen jedoch auf mögliche zusätzliche Adaptationen in den Mechanismen der Rezeptorregulation hin.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb zu untersuchen, ob die chronische Morphinbehandlung zu Adaptationen in der Agonist vermittelten Desensibilisierung und Internalisierung von Opioidrezeptoren führt. Folgende Aspekte waren dabei von besonderem Interesse:

- Geht die chronische Morphinbehandlung mit einer Abschwächung oder Verstärkung der Agonist induzierten Rezeptorinternalisierung einher?
- Sind die Adaptationen in der Rezeptorregulation an eine Sensibilisierung der Adenylylzyklase gebunden?
- Wie greift die chronische Morphinbehandlung in die Mechanismen der Rezeptorregulation ein?
- Welches Rezeptor assoziierte Signal vermittelt die Induktion zellulärer Adaptationen nach chronischer Morphinbehandlung?
- Beruht die Regulation der Rezeptorfunktion und die Sensibilisierung der Adenylylzyklase nach chronischer Morphinbehandlung auf identischen intrazellulären Adaptationen?

2. Material und Methoden

2.1 Zellmodell

Der Einfluss von Adenylylzyklasen auf die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung wurde an COS-7 Zellen untersucht. Hierbei handelt es sich um eine mit dem Simian Virus 40 (SV40) transformierte permanente Nierenzellkultur der grünen Meerkatze (*Cercopithecus aethiops*), die durch stabile Expression des Tumorantigens (*T-Antigen*) zur episomalen Replikation von Plasmiden mit einem entsprechenden Promotor (*SV40 origin*) befähigt sind (Gluzman, 1981). COS-7 Zellen stellen daher ein klassisches Zellmodell zur transienten Überexpression von Proteinen dar (Watson et al., 1993). Sie eignen sich insbesondere für funktionelle Studien der Adenylylzyklase, da sie nur über eine einzige endogene Isoform der Adenylylzyklase verfügen (*ACIX*), die zudem nicht über inhibitorische G-Proteine regulierbar ist (Premont, 1994). Die Untersuchungen zur Regulation der Rezeptorfunktion wurden am Modell des δ -Opioidrezeptors durchgeführt, der nach kurzzeitiger Agonistexposition einer ausgeprägten Internalisierung unterliegt (Belcheva et al., 1992).

2.2 Verwendete Plasmide

Zur Gewährleistung vergleichbarer Transfektionsbedingung wurden alle cDNAs in einen einheitlichen Expressionsvektor (Plasmid pcDNA3.1(+); Fa. Invitrogen) subkloniert. Folgende Konstrukte wurden verwendet:

- δ -Opioidrezeptor (Yasuda et al., 1993): DORpcDNA3.1(+)
- Adenylylzyklase Typ V (Wallach et al., 1994): ACVpcDNA3.1(+)
- C₁-Fragment der ACV (Ammer; unveröffentlicht): ACV-C1-pcDNA3.1(+)
- Adenylylzyklase Typ VI (Krupinski et al., 1992) ACVIpcDNA3.1(+)
- Adenylylzyklase Typ II (Feinstein et al., 1991) ACIIpcDNA3.1(+)

2. Material und Methoden

Von den cDNAs des δ -Opioidrezeptors, der ACV und des C₁-Fragments der ACV wurden ebenfalls Hämagglutinin (*HA*)-markierte Konstrukte hergestellt und in den Vektor pcDNA3.1(+) eingebracht (HA-DORpcDNA3.1(+); HA-ACVpcDNA3.1(+) und HA-ACV-C₁-pcDNA3.1(+)). Die exprimierten Proteine konnten mittels eines gegen das HA-Epitop gerichteten Antikörpers im Westernblot dargestellt werden.

2.3 Kultivierung der Zellen

Alle in der Zellkultur verwendeten Plastikgefäße wurden von der Firma TPP[®] bezogen. Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von der Fa. Sigma-Aldrich bezogen (siehe Anhang).

2.3.1 Materialien

Wachstumsmedium:

500 ml	Dulbecco`s Modifiziertes Eagle Medium (<i>DMEM</i> ; Fa. PAA)
10 % (v/v)	Fötale Kälberserum (<i>FKS</i> ; Fa. PAA), inaktiviert (65°C/30 min)
4 mM	L-Glutamin (Fa. PAA)
100 IU/ml	Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (Fa. PAA)
3 µg/ml	Enrofloxacin (Fa. ICN Biochemicals)

Einfriermedium:

Wachstumsmedium mit 20 % (v/v) *FKS*

10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (*DMSO*)

Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (*PBS*):

8 g	NaCl
0,2 g	KCl

2. Material und Methoden

2,145 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
0,2 g KH_2PO_4
 ad 1 L Aqua bidest.; pH 7,43

PBS/EDTA:

0,04 % (m/v) Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) in PBS; pH 7,43

Trypsin/EDTA-Lösung:

0,05 % (m/v) Trypsin
0,02 % (m/v) EDTA in PBS; pH 7,43

2.3.2 Durchführung

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter sterilen Bedingungen im Laminar Flow (Modell 6.12 S; Fa. BDK). COS-7 Zellen wurden als Monolayer im Brutschrank (Fa. Heraeus) bei 37°C und einer Atmosphäre bestehend aus 5 % (v/v) CO_2 in Luft und gesättigtem Wasserdampf kultiviert. Die Zellen wurden routinemäßig zwei bis drei mal pro Woche nach Trypsinbehandlung im Verhältnis von 1/5 bis 1/10 passagiert. Hierzu wurde das Wachstumsmedium abgesaugt, die Zellen 1 x mit warmen PBS/EDTA gewaschen und anschließend durch Zugabe von 1 ml Trypsin/EDTA-Lösung und Inkubation für 1-2 min im Brutschrank abgelöst. Das Trypsin wurde durch Zugabe von Wachstumsmedium inaktiviert, die Zellen von ihrer Unterlage abgespült und nachfolgend im gewünschten Verdünnungsverhältnis auf Petrischalen oder Zellkulturflaschen überführt.

Da bei COS-7 Zellen mit fortschreitender Passagierung die Transfektionseffizienz nachlässt, wurde zur Beginn der Arbeit ein größerer Stock von COS-7 Zellen in flüssigem Stickstoff angelegt. Hierzu wurden die Zellen von ihrer Unterlage abgelöst, bei 4°C und 300 x g pelletiert und in 1 ml eiskaltem Einfriermedium

2. Material und Methoden

resuspendiert. Die Zellen wurden in ein Einfrierröhrchen überführt, in der Styroporbox bei -70°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Aus diesem Stock konnten bei Bedarf neue Zellen aufgetaut werden. Nach Entnahme eines Aliquots aus dem flüssigen Stickstoff wurden die Zellen in 10 ml eiskaltem Wachstumsmedium resuspendiert und durch anschließende Zentrifugation in der Minifuge (Fa. Heraeus; 4°C ; 300 x g) von Resten des Einfriermediums befreit. Die Zellen wurden in 37°C warmen Wachstumsmedium aufgenommen, auf Zellkulturflaschen ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert.

2.4 Transiente Expression von Plasmid-DNA in COS-7 Zellen

2.4.1 Gewinnung und Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

In Bakterien vermehrte Plasmide können mit Hilfe der alkalischen Extraktionsmethode isoliert werden (Birnboim und Doly, 1979). Dabei werden die Bakterien durch die Anwesenheit von SDS lysiert und die DNA denaturiert. Durch Zugabe von Kaliumacetat wird die chromosomale DNA zusammen mit denaturierten Proteinen gefällt. Die doppelsträngige Plasmid-DNA wird nach Abzentrifugation des Präzipitats im Überstand isoliert, mit Isopropanol gefällt und in Aqua bidest. aufgenommen. Die Ausbeute und Reinheit der Plasmid-DNA kann anschließend photometrisch bei $\lambda = 260/280 \text{ nm}$ bestimmt werden.

2.4.1.1 Materialien

Luria-Bertani Medium (LB-Medium):

20 g LB Broth Base
 ad 1 L Aqua bidest.; autoklaviert

2. Material und Methoden

NucleoBond[®] Puffer (Fa. Macherey-Nagel):

Puffer S1:

50 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)/HCl
10mM EDTA
100 µg/ml RNase A
in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 8,0

Puffer S2:

280 mM NaOH
1 % (m/v) SDS
in Aqua bidest.

Puffer S3:

2,8 M Kaliumacetat
in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 5,1

Puffer N2:

100 mM Tris/H₃PO₄
15 % (v/v) Ethanol
900 mM KCl
0,15 % (m/v) t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (*Triton-X-100*)
in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 6,3

Puffer N3:

100 mM Tris/ H₃PO₄
15 % (v/v) Ethanol

2. Material und Methoden

1,15 M KCl
 in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 6,3

Puffer N5:

100 mM Tris/H₃PO₄
15 % (v/v) Ethanol
1 M KCl
 in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 8,5

2.4.1.2 Durchführung

Von jedem Plasmid wurden transformierte *E. coli* als Stock in Glycerol bei -70°C aufbewahrt. Mit einer autoklavierten Pipettenspitze wurde eine kleine Menge an Bakterien entnommen, in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (50 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C unter starkem Schütteln inkubiert. Als Negativkontrolle wurde LB-Medium mit Ampicillin aber ohne Bakterienzusatz kultiviert. Von den Bakterienkulturen wurden jeweils 50 µl steril entnommen, in einen Erlenmeyerkolben mit 250 ml LB-Medium und Ampicillinzusatz (50 µg/ml) transferiert und wiederum über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Bakterienkultur wurde auf 4°C gekühlt und für 15 min bei 6.000 x g im GSA-Rotor pelletiert (Sorvall® RC-5; Fa. DuPont Instruments). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien in 12 ml *Puffer S1* vorsichtig resuspendiert. Die Bakterien wurden nach Zusatz von 12 ml *Puffer S2* für 5 min bei Raumtemperatur lysiert und die Proteine sowie chromosomale DNA durch Zugabe von *Puffer S3* innerhalb von 5 min gefällt. Die Plasmid-DNA wurde nach 2-maliger Zentrifugation im SS34-Rotor (12.000 x g; 20 min; 4 °C) aus dem Überstand isoliert und durch Säulenchromatografie (NucleoBond® AX500; Fa. Macherey-Nagel) aufgereinigt. Hierzu wurde der Anionenaustauscher mit 6,0 ml *Puffer N2* equilibriert, der oben gewonnene Überstand auf die Säule aufgetragen und die nicht gebundenen Anteile mit 32 ml

2. Material und Methoden

Puffer N3 ausgewaschen. Die Plasmid-DNA konnte anschließend mit 15 ml *Puffer N5* eluiert und mit 11 ml Isopropanol gefällt werden. Das DNA-Pellet wurde einmal mit 5 ml 70 %-igem Ethanol gewaschen, eingetrocknet und schließlich in 500 µl sterilem Aqua bidest. aufgenommen. Die Plasmide wurden in 50 µl Aliquots bei -20°C gelagert.

Die Ausbeute an Plasmid-DNA wurde im Spektrophotometer (Modell U 3200; Fa. Hitachi Instruments) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm in Quarzküvetten mit 1 cm Schichtdicke bestimmt. Eine optische Dichte (*OD*) von 1 entspricht dabei einer DNA Konzentration von 50 µg/ml.

Die Reinheit der Plasmidpräparationen wurde gleichzeitig durch Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und der Bildung des Quotienten aus $OD\ 260 / OD\ 280$ abgeschätzt. Nur Präparationen mit einem Quotienten $> 1,8$ wurden zur Transfektion verwendet.

2.4.2 Restriktionsverdau

Die Identität der verwendeten Plasmide wurde durch Restriktionsverdau mit Hilfe geeigneter Endonukleasen verifiziert. Die Restriktionsenzyme wurden so gewählt, dass für jede cDNA ein charakteristisches Fragmentmuster erzeugt wurde. Die DNA-Fragmente wurden nachfolgend durch Agarose-Gelelektrophorese ihrer Länge nach aufgetrennt.

2.4.2.1 Materialien

Restriktionsenzyme (10 U/µl; Fa. Promega)

Reaktionspuffer (*Puffer H*; 10 x konzentriert; Fa. Promega)

2. Material und Methoden

2.4.2.2 Durchführung

2 µl Reaktionspuffer, 1 U Enzym und 1 µg Plasmid-DNA wurde mit sterilem Aqua bidest. auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. Zur Überprüfung der Enzymaktivität wurde ein Kontrollplasmid mit bekanntem Restriktionsmuster mit angesetzt (Positivkontrolle). Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C im Personal Cycler (Fa. Biometra) inkubiert.

2.4.3 Agarose-Gelelektrophorese

Im Agarosegel kann DNA durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe aufgetrennt werden. Die Detektion der DNA erfolgt nach Anfärben mittels Ethidiumbromid im UV Licht. Die Größenbestimmung der DNA-Fragmente erfolgt anhand eines Längenstandards.

2.4.3.1 Materialien

Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer):

40 mM	Tris/HCl
2 mM	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O
	in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 8,5 mit Essigsäure

1 % (m/v) Agarosegel:

0,3 mg	Agarose
0,25 µg	Ethidiumbromid
	in 30 ml TAE-Puffer gelöst

2. Material und Methoden

2.4.3.2 Durchführung

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurde eine Mini-Gelelektrophorese Kammer (Modell B1A; Fa. Peqlab) verwendet. Als Laufmittel diente TAE-Puffer. Jeder Restriktionsansatz wurde mit 4 µl Auftragspuffer (6 x Loading Dye Solution; Fa. MBI Fermentas) versetzt und 20 µl davon in die Probestaschen des Gels pipettiert. Als Längenstandard diente eine DNA-Leiter (GeneRuler™; Fa. MBI Fermentas). Die Auftrennung der Fragmente erfolgte für 1 h bei einer Stromstärke von 70 mA. Anschließend wurde das Gel im Videodensitometer unter UV Licht (Modell E.A.S.Y. RH-3 ; Fa. Herolab) ausgewertet.

2.4.4 Transfektion von COS-7 Zellen

Als Transfektion wird das Einbringen fremder DNA in Säugerzellen mit Hilfe geeigneter Vektoren bezeichnet. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Calciumphosphat Co-Präzipitation basiert auf der Bildung unlöslicher Komplexe aus Calcium und Phosphatresten der DNA, die durch Endozytose von den Zellen aufgenommen werden (Chen und Okayama, 1987). Durch die Fähigkeit zur episomalen Replikation von Plasmiden stellen COS-7 Zellen ein klassisches transientes Expressionssystem dar, die für jeden Versuch gesondert transfiziert werden müssen.

2.4.4.1 Materialien

Calciumchlorid-Lösung (CaCl_2 -Lösung):

3,68 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
 in 10 ml Aqua bidest.; steril filtriert

2. Material und Methoden

Transfektionspuffer (BBS):

0,819 g	NaCl
0,02 g	Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O
0,533 g	N'N-bis-Aminoethansulfonsäure (BES)

in 50 ml Aqua bidest.; eingestellt auf pH 6,95; steril filtriert

2.4.4.2 Durchführung

Zur Transfektion wurden COS-7 Zellen auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert und bei ca. 70 % Konfluenz für die Versuche verwendet. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch 10 ml frisches Wachstumsmedium ersetzt. Die Transfektionsansätze wurden wie folgt vorbereitet: In ein Polypropylenröhrchen (*Lösung A*) wurde eine Gesamtmenge von 10 µg Plasmid-DNA in 450 µl Aqua bidest. gelöst und im Anschluss daran tropfenweise 50 µl CaCl₂ Lösung unter leichtem Mischen zugesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend unter leichtem Schütteln zu 500 µl BBS (*Röhrchen B*) gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde gemischt, auf die Zellen getropft und diese über Nacht inkubiert.

2.5 Behandlung der Zellen mit Opioiden

2.5.1 Verwendete Substanzen

Morphin-HCl (Fa. Merck)

[D-Ala², D-Leu⁵]Enkephalin (*DADLE*; Fa. Bachem)

Naloxon-HCl (Fa. Merck)

2.5.2 Durchführung

Am Tag nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen, gepoolt und in einem

2. Material und Methoden

Verhältnis von 1/3 auf neue Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert. Zugleich wurde dem Wachstumsmedium zur Induktion von Toleranz und Abhängigkeit 1 μM Morphin aus einer 100 x Stammlösung zugegeben und die Zellen für weitere 48 h inkubiert (Avidor-Reiss et al., 1996). Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach Ablauf der chronischen Vorbehandlung musste das Morphin zunächst durch 3-maliges Waschen mit eiskaltem PBS entfernt werden. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit 37°C warmen 0,1 % (v/v) FKS-haltigem Wachstumsmedium aufgenommen, dem entweder wiederum Morphin oder DADLE (1 μM) zur Aufrechterhaltung von Toleranz und Abhängigkeit bzw. zur Induktion der Rezeptorinternalisierung zugesetzt wurde. Die Zellen wurden für 1 h bei 37°C im Brutschrank stimuliert bevor die Reaktion durch Abkühlen auf 4°C gestoppt wurde. Die Zellen wurden wiederum 3 x mit eiskaltem PBS gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Untergrund abgelöst, pelletiert (300 x g; 10 min) und zur Herstellung von Membranen verwendet.

2.6 Bestimmung von δ -Opioidrezeptoren

Die Bestimmung von Zelloberflächenrezeptoren erfolgte mittels Radioligandenbindung an isolierte Plasmamembranen (Vachon et al., 1987).

2.6.1 Membranpräparation

2.6.1.1 Materialien

Homogenisierungspuffer:

5 mM	Tris/HCl
1 mM	Ethylenglycol-bis- β -aminoethylether N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)
1 mM	Dithiothreitol (DTT; Fa. Gerbu) gelöst in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 7,4

2. Material und Methoden

Bindungspuffer:

50 mM Tris/HCl

5 mM MgCl₂

gelöst in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 7,4

2.6.1.2 Durchführung

Alle Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C im Eisbad. Das Zellpellet wurde in 10 ml Homogenisierungspuffer aufgenommen und für 10 sec homogenisiert (Polytron, Stufe 6; Fa. Bachofer). Nicht zerstörte Zellen sowie Zellkerne wurden durch anschließende Zentrifugation bei 300 x g für 10 min abgetrennt. Der Überstand wurde gewonnen und schwere Plasmamembranen durch Zentrifugation bei 30.000 x g für 30 min im SS34 Rotor (Sorvall®, Fa. DuPont Instruments) isoliert. Das Membranpellet wurde 1 x mit Homogenisierungspuffer gewaschen, in 2 ml Bindungspuffer aufgenommen und sofort für die Radioligandenbindung verwendet.

2.6.2 Radioligandenbindung

2.6.2.1 Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d)

2.6.2.1.1 Prinzip

Als Dissoziationskonstante (K_d) wird diejenige Konzentration eines Liganden bezeichnet, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind. Sie wird in Sättigungsexperimenten aus dem Verhältnis des gebundenen zum freien Anteil eines Radioliganden ermittelt. Bei konstanter Rezeptorzahl nähert sich der Anteil des gebundenen Radioliganden mit steigender Ligandenkonzentration in Form einer hyperbolen Funktion einem Plateau an, das der maximalen Bindungskapazität (B_{max}) entspricht. Die K_d dagegen ist als diejenige Radioligandenkonzentration definiert, bei der 50 % der Bindungsstellen besetzt sind.

2. Material und Methoden

Nach der Scatchard-Transformation kann aus jeder beliebigen Ligandenkonzentration auf die B_{max} geschlossen werden (Scatchard, 1949):

$$B_{max} = \frac{B_0 \times (L + K_d)}{L}$$

Legende:

B_{max} = Maximale Bindungskapazität

B_0 = spezifische Bindung

K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

L = Konzentration des Radioliganden

Aus einem Sättigungsexperiment können die Werte für B_{max} und K_d grafisch aus dem Scatchard-Plot abgeleitet werden. Hierzu wird das Verhältnis von gebundenem zu freiem Radioliganden in Form einer Geraden gegen den gebundenen Liganden aufgetragen. Die Schnittstelle der Geraden mit der x-Achse entspricht dem Wert für die B_{max} . Der negativ reziproke Wert der Steigung (s) entspricht der K_d .

Für die in dieser Arbeit verwendete Methode der Quantifizierung von Oberflächenrezeptoren durch 1-Punkt Messung war es notwendig, die K_d für ^3H -Diprenorphin am δ -Opioidrezeptor zu bestimmen. ^3H -Diprenorphin ist ein nicht selektiver Antagonist am δ -Opioidrezeptor mit hoher Affinität zu G-Protein gekoppelten und ungekoppelten Rezeptoren. Die Bestimmung der spezifischen Bindung erfolgt in Anwesenheit eines hohen molaren Überschusses an Naloxon, einem ebenfalls nicht selektiven Antagonisten am δ -Opioidrezeptor.

Die spezifische Bindung von ^3H -Diprenorphin am δ -Opioidrezeptor kann nach folgender Gleichung ermittelt werden:

$$B_0 = B_{total} - B_{unspec.}$$

2. Material und Methoden

Legende:

- B_0 = spezifische Bindung von ^3H -Diprenorphin
 B_{total} = Bindung von ^3H -Diprenorphin in Abwesenheit von Naloxon
 $B_{unspec.}$ = Bindung von ^3H -Diprenorphin in Anwesenheit von Naloxon

2.6.2.1.2 Materialien

^3H -Diprenorphin (spezifische Aktivität = 53 Ci/mmol; Fa. Amersham Biosciences)

Stammlösung: 16 nM in Bindungspuffer

Naloxon-HCl (Fa. Merck)

Stammlösung: 100 μM

Blocklösung für GF/B-Filter (Whatman[®]; Fa. VWR):

0,1 % (m/v) Polyethylenglycol 6000 (PEG; Fa. Merck), gelöst in Aqua bidest.

2.6.2.1.3 Durchführung

Jeder Messpunkt erfolgte in Doppelbestimmung. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 C im Eisbad durchgeführt.

Die Bestimmung der K_d für ^3H -Diprenorphin erfolgte an frisch präparierten Membranen von δ -Opioidrezeptor tragenden Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) Hybridzellen (Hamprecht et al., 1985). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit dem stabil in HEK293 oder transient in COS-7 Zellen exprimierten Konstrukt der in dieser Arbeit benutzten cDNA des δ -Opioidrezeptors der Ratte erzielt. Die Reaktionsansätze zur Erstellung der Sättigungskurven enthielten 8 verschiedene Konzentrationen an ^3H -Diprenorphin (0,25 bis 16 nM), 200 μg Membranprotein in einem Gesamtvolumen von 200 μl Bindungspuffer. Die unspezifische Bindung wurde in Anwesenheit von 10 μM Naloxon bestimmt. Die Bindungsansätze wurden gemischt und bis zum Erreichen eines Equilibriums im Wasserbad inkubiert (37°C; 45 min). Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem Bindungspuffer

2. Material und Methoden

gestoppt und das an den Plasmamembranen gebundene ^3H -Diprenorphin durch Filtration über Silikatglasfaserfilter (GF/B; Whatman[®]; Fa. VWR) mit Hilfe einer Vakuum Filtrationseinheit (Fa. Millipore) abgetrennt. Zur Absättigung der unspezifischen Bindung wurden die Glasfaserfilter zuvor mit PEG-Blocklösung benetzt. Die Filter wurden 3 x mit 3 ml eiskaltem Bindungspuffer gewaschen, in Zählfläschchen überführt (Minis[®] 2000; Fa. Zinsser Analytic) und mit je 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Rotiszint[®]EcoPlus; Fa. Roth) extrahiert. Die gebundene Radioaktivität wurde im Szintillationsmessgerät (Fa. Beckmann) bestimmt und zur Konstruktion der Sättigungskurven verwendet.

2.6.2.2 Bestimmung der Rezeptordichte (B_{max})

2.6.2.2.1 Prinzip

Mit der aus den Sättigungsexperimenten ermittelten K_d für ^3H -Diprenorphin am δ -Opioidrezeptor konnten diese durch 1-Punkt Messung und Transformation der gewonnenen spezifischen Bindung nach der Methode von Scatchard quantifiziert werden. Die verwendete Ligandenkonzentration liegt dabei im Bereich der K_d .

2.6.2.2.2 Materialien

^3H -Diprenorphin (spezifische Aktivität = 53 Ci/mmol; Fa. Amersham Biosciences)

Stammlösung: 16 nM in Bindungspuffer

Naloxon-HCl (Fa. Merck)

Stammlösung: 100 μM

Blocklösung für GF/B-Filter (Whatman[®]; Fa. VWR):

0,1 % (m/v) Polyethylenglycol 6000 (PEG; Fa. Merck), gelöst in Aqua bidest.

2. Material und Methoden

2.6.2.2.3 Durchführung

Zur Bestimmung der totalen Bindung enthielten die Reaktionsansätze ca. 1 nM ³H-Diprenorphin und 200 µg Membranprotein in einem Gesamtvolumen von 200 µl Bindungspuffer. Die unspezifische Bindung wurde durch Zusatz von 10 µM Naloxon zu den Ansätzen bestimmt. Die Bindungsansätze wurden gemischt, für 45 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und wie oben beschrieben weiter prozessiert. Jedes Experiment wurde an mindestens 3 verschiedenen Zellpräparationen in Doppelbestimmung durchgeführt.

2.6.3 Bestimmung hochaffiner δ-Opioidrezeptoren

2.6.3.1 Prinzip

Die Bestimmung funktionell an G-Proteine gekoppelter Rezeptoren wird in heterologen Verdrängungsexperimenten durchgeführt. Hierbei wird eine konstante Menge eines radioaktiv markierten Antagonisten (hier: ³H-Diprenorphin) durch steigende Konzentrationen eines Agonisten (Displacers) vom Rezeptor verdrängt. Da Agonisten eine höhere Affinität zur G-Protein gekoppelten als zur ungekoppelten Rezeptorkonformation aufweisen, stellt die ermittelte inhibitorische Konstante (K_i) ein Maß für den Anteil hochaffiner Rezeptoren an der Gesamtpopulation dar. Die K_i wird aus der halbmaximalen Hemmkonzentration des Displacers (IC_{50}) mit Hilfe der Formel nach Cheng-Prusoff (1973) bestimmt:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{(1 + L) / K_d}$$

Legende:

- K_i = Inhibitorische Konstante des Displacers
- IC_{50} = Halbmaximale Hemmkonzentration des Displacers
- L = Konzentration des Radioliganden
- K_d = Dissoziationskonstante des Radioliganden

2. Material und Methoden

2.6.3.2 Materialien

³H-Diprenorphin (spezifische Aktivität = 53 Ci/mmol; Fa. Amersham Biosciences)

Stammlösung: 16 nM in Bindungspuffer

Deltorphin II (Fa. Bachem)

Stammlösungen: 10e-10 bis 10e-5 M in Bindungspuffer

Blocklösung für GF/B-Filter (Whatman®; Fa. VWR):

0,1 % (m/v) Polyethylenglycol 6000 (PEG; Fa. Merck), gelöst in Aqua bidest.

2.6.3.3 Durchführung

Die Ansätze für heterologe Verdrängungskurven enthielten in einem Totalvolumen von 200 µl Homogenisierungspuffer ca. 1 nM ³H-Diprenorphin, 50 µg Membranprotein und aufsteigende Konzentrationen an Deltorphin II (10e-11 bis 10e-6M). Die totale ³H-Diprenorphinbindung wurde in Abwesenheit von Deltorphin II bestimmt. Die Reaktionsansätze wurden für 2 h bei 4°C inkubiert und wie oben beschrieben weiter prozessiert. Jedes Experiment wurde mindestens 3 x an unterschiedlichen Membranpräparationen in Doppelbestimmung wiederholt.

2.7 Proteinbestimmung nach Lowry

Die im Bindungsassay eingesetzte Proteinmenge wurde nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Das Prinzip beruht auf eine durch Tyrosin und Tryptophan vermittelte Reduktion von Cu²⁺ zu Cu¹⁺, die nachfolgend mit Folin-Reagenz einen tiefblauen Farbkomplex bilden.

2.7.1 Materialien

Kupfersulfat–Tartrat–Natriumcarbonat (CTC-Lösung):

2. Material und Methoden

0,1 % (m/v)	CuSO ₄ x 5 H ₂ O
0,2 % (m/v)	Na ⁺ /K ⁺ – Tartrat
10 % (m/v)	Na ₂ CO ₃
	gelöst in Aqua bidest.

Lowry A:

10 ml	CTC–Lösung
10 ml	0,8 M NaOH
20 ml	5 % (m/v) Natriumdodecylsulfat (<i>SDS</i>)

Lowry B:

1 ml	Folin Ciocalteu Phenol Reagenz (<i>Folin-Reagenz</i>) verdünnt in 5 ml Aqua bidest.
------	--

Standardkurve:

A :	Aqua bidest.	
B:	2,5 % (m/v)	bovines Serumalbumin (<i>BSA</i>)
C :	5 % (m/v)	BSA
D :	7,5 % (m/v)	BSA
E :	10 % (m/v)	BSA
	jeweils gelöst in Aqua bidest.	

2.7.2 Durchführung

Die Messung erfolgte jeweils in Doppelbestimmung. Die in jeweils 100 µl Aqua bidest. verdünnten Proben wurden mit 200 µl *Lowry A* für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jeweils 100 µl *Lowry B* zugesetzt,

2. Material und Methoden

die Ansätze gemischt und für weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bei den Standardlösungen wurde entsprechend verfahren. Die Farbintensität wurde anschließend im Spektrophotometer (U-3200; Fa. Hitachi) bei einer Wellenlänge von $\lambda = 750$ nm gemessen. Aus der Standardkurve wurden die Proteingehalte der Proben durch lineare Regression abgeleitet.

2.8 Intrazelluläre cAMP Akkumulation

2.8.1 Prinzip

Die Bestimmung der Aktivität der Adenylylzyklase erfolgte indirekt über die Quantifizierung des gebildeten Produktes zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat (*cAMP*). Nach Aktivierung von δ -Opioidrezeptoren wird in Abhängigkeit der anwesenden Isoformen der Adenylylzyklase die Synthese von *cAMP* entweder gehemmt oder stimuliert. Nach dem Abstoppen der Reaktion auf Eis und Ansäuerung des pH-Wertes diffundiert das gebildete *cAMP* in den Überstand und kann im ELISA bestimmt werden. In Anwesenheit eines Phosphodiesterasehemmers (3-Isobuthyl-1-methylxanthin; *IBMX*), der die hydrolytische Spaltung von *cAMP* blockiert, ist dabei die Menge des gebildeten *cAMP* proportional zur Aktivität der Adenylylzyklase.

2.8.2 Materialien

Inkubationsmedium:

25 mM	N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] (<i>HEPES</i>)
0,5 mM	<i>IBMX</i>
0,01 % (m/v)	<i>BSA</i>
	gelöst in DMEM ohne Natriumbicarbonat

2.8.3 Durchführung

Transient transfizierte COS-7 Zellen wurden in jeweils 1 ml DMEM auf eine 24-Well-Platte ausgesät und für 48 h entweder in Ab- oder Anwesenheit von Morphin zur Induktion von Toleranz und Abhängigkeit kultiviert. Zur Bestimmung der cAMP Akkumulation wurden die Zellen im Eisbad abgekühlt, 3 x mit PBS gewaschen und in jedes Well 250 µl Inkubationsmedium mit den entsprechenden Liganden pipettiert. Die cAMP Akkumulation wurde anschließend für 15 min bei 37 °C im Wasserbad bestimmt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Zellen auf 4°C und Zugabe von 750 µl 50 mM HCl abgestoppt. Die Platte wurden anschließend für 30 min im Eisbad inkubiert und der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von 39 µl 1 M NaOH pro Well auf pH 6,0 eingestellt. Anschließend wurden die Überstände abgenommen, die Zellen abzentrifugiert (300 x g; 10 min) und das gebildete cAMP im Überstand bestimmt.

2.9 Bestimmung von cAMP im ELISA

2.9.1 Prinzip

Das gebildete cAMP wurde im indirekten, kompetitiven ELISA bestimmt (Horton et al., 1992). Das System beruht auf den Prinzipien der Antigen-Antikörperbindung. Dabei stellt cAMP das Antigen dar, das von einem spezifischen (ersten) Antikörper gebunden wird. Der Antigen-Antikörper-Komplex wiederum wird von einem immobilisierten, gegen den ersten Antikörper gerichteten zweiten Antikörper gebunden. Die Sichtbarmachung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgt mit Hilfe einer enzymatischen Farbreaktion. Dazu wird mit Meerrettich-Peroxidase konjugiertes cAMP zugegeben, das mit dem in der Probe befindlichen cAMP um die Bindung am ersten Antikörper konkurriert. Die Menge des gebundenen Meerrettich-Peroxidase gekoppelten cAMP wird mit einem geeigneten Substrat bestimmt. Die Farbreaktion kann im Photometer gemessen und der Gehalt an cAMP der Proben durch Vergleich mit einer Standardkurve bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.9.2 Materialien

Beschichtungspuffer (Carbonatpuffer):

1,59 g Na_2CO_3
2,93 g NaHCO_3
gelöst in 1 L Aqua bidest.; pH 9,4

Blockpuffer:

0,1 % (m/v) BSA
gelöst in PBS; pH 7,4

Waschpuffer (Phosphatpuffer):

50 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 / \text{NaH}_2\text{PO}_4$ in Aqua bidest. gelöst; pH 7,4
0,01 % (v/v) Tween 20

Probenpuffer:

50 mM NaAcetat
0,1 % (m/v) BSA
in Aqua bidest. gelöst; auf pH 6,0 eingestellt

Standardlösungen:

cAMP-Stammlösung: 10 μM in Probenpuffer
Standard B: 1/10-Verdünnung aus cAMP-Stammlösung
Standard C: 1/5-Verdünnung aus Standard B
Standard D: 1/5-Verdünnung aus Standard C
Standard E: 1/5-Verdünnung aus Standard D
Standard F: 1/5-Verdünnung aus Standard E

2. Material und Methoden

Standard G: 1/5-Verdünnung aus Standard F

Standard H: 1/5-Verdünnung aus Standard G
jeweils in Probenpuffer verdünnt

Konjugatlösung:

2-O-succinyl-cAMP gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase, 1/700 in Probenpuffer

Substratlösung:

Lösung A:

1 g Wasserstoffperoxid-Harnstoff
18 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$
10,3 g Citronensäure x 1 H_2O
gelöst in 1 L Aqua bidest.

Lösung B:

500 mg Tetramethylbenzidin (*TMB*)
40 ml Dimethylsulfoxid (*DMSO*)
10,3 g Citronensäure x 1 H_2O
gelöst in 960 ml Aqua bidest.

Beide Lösungen wurden bei 4°C gelagert. Die fertige Substratlösung wurde kurz vor Gebrauch im Verhältnis 1/1 hergestellt.

2.9.3 Durchführung

Für den ELISA wurden 96-Well-Mikrotiterplatten (Maxisorb®; Fa. Nunc) verwendet. Vor Gebrauch wurden die Platten mit 50 µl Antikörperlösung beladen (10 µg

2. Material und Methoden

affinitätsgereinigtes anti-Kaninchen-IgG pro ml Beschichtungspuffer) und eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3 x mit Phosphatpuffer gewaschen, ausgeklopft und durch Zugabe von 200 µl/Well Blockpuffer für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Die Platten wurden 3 x mit Phosphatpuffer gewaschen und 50 µl/Well des ersten Antikörpers aufgetragen (Kaninchen anti-cAMP; 1/7.000 mit Probenpuffer). Die ersten drei Wells der Reihe A wurden davon ausgenommen, sie wurden zur Ermittlung der unspezifischen Bindung (NSB-Wert) herangezogen. In die ersten drei Wells der Reihen B bis H wurden jeweils 100 µl der entsprechenden Standardlösungen zugegeben. In die verbliebenen Wells der Mikrotiterplatte wurden jeweils in Dreifachbestimmung 100 µl der zu bestimmenden Proben aufgetragen, welche vorher mit Probenpuffer im Verhältnis 1/2 verdünnt wurden. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden lang bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Abschließend wurde noch in jedes Well 50 µl der Konjugatlösung (1/700 in Probenpuffer) gegeben und die Platten über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Platte 5 x mit Phosphatpuffer gewaschen, ausgeschlagen und mit 150 µl/Well Substratlösung versetzt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 50 µl/Well 1 M HCl Lösung gestoppt und die Farbintensität bei einer Wellenlänge von $\lambda = 450 \text{ nm}$ im Mikro-ELISA-Reader (Rainbow Spectra; Fa. Tecan) bestimmt.

2.10 Bestimmung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAP-Kinase)

2.10.1 Prinzip

Die extrazellulär Signal-regulierten Kinasen ERK-1 und-2 werden nach Stimulation eines Opioidrezeptors durch Phosphorylierung aktiviert (Koch et al., 1994). Nach Lyse der Zellen können die aktivierten MAP-Kinasen mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers im Westernblot bestimmt werden.

2. Material und Methoden

2.10.2 Materialien

Probenpuffer:

62,5 mM	Tris/HCl-Lösung, eingestellt auf pH 6,8
50 mM	DTT
2 % (m/v)	SDS
10 % (v/v)	Glycerol
0,1 % (m/v)	Bromphenolblau

2.10.3 Durchführung

Zur Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität wurden transient transfizierte COS-7 Zellen auf eine 12-Well-Platte ausgesät und für 48 h in Ab- oder Anwesenheit von Morphin kultiviert. Für den Versuch wurden die Platten auf Eis gelegt, das Wachstumsmedium abgesaugt und jeweils 1 ml 0,1 % (v/v) FKS-haltiges DMEM mit den entsprechenden Liganden zugegeben. Die Agonist vermittelte Stimulation der MAP-Kinase wurde für 5 min bei 37°C im Wasserbad bestimmt. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Zellen auf 4°C (Eisbad) gestoppt, das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von jeweils 250 µl Probenpuffer lysiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 95°C erhitzt, abgekühlt und die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.11 Umverteilung von GRK2 und β -Arrestin 1

2.11.1 Prinzip

Durch Aktivierung eines Opioidrezeptors werden zytosolische Proteine wie G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen und Arrestine zur Plasmamembran hin umverteilt (Inglese et al., 1993; Ferguson et al., 1996a und b). Nach Präparation von Plasmamembranen können diese im Westernblot dargestellt werden.

2. Material und Methoden

2.11.2 Durchführung

Transient transfizierte COS-7 Zellen wurden in Petrischalen mit 10 cm Durchmesser kultiviert und für 5 min mit den entsprechenden Liganden bei 37°C stimuliert. Die Reaktion wurde durch Abkühlen der Zellen auf 4°C gestoppt und Plasmamembranen wie oben beschrieben präpariert. Um Proteindegradation zu verhindern, wurden dem Homogenisierungspuffer Proteasehemmer zugegeben (Benzamidin, 1 mM; Phenylmethylsulfonylfluorid, 0,1 mM; Complete™, Fa. Boehringer Mannheim, 1 Tablette/50 ml). Die Proteine wurden mit Azeton gefällt, in einer Konzentration von 50 µg/10 µl in Probenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen und zur Bestimmung der Proteine im Westernblot verwendet.

2.12 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

2.12.1 Prinzip

In der SDS-PAGE können Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Werden die Proteine anschließend elektrophoretisch auf Membranen transferiert, so können diese mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden (Westernblot). Dieses Verfahren wurde zur Überprüfung der Expression HA-markierter Proteine (δ -Opioidrezeptor, Adenylylzyklasen), der Phosphorylierung von MAP-Kinasen (ERK-1, -2) sowie der Umverteilung von GRK2 und β -Arrestin 1 verwendet.

2.12.2 Materialien

SDS-Polyacrylamidgele:

Trenngel:

5 ml	30 % (m/v) Polyacrylamid (PAA)-Stammlösung (Rotiphorese® Gel 30; Fa. Roth)
3,75 ml	1,5 M Tris/HCl-Lösung, eingestellt auf pH 8,8
150 µl	10 % (m/v) SDS-Lösung

2. Material und Methoden

6,1 ml Aqua bidest.

Zur Polymerisation werden N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (*TEMED*) und Ammoniumpersulfat (*APS*) zugesetzt:

15 µl TEMED
75 µl 10 % (m/v) APS

Sammelgel:

1,7 ml PAA-Stammlösung
1 ml Tris/HCl-Lösung, eingestellt auf pH 6,8
100 µl 10 % (m/v) SDS-Lösung
7 ml Aqua bidest.

Zur Polymerisation werden zugesetzt:

20 µl TEMED
100 µl 10 % (m/v) APS

Laufpuffer:

3 g Tris-HCl
14,4 g Glyzin
1 g SDS
gelöst in 1 L Aqua bidest.

2.12.3 Durchführung

Die Proteine wurden im Probenpuffer nach Laemmli (1970) für 5 min bei 95°C erhitzt und anschließend abgekühlt. Die Gelkammer (Mini-Protean II; Fa. Bio-Rad)

wurde zusammengebaut und je ein Sammel- und Trenngel gegossen. In die Sammelgele wurden Probenkämme eingesetzt. Nach vollständiger Auspolymerisierung der Gele wurden diese in die Laufkammer eingesetzt, die Probenkämme entfernt und jeweils 10 µl der Proben in die Probentaschen eingebracht. Als Größenstandard dienten biotinylierte Proteine mit bekanntem Molekulargewicht (Broad Range; Fa. Bio-Rad). Anschließend wurde Laufpuffer zugegeben und die Proteine unter Anlegen einer elektrischen Spannung von 100 V im Sammelgel und 200 V im Trenngel aufgetrennt.

2.13 Bestimmung von Proteinen im Westernblot

2.13.1 Prinzip

Im Westernblot können auf Membranen immobilisierte Proteine mit Hilfe von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Die Antigen-Antikörper-Komplexe werden mittels Chemilumineszenz detektiert.

2.13.2 Elektrophoretischer Proteintransfer

2.13.2.1 Materialien

Anodenpuffer I:

20% (v/v)	Methanol
0,2 M	Tris-HCl
	in Aqua bidest.; keine pH-Einstellung nötig

Anodenpuffer II:

20% (v/v)	Methanol
0,02 M	Tris-HCl
	in Aqua bidest.; keine pH-Einstellung nötig

2. Material und Methoden

Kathodenpuffer:

20% (v/v)	Methanol
40 mM	ϵ -Aminocaprylsäure (Fa. Serva)
	in Aqua bidest.; keine pH-Einstellung nötig

2.13.2.2 Durchführung

Für jedes SDS-Polyacrylamidgel wurde eine Polyvinylidenfluorid-(*PVDF*)-Membran (Immobilon-P®; Fa. Millipore) vorbereitet. Die Membranen wurden für 10 min mit Methanol aktiviert, anschließend für 10 min mit Aqua bidest. hydratisiert und bis zur weiteren Verwendung in *Anodenpuffer II* equilibriert. Auf eine befeuchtete Graphitanode (Transblot; Fa. Pharmacia) wurden nacheinander 6 in *Anodenpuffer I* sowie 3 in *Anodenpuffer II* getränkte Filterpapiere geschichtet. Darauf wurden die Membranen und die Gele gelegt. Hiernach folgten 9 in *Kathodenpuffer* getränkte Filterpapiere. Der Sandwich wurde mit der Graphitkathode abgedeckt und die Proteine bei einer Stromstärke von 0,8 mA pro cm² Blotfläche für eine Stunde transferiert.

2.13.3 Antikörperdetektion

Als erster Antikörper wurde ein spezifischer, gegen das gewünschte Antigen gerichteter Antikörper verwendet. Der HA-Antikörper wurde freundlicherweise von Herrn Dr. S. Schulz (Universität Magdeburg) zur Verfügung gestellt. Die Antikörper gegen GRK2 und phospho-MAP (Fa. Cell Signaling) sowie gegen β Arrestin 1 (Fa. Dianova) wurden kommerziell bezogen. Der zweite Antikörper war gegen die Spezies des primären Antikörpers gerichtet und an Meerrettich-Peroxidase gekoppelt (Fa. Dianova). Der biotinylierte Proteinmarker wurde mit einem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten anti-Biotin-IgG (Fa. Cell Signaling) identifiziert.

2. Material und Methoden

2.13.3.1 Materialien

Blocklösung:

10% (v/v) Blockierungsreagenz auf Polymerbasis (Roti[®]-Block; Fa. Roth)
in Aqua bidest.

Waschpuffer (TBS-T):

25 mM Tris-HCl
190 mM NaCl
1% (m/v) Tween[®]20
in Aqua bidest.; eingestellt auf pH 8,0

2.13.3.2 Durchführung

Nach dem Transfer wurden die Membranen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blocklösung behandelt. Anschließend wurden die Membranen mit dem ersten Antikörper (verdünnt in TBS-T mit 1% Roti[®]-Block) über Nacht bei 4°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Membranen 3 x mit TBS-T gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem zweiten Antikörper (verdünnt in TBS-T mit 1% Roti[®]-Block) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membranen wurden erneut 3 x mit TBS-T gewaschen und zur Detektion der Antikörperbindung verwendet.

2.13.4 Chemilumineszenz

2.13.4.1 Prinzip

Die Antigen/Antikörperkomplexe wurden mittels Chemilumineszenz nachgewiesen. Dabei wird Luminol durch die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase in Anwesenheit von H₂O₂ oxidiert. Fällt das Luminol nach dieser chemischen Aktivierung wieder in den Grundzustand zurück, wird Energie in Form von Licht ausgesendet, die durch

Auflegen eines Röntgenfilms dokumentiert werden kann.

2.13.4.2 Materialien

Substratlösung:

2,5 mM	Luminol (3-Aminophthalhydrazid) in DMSO
400 µM	p-Cumarsäure in DMSO
100 mM	Tris-HCl; eingestellt auf pH 8,5
2,7 mM	H ₂ O ₂ gelöst in Aqua bidest.

2.13.4.3 Durchführung

Die gewaschenen PVDF Membranen wurden für 2 min mit der Substratlösung inkubiert, in eine Röntgenkassette verbracht und ein Röntgenfilm (Hyperfilm™; Fa. Amersham Biosciences) belichtet. Nach einer Expositionszeit von ca. 1 – 5 min wurden die Filme entwickelt und mit Hilfe eines Videodensitometers (Modell E.A.S.Y. RH-3 ; Fa. Herolab) dokumentiert sowie ausgewertet.

2.14 Statistische Auswertung

Jeder Versuch wurde in Zwei- oder Dreifachbestimmung ausgeführt. Aus den gewonnenen Messwerten wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Jedes Experiment wurde mindestens 3 x mit separat transfizierten Zellen wiederholt. Aus den Ergebnissen wurden der Mittelwert ± Standardfehler berechnet. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen 2 Stichprobenmengen wurden mit dem Student's *t*-Test unter Verwendung des Programms „InStat®“ für Macintosh, Version 2.03, Fa. GraphPad, ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung der Affinität von ^3H -Diprenorphin am δ -Opioidrezeptor

Zur Bestimmung der Rezeptordichte durch 1-Punkt Messung wird nach der Methode nach Scatchard (1949) die Affinität des Radioliganden an seinem Rezeptor benötigt. Die Abbildungen 4A und B zeigen ein repräsentatives Sättigungsexperiment sowie einen Scatchard-Plot zur Bestimmung der Dissoziationskonstante (K_d) und maximalen Bindungskapazität (B_{\max}) für ^3H -Diprenorphin an Membranen von δ -Opioidrezeptor tragenden NG108-15 Zellen. Die aus vier unabhängigen Experimenten errechneten Werte lagen für die B_{\max} bei 607 ± 23 fmol/mg Membranprotein und für die K_d bei $1,09 \pm 0,65$ nM. Vergleichbare Ergebnisse ergaben sich für das im weiteren Verlauf dieser Arbeit verwendete und in COS-7 Zellen heterolog exprimierte Konstrukt des δ -Opioidrezeptors.

3.2 Charakterisierung des Zellmodels

3.2.1 Transfektionseffizienz

3.2.1.1 Bestimmung der optimalen Menge an Plasmid-DNA

COS-7 Zellen stellen ein transientes Expressionsmodell dar. Um vergleichbare experimentelle Bedingungen zu schaffen, musste zuerst diejenige Menge an Plasmid-DNA bestimmt werden, die eine reproduzierbare Expression der gewünschten cDNAs erlaubt. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit zunehmenden Mengen an DORpcDNA3.1(+) transfiziert und die Gesamtmenge an Plasmid-DNA durch Auffüllen mit Kontrollplasmid (pcDNA3.1(+)) auf $10 \mu\text{g}$ pro Petrischale konstant gehalten. Nach 72 h wurde die δ -Opioidrezeptordichte mittels ^3H -Diprenorphinbindung in Plasmamembranen bestimmt. Wie aus Abbildung 5 hervorgeht, nimmt die Expression des δ -Opioidrezeptors mit ansteigender Menge an DORpcDNA3.1(+) kontinuierlich zu. Alle weiteren Transfektionen wurden mit einer Menge von $10 \mu\text{g}$ Gesamtplasmid vorgenommen.

3. Ergebnisse

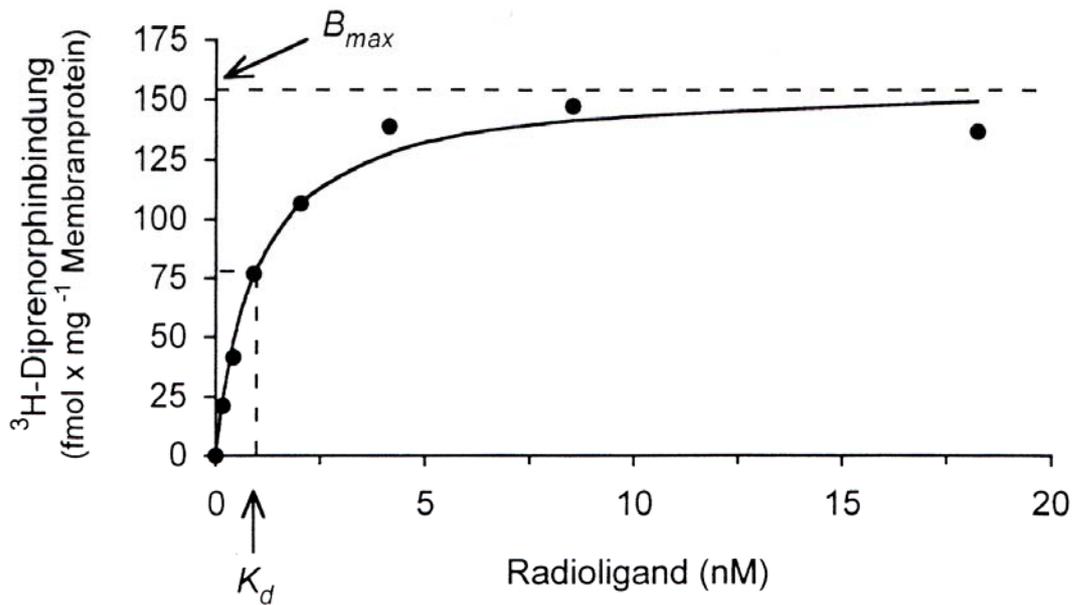


Abb. 4A: Repräsentatives Sättigungsexperiment an NG108-15 Zellen.

Jeweils 200 μ g Membranprotein wurde mit ansteigenden Konzentrationen an ³H-Diprenorphin in An- oder Abwesenheit von 10 μ M Naloxon bis zum Erreichen des Equilibriums inkubiert (45 min; 37 °C). Der Anteil an spezifisch gebundenen ³H-Diprenorphin wurde errechnet und in fmol/mg Membranprotein angegeben. Die Pfeile markieren die Werte für K_d und B_{max} .

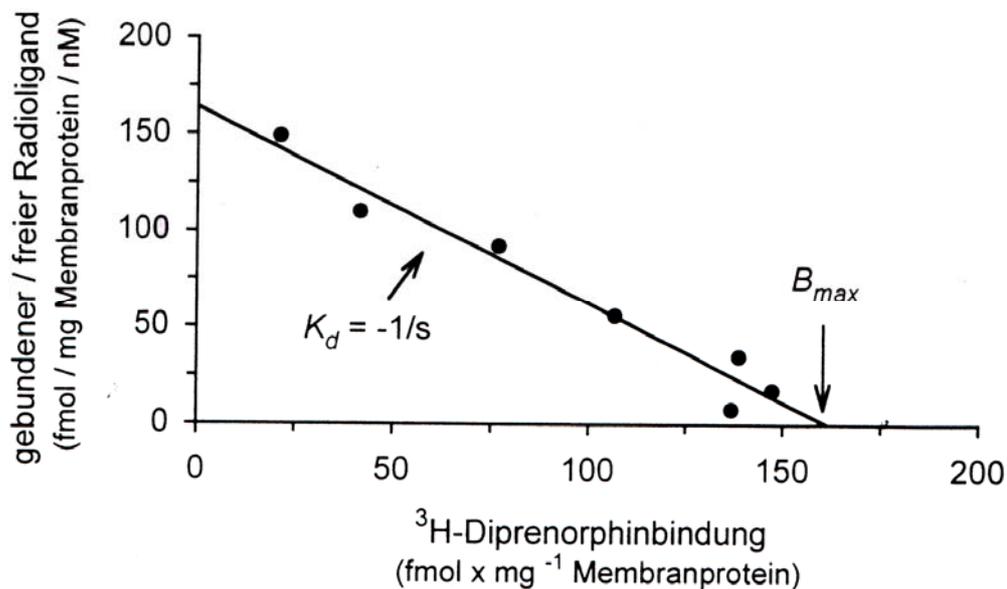


Abb. 4B: Scatchard-Plot.

Grafische Darstellung der Ergebnisse des Sättigungsexperiments nach Scatchard-Transformation. Die Schnittstelle der Geraden mit der x-Achse entspricht der B_{max} , der negativ reziproke Wert der Steigung der Geraden ergibt die K_d .

3. Ergebnisse

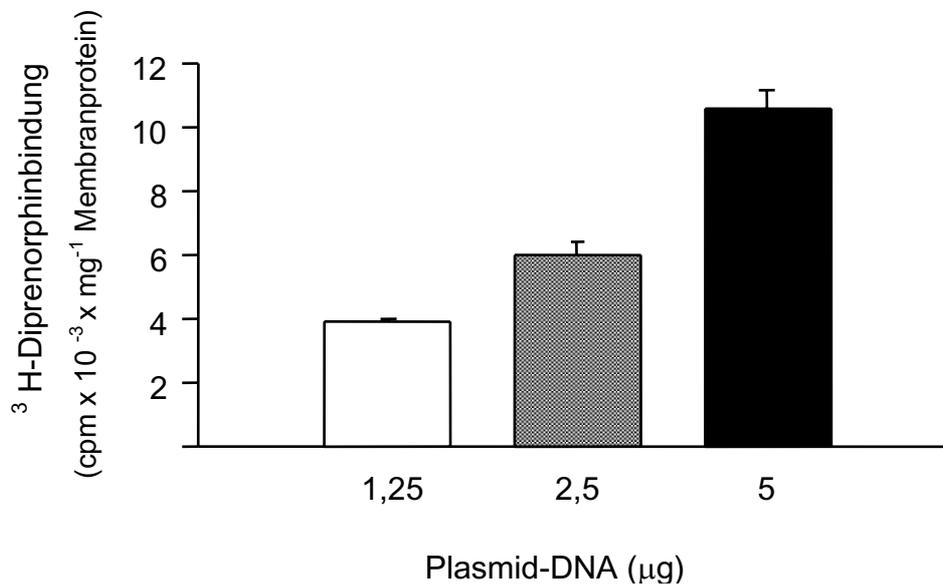


Abb. 5: Überprüfung der Transfektionseffizienz.

COS-7 Zellen wurden mit 1,25, 2,5 und 5 µg DORpcDNA3.1(+) in einer Gesamtmenge von 10 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Expression des δ -Opioidrezeptors wurde mittels Radioligandenbindung bestimmt und in cpm/mg Membranprotein angegeben. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Versuchen dar.

3.2.1.2 Zeitverlauf der Expression des δ -Opioidrezeptors

Die Induktion von Toleranz und Abhängigkeit erfordert eine chronische Exposition der Zellen mit Morphin über einen Zeitraum von 48 h hinweg. Chronische Opioideffekte können aber nur dann ausgebildet werden, wenn über den gesamten Behandlungszeitraum eine ausreichende Zahl an δ -Opioidrezeptoren vorhanden ist. Deshalb musste die Expression des δ -Opioidrezeptors über einen Zeitraum von 72 h hinweg nach der Transfektion verifiziert werden. Hierfür wurden COS-7 Zellen mit jeweils 5 µg DORpcDNA3.1(+) in 10 µg Gesamtplasmid pro Petrischale transfiziert und 24 h nach der Transfektion auf drei Kulturflaschen aufgeteilt. Die Zellen wurden 30, 48 und 72 h nach der Transfektion geerntet und die Expression des δ -Opioidrezeptors mittels Radioligandenbindung an Plasmamembranen ermittelt. Der in Abbildung 6 dargestellte Zeitverlauf zeigt ein Expressionsmaximum

3. Ergebnisse

der Rezeptoren nach 48 h. Bereits 30 h nach der Transfektion wurde ca. 60 % der maximalen Rezeptormenge gebildet, 72 h nach der Transfektion lag sie immer noch bei ca. 75 %. Hiervon abgeleitet wurde einen Tag nach der Transfektion mit der chronischen Morphinbehandlung begonnen. Dies gewährleistet eine ausreichende Anzahl von Rezeptoren über den gesamten Behandlungszeitraum von 48 h hinweg.

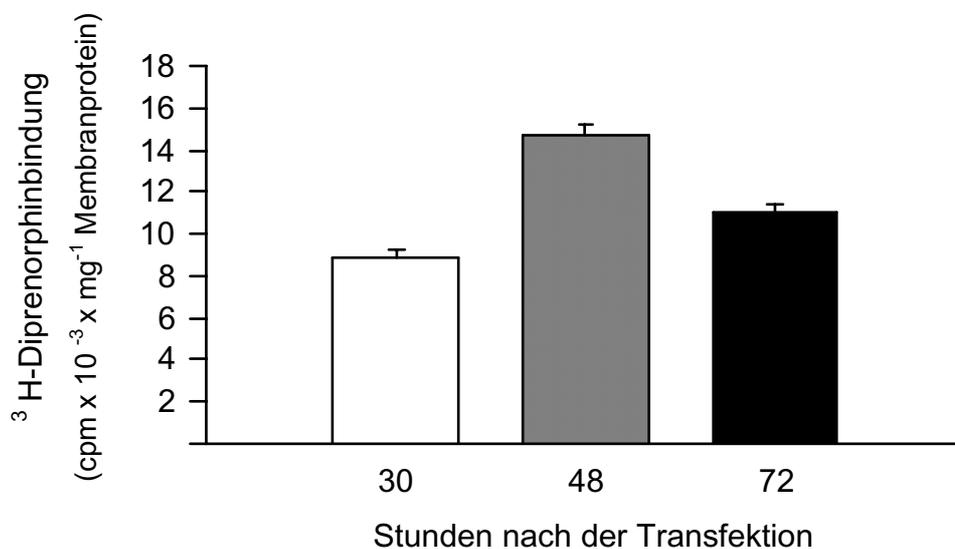


Abb. 6: Zeitverlauf der Expression von δ -Opioidrezeptoren.

COS-7 Zellen wurden mit DORpcDNA3.1(+) transient transfiziert und die Rezeptorexpression nach 30, 48 und 72 h bestimmt. Die Rezeptordichte wurde als spezifische Bindung von ³H-Diprenorphin an Plasmamembranen dargestellt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten.

3.2.1.3 Co-Expression von δ -Opioidrezeptoren zusammen mit einer Adenylylzyklase

Im Verlauf dieser Studie wird die Regulation des δ -Opioidrezeptors in An- oder Abwesenheit einer zusätzlich exprimierten Adenylylzyklase untersucht. Dies setzt voraus, dass das Einbringen einer weiteren cDNA die Expression des δ -Opioidrezeptors nicht beeinträchtigt. Um dies zu untersuchen, wurden COS-7

3. Ergebnisse

3.2.2 Induktion chronischer Opioideffekte in COS-7 Zellen

3.2.2.1 Agonist vermittelte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors

Eine kurzzeitige Aktivierung von δ -Opioidrezeptoren mit hoch effizienten Agonisten führt zur Desensibilisierung und Internalisierung der Rezeptoren. Im folgenden Experiment sollte zunächst die Reproduzierbarkeit dieses Opioideffektes in COS-7 Zellen untersucht werden. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit dem Konstrukt für den δ -Opioidrezeptor transfiziert und für 1 h mit dem stabilen Enkephalinderivat DADLE inkubiert und die Anzahl der Oberflächenrezeptoren mittels Radioligandenbindung in isolierten Plasmamembranen bestimmt. Wie aus Abbildung 8 ersichtlich ist, resultiert die kurzzeitige Exposition mit DADLE in einer signifikanten Abnahme von Membran assoziierten δ -Opioidrezeptoren ($-30,0 \pm 4,7 \%$; $n = 9$).

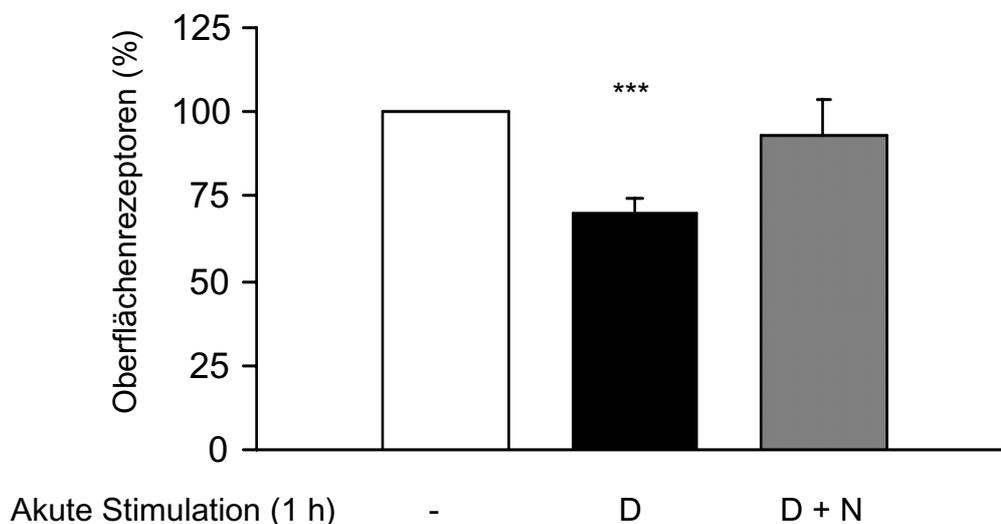


Abb. 8: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in COS-7 Zellen.

δ -Opioidrezeptor exprimierende COS-7 Zellen wurden entweder in Ab- (-) oder Anwesenheit von DADLE (D; $1 \mu\text{M}$) oder DADLE und Naloxon (D+N; $1 \mu\text{M} + 10 \mu\text{M}$) für 1 h behandelt. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren wurde mittels Bindung von ^3H -Diprenorphin an Plasmamembranen bestimmt und in % bezogen auf unbehandelte Kontrollzellen angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus $n = 9$ (D) bzw. $n = 3$ (D + N) unabhängigen Experimenten. Der Unterschied zur Kontrolle ist signifikant (***) $p < 0,001$.

3. Ergebnisse

Die Internalisierung der Rezeptoren konnte durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem Opioidantagonisten Naloxon aufgehoben werden.

3.2.2.2 *Sensibilisierung der Adenylylzyklase*

Die chronische Behandlung von Zellen mit Morphin führt zur Sensibilisierung der Adenylylzyklase, die sich nach dem Entzug des Opioids in einer überschießenden cAMP-Produktion äußert. COS-7 Zellen enthalten endogen nur eine einzige Isoform der Adenylylzyklase (ACIX), die nicht durch Opiode reguliert wird. Nachdem mit Hilfe eines HA-markierten Konstrukts die Expression der ACV gezeigt wurde, musste in einem nächsten Schritt die Rekonstitution der akut und chronisch von Opioiden regulierte Aktivität der Adenylylzyklase überprüft werden. Hierzu wurden COS-7 Zellen entweder mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine oder zusammen mit der ACV co-transfiziert. Die Co-Expression einer Adenylylzyklase führt zu einem etwa 5-fachen Anstieg der Forskolin stimulierten cAMP Produktion. Die Expression der ACV stattet zudem die Zellen mit der Fähigkeit aus, den intrazellulären cAMP Gehalt über Opioidrezeptoren zu regulieren. So führt die akute Aktivierung des δ -Opioidrezeptors mit Morphin zu einer signifikanten Hemmung der cAMP Produktion ($- 63,7 \pm 10,3 \%$, $n = 6$). Eine längerfristige Behandlung der Zellen mit Morphin für 48 h führt darüber hinaus zur Ausbildung chronischer Opioideffekte, die sich in einem Verlust der akuten Hemmung der Adenylylzyklase (Toleranz) und der Präzipitation einer überschießenden cAMP Produktion mit Naloxon auf mehr als das Doppelte ($+ 115,6 \pm 7,9 \%$, $n = 6$) äußert. Bei Zellen die nur den δ -Opioidrezeptor exprimierten konnte weder eine akute noch eine chronische Opioidregulation der cAMP Produktion gemessen werden (Abbildung 9).

3. Ergebnisse

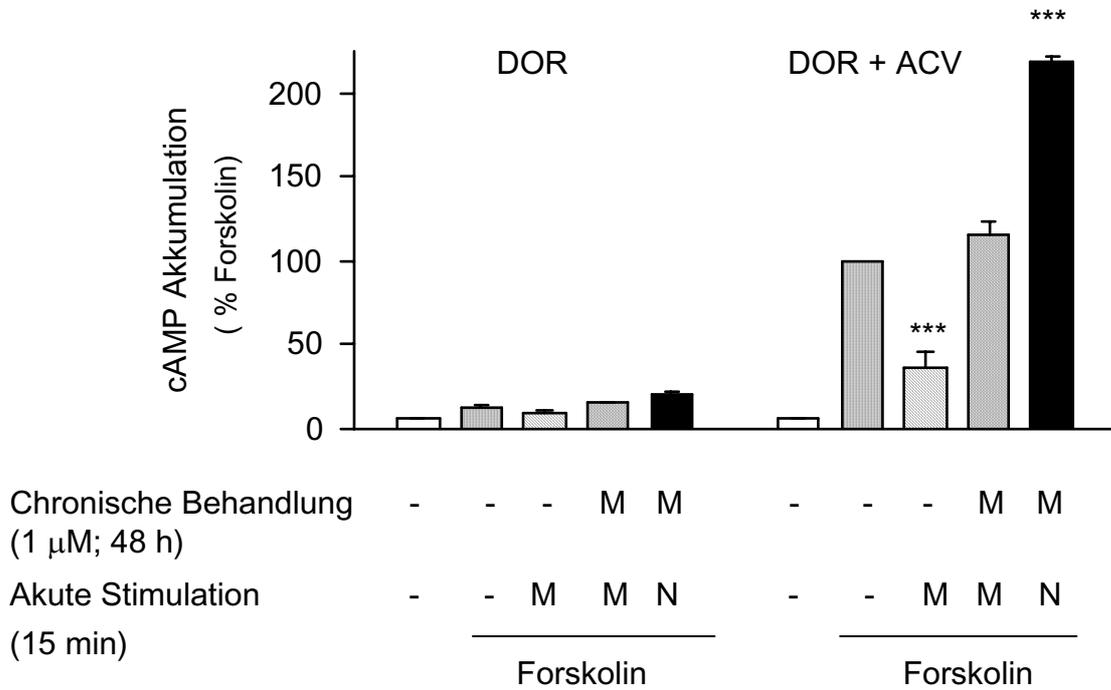


Abb. 9: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden entweder mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine (DOR) oder zusammen mit der ACV (DOR + ACV) transfiziert und die akute sowie chronische Regulation des cAMP Gehaltes durch Morphin bestimmt. Akut wurden die Zellen entweder mit Morphin (M; 1 μ M) oder Naloxon (N; 10 μ M) stimuliert, chronische Opioideffekte wurden nach Behandlung mit Morphin (M; 1 μ M, 48 h) untersucht. Die Effekte dieser Behandlungen auf die cAMP Akkumulation wurden im ELISA gemessen und in % bezogen auf die Forskolin stimulierte cAMP Akkumulation bei Anwesenheit der ACV (= Kontrolle) angeben. Die Mittelwerte \pm SEM ergaben sich aus n = 3 (DOR) bzw. n = 6 (DOR + ACV) unabhängigen Experimenten. Die Unterschiede zur Kontrolle sind signifikant (***) ($p < 0,001$).

3.3 Einfluss einer chronischen Morphinbehandlung auf die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors

3.3.1 Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Abwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase

Der Effekt einer chronischen Morphinbehandlung auf die Agonist induzierte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors wurde zunächst an COS-7 Zellen untersucht, die keine funktionelle Kopplung des δ -Opioidrezeptors an die Adenylylzyklase aufweisen. Eine Hälfte der Zellen blieb unbehandelt und diente als Kontrollzellen,

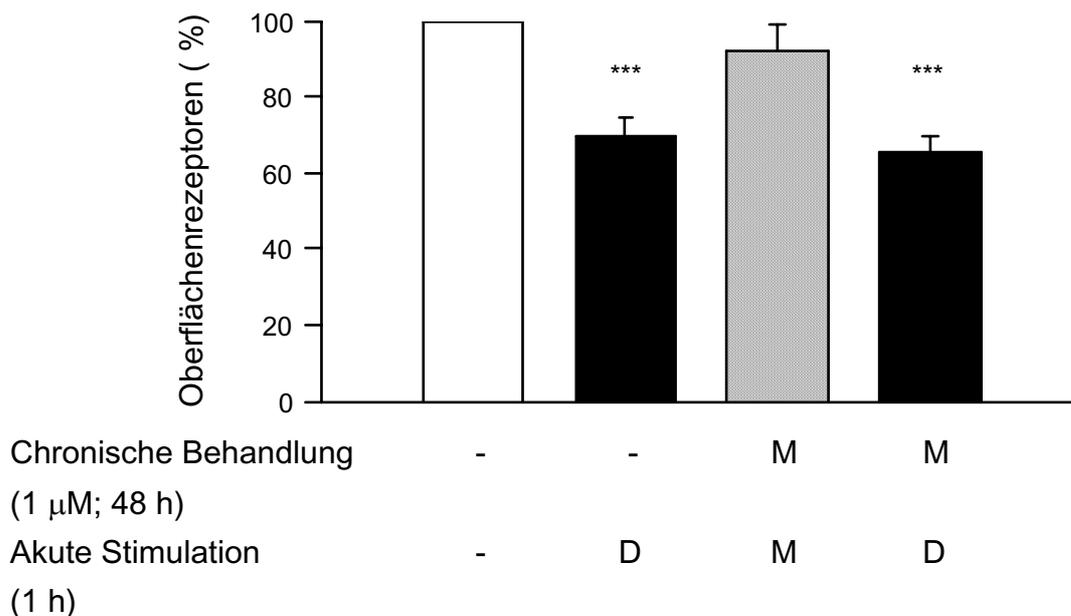


Abb. 10: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Behandlung mit Morphin in Abwesenheit einer regulierbaren Adenylylzyklase.

δ -Opioidrezeptor exprimierende COS-7 Zellen wurden für 48 h entweder in Ab- (Kontrolle) oder Anwesenheit von Morphin (M; 1 μ M) inkubiert und die Rezeptorinternalisierung nach 1-stündiger Exposition mit DADLE (D; 1 μ M) an isolierten Plasmamembranen bestimmt. Die Rezeptordichte unbehandelter Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 5 (mit Morphin behandelte Zellen) bzw. n = 9 (Kontrollzellen) unabhängigen Experimenten dar. Die Unterschiede zu unbehandelten Kontrollzellen sind signifikant (***) p < 0,001).

3. Ergebnisse

die andere Hälfte wurde für 48 h mit Morphin (1 μ M) inkubiert. Sowohl Kontrollzellen als auch chronisch mit Morphin behandelte Zellen wurden für 1 h mit DADLE stimuliert und nachfolgend die Rezeptorinternalisierung an isolierten Plasmamembranen mittels Radioligandenbindung gemessen. Aus Abbildung 10 wird ersichtlich, dass die chronische Behandlung der Zellen mit Morphin alleine keinen Einfluss auf die Zahl der Oberflächenrezeptoren hat. Darüber hinaus besteht kein Unterschied zwischen der DADLE induzierten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Kontrollzellen ($- 34,5 \pm 4,3 \%$; $n = 5$) oder chronisch mit Morphin behandelten Zellen ($- 30,0 \pm 4,7\%$; $n = 9$). Somit hatte eine chronische Morphinbehandlung in Abwesenheit einer funktionellen Kopplung an die Adenylylzyklase keinen Einfluss auf die Agonist induzierte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors.

3.3.2 Regulation des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase

Die Co-Expression des δ -Opioidrezeptors mit der ACV in COS-7 Zellen führt nach einer chronischen Morphinbehandlung zur Sensibilisierung der Effektorregulation. (siehe Abbildung 9). Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob die chronisch Morphin induzierten Adaptationen auf Ebene der Adenylylzyklase Einfluss auf die Agonist vermittelte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors hat. Hierzu wurden die Zellen mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und der ACV co-transfiziert und für 48 h mit Morphin behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrollen. Im Anschluss daran wurden sowohl Kontrollzellen als auch mit Morphin vorbehandelte Zellen für eine weitere Stunde mit DADLE stimuliert und die Zahl der Membran assoziierten Rezeptoren mittels Radioligandenbindung gemessen. Auch hier hat die chronische Morphinbehandlung keinen Einfluss auf die Zahl der Oberflächenrezeptoren. Dagegen war das Ausmaß der DADLE induzierten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in chronisch Morphin behandelten Zellen fast

3. Ergebnisse

doppelt so stark ausgeprägt ($- 40,8 \pm 6,6 \%$, $n = 5$) als in Kontrollzellen ($- 23,7 \pm 3,6 \%$; $n = 5$). Dies zeigt, dass die Anwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase mit der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung interferiert und diese verstärkt (Abbildung 11).

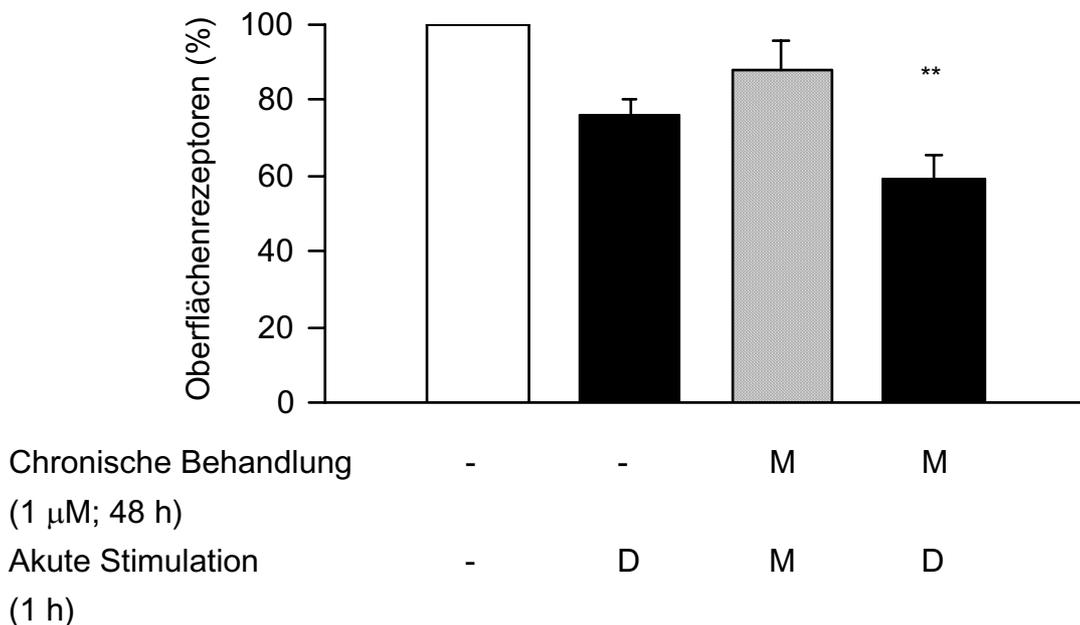


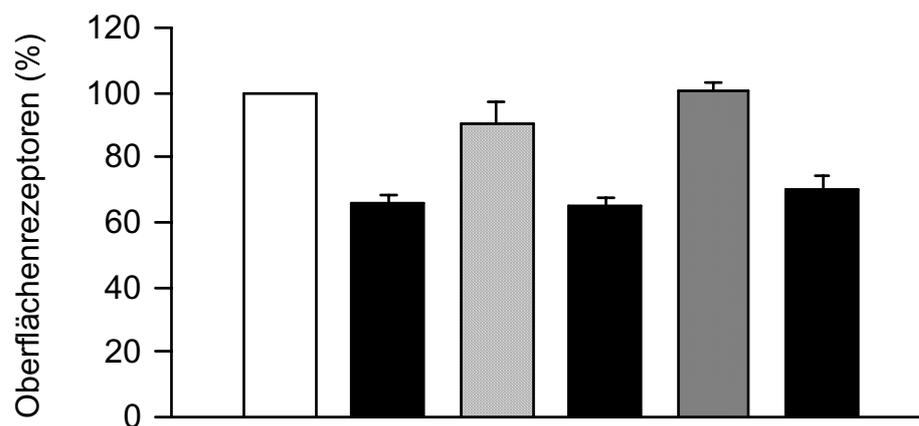
Abb. 11: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Behandlung mit Morphin in Anwesenheit einer regulierbaren Adenylylzyklase.

δ -Opioidrezeptor und ACV exprimierende COS-7 Zellen wurden für 48 h entweder in Ab-(Kontrolle) oder Anwesenheit von Morphin (M; 1 μ M) inkubiert und die Rezeptorinternalisierung nach 1-stündiger Exposition mit DADLE (D; 1 μ M) an isolierten Plasmamembranen bestimmt. Die Rezeptordichte unbehandelter Kontrollzellen wurde auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von $n = 5$ unabhängigen Experimenten dar. **: $p < 0,01$, signifikant unterschiedlich zu DADLE behandelten Kontrollzellen.

3. Ergebnisse

3.3.3 Blockade der verstärkten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors mit Naloxon

Um zu überprüfen, ob die verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase durch eine chronische Aktivierung des Rezeptors mit Morphin vermittelt wird, wurde die Morphinwirkung durch den Opioidantagonisten Naloxon aufgehoben. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und der ACV co-transfiziert und für 48 h mit Morphin (1 μ M) zusammen mit Naloxon (10 μ M) oder mit Naloxon alleine



Chronische Behandlung (1 μ M; 48 h)	-	-	M+N	M+N	N	N
Akute Stimulation (1 h)	-	D	-	D	-	D

Abb. 12: Blockade des chronischen Morphineffektes auf die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors durch Naloxon.

Mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und der ACV co-transfizierte COS-7 Zellen wurden für 48 h in Anwesenheit von Morphin und Naloxon (M+N; 1 μ M + 10 μ M) oder Naloxon alleine (N; 10 μ M) inkubiert. Die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors wurde nachfolgend durch Stimulation der Zellen mit DADLE(D; 1 μ M; 1 h) bestimmt und die Zahl der Oberflächenrezeptoren auf unbehandelte Kontrollzellen (100 %) bezogen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

3. Ergebnisse

(10 μM) behandelt. Darauf hin wurde die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach einstündiger Stimulation der Zellen mit DADLE (1 μM ; 1h) bestimmt. Wie aus Abbildung 12 hervorgeht, besteht kein Unterschied im Ausmaß der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors zwischen Kontrollzellen und chronisch mit Morphin und Naloxon oder mit Naloxon alleine behandelten Zellen. Somit hebt Naloxon die verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Zellen mit funktionell regulierter Adenylylzyklase nach chronischer Morphinbehandlung auf.

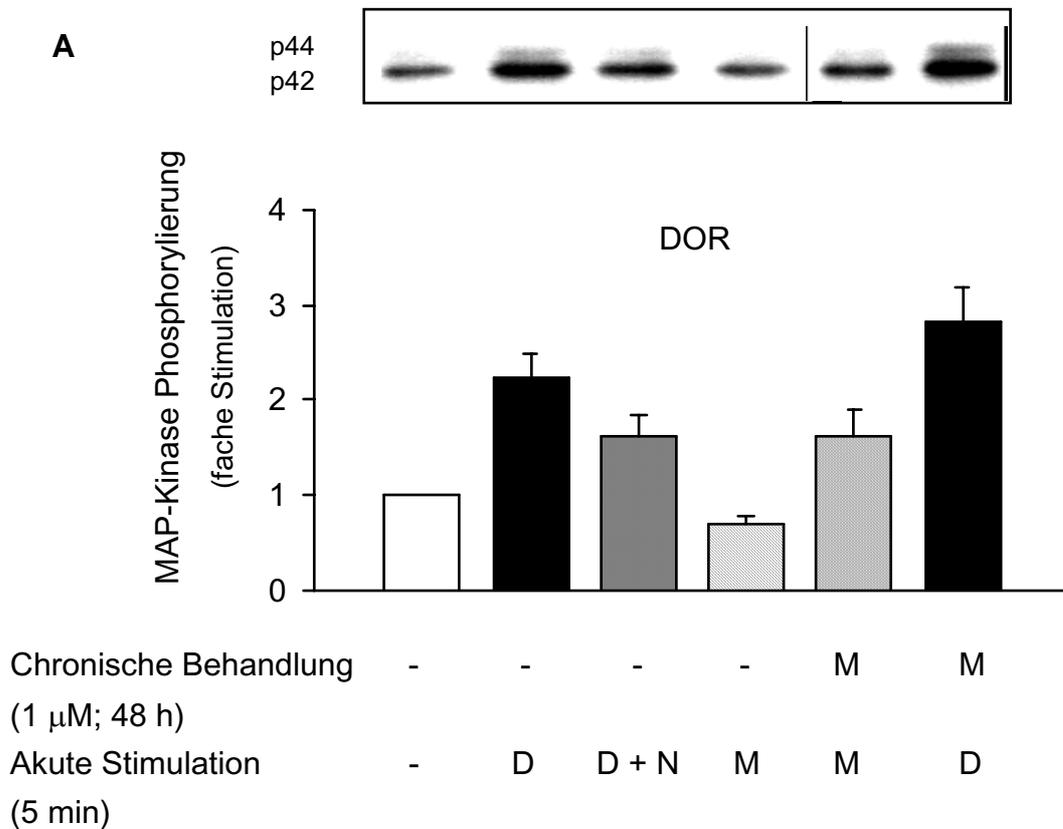
3.4 Sensibilisierung von δ -Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung

3.4.1 Regulation der ERK-1 und -2 Aktivität

Die verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase kann durch eine erhöhte Sensibilität der Rezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung vermittelt werden. Um eine gesteigerte Rezeptorfunktion nachzuweisen, wurde die Agonist induzierte Aktivierung der ERK-1 und -2 als Marker für einen $G_{\beta\gamma}$ vermittelten Opioideffekt untersucht. Hierzu wurden COS-7 Zellen entweder mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine oder zusammen mit der ACV transfiziert und für 48 h entweder in Ab- oder Anwesenheit von Morphin (1 μM) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und die Aktivierung der ERK-1 und -2 nach akuter Stimulation mit verschiedenen Liganden mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers im Westernblot bestimmt. Als Kontrolle wurde mit einem MAP-Kinase spezifischen Antikörper überprüft, ob die untersuchten Mengen an MAP-Kinase identisch sind. Unabhängig von der Anwesenheit einer regulierbaren Adenylylzyklase führt die akute Stimulation des δ -Opioidrezeptors mit DADLE (1 μM) zu einer deutlichen Zunahme der MAP-Kinase Aktivität, die durch Naloxon (10 μM) teilweise antagonisierbar ist. Die akute Stimulation des δ -Opioidrezeptors mit Morphin (1 μM)

3. Ergebnisse

hat keinen Einfluss auf die MAP-Kinase Aktivität. Dagegen führt die chronische Morphinbehandlung in beiden Zellsystemen zu einem leichten Anstieg der basalen MAP-Kinase Phosphorylierung. Werden die δ -Opioidrezeptoren im Anschluss an die chronische Morphinbehandlung akut mit DADLE ($1 \mu\text{M}$) stimuliert, so ist die Aktivierung der MAP-Kinase in Anwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase signifikant stärker ausgeprägt als in Zellen die den δ -Opioidrezeptor alleine exprimieren. Dieses Ergebnis zeigt, dass eine chronische Morphinbehandlung in Anwesenheit von ACV die Funktion des δ -Opioidrezeptors erhöht (Abbildung 13 A und B).



3. Ergebnisse

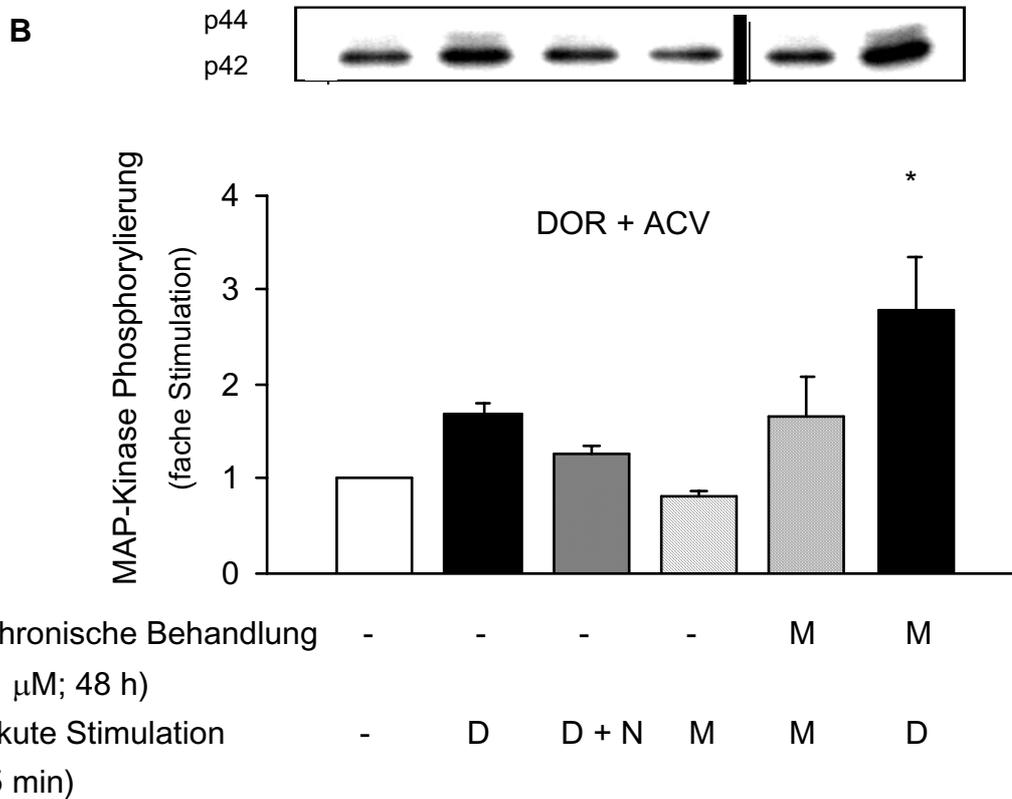


Abb. 13: Regulation der MAP-Kinase Aktivität in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen exprimierten entweder den δ -Opioidrezeptor alleine (A, DOR) oder zusammen mit der ACV (B, DOR + ACV). Ein Teil der Zellen wurde mit Morphin (M; 1 μ M) für 48 h inkubiert, bevor die δ -Opioidrezeptoren mit den folgenden Liganden 5 min lang bei 37 °C stimuliert wurden: DADLE (D; 1 μ M), DADLE und Naloxon (D + N; 1 μ M und 10 μ M) und Morphin (M; 1 μ M). Die Phosphorylierung der MAP-Kinase wurde mit einem phosphospezifischen Antikörper im Westernblot detektiert. Ein repräsentativer Blot ist jeweils in die Abbildungen eingefügt. Die Immunreaktivität wurde densitometrisch ausgewertet und auf die basale MAP-Kinase Aktivität von Kontrollzellen bezogen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar. Die DADLE induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinasen nach einer chronischen Morphinbehandlung ist signifikant stärker (*; $p < 0,05$) als in naiven Zellen.

3. Ergebnisse

3.4.2 Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Interaktion

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die beobachtete Zunahme der Internalisierung von δ -Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung in ACV exprimierenden Zellen mit einer verstärkten Rezeptor/G-Protein Interaktion einhergeht. Hierzu wurde der Anteil hoch affiner Rezeptoren im heterologen Bindungsexperiment mit Hilfe des selektiven Agonisten Deltorhin II bestimmt. Dieser ist in der Lage, zwischen der G-Protein gekoppelten und -ungekoppelten Rezeptorkonformation zu unterscheiden. Die durch Verdrängung einer konstanten Menge des Antagonisten ^3H -Diprenorphin ermittelte K_i für Deltorhin II stellt somit ein Maß für den Anteil hoch affiner Rezeptoren dar. COS-7 Zellen wurden entweder mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine oder zusammen mit der ACV transfiziert und am nächsten Tag für weitere 48 h mit Morphin ($1 \mu\text{M}$) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Wie aus Abbildung 14 hervorgeht, nimmt die spezifische Bindung für ^3H -Diprenorphin bei Anwesenheit steigender Konzentrationen von Deltorhin II dosisabhängig ab. Dabei liegt die K_i für Deltorhin II für den δ -Opioidrezeptor unabhängig von der Anwesenheit einer Adenylylzyklase bei ca. 3 nM ($3,1 \pm 0,8 \text{ nM}$; $n = 3$). Nach chronischer Behandlung der Zellen mit Morphin erhöht sich die Affinität von Deltorhin II gegenüber dem δ -Opioidrezeptor bei Anwesenheit der ACV um das zweifache (K_i $1,6 \pm 0,6 \text{ nM}$; $n = 3$), ohne funktionell regulierte Adenylylzyklase dagegen nicht. Die Ergebnisse zeigen, dass in COS-7 Zellen die Co-Expression der ACV mit einer Zunahme hoch affiner δ -Opiorezeptoren nach einer chronischen Morphinbehandlung einhergeht.

3. Ergebnisse

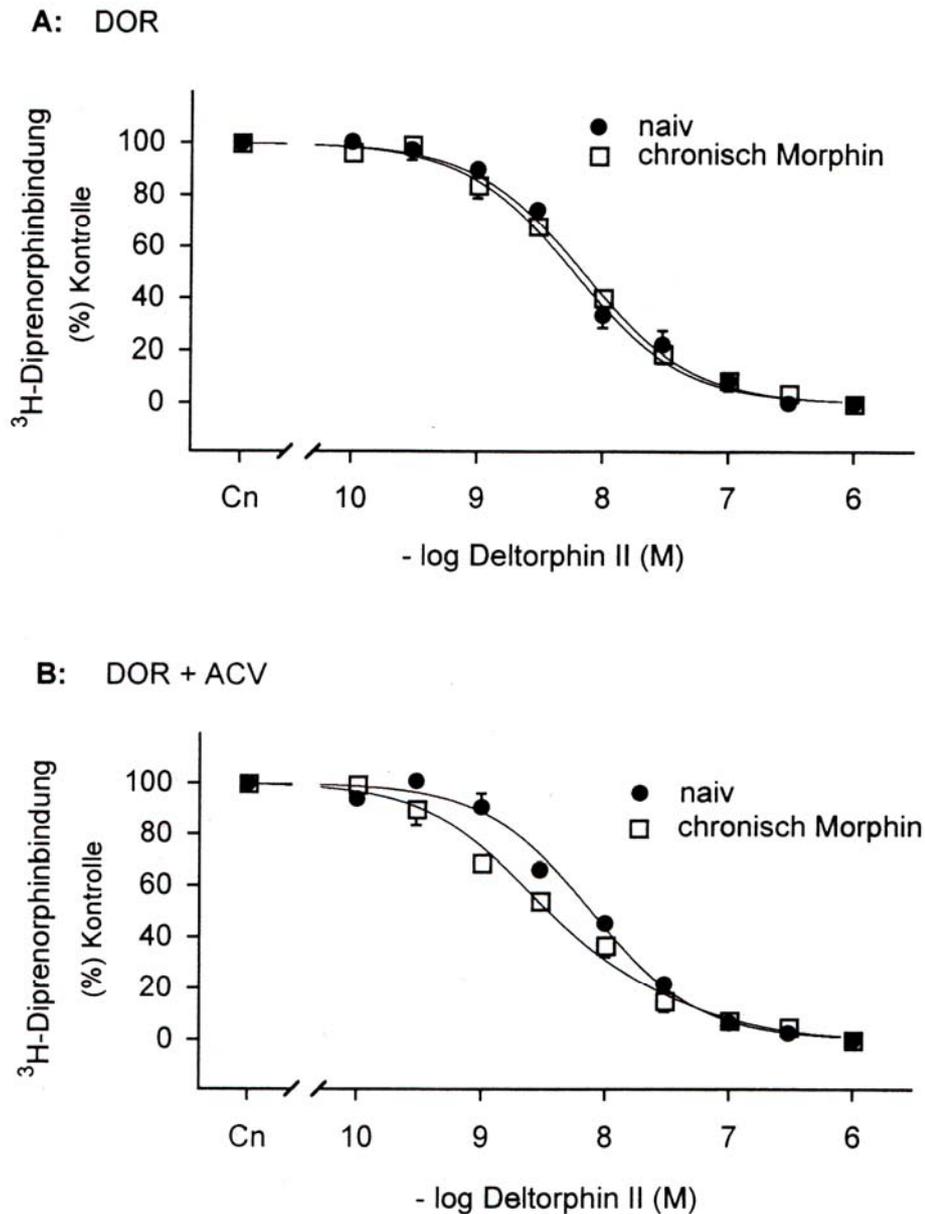


Abb. 14: Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Interaktion in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen exprimierten entweder den δ -Opioidrezeptor alleine (A; DOR) oder zusammen mit der ACV (B; DOR + ACV). Die Zellen wurden entweder mit (\square) oder ohne Morphin (\bullet) für 48 h behandelt und die Affinität von Deltorhin II in heterologen Verdrängungsexperimenten an isolierten Plasmamembranen bestimmt. Das gebundene ^3H -Diprenorphin wurde in % zur Kontrolle dargestellt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten dar.

3. Ergebnisse

3.5 Regulation der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit weiterer Adenylylzyklase-Isoformen

3.5.1 Co-Expression der Adenylylzyklase vom Typ VI

3.5.1.1 Sensibilisierung der Adenylylzyklase

Um zu überprüfen, ob die Sensibilisierung und verstärkte Agonist vermittelte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung exklusiv an die Anwesenheit von ACVI gebunden ist, wurden weitere Isoformen der Adenylylzyklase mit unterschiedlichen Regulationseigenschaften untersucht.

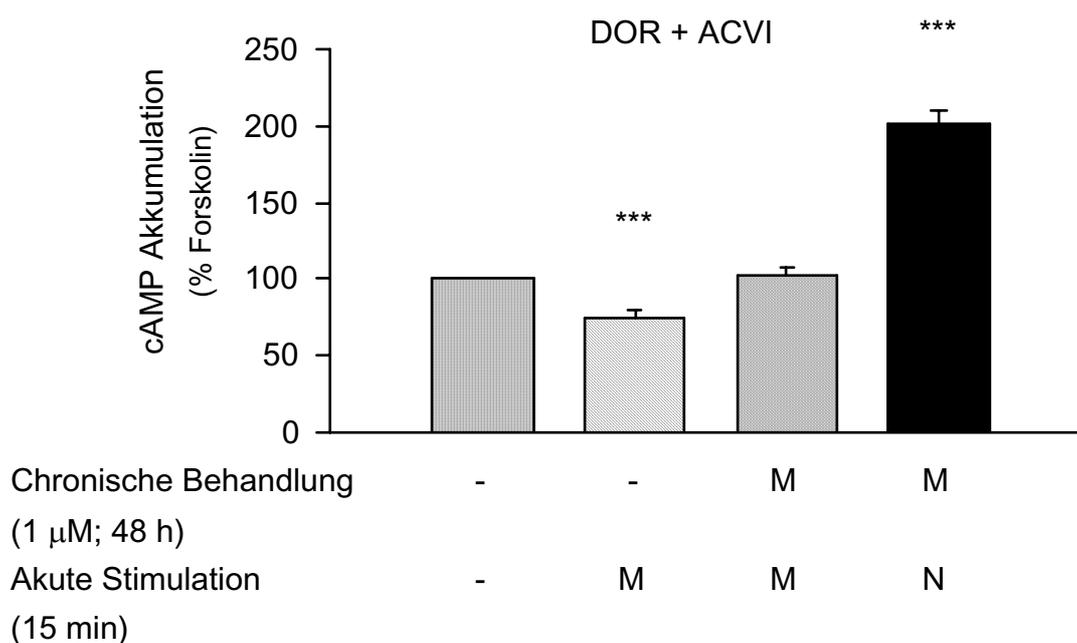


Abb. 15: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase vom Typ VI in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen, welche den δ -Opioidrezeptor zusammen mit der ACVI co-exprimierten (DOR + ACVI), wurden für 48 h mit Morphin (1 μ M) behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Aktivität der Adenylylzyklase wurde in Anwesenheit von Forskolin (1 μ M), Forskolin und Morphin (M; 1 μ M) oder Forskolin und Naloxon (N; 10 μ M) für 15 min bei 37 °C stimuliert und das gebildete cAMP im ELISA bestimmt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede zur Forskolinkontrolle sind signifikant (***; p < 0,001).

3. Ergebnisse

Zunächst wurde die ACVI co-exprimiert, da sie ebenso wie die ACV (siehe Abbildung 10) durch inhibitorische G-Proteine gehemmt wird. COS-7 Zellen wurden mit dem Konstrukt für den δ -Opiodrezeptor und der ACVI transfiziert und nachfolgend die akute und chronische Regulation der intrazellulären cAMP Produktion nach Inkubation der Zellen mit Morphin (1 μ M) für 48 h bestimmt. Abbildung 15 zeigt, dass die akute Aktivierung des δ -Opiodrezeptors mit Morphin zu einer signifikanten Hemmung der cAMP Produktion um $- 24,6 \pm 3,5 \%$ ($n = 3$) führt. Im Verlauf der chronischen Morphinbehandlung gleicht sich die ursprünglich verminderte cAMP Produktion den Ausgangswerten an (Toleranz). Die Verdrängung von Morphin von seinem Rezeptor durch Naloxon führt zu einer überschießenden cAMP Produktion von $+ 201,5 \pm 9,2 \%$ ($n = 3$), ein regulatorisches Phänomen das auf die Ausbildung von Abhängigkeit hinweist. Diese Ergebnisse zeigen, dass in COS-7 Zellen die ACVI funktionell durch den δ -Opiodrezeptor reguliert wird und eine chronische Morphinbehandlung zur Sensibilisierung der Adenylylzyklase führt.

3.5.1.2 Internalisierung des δ -Opiodrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung

Die Anwesenheit der ACVI führt zur Ausbildung chronischer Opioideffekte in COS-7 Zellen. Es stellte sich daher die Frage, ob die ACVI ebenso wie die ACV die Internalisierung des δ -Opiodrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung beeinflusst. Hierzu wurde der δ -Opiodrezeptor gemeinsam mit der ACVI in COS-7 Zellen exprimiert und die Zellen für weitere 48 h mit Morphin (1 μ M) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Agonist vermittelte Internalisierung des δ -Opiodrezeptors nach Exposition für 1 h mit DADLE bestimmt. Abbildung 16 zeigt, dass in dieser Versuchsreihe die akute Stimulierung mit DADLE zu einer Internalisierung des δ -Opiodrezeptors von ca. 40 % führt ($- 39,8 \pm 3,1 \%$; $n = 3$). Nach chronischer Morphinbehandlung ist diese wiederum signifikant stärker ausgebildet als in Kontrollzellen ($- 64,5 \pm 11,6 \%$; $n = 3$). Da die ACVI im Gegensatz

3. Ergebnisse

zur ACV nicht von endogen exprimierten $G_{\alpha z}$ -Untereinheiten reguliert wird, kann durch chronische Inkubation von Morphin ($1 \mu\text{M}$) zusammen mit Pertussis Toxin (PTX; 25 ng/ml) die G-Protein vermittelte Signalweiterleitung vom Opioidrezeptor an seine intrazellulären Effektoren verhindert werden. Die anschließende Stimulation der δ -Opioidrezeptoren mit DADLE ($1 \mu\text{M}$) verringerte die Zahl der Oberflächenrezeptoren ($-41,1 \pm 5,4 \%$; $n = 3$) in ähnlichem Ausmaß wie in Kontrollzellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass die funktionelle Kopplung des δ -Opioidrezeptors an die ACVI zu einer verstärkten Rezeptorinternalisierung nach chronischer Morphinbehandlung führt. Dieser Effekt kann durch Blockade der G-Protein vermittelten Signalweiterleitung mit Pertussis Toxin unterbunden werden.

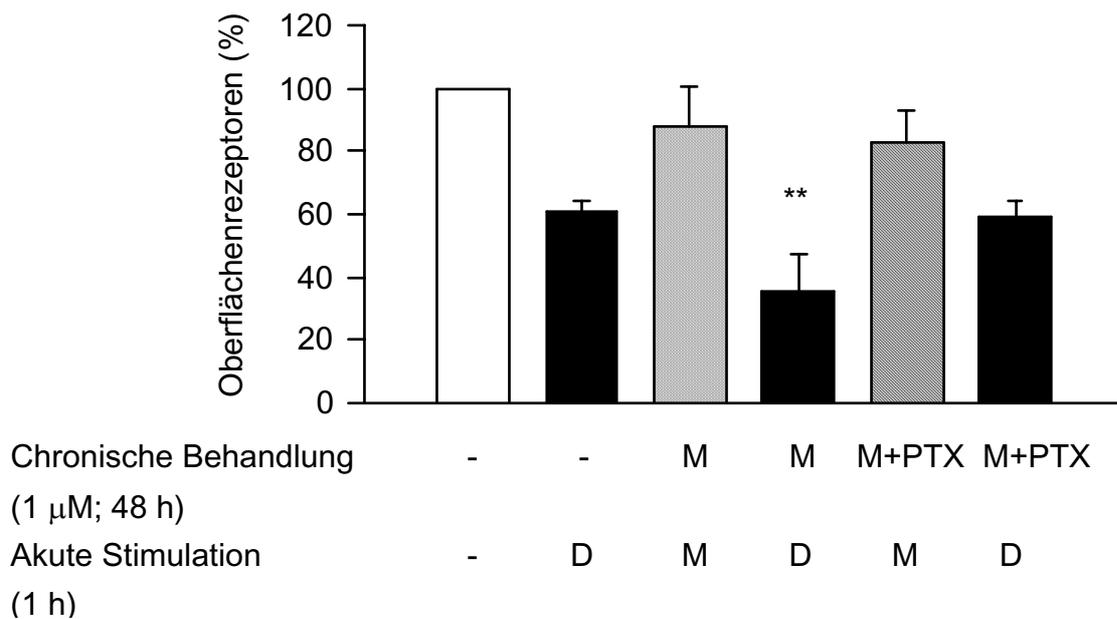


Abb. 16: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit von ACVI.

COS-7 Zellen wurden mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und der ACVI co-transfiziert und für 48 h mit Morphin (M; $1 \mu\text{M}$) oder Morphin und Pertussis Toxin (M+PTX; $1 \mu\text{M}$ und 25 ng/ml) inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors durch Stimulation der Zellen mit DADLE (D; $1 \mu\text{M}$; 1 h) bestimmt. Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ unabhängigen Experimenten dar. Das Ausmaß der DADLE induzierten Rezeptorinternalisierung nach einer chronischen Morphinvorbehandlung ist signifikant größer (**; $p < 0,01$) als in Kontrollzellen.

3. Ergebnisse

Die Regulation der Rezeptorinternalisierung durch chronische Morphinbehandlung ist daher auf intrazelluläre Adaptationen auf Ebene der G-Protein gekoppelten Signaltransduktion zurück zu führen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Ausbildung chronischer Morphineffekte an die Anwesenheit funktionell regulierbarer Adenylylzyklasen und einer intakten G-Protein vermittelten Signaltransduktion in der Zelle gebunden ist.

3.5.2 Co-Expression der Adenylylzyklase vom Typ II

3.5.2.1 Regulation der Aktivität der Adenylylzyklase

Die Ausbildung chronischer Opioideffekte auf Ebene der Rezeptorinternalisierung kann entweder über die Interaktion aktivierter G_{α} -Untereinheiten mit ACV und VI oder durch freie $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten vermittelt sein. Deshalb wurde im nächsten Schritt die Regulation des δ -Opioidrezeptors in Anwesenheit der ACII untersucht, die durch freie $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten aktivierter inhibitorischer G-Proteine stimuliert wird. Hierzu wurde die ACII zusammen mit δ -Opioidrezeptoren in COS-7 Zellen co-exprimiert und im Anschluss daran die Regulation der enzymatischen Aktivität nach akuter und chronischer Aktivierung der Rezeptoren untersucht. Im Gegensatz zu den Isoformen V und VI führt die akute Aktivierung von Opioidrezeptoren mit Morphin (1 μ M; 15 min) zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären cAMP Produktion (+ 53,4 \pm 17,9 %; n = 3). Im Verlauf einer chronischen Behandlung der Zellen mit Morphin (48 h; 1 μ M) nimmt die Stimulation der ACII Aktivität kontinuierlich ab und erreicht nach 48 h wieder Kontrollwerte. Entzieht man den Zellen nun Morphin durch die Zugabe von Naloxon, so ändert sich die intrazelluläre cAMP Konzentration nicht weiter (Abbildung 17). Diese Ergebnisse zeigen, dass in COS-7 Zellen δ -Opioidrezeptoren funktionell an die co-exprimierte ACII koppeln und sich nach chronischer Morphinexposition Adaptationen in Form einer Abschwächung der akuten Opioidwirkung ausbilden. Die chronische Morphinbehandlung geht dagegen nicht mit einer Sensibilisierung der ACII einher,

3. Ergebnisse

da nach dem Opioidentzug keine weitere Regulation der enzymatischen Aktivität beobachtet wurde (Abbildung 17).

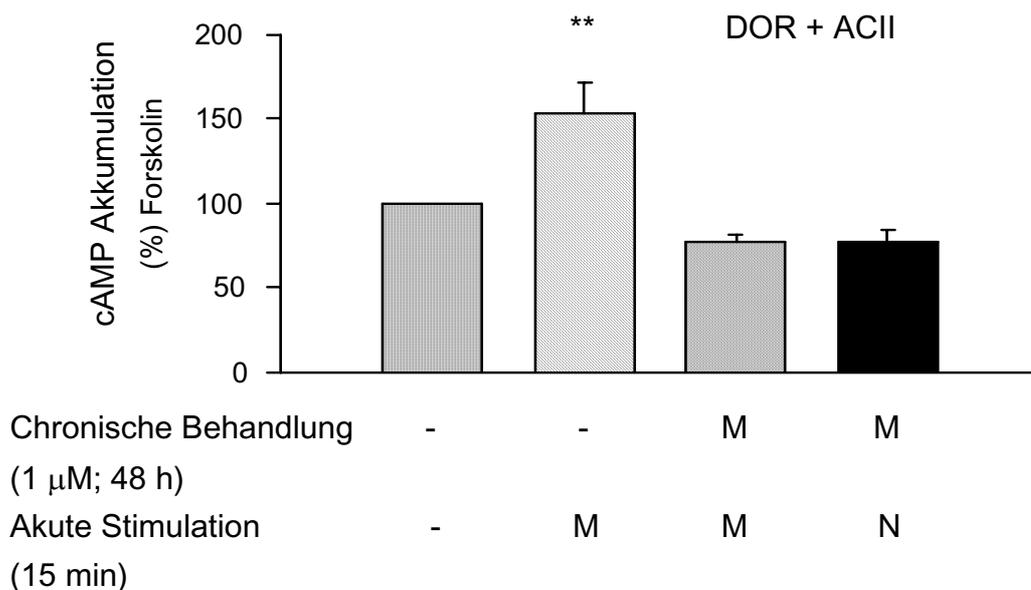


Abb. 17: Akute und chronische Opioidregulation der Adenylylzyklase vom Typ II in COS-7 Zellen.

δ -Opioidrezeptor und ACII co-exprimierende COS-7 Zellen (DOR + ACII) wurden für 48 h mit Morphin (1 μ M) behandelt. Kontrollzellen blieben unbehandelt. Die Regulation der ACII Aktivität wurde in Anwesenheit von Forskolin (1 μ M) mit Morphin (M; 1 μ M) und Naloxon (10 μ M) für 15 min bei 37 °C bestimmt und das gebildete cAMP im ELISA quantifiziert. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar. Die Unterschiede zur Forskolin stimulierten Aktivität sind signifikant (**; p < 0,01).

3.5.2.2 Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung

Zur Überprüfung der Frage, ob die funktionelle Regulation der ACII ebenfalls mit Adaptationen in der Rezeptorregulation nach chronischer Morphinexposition einhergeht, wurden δ -Opioidrezeptoren zusammen mit der ACII in COS-7 Zellen co-exprimiert und für 48 h entweder in An- oder Abwesenheit von Morphin (1 μ M)

3. Ergebnisse

kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Rezeptoren kurzzeitig mit DADLE stimuliert (1 μ M; 1 h) und das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung mittels Radioligandenbindung an isolierten Plasmamembranen ermittelt. Wie aus Abbildung 18 hervorgeht, resultiert die akute Stimulation von Kontrollzellen in einer Internalisierung der δ -Opioidrezeptoren um $25,0 \pm 7,0$ % (n = 3). Die chronische Behandlung der Zellen mit Morphin steigerte das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung auf $37,7 \pm 4,2$ % (n = 3). Die Zunahme der Internalisierung von δ -Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung ist somit nicht an eine durch inhibitorische G_{α} -Untereinheiten vermittelte Sensibilisierung der Adenylylzyklase gebunden, vielmehr scheint eine funktionell intakte Rezeptor/Effektorkopplung ausschlaggebend zu sein.

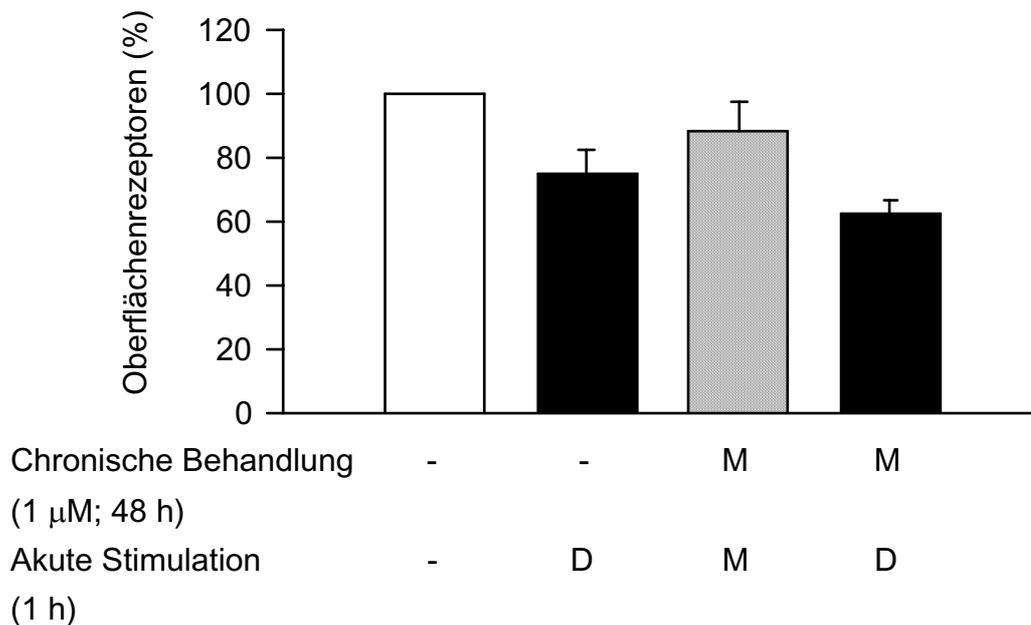


Abb. 18: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors bei Anwesenheit der funktionell regulierbaren Adenylylzyklase vom Typ II.

δ -Opioidrezeptoren wurden zusammen mit der ACII in COS-7 Zellen co-exprimiert und mit Morphin (M; 1 μ M) für weitere 48 h inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Im Anschluss daran wurde die Rezeptorinternalisierung durch Zugabe von DADLE (D; 1 μ M; 1 h) zum Wachstumsmedium induziert und mit Hilfe der Radioligandenbindung in isolierten Plasmamembranen bestimmt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar.

3. Ergebnisse

3.5.3 Co-Expression eines funktionell inaktiven Konstrukts der Adenylylzyklase vom Typ V

3.5.3.1 Überprüfung der Proteinexpression

Die Existenz einer funktionell regulierten Adenylylzyklase als Voraussetzung für die Ausbildung chronischer Morphineffekte auf die Rezeptorregulation deutet auf eine Beteiligung des gebildeten cAMP als Mediator hin. Um diese Frage zu überprüfen, wurden δ -Opioidrezeptoren zusammen mit einem funktionell inaktiven Konstrukt der ACV co-transfiziert, das eine intakte Kopplung inhibitorischer G_{α} -Untereinheiten aber keine enzymatische Aktivität aufweist. Zur Expressionskontrolle wurden COS-7 Zellen mit einem HA-markierten Konstrukt des C_1 -Fragments der ACV (HA-ACV- C_1) entweder alleine oder zusammen mit dem δ -Opioidrezeptor transfiziert und die Expression der Proteine mittels eines HA-spezifischen Antikörpers im Westernblot bestimmt. Dafür wurden 48 h nach der Transfektion Plasmamembranen isoliert und elektrophoretisch getrennt (10 % SDS-PAGE). Als Kontrollen dienten Plasmamembranen nicht transfizierter Zellen (WT). Nach Expression des HA-ACV- C_1 Konstrukts erkennt der Antikörper eine einzige Bande bei 62 kDa, die dem errechneten Molekulargewicht des Fragments entspricht. Der Einfluss eines co-exprimierten HA-markierten Konstrukts für den δ -Opioidrezeptor auf die Expression der HA-ACV- C_1 konnte in diesem Fall nicht durchgeführt werden, da die multiplen Banden des glykosilierten HA-markierten δ -Opioidrezeptores (60 - 70 kDa) diejenigen des C_1 -Fragments der ACV überlagern. Die Co-Expression des nicht markierten δ -Opioidrezeptors hatte jedoch keinen Einfluss auf die gebildeten HA-ACV- C_1 Mengen (Abbildung 19). Diese Ergebnisse zeigen, dass das HA-ACV- C_1 Konstrukt in COS-7 Zellen exprimiert wird und die Menge des gebildeten Proteins bei Co-Expression des δ -Opioidrezeptors unter den gewählten experimentellen Bedingung nicht beeinflusst wird.

3. Ergebnisse

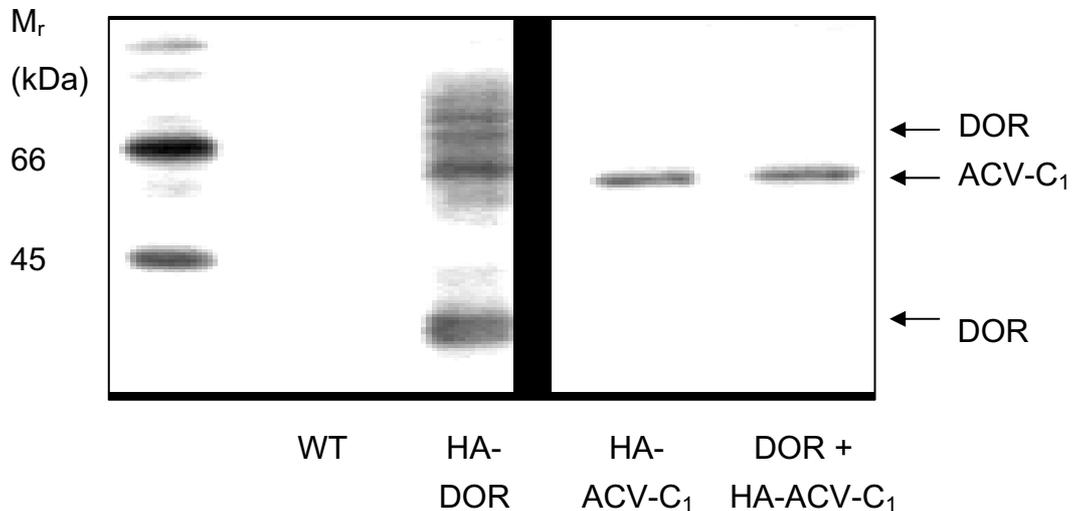


Abb. 19: Expression des HA-markierten C₁-Konstrukts der ACV.

COS-7 Zellen wurden mit Konstrukten für den HA-markierten δ -Opioidrezeptor (HA-DOR), mit dem HA-markierten ACV-C₁ Fragment (HA-ACV-C₁) oder den δ -Opioidrezeptor (DOR) transfiziert. Die Proteinexpression wurde mit Hilfe eines HA-spezifischen Antikörpers im Westernblot bestimmt. Nicht transfizierte Zellen dienten als Kontrolle (WT). Der dargestellte Blot wurde mit vergleichbaren Ergebnissen drei mal wiederholt.

3.5.3.2 Regulation des C₁-Fragments der Adenylylzyklase vom Typ V durch Morphin

Nachdem die Expression des HA-markierten ACV-C₁ Fragments in COS-7 Zellen gezeigt wurde, konnte im nächsten Schritt die Ausbildung chronischer Opioideffekte auf die cAMP Produktion untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und des HA-markierten ACV-C₁-Fragments co-transfiziert und einer chronischen Behandlung mit Morphin (1 μ M; 48 h) unterzogen. Als Positivkontrolle dienten Zellen mit der funktionell intakten ACV. Da das HA-ACV-C₁ Fragment keine enzymatische Aktivität besitzt, konnte nach Stimulation der Adenylylzyklase mit Forskolin (1 μ M; 15 min) keine Zunahme der intrazellulären cAMP Akkumulation verglichen zur endogenen ACIX beobachtet

3. Ergebnisse

werden. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, kann im Vergleich zur ACV bei Anwesenheit des HA-ACV-C₁ Fragments durch Präzipitation des Morphinenzugs mit Naloxon ebenfalls keine Supersensitivität der Adenylylzyklase beobachtet werden. Obwohl inhibitorische G α -Untereinheiten mit dem HA-ACV-C₁ Fragment interagieren, ist keine akute Hemmung der cAMP Produktion über Opioidrezeptoren zu messen. Die Untersuchung der funktionellen Regulation des HA-ACV-C₁ Fragmentes beschränkt sich daher auf eine mögliche Sensibilisierung nach chronischer Morphinexposition.

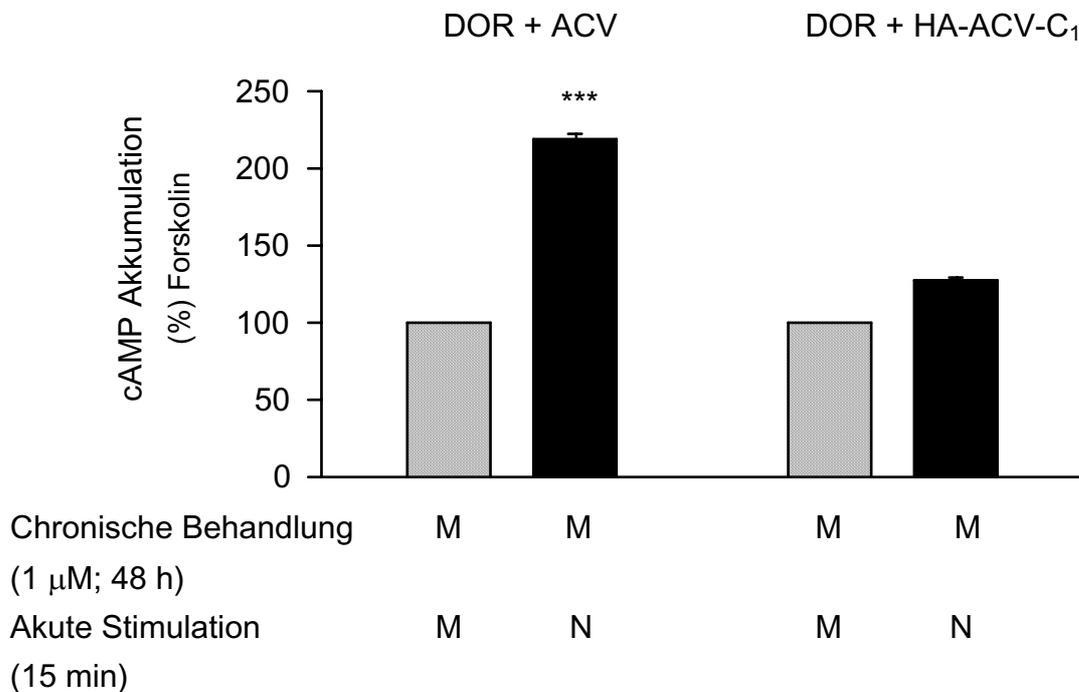


Abb. 20: Chronische Regulation des C₁-Fragments der ACV durch Morphin.

δ -Opioidrezeptoren wurden zusammen mit dem HA-markierten ACV-C₁ Fragment co-exprimiert (DOR + HA-ACV-C₁) und für 48 h mit Morphin (1 μ M) behandelt. Im Anschluss daran wurde die cAMP Produktion in Anwesenheit von Forskolin (1 μ M), Morphin (M; 1 μ M) und Naloxon (10 μ M) für 15 min bei 37 °C gemessen. Die intrazelluläre cAMP Konzentration nach chronischer Morphinbehandlung wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Versuchen dar. ***; p < 0,001; signifikant unterschiedlich zu Morphin.

3. Ergebnisse

3.5.3.3 Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung

Da freie $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten beispielsweise Rezeptorkinasen regulieren können, wurde die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung in Anwesenheit des HA-ACV-C₁ Fragments untersucht. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit den Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor und dem HA-markierten ACV-C₁ Fragment co-transfiziert und anschließend mit Morphin

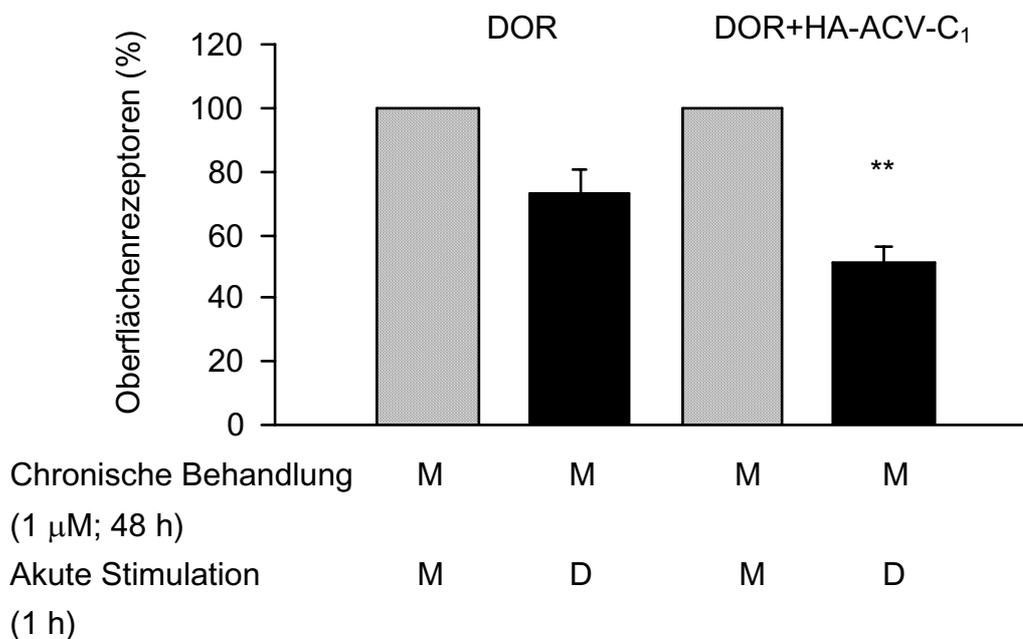


Abb. 21: Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung in Anwesenheit des HA-ACV-C₁ Fragments.

COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine (DOR) oder zusammen mit dem HA-ACV-C₁ Fragment (DOR + HA-ACV-C₁) transfiziert und für 48 h mit Morphin (M; 1 μ M) behandelt. Im Anschluss daran wurde die Rezeptorinternalisierung durch kurzzeitige Stimulation DADLE (D; 1 μ M; 1 h) bestimmt. Die Zahl der Oberflächenrezeptoren chronisch Morphin behandelter Zellen wurde jeweils auf 100 % gesetzt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 5 (DOR) bzw. n = 3 (DOR + HA-ACV-C₁) unabhängigen Versuchen dar. DADLE internalisierte den δ -Opioidrezeptor bei Anwesenheit des HA-ACV-C₁ Fragments signifikant stärker (**; p < 0,01) als in Kontrollzellen.

3. Ergebnisse

behandelt (1 μ M; 48 h). Im Anschluss daran wurde die Rezeptorinternalisierung nach Stimulation der Zellen mit DADLE (1 μ M; 1 h) bestimmt. In chronisch Morphin behandelten Kontrollzellen (alleinige Expression des δ -Opioidrezeptors) führte die kurzzeitige Stimulation mit DADLE zu einer Abnahme der Oberflächenrezeptoren ($-27,4 \pm 8,1$ %; $n = 5$). Wie aus Abbildung 21 hervorgeht, resultierte die Co-Expression des HA-ACV-C₁ Fragments in einem signifikant stärkeren Verlust von δ -Opioidrezeptoren von der Zelloberfläche um $-49,1 \pm 4,9$ % ($n = 3$). Dieses Ergebnis zeigt, dass die chronische Aktivierung von G-Proteinen und deren Interaktion mit Adenylylzyklasen die Rezeptorfunktion unabhängig von der Regulation der enzymatischen Aktivität beeinflusst. Das Fehlen adaptiver Veränderungen auf Ebene der Adenylylzyklase schließt allerdings nicht aus, dass die kontinuierliche Interaktion inhibitorischer G _{α} -Untereinheiten mit dem HA-ACV-C₁ Fragment nach chronischer Morphinexposition Einfluss auf weitere G-Protein regulierte Mechanismen nimmt.

3.6 Untersuchungen zum Mechanismus der verstärkten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinexposition

3.6.1 Aktivierung der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2

Im letzten Teil der Arbeit wurde auf den möglichen Einfluss einer funktionell intakten Regulation der Adenylylzyklase auf die Verstärkung der Rezeptorinternalisierung nach einer chronischen Morphinbehandlung eingegangen. Die Agonist induzierte Rezeptorinternalisierung wird durch eine Abfolge mehrerer ineinander greifender Regulationsschritte vermittelt. Nach Aktivierung des Rezeptors wird dieser über spezifische Rezeptorkinasen phosphoryliert, nachfolgend über Arrestine sequestriert und unter Vermittlung von Dynamin über so genannte „clathrin coated pits“ endozytiert. In einem ersten Schritt wurde deshalb die Umverteilung der in COS-7 Zellen vorherrschenden Rezeptorkinase 2 (*GRK2*) aus dem Zytosol an die

3. Ergebnisse

Plasmamembranen untersucht, die einen Ausdruck für die Aktivierung des δ -Opioidrezeptors darstellt. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit den Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine oder zusammen mit ACV transfiziert und einer chronischen Behandlung mit Morphin (1 μ M; 48 h) unterzogen. Ein Teil der transfizierten Zellen blieb jeweils unbehandelt und diente als Kontrolle. Die Zellen wurden akut mit DADLE stimuliert (5 min; 37 °C) und die mit der Plasmamembran assoziierte GRK2 im Westernblot bestimmt. Zur Detektion wurde ein selektiver gegen GRK2 gerichteter Antikörper verwendet, der eine charakteristische Bande bei ca. 80 kDa erkannte. Für die densitometrische Auswertung der Immunreaktivität wurden die Proben als Auftragskontrolle zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen Membran assoziierte G_{β} -Untereinheiten (35 kDa) untersucht. Wie in Abbildung 22 dargestellt, führt unabhängig von der Anwesenheit der ACV die akute Stimulation des δ -Opioidrezeptors zu einer deutlichen Anreicherung von GRK2 an die Plasmamembran. Bei den δ -Opioidrezeptor exprimierenden Kontrollzellen konnte nach akuter Rezeptoraktivierung eine Zunahme von $24,7 \pm 13,4$ % (n = 3) in der GRK2 Immunreaktivität gemessen werden. In diesem Zellsystem hatte die chronische Morphinbehandlung keinen Einfluss auf die basale Anlagerung von GRK2 an die Plasmamembran. Die anschließende Stimulation der Rezeptoren mit DADLE resultierte dagegen wieder in einer Zunahme der GRK2 Immunreaktivität um $48,0 \pm 25,6$ % (n = 3). Nach Co-Expression der ACV führte die akute Aktivierung der δ -Opioidrezeptoren mit DADLE zu einer signifikanten Assoziation der GRK2 an die Plasmamembran ($+ 35,0 \pm 12,6$ %, n = 3). Im Gegensatz zu Kontrollzellen konnte nach der chronischen Morphinbehandlung bereits ein signifikanter Anstieg der GRK2 Immunoreaktivität in Anwesenheit von Morphin gemessen werden ($+ 48,0 \pm 25,6$ %; n = 3). Diese erhöhte GRK2 Assoziation nahm nach anschließender DADLE Stimulation nochmals weiter zu ($+ 67,7 \pm 6,0$ %; n = 3). Diese Ergebnisse zeigen, dass die chronische Morphinbehandlung in Anwesenheit einer funktionell regulierbaren Adenylylzyklase zu einer vermehrten Bereitstellung von GRK2 an der Plasmamembran führt, die nach Aktivierung des

3. Ergebnisse

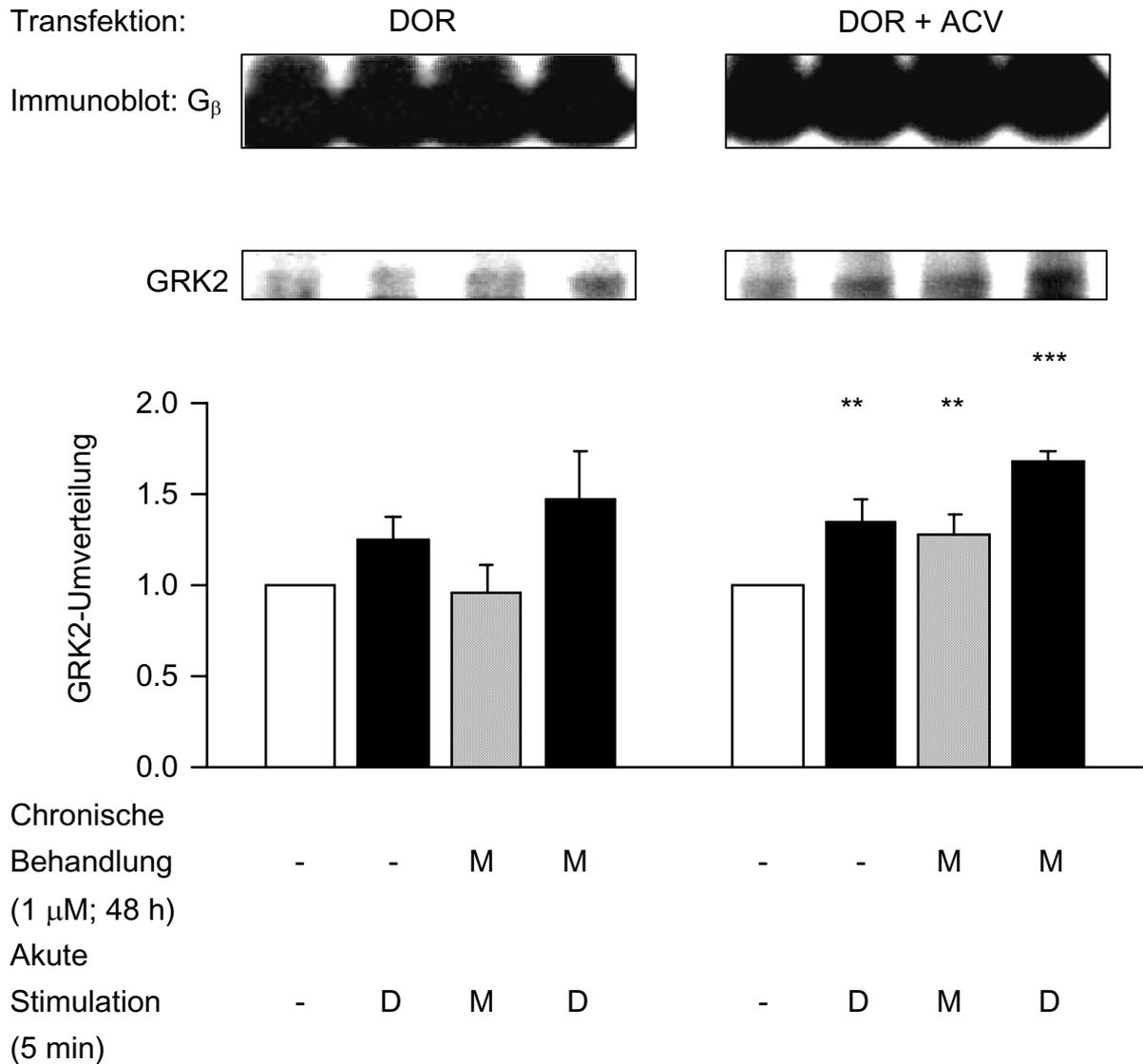


Abb. 22: Umverteilung der GRK2 in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine (DOR) oder mit ACV (DOR + ACV) transfiziert und in An- oder Abwesenheit von Morphin (M; 1 μ M) für weitere 48 h inkubiert. Nach akuter Stimulation der δ -Opioidrezeptoren mit DADLE (D; 1 μ M; 37 °C) wurden Plasmamembranen isoliert und die Menge der an Membranen assoziierten GRK2 im Westenblot bestimmt. Als Auftragskontrolle diente Membran assoziiertes G β . Repräsentative Blots sind in die Abbildung eingefügt. Die Immunreaktivität wurde densitometrisch ausgewertet und im Vergleich zur basalen Schwärzung unbehandelter Zellen dargestellt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten dar. Bei DOR + ACV sind die Unterschiede zur Basalen signifikant (**; p < 0,01; ***; p < 0,001).

3. Ergebnisse

δ -Opioidrezeptors möglicherweise zu einer verstärkten Phosphorylierung beitragen kann.

3.6.2 Umverteilung von β -Arrestin 1

Der phosphorylierte δ -Opioidrezeptor stellt ein Substrat für β -Arrestin 1 dar, einem zytosolischen Adapterprotein, das die Anlagerung an „clathrin coated pits“ vermittelt. Im letzten Schritt der Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die vermehrte Rekrutierung von GRK2 nach Aktivierung des Rezeptors mit DADLE Einfluss auf die Umverteilung von β -Arrestin 1 als Indikator für eine effizientere Rezeptorendozytose nach chronischer Morphinbehandlung nimmt. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit den Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine oder zusammen mit der ACV transfiziert und für 48 h mit Morphin (1 μ M) behandelt. Ein Teil der transfizierten Zellen blieb jeweils unbehandelt und diente als Kontrolle. Die Umverteilung von β -Arrestin 1 an die Plasmamembran nach akuter Stimulation der Rezeptoren mit DADLE (5 min; 37 °C) wurde ebenfalls wieder im Westernblot bestimmt. Zur Detektion von β -Arrestin 1 wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der eine charakteristische Bande bei 50 kDa erkannte. Um bei der densitometrischen Auswertung der Immunreaktivität von identischen Proteinmengen ausgehen zu können, wurden die Proben als Auftragskontrolle mit einem spezifischen Antikörper gegen G_{β} -Untereinheiten (35 kDa) angefärbt. Die Agonist vermittelte Regulation von β -Arrestin 1 stellte sich wie folgt dar (siehe Abbildung 23): in δ -Opioidrezeptor exprimierenden Kontrollzellen lag nach akuter Aktivierung der Rezeptoren mit DADLE nur geringfügig mehr β -Arrestin 1 an den Plasmamembranen vor als in unbehandelten Zellen (+ 21,3 \pm 11,3 %; n = 3). Die chronische Morphinbehandlung geht mit einer Zunahme der β -Arrestin 1 Konzentrationen einher (+ 64,3 \pm 7,2 %; n = 3), die sich nach anschließender DADLE Stimulation nochmals steigerte (+ 94,7 \pm 18,2 %; n = 3). Im Gegensatz dazu führte die Co-Expression der ACV nach akuter Exposition der Zellen mit DADLE zu einer deutlich stärkeren Umverteilung von

3. Ergebnisse

β -Arrestin 1 an die Plasmamembran (+ 131,0 \pm 45,0 %; n = 3). Nach der chronischen Morphinbehandlung konnten etwa vergleichbare Mengen an β -Arrestin 1 detektiert werden (+ 148,0 \pm 9,0 %; n = 3). Wurden die Rezeptoren

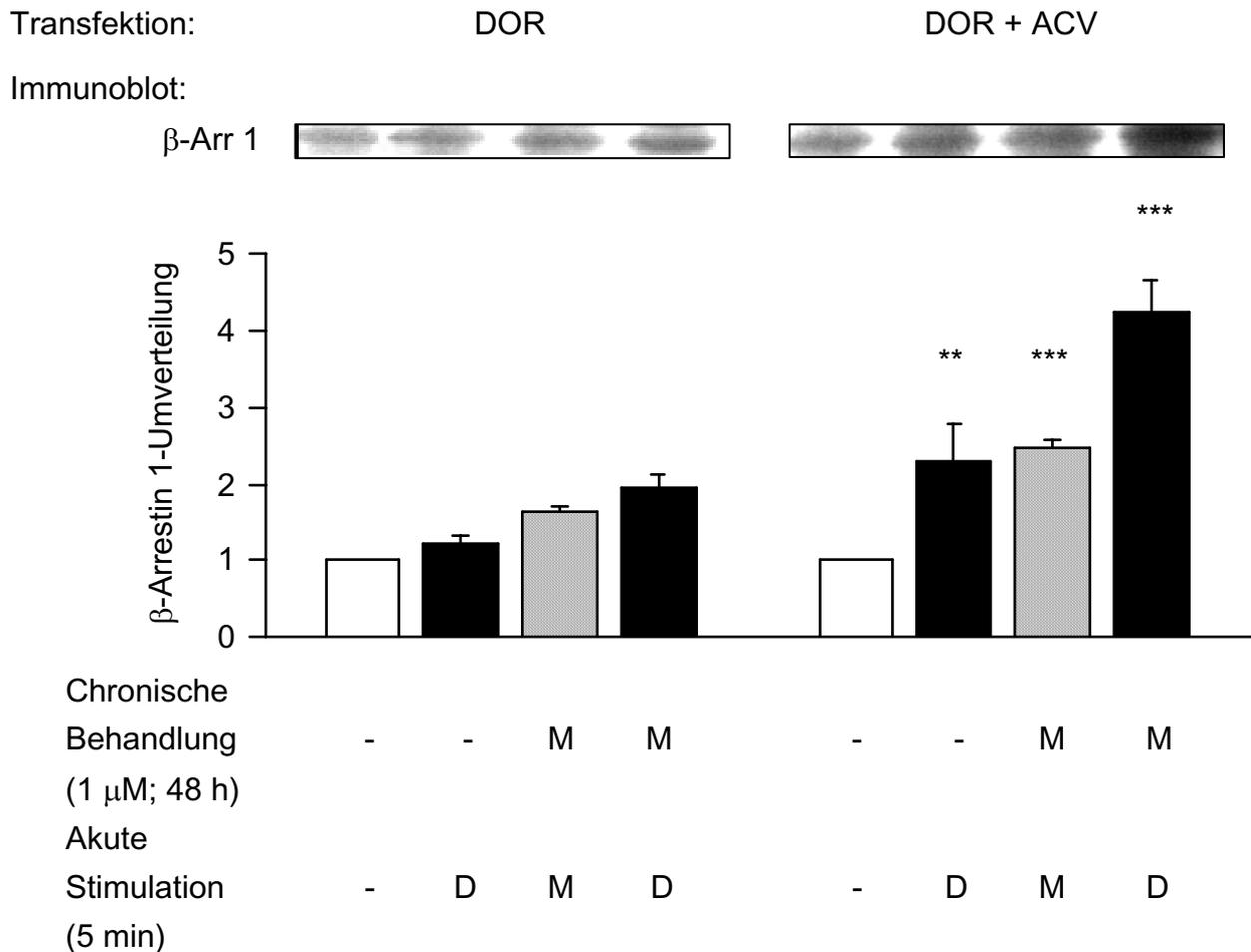


Abb. 23: Umverteilung von β -Arrestin 1 in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit den Konstrukten für den δ -Opioidrezeptor alleine (DOR) oder mit der ACV (DOR + ACV) transfiziert und in An- oder Abwesenheit von Morphin (M; 1 μ M) für weitere 48 h inkubiert. Nach akuter Stimulation des δ -Opioidrezeptors mit DADLE (D; 1 μ M; 37 °C) wurden Plasmamembranen isoliert und das an Membranen assoziierte β -Arrestin 1 im Westenblot detektiert. Ein repräsentativer Blot ist in die Abbildung eingefügt. Die Immunreaktivität wurde densitometrisch erfasst und auf die basale Schwärzung der Kontrollen bezogen. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte \pm SEM von n = 3 unabhängigen Experimenten dar. Bei DOR + ACV sind die Unterschiede zu unbehandelten Zellen signifikant (**; p < 0,01; ***; p < 0,001).

3. Ergebnisse

unter diesen Bedingung mit DADLE stimuliert, so konnte eine signifikant gesteigerte Translokation von β -Arrestin 1 von $+ 323,0 \pm 40,0 \%$ ($n = 3$) beobachtet werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die verstärkte Internalisierung von δ -Opioidrezeptoren nach chronischer Morphinbehandlung in Anwesenheit von ACV mit einer Zunahme der β -Arrestin 1 Translokation einhergeht.

4. Diskussion

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung chronischer Morphineffekte auf die Agonist vermittelte Internalisierung von δ -Opioidrezeptoren in COS-7 Zellen. Von besonderem Interesse war dabei, ob die mit der Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit einhergehenden intrazellulären Adaptationen auf Ebene der Adenylylzyklase mit der Regulation der Rezeptorfunktion interferieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass die chronische Morphinbehandlung bei Anwesenheit einer funktionell intakten Rezeptor/Effektor Kopplung zu einer Sensibilisierung der Funktion des δ -Opiodrezeptors führt. Die gesteigerte Empfindlichkeit des Rezeptors äußert sich einerseits in einer erhöhten Affinität gegenüber dem Opioidagonisten Deltorphin II, andererseits in einer gesteigerten Rezeptorvermittelten Aktivierung von ERK-1 und -2. Als Ausdruck der erhöhten Rezeptorfunktion konnte zudem eine verstärkte Internalisierung des Rezeptors nach kurzfristiger Agoniststimulation gezeigt werden, die durch eine erhöhte Kapazität der an der Rezeptorendozytose beteiligten Mechanismen vermittelt wird.

Die Bearbeitung der Fragestellung erforderte einen Rezeptortyp, der selbst nach längerfristiger Morphinbehandlung weder in seiner Funktion beeinflusst noch internalisiert wird. Dazu stehen grundsätzlich der μ - und der δ -Opioidrezeptor zur Verfügung, die eine akute Regulation auf Rezeptorebene umgehen (Keith et al., 1996; Whistler und von Zastrow, 1998; Eisinger et al., 2002). Da der δ -Opioidrezeptor aufgrund struktureller Unterschiede vor allem in seinem C-Terminus nach Stimulation mit hoch effizienten Agonisten (DADLE, Etorphin) einer stärkeren Internalisierung unterliegt als der μ -Rezeptor (Trapaidze et al., 1996; Koch et al., 1998; Zhang et al., 1999), wurde die vorliegende Arbeit am Modell des δ -Opioidrezeptors durchgeführt.

Die Internalisierung des δ -Opioidrezeptors wurde mit Hilfe des tritierten Antagonisten ^3H -Diprenorphin an Plasmamembranpräparationen gemessen. Diese Methode erfasst die Zahl der an der Zelloberfläche lokalisierten Rezeptoren. Durch

4. Diskussion

Vergleich mit unbehandelten Kontrollzellen kann so das Ausmaß der Rezeptorinternalisierung bestimmt werden (Pfeiffer und Herz, 1982; Law et al., 1984; Trapaidze et al., 1996).

COS-7 Zellen stellen sich für diese Studie als überaus vorteilhaft heraus, da sie mit allen für die Rezeptorinternalisierung benötigten Komponenten ausgestattet sind. Die erhöhte Kapazität der Rezeptorinternalisierung nach chronischer Morphinbehandlung konnte nur deshalb identifiziert werden, da in diesen Zellen der Gehalt an zytosolischen GRK2 und β -Arrestin 1 geringer als in anderen Zelllinien ist (Ménard et al., 1997). Dadurch ist das Ausmaß der Agonist vermittelten Internalisierung des δ -Opioidrezeptors im Vergleich weniger stark ausgeprägt als in HEK293 oder NG15-108 Zellen (Keith et al., 1993; Bot et al., 1997). Eine vergleichbar geringe Internalisierungsrate G-Protein gekoppelter Rezeptoren in COS-7 Zellen konnte kürzlich für Leukotrien B₄- und Oxytocinrezeptoren gezeigt werden, die in beiden Fällen nach Überexpression der limitierenden GRK2 signifikant gesteigert wurde (Chen et al., 2004; Hasbi et al., 2004).

Die Untersuchungen zum Einfluss einer funktionell intakten Rezeptor/Effektor Kopplung für die Ausbildung chronischer Opioideffekte konnte ebenfalls nur am Modell der COS-7 Zellen durchgeführt werden, da diese nur eine einzige, nicht von Opioidrezeptoren regulierbare Isoform der Adenylylzyklase (AVIX) besitzen (Premont, 1994; Avidor-Reiss et al., 1996). Somit kann durch Co-Expression verschiedener Konstrukte der Adenylylzyklase das Signal identifiziert werden, das für die Auslösung chronisch Morphin induzierter Adaptationen ausschlaggebend ist. Diese Eigenschaft von COS-7 Zellen wurde bereits früher erfolgreich zur Charakterisierung des G-Proteins genutzt, das die Information für die Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit vermittelt (Ammer und Christ, 2002). Darüber hinaus konnten in diesem Zellsystem nach Rekonstitution diejenigen Isoformen der Adenylylzyklase bestimmt werden, die nach chronischer Morphinbehandlung mit einer überschießenden cAMP Produktion antworten (Avidor-Reiss et al., 1997; Eckhardt et al., 2000).

Für die praktische Durchführung der Experimente war allerdings von Nachteil, dass

4. Diskussion

durch die Transformation mit dem SV40 Virus und Expression des T-Antigens keine stabile Expression von Plasmid-DNA in diesen Zellen möglich ist (Gluzman, 1981). Dagegen sind COS-7 Zellen zur extrachromosomalen Replikation von Plasmiden mit *SV40 origin* befähigt, die mit einer transienten Überexpression von Proteinen einhergeht (Watson et al., 1993). Somit mussten COS-7 Zellen für jedes Experiment neu transfiziert werden. Eventuelle Schwankungen in der Proteinexpression konnten allerdings vernachlässigt werden, da sowohl die Regulation der Rezeptorfunktion als auch die Induktion adaptiver Veränderungen auf Ebene der Adenylylzyklase durch die absolute Proteinmenge nicht beeinflusst wird (Law et al., 1994; Avidor-Reiss et al., 1996). Auch in dieser Arbeit ergaben die gewonnenen Ergebnisse einen einheitlichen Trend, welcher unabhängig von der jeweiligen Rezeptordichte als Durchschnittswert verschiedener Zellpopulationen anzusehen ist. Somit orientierten sich diese Versuchsbedingungen auch an physiologischen Gegebenheiten, da die Ausstattung einzelner Nervenzellen mit verschiedenen Komponenten Opioidrezeptor assoziierter Signalkaskaden ebenfalls variiert.

In dieser Studie sollten COS-7 Zellen durch die chronische Morphinbehandlung in das Stadium der Toleranz und Abhängigkeit versetzt werden. Ein zelluläres Korrelat hierfür ist die Sensibilisierung der Adenylylzyklase (Supersensitivität), die nach dem Opioidentzug mit einem Anstieg der intrazellulären cAMP Produktion einhergeht (Thomas und Hoffman, 1987; Johnston und Watts, 2003). Um entsprechende Versuchsbedingungen zu rekonstituieren, wurden die Untersuchungen zunächst in Anwesenheit der ACV durchgeführt. Von dieser Isoform ist bekannt, dass sie auf zellulärer Ebene durch eine längerfristige Opioidbehandlung sensibilisiert wird (Childers, 1991; Avidor-Reiss et al., 1996). Sie wird zudem in verschiedenen Gehirnarealen exprimiert (Locus coeruleus; Nucleus accumbens), die wesentlich an der Entstehung von Entzugssymptomen beteiligt sind (Maldonado et al., 1992; Self und Nestler, 1995).

Die Ergebnisse der Internalisierungsversuche zeigen, dass eine chronische Morphinbehandlung bei Anwesenheit einer funktionell intakten Signaltransmission vom δ -Opioidrezeptor zur Adenylylzyklase zu einer signifikant stärkeren

4. Diskussion

Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach kurzzeitiger Stimulation mit DADLE führt (siehe Abbildungen 10 und 11). Voraussetzung für die Entstehung dieses chronischen Opioideffektes ist allerdings, dass während der Morphinbehandlung eine intakte Signaltransduktion zwischen dem Rezeptor und der Adenylylzyklase besteht. Die Identität der regulierten Isoform der Adenylylzyklase ist allerdings nicht von Bedeutung. Dies wurde deutlich, nachdem bei Co-Expression des δ -Opioidrezeptors die ACV durch ACVI ersetzt und die Rezeptor/G-Protein Interaktion mit PTX unterbunden wurde. Obwohl die Co-Expression von ACVI die Rezeptorinternalisierung nach chronischer Morphinexposition verstärken konnte, konnte dieser Effekt nach Unterbrechung der G-Protein aktivierten Signalweiterleitung mit PTX nicht mehr beobachtet werden (siehe Abbildung 16). Die Regulation der Rezeptorfunktion und -internalisierung kann somit als Ausdruck intrazellulärer Adaptationen im Stadium der Toleranz und Abhängigkeit angesehen werden. Nachdem bisher nur Adaptationen auf Ebene der Adenylylzyklase mit der Ausbildung zellulärer Korrelate für Toleranz und Abhängigkeit assoziiert werden, stellt sich die Frage, ob die Sensibilisierung der Adenylylzyklase mit dem Mechanismus der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors interferiert.

Diese Frage wurde durch Co-Transfektion der Zellen mit der ACII beantwortet. Diese Isoform wird vom δ -Opioidrezeptor über freigesetzte $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheiten direkt reguliert, zeigt aber keine Sensibilisierung nach chronischer Opioidbehandlung (Taussig et al., 1993a; Taussig und Gilman, 1995; Avidor-Reiss et al., 1997). Trotzdem führte die chronische Morphinbehandlung in diesen Zellen zu einer gesteigerten Rezeptorinternalisierung (siehe Abbildungen 17 und 18). Das Phänomen der Adenylylzyklase Supersensitivität scheint daher nicht an die Veränderungen in der Rezeptorregulation gekoppelt zu sein.

Die verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung steht auch nicht mit der katalytischen Aktivität der Adenylylzyklase in Verbindung, da die alleinige Anwesenheit der Bindungsstelle für aktivierte G_{α} -Untereinheiten in Abwesenheit einer enzymatischen Funktion die Adaptation auf Rezeptorebene vermitteln konnte (Tang et al., 1991; Dessauer et al.,

4. Diskussion

1998). Dies wurde durch Co-Transfektion des δ -Opioidrezeptors mit dem HA-ACV-C₁ Fragment gezeigt (siehe Abbildung 21). Folglich ist die direkte Interaktion aktivierter G _{α} - oder G _{$\beta\gamma$} - Untereinheiten mit einer Adenylylzyklase das entscheidende Signal zur Auslösung chronischer Morphinwirkungen auf die Rezeptorinternalisierung. Diese Schlussfolgerung wird durch die Versuche mit den MAP-Kinase Isoformen ERK-1 und -2 unterstützt. Die MAP-Kinase stellt einen über Opioidrezeptoren indirekt regulierten Effektor dar, wobei freie G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten lediglich am Beginn einer komplexen Kaskade alternativer Stoffwechselwege stehen (Burt et al., 1996; Schulz et al., 2004). Somit kann die Aktivierung der MAP-Kinase in COS-7 Zellen unabhängig von der An- oder Abwesenheit einer funktionell gekoppelten Adenylylzyklase beobachtet werden, ohne dass damit in die Rezeptorregulation eingegriffen wird (siehe Abbildung 13). Die nach einer chronischen Morphinbehandlung beobachtete verstärkte Aktivierung von ERK-1 und -2 ist deshalb als erhöhte Empfindlichkeit der δ -Opioidrezeptoren zu interpretieren. Die nächste Frage war nun, wie die direkte Assoziation von G-Protein Untereinheiten mit ihren entsprechenden Effektoren in den Ablauf der Internalisierung des δ -Opioidrezeptors eingreifen kann.

Ein möglicher Ort für die Interaktion zwischen G-Protein vermittelter Effektorregulation und den Mechanismen der Rezeptorfunktion stellt der G-Protein Zyklus dar. Zum einen existiert eine Familie von Proteinen mit so genannter PH Domäne, die freie G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten binden und die Reassoziierung zum Heterotrimer verhindern können. Zum anderen kann durch Bindung so genannter GAP-Proteine an die aktivierte G _{α} -Untereinheit die GTPase-Aktivität erhöht und die Signalübertragung beeinflusst werden. Eine mögliche Wechselwirkung könnte dadurch entstehen, dass die während einer chronischen Morphinbehandlung kontinuierlich freigesetzten G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten mit regulatorischen Proteinen mit PH Domäne interagieren. Ein solches Protein stellt die GRK2 dar (Touhara et al., 1994), die nach der G-Protein Aktivierung freigesetzte G _{$\beta\gamma$} -Untereinheiten als Bindungspartner zur Umverteilung an die Plasmamembran und Phosphorylierung des δ -Opioidrezeptors benötigt (Guo et al., 2000). In der Tat konnte gezeigt werden,

4. Diskussion

dass die chronische Morphinbehandlung bei Anwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase mit einer deutlichen Anreicherung von GRK2 an der Plasmamembran einher geht (siehe Abbildung 22). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt kann noch nicht gesagt werden, ob es sich um eine vermehrte GRK2 Umverteilung aus dem Zytosol oder um eine Hochregulation des Gesamtproteins handelt. Letzteres konnte in Neuronen des Locus coeruleus der Ratte nach einer chronischen Morphinadministration beobachtet werden (Terwilliger et al., 1994). Weiterhin geht aus Abbildung 22 hervor, dass die akute Stimulation von δ -Opioidrezeptoren mit DADLE nach chronischer Morphinbehandlung eine verstärkte Rekrutierung von GRK2 an die Plasmamembran zur Folge hat. Hierdurch könnte sich eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen gesteigerte Phosphorylierung und Internalisierung des δ -Opioidrezeptors erklären. Obwohl aus den vorliegenden Untersuchungen keine direkte Aussage über die Aktivität der GRK2 durch Bestimmung der Rezeptorphosphorylierung möglich ist, weist die vermehrte Umverteilung von β -Arrestin 1 indirekt auf einen solchen Mechanismus hin (siehe Abbildung 23). Eine solche Interpretation erscheint plausibel, da β -Arrestin 1 den phosphorylierten Rezeptor als Stimulus für die Membranamverteilung benötigt (Ferguson et al., 1996b). Eine vermehrte Bindung phosphorylierter Rezeptoren an „clathrin coated pits“ mit nachfolgender Sequestrierung und Internalisierung ist die Folge (Kovoor et al., 1997; Law et al., 2000).

Obwohl δ -Opioidrezeptoren in Abwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase kontinuierlich ihre assoziierten G-Proteine aktivieren, reicht dies nicht zur Ausbildung chronisch Morphin induzierter Adaptationen auf Ebene der Rezeptorinternalisierung aus. Hierfür ist offensichtlich die Interaktion zwischen aktivierten G_{α} -Untereinheiten und einer Adenylylzyklase essentiell. In diesem Zusammenhang kann durch die Bindung einer aktivierten G_{α} -Untereinheit an ihren Effektor die Geschwindigkeit des G-Protein Zyklus beeinflusst werden. So können beispielsweise die ACV und Phospholipase C zur Familie der GAP (GTPase activating protein) oder RGS (regulators of g-protein signaling) Proteine gezählt

4. Diskussion

werden (Berstein et al., 1992; Wittpoth et al., 2000; Hollinger und Heppler, 2002), die eine beschleunigte Hydrolyse von GTP zu GDP bewirken und somit die Reassoziaton des Heterotrimers fördern (Markby et al., 1993). Dies resultiert in einer Abschwächung des G-Protein abhängigen Signals, was in der Regel zur Desensibilisierung von Rezeptoren beiträgt (Hunt et al., 1996; Watson et al., 1996). In der vorliegenden Arbeit führt die Co-Expression eines Effektors mit GAP-Funktion allerdings zur Sensibilisierung von δ -Opioidrezeptoren. Dies könnte durch eine vermehrte Bereitstellung heterotrimerer G-Proteine oder einem pro Zeiteinheit häufiger ablaufenden G-Protein Zyklus erklärt werden. Als Konsequenz beider Erklärungsmöglichkeiten resultiert eine verstärkte Kopplung der Rezeptoren an ihre G-Proteine, was einerseits mit einer Zunahme der Funktion hoch affiner Rezeptoren für Deltorphin II und andererseits mit einer vermehrten Aktivität und Internalisierung von δ -Opioidrezeptoren nach DADLE Stimulation korreliert. Die Expression eines direkt regulierten Effektors bewirkt offenbar eine positive Rückkopplung („feedback“) zwischen Rezeptor und G-Protein. Derartige Regulationsmechanismen sind in der Physiologie nicht unbekannt. Positive „feedback“-Mechanismen verstärken die Antwort des ursprünglichen Signals und wurden für G-Proteine und der cGMP abhängigen Phosphodiesterase in Stäbchenzellen der Retina beschrieben (Arshavsky und Bownds, 1992).

Nach einer längerfristigen Schmerztherapie mit Opioiden kann es zur Ausbildung einer gesteigerten Schmerzempfindung kommen, ein paradoxes Phänomen das als Hyperalgesie oder Allodynie bezeichnet wird (Koppert, 2004). An der erhöhten Schmerzempfindung sind NMDA-Rezeptoren ursächlich beteiligt, die nach PKC vermittelter Phosphorylierung für ihre endogenen Liganden hypersensibilisiert werden (Woolf und Thompson, 1991; Célèrier et al., 2000; Guo et al., 2002). Die Sensibilisierung von NMDA-Rezeptoren geht mit der Entwicklung von Toleranz gegenüber Opioiden einher und tritt zeitlich verzögert sowie mit ansteigender Intensität auf. Auf zellulärer Ebene wird eine Beteiligung der Adenylylzyklase diskutiert, die im Opioidenzug zur Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter führt (Fairbanks und Wilcox, 2000). Die in dieser Arbeit beschriebene Sensibilisierung von δ -Opioidrezeptoren nach einer chronischen Morphinbehandlung könnte über

4. Diskussion

eine vermehrte Aktivierung der PLC und nachfolgender Freisetzung von Calcium eine erhöhte Aktivität der PKC bewirken. Hierüber könnte eine mögliche Wechselwirkung zwischen Opioidrezeptoren und NMDA-Rezeptoren hergestellt werden. Die Beobachtung, dass bei Verwendung von Morphin im Gegensatz zu anderen Opioiden die Hyperalgesie bereits während der Schmerztherapie auftritt kann als weiteres Beispiel für die Sonderstellung des Morphin gelten (Ali, 1986).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in transient transfizierten COS-7 Zellen die chronische Aktivierung von δ -Opioidrezeptoren mit Morphin in Anwesenheit einer funktionell regulierten Adenylylzyklase zur Ausbildung intrazellulärer Adaptationen führt, die mit der Entstehung von Abhängigkeit einhergehen. Diese äußern sich bei Anwesenheit einer durch inhibitorische G_{α} -Untereinheiten regulierbaren Adenylylzyklase in einer Sensibilisierung der cAMP Produktion. Die intrazellulären Adaptationen gehen in COS-7 Zellen zudem mit einer Sensibilisierung des δ -Opioidrezeptors und einer verstärkten Agonist vermittelten Rezeptorinternalisierung einher. Als Voraussetzung für die Induktion intrazellulärer Adaptationen nach einer chronischen Morphinbehandlung ist das Vorliegen eines funktionell intakten G-Protein Zyklus zu nennen, der eine feedback-Regulation mit dem Effektor erfordert. Somit kann die verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung als Indikator für intrazelluläre Adaptationen im Stadium der Abhängigkeit angesehen werden.

5. Zusammenfassung

Opioidrezeptoren sind membranständige, an inhibitorische G-Proteine gekoppelte Rezeptoren, deren längerfristige Aktivierung zur Ausbildung von Toleranz und Abhängigkeit führt. Auf zellulärer Ebene geht Toleranz häufig mit einer Desensibilisierung der Rezeptorfunktion einher, während Abhängigkeit durch eine Sensibilisierung der Adenylylzyklase gekennzeichnet ist.

Morphin nimmt unter den Opioiden eine Sonderstellung ein, da es Opioidrezeptoren selbst nicht zu internalisieren vermag. Hieraus resultiert eine uneingeschränkte inhibitorische Signaltransduktion mit der Möglichkeit zur verstärkten Ausbildung intrazellulärer Adaptationen nach chronischer Morphinbehandlung.

In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die chronische Morphinbehandlung zu Adaptationen in der Agonist vermittelten Regulation der Rezeptorfunktion führt und ob diese an die Sensibilisierung der Adenylylzyklase gebunden sind. Als Zellmodell dienten COS-7 Zellen, die endogen keine durch inhibitorische G-Proteine regulierbare Adenylylzyklase besitzen. Zur Beantwortung der Fragestellung wurde der δ -Opioidrezeptor entweder alleine oder zusammen mit verschiedenen Konstrukten der Adenylylzyklase in COS-7 Zellen co-exprimiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die chronische Morphinbehandlung in Gegenwart funktionell regulierbarer Adenylylzyklasen (ACV, VI) zu einer Sensibilisierung der Funktion des δ -Opioidrezeptors führt. Die gesteigerte Empfindlichkeit des δ -Opioidrezeptors äußert sich in einer erhöhten Affinität gegenüber Deltorphin II sowie in einer verstärkten Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK-1 und -2. Als Ausdruck der gesteigerten Rezeptorfunktion konnte zudem eine verstärkte Internalisierung des δ -Opioidrezeptors nach kurzzeitiger Stimulation mit [D-Ala², D-Leu⁵]Enkephalin identifiziert werden. Diese geht mit einer erhöhten Umverteilung der G-Protein gekoppelten Rezeptorkinase 2 und von β -Arrestin 1 einher.

5. Zusammenfassung

Durch Substitution der ACV mit ACII oder dem enzymatisch inaktiven HA-ACV-C₁ Fragment sowie nach Unterbrechung der ACVI Regulation durch Pertussis Toxin konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Regulation der Rezeptorfunktion weder an die katalytische Aktivität noch an die Sensibilisierung der Adenylylzyklase gebunden ist. Vielmehr scheint eine direkte Interaktion inhibitorischer G_α-Untereinheiten mit der Adenylylzyklase essentiell für die Ausbildung intrazellulärer Adaptationen nach einer chronischen Opioidbehandlung zu sein. Die Sensibilisierung der Adenylylzyklase sowie die gesteigerte Internalisierung des δ-Opioidrezeptors nach chronischer Morphinbehandlung können somit beide als Ausdruck intrazellulärer Adaptationen im Stadium der Abhängigkeit aufgefasst werden.

6. Summary

Sensitisation of δ -Opioid Receptor Function by Chronic Morphine Treatment

Chronic activation of inhibitory G protein-coupled opioid receptors results in the development of tolerance and dependence. On a cellular level, tolerance is often accompanied by desensitisation of opioid receptor function, whereas dependence is characterized by sensitisation of adenylyl cyclase activity.

Morphine displays unique functional properties, as it fails to induce agonist mediated receptor internalisation. Due to an unimpeded inhibitory signalling, chronic morphine treatment is prone to induce intracellular adaptations associated with opioid dependence.

The aim of this thesis was to investigate whether chronic morphine treatment might produce adaptational changes in the regulation of opioid receptor function and whether these are associated with regulatory changes at the level of adenylyl cyclase. COS-7 cells were used as a model system, as they lack an adenylyl cyclase isoform that is susceptible to regulation by inhibitory G protein-coupled receptors. These cells were transiently transfected with cDNAs either for the δ -opioid receptor alone or together with different adenylyl cyclase isoforms. The results obtained show that in the presence of functionally regulated adenylyl cyclase isoforms (ACV, VI) chronic morphine treatment results in sensitisation of δ -opioid receptor function. The enhanced sensitivity of δ -opioid receptors is accompanied by an increased affinity of the receptor towards Deltorphin II as well as an enhanced activation of mitogen-activated protein kinases ERK-1 and -2. As a consequence of enhanced receptor activity, short-term agonist treatment with [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin resulted in a more profound internalisation of the receptor. The enhanced receptor internalisation is associated with an increased agonist induced redistribution of G protein-coupled receptor kinase 2 and β -arrestin 1 from the cytosol to the plasma membrane.

Substitution of ACV by ACII or the enzymatically inactive HA-ACV-C₁ fragment as

6. Summary

well as disruption of ACVI regulation by pertussis toxin treatment provided evidence that the induction of alterations in receptor function are unlikely to require catalytic activity or sensitisation of adenylyl cyclase. In contrast, the results obtained suggest that direct interaction of inhibitory G_{α} subunits and their respective adenylyl cyclase is essential for the induction of cellular adaptations associated with dependence. They also suggest that sensibilization of adenylyl cyclase as well as the increase in agonist induced receptor internalisation may originate from common intracellular adaptations in G protein-coupled signal transduction.

7. Literaturverzeichnis

Ali NM. (1986)

Hyperalgesic response in a patient receiving high concentrations of spinal morphine.

Anesthesiology 65(4): 449

Almeida, OFX, Schulz R, Herz A. (1985)

Paradoxical LH and prolactin responses to naloxone after chronic treatment with morphine.

J Endocrinology 108: 181 - 189

Ammer H, Christ TE. (2002)

Identity of adenylyl cyclase isoform determines the G protein mediating chronic opioid-induced adenylyl cyclase supersensitivity.

J Neurochemistry 83: 818 - 827

Ammer H, Schulz R. (1995)

Chronic activation of inhibitory δ -opioid receptors cross-regulates the stimulatory adenylate cyclase-coupled prostaglandin E₁ receptor system in Neuroblastoma x Glioma (NG108-15) hybrid cells.

J Neurochemistry 64: 2449 - 2457

Ammer H, Schulz R. (1996)

Morphine dependence in human neuroblastoma SH-SY5Y cells is associated with adaptive changes in both the quantity and functional interaction of PGE₁ receptors and stimulatory G proteins.

Brain Research 707: 235 - 244

Ammer H, Schulz R. (1998)

Adenylyl cyclase supersensitivity in opioid-withdrawn NG108-15 hybrid cells requires G_s but is not mediated by the G_s α subunit.

J Pharmacol Exp Ther 286(2): 855 - 862

Arshavsky, VY, Bownds MD. (1992)

Regulation of deactivation of photoreceptor G protein by its target enzyme and cGMP.

Nature 357: 416 - 417

Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, Pfeuffer T, Vogel Z. (1996)

Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation.

J Biol Chem 271(35): 21309 - 21315

Avidor-Reiss T, Nevo I, Saya D, Bayewitch M, Vogel Z. (1997)

Opioid-induced adenylyl cyclase superactivation is isozyme-specific.

J Biol Chem 272(8):5040 - 5047

- Belcheva MM, Barg J, Gloeckner C, Gao S-M, Chuang D-M, Coscia C. (1992)**
Antagonist-induced transient down-regulation of δ -opioid receptors in NG108-15 cells.
Mol Pharmacol 42: 445-452
- Berridge MJ. (1993)**
Inositol trisphosphate and calcium signalling.
Nature 361: 315 - 325
- Berstein G, Blank JL, Jhon DY, Exton JH, Rhee SG, Ross EM. (1992)**
Phospholipase C-beta is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator.
Cell 70(3): 411 - 418
- Birnboim HC, Doly J. (1979)**
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Research 7: 1513 - 1523
- Bot G, Blake AD, Li S, Reisine T. (1997)**
Opioid regulation of the mouse delta-opioid receptor expressed in human embryonic kidney 293 cells.
Mol Pharmacol 52: 272 - 281
- Burt AR, Carr C, Mullianey I, Anderson NG, Milligan G. (1996)**
Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse δ opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation.
J Biochem 320: 227 - 235
- Célèrier E, Rivat C, Jun Y, Laulin J-P, Larcher A, Reynier P, Simonnet G. (2000)**
Long-lasting hyperalgesia induced by fentanyl in rats.
Anesthesiology 92: 465 - 72
- Chakrabarti S, Liu N-J, Gintzler AR. (2003)**
Reciprocal modulation of phospholipase C β isoforms: adaptation to chronic morphine.
PNAS 100(23): 13686 - 13691
- Chakrabarti S, Oppermann M, Gintzler AR. (2001)**
Chronic morphine induces the concomitant phosphorylation and altered association of multiple signaling proteins: a novel mechanism for modulation cell signaling.
PNAS 98(7): 4209 - 4214
- Chakrabarti S, Wang L, Tang W-J, Gintzler AR. (1998)**
Chronic morphine augments adenylyl cyclase phosphorylation: relevance to altered signaling during tolerance/dependence.
Mol Pharmacol 54: 949 - 953

Chen Z, Gaudreau R, Le Guill C, Rola-Plezczyński M, Stanková, J. (2004)

Agonist-induced internalization of leukotriene B₄ receptor 1 requires g-protein-coupled receptor kinase 2 but not arrestins.

Mol Pharmacol 66: 377 - 386

Chen Y, Harry A, Li J, Smit MJ, Bai X, Magnusson R, Pieroni JP, Weng G, Iyengar R. (1997)

Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation.

Proc Natl Acad Sci USA 94(25): 14100 - 14104

Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L. (1993)

Molecular cloning and functional expression of a μ -opioid receptor from rat brain.

Mol Pharmacol 44: 8 - 12

Chen C, Okayama H. (1987)

High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA.

Mol Cell Biol 7(8): 2745 - 2752

Cheng Y-C, Prusoff WH. (1973)

Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction.

Biochem. Pharmacol 22: 3099 - 3108

Childers SR. (1991)

Opioid receptor-coupled second messenger systems.

Life Sci 48: 1991 - 2003

Chu P, Murray S, Lissin D, von Zastrow M. (1997)

δ and κ opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist.

J Biol Chem 272(43): 27124 - 27130

Collier C. (1984)

Epinephrine and epidural narcotics.

Anesthesiology 60(2): 168 - 169

Crespo P, Xu N, Simonds WF, Gutkind JS. (1994)

Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein $\beta\gamma$ subunits.

Nature 369: 418 - 420

Davis RJ. (1993)

The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway.

J Biol Chem 268(20): 14553 - 14556

Dessauer CW, Tesmer JJG, Sprang SR, Gilman AG. (1998)

Identification of a $G_{i\alpha}$ binding site on type V adenylyl cyclase.

J Biol Chem 273(40): 25831 - 25839

Eckhardt K, Nevo I, Levy R, Mikus G, Eichelbaum M, Zogel Z. (2000)

Morphine-related metabolites differentially activate adenylyl cyclase isozymes after acute and chronic administration.

FEBS Letters 470: 309 - 314

Eisinger DA, Ammer H, Schulz R. (2002)

Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization.

J Neurosci 22(23):10192 - 10200

Evans CJ, Keith DE, Morrison H, Magendzo K, Edwards Rh. (1992)

Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.

Science 258: 1952 - 1955

Fairbanks CA, Wilcox, GL. (2000)

Spinal plasticity of acute opioid tolerance.

J Biomed Sci 7: 200 - 212

Feinstein PG, Schrader KA, Bakalyar HA, Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG, Reed PR. (1991)

Molecular cloning and characterization of a Ca²⁺/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain.

Proc Natl Acad Sci USA 88(22): 10173 - 10177

Ferguson GD, Storm DR. (2004)

Why Calcium-stimulated adenylyl cyclases?

Physiology 19: 271 - 276

Ferguson SSG, Barak LS, Zhang J, Caron MG. (1996a)

G-protein-coupled receptor regulation: role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins.

Can J Physiol Pharmacol 74: 1095-1110

Ferguson SSG, Downey III WE, Colapietro A-M, Barak LS, Ménard L, Caron MG. (1996b)

Role of β -arrestin in mediating agonist-promoted G protein-coupled receptor internalization.

Science 271: 363 - 366

Gao B, Gilman AG. (1991)

Cloning and expression of a widely distributed (type IV) adenylyl cyclase.

Proc Natl Acad Sci USA 88: 10178 - 10182

Gilman, AG. (1987)

G-proteins: transducers of receptor-generated signals.

Ann Rev Biochem 56: 615 - 649

Gintzler AR, Chakrabarti S. (2000)

Opioid tolerance and the emergence of new opioid receptor -coupled signaling.

Mol Neurobiol 21: 31 - 33

Gluzman Y. (1981)

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.

Cell 23: 175 - 182

Goldstein A, Naidu A. (1989)

Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures.

Mol Pharmacol 36: 265 - 272

Goodman OB Jr, Krupnick JG, Santini F, Gurevich VV, Penn RB, Gagnon AW, Keen JH, Benovic JL. (1996)

Beta-arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the beta2-adrenergic receptor.

Nature 383: 447 - 450

Gudermann T, Kalkbrenner F, Schultz G. (1996)

Diversity and selectivity of receptor-g protein interaction.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 429 - 459

Guo J, Wu Y, Zhang W, Zhao J, Devi LA, Pei G, Ma L. (2000)

Identification of g protein-coupled receptor kinase 2 phosphorylation sites responsible for agonist-stimulated δ -opioid receptor phosphorylation.

Mol Pharmacol 58(5): 1050 - 1056

Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, Ren K. (2002)

Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia.

J Neurosci 22(14): 6208 - 6217

Hamprecht B, Glaser T, Reiser G, Bayer E, Propst F. (1985)

Culture and characteristics of hormone-responsive neuroblastoma X glioma hybrid cells.

Methods Enzymol 109: 316 - 341

Hanoune J, Defer N. (2001)

Regulation and role of adenylyl cyclase isoforms.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 41: 145 - 174

Harrison LM, Kastin AJ, Zadina JE. (1998)

Opiate tolerance and dependence: receptors, G-proteins, and antiopiates.

Peptides 19(9): 1603 - 1630

Hasbi A, Devost D, Laporte SA, Zingg HH. (2004)

Real-time detection of interactions between the human oxytocin receptor and G protein-coupled receptor kinase-2.

Mol Endocrinol 18(5): 1277 - 1286

Hausdorff WP, Caron MG, Lefkowitz RJ. (1990)

Turn off the signal: desensitization of β -adrenergic receptor function.

FASEB 4: 2881 - 2889

Ho MKC, Wong YH. (2001)

G_z signaling: emerging divergence from G_i signaling.

Oncogene 20: 1615 - 1625

Ho MKC, Yung LY, Chan JSC, Chan JHP, Wong CSS, Wong YH. (2001)

$G_{\alpha_{14}}$ links a variety of G_i - and G_s -coupled receptors to the stimulation of phospholipase C.

Br J Pharmacol 132: 1431 - 1440

Hollinger S, Hepler JR. (2002)

Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling.

Pharmacol Rev 54: 527 - 559

Horton JK, Marin RC, Kalinka S, Cushing A, Kitcher JP, O'Sullivan MJ, Baxendale PM. (1992)

Enzyme immunoassays for the estimation of adenosine 3', 5' cyclic monophosphate and guanosine 3', 5' cyclic monophosphate in biological fluids.

J Immunol Methods 155: 31 - 40

Hughes J, Smith T, Kosterlitz H, Forthergill L, Morgan B, Morris H. (1975)

Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity.

Nature 258; 577 - 579

Hunt TW, Fields TA, Casey PJ, Peralta EG. (1996)

RGS10 is a selective activator of $G\alpha_i$ GTPase activity.

Nature 383: 175 - 178

Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (1993)

Structure and mechanism of the G protein-coupled receptor kinases.

J Biol Chem 268(32): 23735-23738

Insel PA, Ostrom RS. (2003)

Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling.

Cell Mol Neurobiol 23: 305 - 314

Johnson SM, Fleming WW. (1989)

Mechanisms of cellular adaptive sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence.

Pharmacological Reviews 41(4): 435 - 488

Johnston CA, Watts VJ. (2003)

Sensitization of adenylyl cyclase: a general mechanism of neuroadaptation to persistent activation of $G\alpha_{i/o}$ -coupled receptors?

Life Sciences 73: 2913 - 2925

Keith DE Jr, Anton B, Evans CJ. (1993)

Characterization and mapping of a delta opioid receptor clone from NG108-15 cells.

Proc West Pharmacol Soc 36: 299 - 306

Keith DE, Murray SR, Zaki PA, Chus PC, Lissin DV, Kang L, Evans CJ, von Zastrow M. (1996)

Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization.

J Biol Chem 271: 19021 - 19024

Ko JL, Arvidsson U, Williams FG, Law PY, Elde R, Loh HH. (1999)

Visualization of time-dependent redistribution of δ -opioid receptors in neuronal cells during prolonged agonist exposure.

Molecular Brain Research 69: 171 - 185

Koch WJ, Hawes BE, Allen LF, Lefkowitz RJ. (1994)

Direct evidence that G_i-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G_{βγ} activation of p21^{ras}.

Proc Natl Acad Sci USA 91: 12706-12710

Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E, Holt V. (1998)

Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization.

J Biol Chem 273(22): 13652 - 13657

Koppert W. (2004)

Opioid-induzierte Hyperalgesie. Pathophysiologie und Klinik.

Anaesthesist 53: 455 - 466

Kouhen OM-E, Wang G, Solberg J, Erickson LJ, Law P-Y, Loh HH. (2000)

Hierarchical phosphorylation of δ-opioid receptor regulates agonist-induced receptor desensitization and internalization.

J Biol Chem 275(47): 36659 - 36664

Kovoor A, Nappey V, Kieffer BL, Chavkin C.(1997)

μ and δ opioid receptors are differentially desensitized by the coexpression of β-adrenergic receptor kinase 2 and β-arrestin 2 in *Xenopus* oocytes.

J Biol Chem 272(44): 27605 - 27611

Kramer HK, Andria ML, Kushner SA, Esposito DH, Hiller JM, Simon EJ. (2000)

Mutation of tyrosine 318 (Y318F) in the delta-opioid receptor attenuates tyrosine phosphorylation, agonist-dependent receptor internalization, and mitogen-activated protein kinase activation.

Brain Res Mol Brain Res 79(1-2): 55 - 66

Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA. (1992)

Molecular diversity in the adenylyl cyclase family. Evidence for eight forms of the enzyme and cloning of type VI.

J Biol Chem 267(34): 24858 - 24862

Laemmli UK. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature, 227(5259): 680 - 685

Lane-Ladd SB, Pineda J, Boundy VA, Pfeuffer T, Krupinski J, Aghajanian GK, Nestler EJ. (1997)

CREB (cAMP response element-binding protein) in the locus coeruleus: biochemical, physiological, and behavioral evidence for a role in opiate dependence.

J Neuroscience 17(20): 7890 - 7901

Laugwitz K-L, Offermanns St, Spicher K, Schultz G. (1993)

μ and δ opioid receptors differentially couple to G protein subtypes in membranes of human neuroblastoma SH-SY5Y cells.

Neuron 10: 233 - 242

7. Literaturverzeichnis

Law P-Y, Hom DS, Loh HH. (1984)

Down-regulation of opiate receptor in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells: chloroquine promotes accumulation of tritiated enkephalin in the lysosomes.

J Biol Chem 259: 4096 - 4104

Law P-Y, Mcginn TM, Wick MJ, Erikson LJ, Evans C, Loh HH. (1994)

Analysis of delta-opioid receptor activities stably expressed in CHO cell lines: function of receptor density?

J Pharmacol Exp Ther 271(3): 1686 - 1694

Law P-Y, Kouhen OM, Solberg J, Wang W, Erickson LJ, Loh HH. (2000a)

Deltorphin II-induced rapid desensitization of delta-opioid receptor requires both phosphorylation and internalization of the receptor.

J Biol Chem 275(41): 32057 - 32065

Law P-Y, Wong YH, Loh HH. (2000b)

Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.

Annu Rev Pharmacol Toxicol 40: 389 - 430

Lee JWM, Joshi S, Chan JSC, Wong YH. (1998)

Differential coupling of μ -, δ -, and κ - opioid receptors to $G\alpha_{16}$ -mediated stimulation of phospholipase C.

J Neurochem 70: 2203 - 2211

Li JG, Luo LY, Krupnick JG, Benovic JL, Liu-Chen LY. (1999)

U50,488H-induced internalization of the human kappa opioid receptor involves a beta-arrestin- and dynamin-dependent mechanism. Kappa receptor internalization is not required for mitogen-activated protein kinase activation.

J Biol Chem 274(17), 12087 - 12094

Lin F-T, Krueger KM, Kendall HE, Daaka Y, Fredericks ZL, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1997)

Clathrin-mediated endocytosis of the β -adrenergic receptor is regulated by phosphorylation/dephosphorylation of β -arrestin1.

J Biol Chem 272: 31051 - 31057

Lowe JD, Celver JP, Gurevich VV, Chavkin C. (2002)

μ -opioid receptors desensitize less rapidly than δ -opioid receptors due to less efficient activation of arrestin.

J Biol Chem 277(18): 15729 - 15735

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951)

Protein measurement with the Folin Phenol reagent.

J Biol Chem 193: 265 - 275

Maldonado R, Stinus L, Gold LH, Koob GF. (1992)

Role of different brain structures in the expression of the physical morphine withdrawal syndrome.

J Pharmacol Exp Ther 261(2): 669 - 677

Markby DW, Onrust R, Bourne HR. (1993)

Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G α subunit.
Science 262: 1895 - 1901

Matsuoka I, Maldonado R, Defer N, Noel F, Hanoune J, Roques BP. (1994)

Chronic morphine administration causes region-specific increase of brain type VIII adenylyl cyclase mRNA.
Eur J Pharmacol 268(2): 215 - 221

Ménard L, Ferguson SSG, Zhang J, Lin F-T, Lefkowitz RJ, Caron MG, Barak LS. (1997)

Synergistic regulation of β_2 -adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of β -adrenergic receptor kinase and β -arrestin determine kinetics of internalization.
Mol Pharmacol 51: 800 - 808

Miyamae T, Fukushima N, Misu Y, Ueda H. (1993)

δ opioid receptor mediates phospholipase C activation via G $_i$ in *Xenopus* oocytes.
FEBS 333(3): 311 - 314

Neer, EJ. (1994)

G proteins: critical control points for transmembrane signals.
Protein Science 3: 3 -14

Nestler EJ, Aghajanian GK. (1997)

Molecular and cellular basis of addiction.
Science 278: 58 - 63

Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Bayewitch M, Heldman E, Vogel Z. (1998)

Regulation of adenylyl cyclase isozymes on acute and chronic activation of inhibitory receptors.
Mol Pharmacol 54(2): 419 - 426

Pasternak G, Simantov R, Snyder S. (1976)

Characterization of an endogenous morphine-like factor (enkephalin) in mammalian brain.
Mol Pharmacol 12: 504 - 513

Pei G, Kieffer BL, Lefkowitz RJ, Freedman NJ. (1995)

Agonist-dependent phosphorylation of the mouse δ -opioid receptor: involvement of G protein-coupled receptor kinases but not protein kinase C.
Mol. Pharmacol 48: 173 - 177

Pfeiffer A, Herz A. (1982)

Enhancement of δ - but not μ -opiate agonist binding by calcium.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 319: 147 - 153

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. (2002)

Seven-transmembrane receptors.
Nature 3: 639 - 650

Pitcher JA, Freedman NJ, Lefkowitz RJ. (1998)

G protein-coupled receptor kinases.
Annu Rev Biochem 67: 653 - 692

Pitcher JA, Payne ES, Csontos C, DePaoli-Roach AA, Lefkowitz RJ. (1995)

The g-protein-coupled receptor phosphatase: a protein phosphatase type 2A with a distinct subcellular distribution and substrate specificity.
Proc Natl Acad Sci USA 92: 8343 - 8347

Premont RT. (1994)

Identification of adenylyl cyclases by amplification using degenerate primers.
Methods Enzymol 238: 116 - 127

Premont RT, Jacobowitz O, Iyengar R. (1992)

Lowered responsiveness of the catalyst of adenylyl cyclase to stimulation by GS in heterologous desensitization: a role for adenosine 3',5'-monophosphate-dependent phosphorylation.
Endocrinology 131(6): 2774 - 2784

Reisine T, Bell GI. (1993)

Molecular biology of opioid receptors.
Trends Neurosci 16(12): 506 - 510

Rhee MH, Nevo I, Avidor-Reiss T, Levy R, Vogel Z. (2000)

Differential superactivation of adenylyl cyclase isozymes after chronic activation of the CB(1) cannabinoid receptor.
Mol Pharmacol 57(4): 746 - 752

Scatchard, G. (1949)

The attractions of proteins for small molecules and ions.
Ann N Y Acad Sci 51: 660 - 672

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 μ -opioid receptor in HEK 293 cells.
J Neurochem 74: 414 - 422

Schulz R, Eisinger DA, Wehmeyer A. (2004)

Opioid control of MAP kinase cascade.
Eur J Pharmacol 500: 487 - 497

Seeger R, Krebs EG. (1995)

The MAPK signaling cascade.
FASEB J 9: 726 - 735

Self DW, Nestler EJ. (1995)

Molecular mechanisms of drug reinforcement and addiction.
Annu Rev Neurosci 18: 463 - 495

Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA. (1975)

Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity.
Proc Natl Acad Sci USA 72: 590 - 594

- Sibley DR, Strasser RH, Benovic JL, Daniel K, Lefkowitz RJ. (1986)**
Phosphorylation / dephosphorylation of the β -adrenergic receptor regulates its functional coupling to adenylate cyclase and subcellular distribution.
Proc Natl Acad Sci USA 83: 9408 - 9412
- Standifer KM, Pasternak GW. (1997)**
G proteins and opioid receptor-mediated signalling.
Cell Signall 9(3/4): 237 - 248
- Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. (1996)**
Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol 36: 461 - 480
- Sunahara RK, Taussig R. (2002)**
Isoforms of mammalian adenylyl cyclase: multiplicities of signaling.
Molecular Interventions 2(3): 168 - 184
- Szekeres PG, Koenig JA, Edwardson JM. (1998)**
The relationship between agonist intrinsic activity and the rate of endocytosis of muscarinic receptors in a human neuroblastoma cell line.
Mol Pharmacol 53: 759 - 765
- Szücs M, Boda K, Gintzler AR. (2004)**
Dual effects of DAMGO [D-Ala², N-Me-Phe⁴, Gly⁵-ol]-enkephalin and CTAP (D-Phe-Cyx-Tyr-D-Trp-Arg-Ther-Pen-Thr-Nh₂) on adenylyl cyclase activity: implications for μ -opioid receptor G_s coupling.
J Pharmacol Exp Ther 310: 256 - 262
- Tan CM, Kelvin DJ, Litchfield DW, Ferguson SSG, Feldman RD. (2001)**
Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase.
Biochemistry 40: 1702 - 1709
- Tanowitz M, von Zastrow M. (2003)**
A novel endocytic recycling signal that distinguishes the membrane trafficking of naturally occurring opioid receptors.
J Biol Chem 278(46): 45978 - 45986
- Tang W-J, Krupinski J, Gilman AG. (1991)**
Expression and characterization of calmodulin-activated (type I) adenylyl cyclase.
J Biol Chem 266(13): 8595-8603
- Taussig R, Gilman AG. (1995)**
Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.
J Biol Chem 270: 1 - 4
- Taussig R, Quarmby LM, Gilman AG. (1993a)**
Regulation of purified type I and type II adenylyl cyclases by G protein $\beta\gamma$ subunits.
J Biol Chem 268: 9 - 12
- Taussig R, Tang W-J, Hepler JR, Gilman AG. (1993b)**
Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases.
J Biol Chem 269: 6093 - 6100

Taylor DA, Fleming WW. (2001)

Unifying perspectives of the mechanisms underlying the development of tolerance and physical dependence to opioids.
J Pharmacol Exp Ther 297(1): 11 - 18

Terwillige RZ, Ortiz J, Guitart X, Nestler EJ. (1994)

Chronic morphine administration increases β -adrenergic receptor kinase (β ARK) levels in the rat locus coeruleus.
J Neurochem 63: 1983 - 1986

Tesmer JJ, Sprang SR. (1998)

The structure, catalytic mechanism and regulation of adenylyl cyclase.
Curr Opin Struct Biol 8(6): 713 - 719

Thomas JM, Hoffman BB. (1987)

Adenylate cyclase supersensitivity: a general means of cellular adaptation to inhibitory agonists?
TiPS 8: 308 - 311

Thomas JM, Hoffman BB. (1996)

Isoform-specific sensitization of adenylyl cyclase activity by prior activation of inhibitory receptors: role of β_γ subunits in transducing enhanced activity of the type VI isoform.
Mol Pharmacol 49: 907 - 914

Touhara K, Inglese J, Pitcher JA, Shaw G, Lefkowitz RJ. (1994)

Binding of G protein β_γ -subunits to pleckstrin homology domains.
J Biol Chem 269(14): 10271 - 10220

Trapaidze N, Gomes I, Bansinath M, Devi LA. (2000)

Recycling and resensitization of delta opioid receptors.
Cell Biol 19(4): 195 - 204

Trapaidze N, Keith DE, Cvejic S, Evans CJ, Devi LA. (1996)

Sequestration of the δ -opioid receptor. Role of the C terminus in agonist-mediated internalization.
J Biol Chem 271: 29279 - 29285

Tsu RC, Chan JSC, Wong YH. (1995)

Regulation of multiple effectors by the cloned δ -opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase.
J Neurochem 64: 2700 - 2707

Ueda H, Miyamae T, Fukuschima N, Takeshima H, Fukuda K, Sasaki Y, Misu Y. (1995a)

Opioid μ - and κ -receptor mediate phospholipase C activation through Gi1 in *Xenopus* oocytes.
Molecular Brain Research 32: 166 - 170

Ueda H, Miyamae T, Hayashi C, Watanabe S, Fukushima N, Sasaki Y, Iwamura T, Misu Y. (1995b)

Protein kinase C involvement in homologous desensitization of δ -opioid receptor coupled to G_{11} -phospholipase C activation in *Xenopus* oocytes.
J Neurosci 15(11): 7485 - 7499

Vachon L, Costa T, Herz A. (1987)

Opioid receptor desensitization in NG 108-15 cells.
Biochem Pharmacol 36(18): 2889-2897

von Zastrow M, Svingos A, Haberstock-Debic H, Evans C. (2003)

Regulated endocytosis of opioid receptors: cellular mechanisms and proposed roles in physiological adaptation to opiate drugs.
Curr Opin Neurobiol 13: 348 - 353

Waldhoer M, Bartlett SE, Whistler JL. (2004)

Opioid receptors.
Annu Rev Biochem 73: 953 - 990

Wallach J, Droste M, Kluxen FW, Pfeuffer T, Frank R. (1994)

Molecular cloning and expression of a novel type V adenylyl cyclase from rabbit myocardium.
FEBS Lett 338: 257-263

Wang Y, Li JG, Huang P, Xu W, Liu-Chen LY. (2003)

Differential effects of agonists on adenylyl cyclase superactivation mediated by the kappa opioid receptors: adenylyl cyclase superactivation is independent of agonist-induced phosphorylation, desensitization, internalization, and down-regulation.
J Pharmacol Exp Ther 307(3): 1127 - 1134

Watson JD, Gilman M, Witkowski J, Zoller M. (1993)

Rekombinierte DNA, 2. Auflage
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg-Berlin-Oxford Kapitel 12: 195 - 216

Watson N, Linder NE, Druey KM, Kehrl JH, Blumer KJ. (1996)

RGS family members: GTPase-activating proteins for heterotrimeric G-protein α -subunits.
Nature 383: 172 - 175

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

Whistler JL, Enquist J, Marley A, Fong J, Gladher F, Tsuruda P, Murray SR, von Zastrow M. (2002)

Modulation of postendocytic sorting of G protein-coupled receptors.
Science 297: 615 - 620

Whistler JL, von Zastrow M. (1998)

Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by β -arrestin.
Proc Natl Acad Sci USA 95: 9914 - 9919

Williams JT, Christie MJ, Manzoni O. (2001)

Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence.
Physiol Rev 81(1): 299 - 343

Wittpoth C, Scholich K, Bilyeu JD, Patel TB. (2000)

Adenylyl cyclase regulates signal onset via the inhibitory GTP-binding protein, Gi.
J Biol Chem 275(34): 25915 - 25919

Woolf CJ, Thompson SW. (1991)

The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states.
Pain 44(3): 293 - 299

Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T, Bell GI. (1993)

Cloning and functional comparison of κ and δ opioid receptors from mouse brain.
Proc Natl Acad Sci USA 90: 6736 - 6740

Zadina JE, Martin-Schild S, Gerall AA, Kastin AJ, Hackler L, Ge LJ, Zhang X. (1999)

Endomorphins: novel endogenous mu-opiate receptor agonists in regions of high mu-opiate receptor density.
Ann N Y Acad Sci 897: 136 - 144

Zhang J, Ferguson SS, Law PY, Barak LS, Caron MG. (1999)

Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin.
J Recept Signal Transduct Res 19: 301 - 313

Zhang F, Li J, Li JG, Liu-Chen LY. (2002)

(-)-U50,488H [(trans)-3,4-dichloro-N-methyl-N-[2-(1-pyrrolidinyl)-cyclohexyl]benzeneacetamide] induces internalization and down-regulation of the human, but not the rat, kappa-opioid receptor: structural basis for the differential regulation.
J Pharmacol Exp Ther 302(3): 1184 - 1192

Zimmermann G, Taussig R. (1996)

Protein kinase C alters the responsiveness of adenylyl cyclases to G protein alpha and betagamma subunits.
J Biol Chem 271(43): 27161 - 27166

8. Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Schulz danke ich für die freundliche Überlassung des Themas sowie des Arbeitsplatzes, für die stets gewährte Förderung und Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit sowie für die großzügige Erlaubnis zur Nutzung der hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut.

Herrn Prof. Dr. H. Ammer danke ich für die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, sein vielseitiges Engagement und für die zahlreichen wertvollen Hinweise, die wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ich danke all denjenigen Mitarbeitern des Instituts, die mich von Anfang an freundlich aufgenommen haben und mir bei allen Fragen zum wissenschaftlichen Laboralltag zur Seite standen. Allen voran Herrn Thomas Christ und Herrn Dr. Oliver Kuppinger.

Mein besonderer Dank gilt meinem Freund Lorenz, meiner Familie und allen meinen Freunden für die mir entgegen gebrachte nicht enden wollende Geduld, Rücksichtnahme und liebevolle moralische Unterstützung, die ich für die Fertigstellung dieser Arbeit dringend benötigt habe.

Weiterhin möchte ich für die zur Verfügung gestellten cDNAs Herrn Dr. Pfeuffer (Düsseldorf; ACV), Herrn Dr. Krupinski (Princeton; ACVI), Herrn Dr. Wong (Hongkong; ACII) und Herrn Dr. Bell (Chicago; DOR) danken.

Anhang: Bezugsquellen

Verwendete Chemikalien, Reagenzien und Geräte

Amersham Biosciences Europe GmbH, D-79111 Freiburg
Bachem Distribution Services GmbH, D-79576 Weil am Rhein
Bachofer, D-72731 Reutlingen
BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, D-72820 Sonnenbühl-Genlingen
Beckman Instruments GmbH, D-80807 München
Biometra GmbH, D-37079 Göttingen
Boehringer Mannheim GmbH, D-68305 Mannheim
Carl Roth GmbH & Co. KG, D-76185 Karlsruhe
Cell Signaling Technology® Inc., USA-Beverly, 01915 MA
Dianova Gesellschaft für biochemische, immunologische und mikrobiologische Diagnostik mbH, D-20354 Hamburg
Du Pont Instruments GmbH, D-50825 Köln
GERBU Biochemicals GmbH, D-69251 Gaiberg
GraphPad Software, USA- San Diego, 92121 CA
Heraeus Separationstechnik, D-37502 Osterode
Herolab GmbH Laborgeräte, D-69168 Wiesloch
Hitachi Scientific Instruments, D-73529 Schwäbisch Gmünd
ICN Biomedicals GmbH, D-37269 Eschwege
Invitrogen GmbH, D-76131 Karlsruhe
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, D-52313 Düren
MBI Fermentas GmbH, D-68789 St.Leon-Rot
Merck KGaA, D-64293 Darmstadt
MILLIPORE GmbH, D-65824 Schwalbach
Nunc GmbH & Co. KG, D-65203 Wiesbaden
PAA Laboratories GmbH, D-35091 Cölbe

Anhang

Peqlab Biotechnologie GmbH, D-91052 Erlangen

Pharmacia Biotech Products, D-79111 Freiburg

Promega GmbH, D-68199 Mannheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82024 Taufkirchen

Tecan Deutschland GmbH, D-74564 Crailsheim

Techno Plastic Products AG, TPP®, CH-8219 Trasadingen

VWR International GmbH, D-64295 Darmstadt

Zinsser Analytic GmbH, D-60489 Frankfurt