

**Klonierung und pharmakologische Charakterisierung
der equinen Opioidrezeptoren**

von Maximilian Helmut Muehlhaupt

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Klonierung und pharmakologische Charakterisierung
der equinen Opioidrezeptoren

von Maximilian Helmut Muehlhaupt
aus Bad Homburg v.d.H.

München 2018

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Departement
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie

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

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

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermann Ammer

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Lutz S. Göhring
Univ.-Prof. Dr. Hans-Joachim Gabius
Priv.-Doz. Dr. Bettina Wollanke
Priv.-Doz. Dr. Marlon Schneider

Tag der Promotion: 27.07.2018

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|------------|--|-----------|
| I | EINLEITUNG | 1 |
| II | LITERATURÜBERSICHT | 2 |
| 1. | Opioidrezeptoren..... | 2 |
| 1.1 | Einteilung und Vorkommen | 2 |
| 1.2 | Molekularer Aufbau | 4 |
| 1.3 | Effektorsysteme..... | 6 |
| 1.4 | Liganden..... | 7 |
| 2. | Speziesspezifische Opioidwirkung beim Pferd | 8 |
| 2.1 | Butorphanol | 8 |
| 2.2 | Morphin | 9 |
| 2.3 | Fentanyl..... | 9 |
| 2.4 | Weitere Opioide | 10 |
| III | FRAGESTELLUNG | 11 |
| IV | MATERIAL UND METHODEN | 12 |
| 1. | Materialien..... | 12 |
| 1.1 | Geräte | 12 |
| 1.2 | Verbrauchsgegenstände..... | 13 |
| 1.3 | Chemikalien, Substanzen | 14 |
| 1.4 | Puffer | 16 |
| 1.5 | Gebrauchsfertige Lösungen, Kits | 17 |
| 1.6 | DNA, Primer, Antikörper | 18 |
| 1.7 | Zellen, Zellkulturmedien, Additive | 19 |
| 2. | Klonierung der equinen Opioidrezeptoren..... | 20 |
| 2.1 | Primer und Template | 20 |
| 2.2 | GAPDH PCR | 20 |
| 2.3 | PCR Klonierung | 21 |
| 2.4 | Agarose-Gelelektrophorese | 21 |
| 2.5 | Aufreinigung der PCR Produkte | 22 |
| 2.6 | Klonierung in pJet und pcDNA3.1 | 22 |
| 2.7 | Transformation | 24 |
| 2.8 | Aufreinigung der Plasmide..... | 24 |
| 3. | Zellmodell und Zellkultur | 25 |
| 3.1 | Zellmodell HEK 293 Zellen | 25 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.2 | Transfektion | 25 |
| 3.3 | Selektion | 25 |
| 3.4 | Membranpräparation | 26 |
| 3.5 | Proteinbestimmung nach Lowry | 26 |
| 4. | Pharmakologische Charakterisierung | 27 |
| 4.1 | Radioligandenbindung | 27 |
| 4.2 | GTP γ [³⁵ S]-Bindung | 28 |
| 4.3 | Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität | 29 |
| 4.4 | Western Blot | 29 |
| 4.4.1 | SDS-PAGE | 30 |
| 4.4.2 | Western Blot | 30 |
| 5. | Mutagenesestudien | 31 |
| 5.1 | Auswahl der Mutanten | 31 |
| 5.2 | Site-Directed Mutagenese | 32 |
| 6. | Rezeptordimerisierung | 33 |
| 6.1 | Transiente Transfektion | 33 |
| 6.2 | Quervernetzung der Rezeptordimere | 34 |
| 6.3 | Immunpräzipitation | 34 |
| V | ERGEBNISSE | 35 |
| 1. | Klonierung der Opioidrezeptoren | 35 |
| 2. | Molekulare Charakterisierung | 36 |
| 3. | Pharmakologische Charakterisierung | 37 |
| 3.1 | Rezeptoraffinität und -selektivität | 37 |
| 3.2 | Intrinsische Aktivität | 41 |
| 4. | Mutagenesestudien | 44 |
| 5. | Rezeptordimerisierung | 50 |
| VI | DISKUSSION | 52 |
| VII | ZUSAMMENFASSUNG | 64 |
| VIII | SUMMARY | 65 |
| IX | LITERATURVERZEICHNIS | 66 |
| X | ANHANG | 76 |
| 1. | Abbildungsverzeichnis | 76 |

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2. | GenBank Einträge der equinen Opioidrezeptoren | 77 |
| XI | DANKSAGUNG | 81 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| AA | Aminosäure |
| Abb. | Abbildung |
| AK | Antikörper |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| Aq. bidest. | Doppelt destilliertes Wasser |
| bp | Basenpaar |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| Bup | Buprenorphin |
| But | Butorphanol |
| cAMP | Zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat |
| cDNA | Komplementäre DNA |
| cn | Kontrolle |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CTC | Kupfersulfat-Tartrat-Natrium-Carbonat Lösung |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMEH | DMEM mit HEPES |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DSS | Disuccinimidylsuberat |
| DTT | Threo-1,4-dimercapto-2,3-butandiol |
| EtOH | Ethanol |
| ECL | Extrazelluläre Schleife |
| ERK | Extracellular-Signal Regulated Kinase |
| Fen | Fentanyl |
| FKS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase |
| G-Protein | Guaninnukleotid-bindendes Protein |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| h | Stunde |
| HB | Homogenisierungspuffer |
| HBS | HEPES-gepufferte Salzlösung |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure] |
| ICL | Intrazelluläre Schleife |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|------------------|--|
| IC ₅₀ | Halbmaximale Hemmkonzentration |
| kb | Kilobasenpaare |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| kDa | Kilodalton |
| KOR1 | κ-Opioidrezeptor |
| Levo | L-Methadon |
| MAPK | Mitogen-aktivierte Protein-Kinase |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| MOR1 | μ-Opioidrezeptor |
| Mor | Morphin |
| mRNA | Messenger RNA |
| PAA | Polyacrylamid |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PBS | Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Pen | Penicillin |
| PMSF | Phenylmethylsulfonyl-Fluorid |
| RIPA | Radioimmunopräzipitation |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RT | Reverse Transkriptase |
| Rt | Raumtemperatur |
| sec | Sekunde |
| SDS | Natrium-Dodecylsulfat |
| Strep | Streptomycin |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA-Puffer |
| TBS/T | Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween |
| TEMED | N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin |
| TM | Transmembrane Domäne eines G-Protein gekoppelten Rezeptors |
| U50 | U50,488 |
| UV | Ultraviolett |
| vs. | versus |

Die Nomenklatur der Opioidrezeptoren und Liganden entspricht den Empfehlungen der IUPHAR. Bei der Nomenklatur der Aminosäuren wurde der single letter code verwendet.

I Einleitung

Pain control in horses: What do we really know? Unter dieser Überschrift fassten zuletzt L.C. Sanchez und S.A. Robertson den derzeitigen Stand der Schmerzbehandlung beim Pferd in einem kritischen Übersichtsartikel zusammen (Sanchez und Robertson, 2014). Die Autoren kommen darin zum Schluss, dass die aktuellen Empfehlungen zur Schmerztherapie mit Opioidanalgetika immer noch eine Kombination aus Kunst und Wissenschaft darstellen. Ein wesentlicher Grund hierfür ist ein Mangel an aussagekräftigen klinischen Studien und das Fehlen grundlegender Kenntnisse über die opioidergen Mechanismen beim Pferd. Aufgabe der klinischen Pharmakologie ist es, durch Aufklärung der Zielstrukturen für die Opioidwirkung und die Charakterisierung der therapeutisch einsetzbaren Opioidanalgetika eine rationale Basis für die Ableitung geeigneter Indikationsgebiete und Dosierungsschemata zu erarbeiten.

Mit der Klonierung und Annotation des Pferdegenoms in den Jahren 2006 und 2015 wurden die Voraussetzungen für die molekulare Charakterisierung der Opioidrezeptoren des Pferdes geschaffen (Wade et al., 2009; Hestand et al., 2015). Ziel der vorliegenden Dissertationsschrift war es, die für die analgetische Wirkung der Opioide verantwortlichen κ - und μ -Opioidrezeptoren (*eOPRK1*; *eOPRM1*) zu klonieren und die verfügbaren Opioidanalgetika anhand der exprimierten Rezeptoren pharmakologisch zu charakterisieren.

Die Ergebnisse zeigen, dass aufgrund einiger weniger Aminosäureunterschiede in der Primärstruktur der Rezeptoren die Wirkprofile einzelner Opioidanalgetika beim Pferd teilweise erheblich von denjenigen bei Mensch und Labornagern abweichen. Damit können einige klinisch relevante Besonderheiten in der Opioidwirkung beim Pferd erklärt werden. Darüber hinaus weisen die Ergebnisse darauf hin, dass die Wirkeigenschaften von Opioidanalgetika nicht vollständig von präklinischen Schmerzmodellen oder anderen Spezies auf das Pferd übertragbar sind.

II Literaturübersicht

1. Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren sind die zellulären Bindungspartner der Opioiden, Substanzen die bereits seit 4000 Jahren von verschiedenen Kulturen aus dem Saft des Schlafmohns gewonnen werden und zur Schmerzlinderung und Therapie eingesetzt wurden (Brownstein, 1993). Im Rohopium sind verschiedene Alkaloide wie Morphin und Codein enthalten (Waldhoer et al., 2004). In der heutigen Medizin werden Opioiden zur Therapie akuter und chronischer Schmerzen sowie zur Narkoseprämedikation angewendet (McQuay, 1999). Bei unseren Haussäugetieren werden sie vor allem bei Hund, Katze und Pferd angewendet (Hellyer, 1997).

1.1 Einteilung und Vorkommen

Mittels radioaktiv markierter Pharmaka konnten im Jahr 1973 erstmals Opioidrezeptoren im Gehirn nachgewiesen werden (Pert und Snyder., 1973; Simon, 1973). Mithilfe selektiver Liganden und spezifischer Organsysteme wurden in den darauffolgenden Jahren die 3 verschiedenen Rezeptortypen ($\delta = \textit{vas deferens}$; $\kappa = \textit{Ketocyclazocin}$; $\mu = \textit{Morphin}$) pharmakologisch charakterisiert. Diese werden nach der aktuellen IUPHAR Nomenklatur mit δ - (DOR), κ - (KOR) und μ -Rezeptor (MOR) bezeichnet und abgekürzt (Dhawan et al., 1996). Pharmakologisch lassen sich die drei Rezeptoren weiterhin in verschiedene Subtypen ($\delta_1, \delta_2; \kappa_{1a}, \kappa_{1b}, \kappa_2, \kappa_3; \mu_1, \mu_2$) unterteilen (Goldstein und Naidu, 1989; Standifer und Pasternak, 1997), deren molekulare Struktur bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. Kloniert wurden die drei Rezeptoren erstmals aus dem Gehirn von Maus und Ratte in den Jahren 1992 (δ -Rezeptor) und 1993 (κ - und μ -Rezeptor) (Evans et al., 1992; Meng et al., 1993; Chen et al., 1993). In der Folge wurde die genomische Struktur für Mensch, Ratte und Maus aufgeklärt. Insbesondere existieren für den μ -Rezeptor je nach Spezies bis zu 25 verschiedene Splicevarianten (Pan, 2005), von denen sich der MOR1B als klinisch relevant dargestellt hat (Schulz et al., 1998). Die Familie der Opioidrezeptoren wurde im Jahr 1994 schließlich um die Rezeptoren für Nociceptin/Orphanin erweitert (Mollereau et al., 1994). Diese binden als definierendes Kriterium wie alle anderen Opioidrezeptoren auch den Antagonisten Naloxon (Corbett et al., 2006).

Opioidrezeptoren sind Bestandteil endogener opioidergere Systeme und stellen die natürlichen Bindungsstellen für endogene Opioidpeptide (Endorphine, Enkephaline, Dynorphine) dar (Lord et al., 1977). Ihre Lokalisierung in der Schmerzbahn wird für die analgetischen Eigenschaften der Opiode verantwortlich gemacht. Neben dem zentralen Nervensystem werden Opioidrezeptoren aber auch in vielen anderen Geweben einschließlich dem peripheren Nervensystem (Plexus myentericus, Plexus submucosus), Immunzellen, Herzmuskelzellen, Leberzellen und Tumorzellen exprimiert (Afsharimani et al., 2011). Hier sind sie entweder Zielstruktur für besondere Indikationen wie z.B. sekretorische Diarrhoe oder Verlängerung der Überlebenszeit von Organen für die Transplantation oder die Ausbildung von Nebenwirkungen. Die antinociceptive Wirkung der Opiode wird vor allem durch μ -Rezeptoren vermittelt. Diese spielen vor allem beim somatischer Schmerz eine Rolle und sind für die Ausbildung chronischer Opiodeffekte wie Toleranz und Abhängigkeit von Bedeutung (Janecka et al., 2004; Koch et al., 2005). Viszerale Schmerzen werden dagegen von κ -Rezeptoren auf sensiblen Afferenzen glattmuskulärer Organe vermittelt (Riviere, 2004). Hierauf begründet sich die gute analgetische Wirksamkeit von Opioiden mit κ -Aktivität beim Kolikschmerz. Ihre Lokalisation an dopaminergen Nervenendigungen ist jedoch auch für das dysphorische Potential beim Menschen verantwortlich (Pfeiffer et al., 1986). δ -Rezeptoren sind vor allem für die antidepressiven Wirkungen der Opiode verantwortlich (Broom et al., 2002).

1.2 Molekularer Aufbau

Opioidrezeptoren gehören zur größten Gruppe der membranständigen Rezeptoren, den G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Minami und Satoh, 1995). Die Mitglieder dieser Gruppe zeichnen sich durch ihren heptahelikalen Aufbau aus. Sie enthalten 7 transmembrane Domänen, die durch drei extra- und intrazelluläre Schleifen miteinander verbunden werden (Abb. 1). Extrazellulär findet sich der Amino- (N-) Terminus, der Carboxyl- (C-) Terminus intrazellulär (Law et al., 2000).

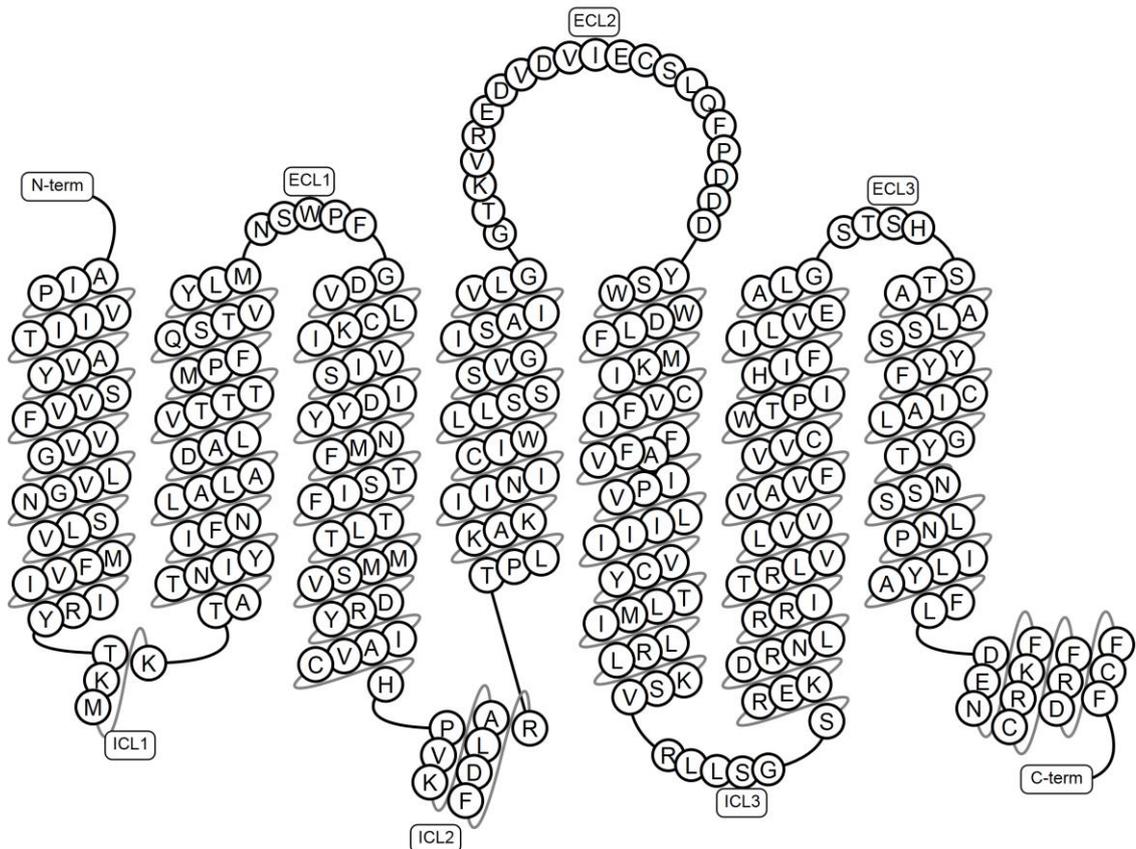


Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen κ -Opioidrezeptors mittels Snakeplot. Die Grafik wurde mit http://gpcrdb.org/protein/oprk_human/ erstellt. Dargestellt sind die 7 transmembranen Helices, die verbindenden extrazellulären und intrazellulären Schleifen sowie der N- und C-Terminus sind gekürzt. N-term, N-Terminus; ECL, Extrazelluläre Schleife; ICL, Intrazelluläre Schleife; C-term, C-Terminus

Die extrazellulären Schleifen und die transmembranen Domänen sind entscheidend für die Ligandenbindung, während die intrazellulären Domänen (vor allem ICL 3) und der C-Terminus mit den G-Proteinen interagieren und nach Phosphorylierung spezifischer Serin- und Threoninreste zur Rezeptorregulation beitragen (Law et al., 2000; Koch et al., 2005; Busillo et al., 2010; Butcher et al., 2011; Nobles et al., 2011). Die terminalen Regionen unterscheiden sich stark innerhalb der

verschiedenen Rezeptortypen, die transmembranen Domänen weisen dagegen zu ungefähr 70 % übereinstimmende Aminosäuresequenzen auf (Wu et al., 2012). Durch eine Komplexierung der Rezeptoren mit Antagonisten war es im Jahr 2012 erstmals möglich, die Kristallstrukturen der drei Opioidrezeptortypen aufzuklären und damit wertvolle Einblicke in den Aufbau der Ligandenbindungsstellen und den daran beteiligten Aminosäureresten zu erhalten (Wu et al., 2012; Manglik et al., 2012; Granier et al., 2012). Die Kristallstrukturen geben jedoch nur die inaktiven Rezeptorzustände wieder, die für die Simulation der hochaffinen Bindungsstellen für Agonisten nur eingeschränkt aussagekräftig sind. Als wichtigste Gründe hierfür sind die energetische Instabilität der aktiven Rezeptorzustände und die ausgesprochen hohe Flexibilität der 7 transmembranen Domänen im Lipiddoppellayer zu nennen (Cherezov et al., 2007). Durch Entfernen der N- und C-Termini, kürzen der extra- und intrazellulären Domänen und Imitierung des aktiven, G-Protein-gekoppelten Rezeptorzustandes mithilfe eines Nanobodies gelang es Huang et al. (2015) und Che et al. (2018) erstmals, die aktive Konformation des μ - bzw. κ -Rezeptors zu kristallisieren. Mithilfe der Kristallstrukturen konnten in den transmembranen Domänen einige evolutiv konservierte Aminosäuren mit großer Relevanz für die Rezeptoraffinität und -selektivität sowie die intrinsische Aktivität („Message – Address“ Hypothese) der verschiedenen Liganden detektiert werden. So interagieren z.B. die Morphinane (Abkömmlinge des Morphins) in Bezug auf ihre Selektivität und Affinität („Address“) am κ -Rezeptor mit D 138, E 297, I 294 und E 209 der TM 6 oder ECL 2. Für die intrinsische Aktivität („Message“) sind molekulare Interaktionen der Liganden mit Aminosäureresten W 287, H 291 und dem D/ERY Motiv zwischen TM 3 und TM 6 von Bedeutung (Martinez-Mayorga et al., 2013). Am μ -Rezeptor wurden dieselben Motive für die Ligandenbindung gefunden (Manglik et al., 2012). Dieses „Message – Address“ System, also die Unterscheidung zwischen Bindung an den Rezeptor und dessen Aktivierung, kann unseren heutigen Vorstellungen nach nicht mehr bei allen Opioiden angewendet werden (Wu et al., 2012; Manglik et al., 2012; Filizola und Devi, 2012).

1.3 Effektorsysteme

Opioide vermitteln ihre Effekte durch rezeptorvermittelte Aktivierung von Guaninnukleotid-bindenden Proteinen. Diese auch als GTP-bindende oder kurz G-Proteine bezeichneten regulatorischen Proteine bestehen jeweils aus einer α -, β - und γ -Untereinheit. Die α -Untereinheit bindet GDP oder GTP, die β - und γ -Untereinheiten formen ein funktionelles Dimer. Im inaktiven Zustand ist an die α -Untereinheit ein GDP gebunden und bildet einen Komplex mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit (Heterotrimer). Nach Aktivierung durch einen Rezeptor verliert das GDP aufgrund einer Konformationsänderung der α -Untereinheit seine Affinität und wird durch ein GTP ersetzt. Die GTP-gebundene α -Untereinheit dissoziiert daraufhin vom $\beta\gamma$ -Dimer ab, wodurch sowohl die frei gewordene α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit nachfolgende Signaltransduktionswege regulieren können (Bockaert, 1991; Standifer und Pasternak, 1997). Es sind mittlerweile 23 unterschiedliche G_α -Untereinheiten, 5 β -Untereinheiten und 10 γ -Untereinheiten nachgewiesen worden. G-Proteine werden entsprechend der Aktivität ihrer α -Untereinheit in verschiedene Subtypen eingeteilt: G_s -Proteine (cAMP abhängige Reaktionen), G_i -Proteine (inhibitorische G-Proteine) und G_q -Proteine (Phospholipase C regulierende G-Proteine). Die Selektivität der Rezeptor/Effektor-Kopplung wird dabei weiter durch die Zusammensetzung der G-Protein Untereinheiten reguliert (Gudermann et al., 1996).

Opioidrezeptoren sind hauptsächlich an G_i - und G_q -Proteine gekoppelt (Connor und Christie, 1999). Diese regulieren ihrerseits die Aktivität von Adenylzyklasen, spannungsabhängigen Ca^{2+} - und K^+ -Kanäle. K^+ -Kanäle werden aktiviert, Ca^{2+} -Kanäle deaktiviert (Kaneko et al., 1994; Minami und Satoh, 1995) und die Adenylarzyklasen je nach Ausstattung der Zelle mit den verschiedenen G-Proteinen beeinflusst (Dhawan et al., 1996). Bei HEK 293 Zellen wird der intrazelluläre Gehalt an cAMP nach Stimulation durch Forskolin von Opioiden gehemmt (Lai et al., 1995). Weiterhin regulieren Opioide nicht-klassische Effektorsysteme wie Rezeptortyrosinkinasen (RTK) und Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (ERK1/2) (Schulz et al., 2004). Diese erfolgt jedoch indirekt über Aktivierung z.B. der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 3 (GRK3) oder von Arrestin 3 (Macey et al., 2006).

1.4 Liganden

Bei den Opioiden werden endogene, natürliche und synthetische Liganden unterschieden. Die endogenen Opioide lassen sich in drei Gruppen einteilen: Endorphine, Enkephaline und Dynorphine (Corbett et al., 2006). Die Endorphine α , β und γ gehen aus dem Vorläuferpeptid Pro-Opiomelanocortin (POMC) hervor (Nakanishi et al., 1979). Die Familie der Enkephaline enthält die Varianten Met-Enkephalin, Leu-Enkephalin und Met-Arg-Phe-Enkephalin, die anhand ihrer N-terminalen Aminosäuren unterschieden werden (Dhawan et al., 1996). Die Dynorphine unterteilen sich in Dynorphin A und B sowie das α - und β -Neoendorphin (Chavkin et al., 1982). Die genannten Peptidhormone stellen die natürlichen Liganden der endogenen Opioidsysteme dar, deren biologische Funktionen immer noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Ballantyne und Sullivan, 2017). Opiate dagegen stellen die natürlichen Inhaltsstoffe des Schlafmohns mit Alkaloidstruktur dar und greifen rein zufällig in die Funktion der endogenen Opioidsysteme ein. Neben Morphin und Codein enthält Rohopium auch Phenantrane und Benzylisochinoline. Die von Morphin abgeleiteten Substanzen stellen wiederum synthetische Opioide dar und werden als Morphinane bezeichnet. Zu ihnen zählen Butorphanol, Buprenorphin und Heroin. Darüber hinaus existieren rein synthetische Substanzen wie die Diphenylpropylamin- (L- und D- Methadon) und Piperidinderivate, zu denen Fentanyl, Remifentanyl, Sufentanyl und Pethidin gezählt werden (Corbett et al., 2006). Neben ihrer chemischen Struktur lassen sich die Opioide pharmakologisch anhand ihrer Selektivität (δ -, κ -, μ -selektiv) und intrinsischen Aktivität (Agonisten, partielle Agonisten, Antagonisten) einteilen (Goldstein und Naidu, 1989). Dabei sind auch gemischte Antagonist/Agonisten möglich, die einen Rezeptortyp aktivieren, den anderen jedoch kompetitiv blockieren (Dhawan et al., 1996; Waldhoer et al., 2004). Die klinische Wirkung der Opioide ist daher äußerst komplex und wird neben der verabreichten Dosis, der Pharmakokinetik und der Eindringtiefe in das ZNS (Lipophilie, Transporter) vor allem durch die Affinität, Selektivität und intrinsische Aktivität bestimmt. Dabei können Antagonisten wie Naloxon und Naltrexon sowie schwache partielle Agonisten die Wirkung endogener Schmerzmechanismen blockieren (Corbett et al., 2006). Von den therapeutisch eingesetzten Substanzen stellen Fentanyl einschließlich seiner Derivate und Methadon hochselektive Agonisten am μ -Rezeptor dar (Raynor et al., 1994). Selektive κ -Agonisten wie U50,488 oder

U69,588 sind rein vom experimentellem Interesse und für die Charakterisierung der Rezeptoren unerlässlich (Minami und Satoh, 1995). Die Standardverbindung Morphin bindet sowohl an μ - als auch an κ - Rezeptoren und stellt beim Menschen einen vollen, bei der Ratte dagegen nur einen partiellen Agonisten am μ -Rezeptor dar. An den κ -Rezeptor des Menschen und der Ratte bindet Morphin dagegen mit einer ~ 100 -fach niedrigeren Affinität und entspricht bei beiden Spezies nur einem partiellen Agonisten (Toll et al., 1998). Das in der Schmerztherapie häufig eingesetzte Buprenorphin stellt bei allen Spezies ein Beispiel für einen partiellen Agonisten an beiden genannten Opioidrezeptoren dar (Zhu et al., 1997; Toll et al., 1998). Butorphanol schließlich verhält sich am κ - und μ -Rezeptor des Menschen als partieller Agonist (Fulton et al., 2008).

2. Speziesspezifische Opioidwirkung beim Pferd

Aufgrund ihres Status als Betäubungsmittel und der vor allem beim Pferd zu beobachtenden schwerwiegenden Nebenwirkungen wie zentrale Erregung (erhöhte Lokomotion, Katatonie, Katalepsie) und Sedation (dosisabhängig über μ -Rezeptoren vermittelt!), Konstipation und Atemlähmung, werden Opiode im Vergleich zu anderen Spezies zur Behandlung traumatischer Schmerzen selten eingesetzt (Bennett et al., 2002). Aufgrund der genannten Nebenwirkungen wurden klinische Studien zur analgetischen Wirksamkeit der Opiode bisher nur in verträglichen Dosierungen in Kombination mit anderen Stoffen, zum Beispiel α_2 -Agonisten durchgeführt (Schatzman et al., 2001; Taylor et al., 2016). Vor allem aus der klinischen Erfahrung sind einige speziesspezifische Wirkungen der Opiode beim Pferd bekannt.

2.1 Butorphanol

Butorphanol wird im Vergleich zum Menschen umfangreich beim Pferd eingesetzt. Ein wesentlicher Grund hierfür ist seine herausragende Wirkung beim viszeralem Schmerz (Kolik), der über κ -Rezeptoren vermittelt wird (Kalpravidh et al., 1984). Dabei erhöht Butorphanol die Schmerzschwelle im rektalen (Skarda und Muir, 2003) und caecalen Ballonmodell (Muir und Robertson, 1985). Als weitere

Indikationen werden Sedation zusammen mit einem α_2 -Agonisten im Rahmen einer Prämedikation genannt (Schatzman et al., 2001). Beim Menschen dagegen wirkt es nur schwach analgetisch beim traumatischen und Geburtsschmerz. Diese Wirkung geht aufgrund seiner partiellen Aktivität am κ -Rezeptor jedoch mit einer starken Dysphorie einher, so dass es hier bisher keine klinische Bedeutung erlangt hat (Pfeiffer et al., 1986; Commiskey et al., 2005). Da Butorphanol bei opioidabhängigen Patienten einen Entzug auslöst (Preston et al., 1988), unterliegt es nicht den betäubungsmittelrechtlichen Bestimmungen. Diese Eingruppierung trägt wesentlich zu seiner weiten Verbreitung in der Tiermedizin bei.

2.2 Morphin

Morphin gilt als Goldstandard in der Schmerztherapie mit Opioiden (Waldhoer et al., 2004) und stellt beim Menschen einen vollen Agonisten am μ - und partiellen Agonisten am κ -Rezeptor dar (Goldstein und Naidu, 1989; Toll et al., 1998). Neben der Schmerztherapie wird es als Antitussivum und Sedativum angewendet. Auffällig ist beim Morphin, dass es trotz Aktivierung der Rezeptoren im Gegensatz zu anderen Agonisten nicht zum schnellen Verlust der Rezeptorfunktion kommt (Keith et al., 1996). Beim Pferd wurde für Morphin eine gute Wirksamkeit bei der spastischen und postoperativen Kolik beschrieben. In Kombination mit einem α_2 -Agonisten ist eine ausreichende Sedation zu erwarten (Love et al., 2006). Auf Grund seiner bereits in niedrigen analgetischen Dosierungen einsetzenden erregenden Wirkung auf das motorische Zentrum, die wie seine analgetische Potenz bereits im 19. Jahrhundert von Guinard (1899) beschrieben wurde, wird es im klinischen Alltag nur noch selten eingesetzt.

2.3 Fentanyl

Fentanyl ist ein Piperidinderivat mit einer ausgeprägten Selektivität für μ -Rezeptoren (Raynor et al., 1994). Es besitzt beim Menschen und anderen Spezies eine hohe analgetische Potenz beim traumatischen Schmerz, führt jedoch rasch zu einer Toleranzausbildung (Poklis, 1995). Beim Pferd ist für Fentanyl eine geringe analgetische Wirksamkeit beschrieben, allerdings geht diese ähnlich wie bei Morphin mit einer starken Lokomotion einher (Nugent et al., 1982; Sanchez et al.,

2007). Obwohl hierfür eine indirekte Aktivierung des dopaminergen Systems vorgeschlagen wird, kann diese nicht vollständig durch Antagonisten an Dopaminrezeptoren gehemmt werden (Pascoe und Taylor, 2003). Ob transdermal eingesetzte Fentanyl-Pflaster beim Pferd bei starken Schmerzen ausreichend wirksam sind, konnte bisher nicht abschließend geklärt werden (Sanchez und Robertson, 2014).

2.4 Weitere Opioide

Neben μ -Rezeptor Agonisten wie Remifentanyl und Sufentanil, steht für die Pferdemedizin vor allem L-Methadon als zugelassene Veterinärspezialität zur Neuroleptanalgesie zur Verfügung (Schatzman et al., 2001).

Buprenorphin, bei Mensch und Ratte als partieller μ -Agonist charakterisiert (Zhu et al., 1997; Toll et al., 1998), zeichnet sich durch eine äußerst hohe Affinität und lange Verweildauer an den Rezeptoren aus. Da es nur über eine geringe analgetische Potenz verfügt, wird es in der Humanmedizin vor allem zur Therapie chronischer Schmerzen eingesetzt. Es gilt als besonders sicher in der Anwendung, da es hinsichtlich der Ausbildung einer Atemdepression einen ceiling-Effekt aufweist (Dahan et al., 2006). Für das Pferd wurde anhand eines thermischen Schmerzmodells ein etwas höherer analgetischer Effekt im Vergleich zu Butorphanol bestimmt (Love et al., 2012).

Die molekularen Ursachen für die tierartlichen Besonderheiten in der Wirkung von Opioidanalgetika sind bisher nicht bekannt. Neben möglichen pharmakokinetischen und funktionellen Unterschieden könnten bei den zum Teil starken Unterschieden in den Wirkprofilen vor allem pharmakodynamische Ursachen auf Rezeptorebene eine entscheidende Rolle spielen. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für die Histaminrezeptoren gezeigt (Lim et al., 2008; 2010).

III Fragestellung

Opioide werden in der Pferdemedizin zur Narkoseprämedikation und Behandlung akuter traumatischer und viszeraler Schmerzen eingesetzt. Im Vergleich zu anderen Spezies geht die Anwendung von Opioiden beim Pferd jedoch mit einer Reihe speziesspezifischer Besonderheiten einher. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika einer umfassenden pharmakologischen Charakterisierung zu unterziehen, auf deren Basis rationale Indikationsgebiete abgeleitet und speziesspezifische Arzneimittelwirkungen erklärt werden können. Hierfür wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- Molekulare Klonierung der κ - und μ -Opioidrezeptoren (*eOPRK1*; *eOPRM1*) aus dem Hypothalamus des Pferdes
- Stabile Expression der Rezeptoren in HEK 293 Zellen
- Funktionelle Charakterisierung der therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika mittels Radioligandenbindung und Bestimmung der vom Rezeptor aktivierten Signalmechanismen
- Vergleich der pharmakodynamischen Eigenschaften von Opioiden beim Pferd mit denjenigen von Mensch und Ratte
- Mutagenesestudien zur Identifizierung einzelner Aminosäuren, die für die tierartlichen Unterschiede in der Wirkung von Morphin, Butorphanol und Buprenorphin am KOR1 sowie von Fentanyl und anderen Piperidinderivaten am MOR1 des Pferdes verantwortlich sind.

IV Material und Methoden

1. Materialien

1.1 Geräte

| <i>Gerät</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|---|--|---|
| Brutschrank | Modell 6000 | Heraeus (Hanau) |
| Gefrierschrank | Liebherr Premium NoFrost, Modell GNP 3666, Index 20F/001 -20°C | Liebherr Hausgeräte GmbH (Ochsenhausen) |
| Tiefkühlschrank | GFL 6485 -80°C | GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel) |
| Sterilbank | Laminar Flow. Modell 6.12 S | BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH (Sonnenbühl-Genkingen) |
| Wasserbad | Julabo 20B | Helmut Saur (Reutlingen) |
| Zentrifuge | Mega Star 600R | VWR Funding Inc. (Radnor, USA) |
| Zentrifuge | Micro Rapid/K | Andreas Hettich GmbH & Co. KG (Tuttlingen) |
| Zentrifuge | Sorvall RC 6+ | Thermo Scientific (Waltham, USA) |
| PCR-Thermocycler | T Professional BASIC | Biometra GmbH (Göttingen) |
| Gelelektrophoresekammer für Agarose-Gelelektrophorese | Easy Cast TM Modell B1 | Owl, Separation Systems (Rochester, USA) |
| Anschlussgerät für Gelelektrophoresekammer | | Biometra GmbH (Göttingen) |
| Semi-dry Blotter | Multiphor II | Pharmacia LKB (Uppsala, Schweden) |
| Gelgießstand für SDS-Gele | | Bio-Rad Laboratories GmbH (München) |
| Gelelektrophoresekammer für SDS-Gelelektrophorese | Mini-Protean II | Bio-Rad Laboratories GmbH (München) |
| Spannungsgeber für Semi-dry Blotter und Gelelektrophoresekammer | Power Supply, Modell 1000/500 | Bio-Rad Laboratories GmbH (München) |
| Chemilumineszenz Detektor, UV Transilluminator | Fusion SL | Vilber Lourmat Deutschland GmbH (Eberhardzell) |
| Eismaschine | AF 80 | Scotsman Ice Systems Frimont S.P.A. (Mailand, Italien) |
| Photometer | Genesys 10S UV-Vis Spectrometer | Thermo Scientific (Waltham, USA) |

Material und Methoden

| | | |
|--------------------------|--|--|
| Autoklav | Systec 2540 EL | biomedis Laborservice GmbH (Gießen) |
| Sterilisator | UL50 | Memmert GmbH & Co. KG (Schwabach) |
| Scintillationsmesssystem | LS 6500 | Beckmann-Coulter (Krefeld) |
| Mikroskop Zellkultur | Labovert | Leitz (Wetzlar) |
| Microwelle | 900 & Grill | SEVERIN Elektrogeräte GmbH (Sundern) |
| Schüttler | REAX 2000 | Heidolph Instruments GmbH & Co. KG (Schwabach) |
| Thermomixer | Compact | Eppendorf (Hamburg) |
| Schüttler | TPM-2 | Sarstedt AG & Co. (Nümbrecht) |
| Rüttelplatte | Mini Rocking Platform | Biometra GmbH (Göttingen) |
| Pipetten | 1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, 500-5000 µl | Eppendorf (Hamburg) |
| Ultraschall Processor | Vibra Cell™ | Sonics & Materials Inc. (Danbury, USA) |
| Zellhomogenisator | Kinematica® 8/EU 9452 220V 50Hz | Bachofer (Reutlingen) |

1.2 Verbrauchsgegenstände

| Produkt | Hersteller |
|---|--|
| Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml | Eppendorf (Hamburg) |
| PCR-Einzelgefäße mit angehängtem Deckel 0,2 ml (781300) | Brand GmbH & Co. KG (Wertheim) |
| Zählubes Minis® | Zinsser Analytic GmbH (Frankfurt am Main) |
| Microglasfilterpapier (Glass-Mikrofibre Discs grade MGB) | Muntkell & Filtrak GmbH (Bärenstein) |
| Pipettenspitzen 1-10/10-100/100-1000 µl | Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindling-Arnhofen) |
| Ampuwa® Wasser für Injektionszwecke und andere Anwendungen (PCR-H ₂ O) | Fresenius Kabi AG (Bad Homburg) |
| Einmalküvetten PS Halbmicro/1,6 ml | A. Hartenstein Gesellschaft für Labor- und Medizintechnik mbH (Würzburg) |
| Schraubtubes 1,5/2,0 ml (APEX® Screw-Cap Microcentrifugation Tubes) | Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindling-Arnhofen) |
| Immobilon™ PVDF Membran (Immobilon-P Transfer Membrane 0,45 µm) | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| Electrode Paper Novablot (PKG/500) Filterpapier für Semi-Blotting | GE Healthcare Bio-Science AB (Uppsala, Schweden) |
| Zellkulturflaschen mit Vent Schraubkappen 75/150 cm ² | VWR Funding Inc. (Radnor, USA) |

Material und Methoden

| | |
|--|--|
| Petrischalen Ø 60/100 mm | TPP® (Trasadingen, Schweiz) |
| Zellkultur Testplatten 6/12/24/96 | TPP® (Trasadingen, Schweiz) |
| Zentrifugen Röhren (PP/Polypropylen) 15/50 ml | TPP® (Trasadingen, Schweiz) |
| Vakuum Filtrationssysteme 150 ml | TPP® (Trasadingen, Schweiz) |
| MultiGuard™ Barrier Tips 1-10/10- 100/100-1000 µl | Sorenson BioScience, Inc. (Salt Lake City, Utah, USA) |
| Serologische Pipetten 5/10/25 ml | VWR Funding Inc. (Radnor, USA) |
| Glaspasteurpipetten | Josef Peske GmbH & Co. KG (Aindlingen-Arnhofen) |
| Parafilm "M"® Laboratory film | Pechiney Plastic Packaging (Chicago, IL., USA) |

1.3 Chemikalien, Substanzen

| <i>Produkt</i> | <i>Abkürzung</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|----------------------------------|---|
| Agarose Basic | | AppliChem GmbH (Darmstadt) |
| Ammoniumpersulfat | APS | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Ampicillin Natriumsalz | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Albumin, proteasefrei (bovin) | BSA | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Bromphenolblau | BPB | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Buprenorphin-HCl | Bup | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| Butorphanoltartrat | But | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| Calciumchlorid | CaCl ₂ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Dimethylsulfoxid | DMSO | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Diprenorphin | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| [³ H]Diprenorphin | | Perkin-Elmer, Inc. (Waltham, USA) |
| Disuccinimidylsuberat | DSS | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| Dithiotreitol | DTT | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Dinatriumhydrogenphosphat | Na ₂ HPO ₄ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| E-Amino-n-Capronsäure | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Ethylendiamintetraessigsäure (Na ⁺ - EDTA) | EDTA | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Fentanylcitrat | Fen | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |

Material und Methoden

| | | |
|---|--|---|
| Folin-Ciocalteau´s Phenol Reagenz | Folin-Reagenz | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Guanosin 5'-Diphosphat Natriumsalz | GDP | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Glycerol | | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| [gamma-S35]Guanosin 5'-thiotriphosphat | GTP γ [³⁵ S] | Hartmann Analytic GmbH.(Braunschweig) |
| Kaliumchlorid | KCl | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Kupfer-II-Sulfat x 5 H ₂ O | CuSO ₄ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| LB-Agar | | International Diagnostics Group plc. (Lancashire, UK) |
| LB-Medium | | International Diagnostics Group plc. (Lancashire, UK) |
| Levomethadon-HCl | Levo | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Luminol (3-Aminophtalhydrazid) | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Magnesiumchlorid | MgCl ₂ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Methanol | MeOH | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Morphin-HCl | Mor | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| Naloxon-HCl | | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| Natriumcarbonat | Na ₂ CO ₃ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Natriumchlorid | NaCl | Calbiochem (Teil der Merk Millipore GmbH; Schwalbach/Ts.) |
| Natriumdesoxychololat | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Natriumdihydrogenphosphat | NaH ₂ PO ₄ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Natriumkaliumtartrat | Na ⁺ /K ⁺ -Tartrat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Natrium-Laurylsulfat | SDS | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Nonidet P40 | | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N´-(2-Etansulfonsäure) | HEPES | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Remifentanil-HCl | Remi | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Pethidin-HCl | Pet | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Phenylmethylsulfonyl-Fluorid | PMSF | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Polyethylenglycol 6000 | PEG | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |

Material und Methoden

| | | |
|---|---|---|
| Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat (Tween® 20) | Tween | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Salzsäure | HCl | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| SDS ultra pure | SDS C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Sufentanilcitrat | Suf | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| TRIS Ultra Qualität, Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan | Tris C ₄ H ₁₁ NO ₃ | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Tetramethylbenzamidin | TMB | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| U50,488 | | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |
| N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin | TEMED | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Wasserstoffperoxid | H ₂ O ₂ | Merk Millipore GmbH (Schwalbach/Ts.) |

1.4 Puffer

| Bezeichnung | Abkürzung/ pH Wert | Zusammensetzung |
|---|-------------------------------|--|
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung | PBS pH=7,4 | NaCl 140 mM KCl 3 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 8 mM KH ₂ PO ₄ 1,5 mM Aq. bidest. |
| HEPES-gepufferte Kochsalzlösung, 2fach | HBS pH=7,4 | NaCl 150 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 8 mM HEPES 20mM Aq. bidest. |
| Tris-Acetat-EDTA-Puffer; Laufpuffer Agarose-Gelelektrophorese | TAE | Tris 0,04 M Eisessig 0,02 M Na ⁺ EDTA 0,001 M Aq. bidest |
| Elektrophoresepuffer (SDS-Gelelektrophorese) | | Tris 0,025 M Glycin 0,2 M SDS 0,003 M Aq. bidest |
| Tris 1,25 M | pH=6,8 | Tris 1,25 M Aq. bidest |
| Tris 1,5 M | pH=8,8 | Tris 1,5 M Aq. bidest |
| Tris 5mM | pH=7,4 | Tris 5mM Aq. bidest |
| Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween | TBS/T pH=8,0 | Tris 0,025 M NaCl 0,19 M Tween 20 0,1% Aq. bidest |
| Tris-Magnesium-Puffer | TM-Puffer pH=7,4 | Tris 50 mM MgCl ₂ 5 mM Aq. bidest |

Material und Methoden

| | | |
|--|---------------------|---|
| Tris-EDTA-Puffer | TE-Puffer pH=7,4 | Tris 50 mM Na ⁺ EDTA 5 mM Aq. bidest |
| Homogenisierungs-Puffer | HB pH=7,4 | Tris 5 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM Aq. bidest |
| Kupfersulfat-Tartrat-Natriumcarbonat | CTC | CuSO ₄ x 5 H ₂ O 0,1% Na ⁺ /K ⁺ -Tartrat 0,2% Na ₂ CO ₃ 10% Aq. bidest |
| Anodenpuffer I (Western Blot) | pH=10,4 | Tris 0,25 M MeOH 100 ml Aq. bidest. 400 ml |
| Anodenpuffer II (Western Blot) | pH=10,4 | Tris 0,025 M MeOH 100 ml Aq. bidest. 400 ml |
| Kathodenpuffer (Western Blot) | pH=7,6 | E-Amino-n-Caprinsäure 2,6 g MeOH 100 ml Aq. bidest. 400 ml |
| Probenpuffer 2-fach (nach Laemmli) | | Tris; 1,25M; pH 6,8 100 µl Glycerol; 25% 200 µl SDS; 10% 200 µl Bromphenolblau 120 µl DTT 1M 200 µl Aq. bidest. 180 µl |
| Radioimmunopräzipitationspuffer (RIPA) | pH=7,2 | Tris 50 mM NaCl 150 mM Nonidet P40 1% Natriumdesoxycholat 0,5% EDTA 5 mM |

1.5 Gebrauchsfertige Lösungen, Kits

| <i>Produkt</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|---|
| Pfu-DNA-Polymerase | Promega GmbH (Mannheim) |
| T4-DNA-Ligase | Promega GmbH (Mannheim) |
| NotI 10u/µl | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| XbaI 10u/µl | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| 6 x DNA Loading Dye | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) |
| dNTP Set 100 mM Solutions | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) |
| GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder | Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) |
| Roti®-GelStain ready-to-use | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 30% AcrylamidstammLösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1 | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |

Material und Methoden

| | |
|---|---|
| Rotiszint® eco plus LSC-Universalcocktail | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Rotiblock® Blockierungsreagenz für Western Blot und ELISA | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| peqGOLD Gel Extraktion Kit | PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) |
| peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I | PEQLAB Biotechnologie GmbH (Erlangen) |
| NucleoBond® Xtra Midi Plus | Macherey und Nagel, GmbH & Co. KG (Düren) |
| CloneJET PCR Cloning Kit | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| Lipofectamine® 2000 Transfections Reagent | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |
| Complete™ Protease Inhibitor Cocktail | Roche Diagnostics GmbH (Penzberg) |
| Protein A-Sepharose CL-4B | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Biotinylated Molecular Weight Marker mol wt 6,500-180,000 Da | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |

1.6 DNA, Primer, Antikörper

DNA

| <i>Bezeichnung</i> | <i>Beschreibung</i> | <i>Bezugsquelle</i> |
|--------------------------|---|--|
| pcDNA3.1(+) | Plasmidvektor | Invitrogen AG (Carlsbad, USA) |
| Equine Brain, whole cDNA | cDNA Bibliothek des equinen Hippocampus | Zyagen (San Diego, USA) |
| hOPRK1 in pcDNA3.1 | | Zur Verfügung gestellt von Prof. Kieffer, Straßburg (Frankreich) |
| rOPRM1 in pcDNA3.1 | | Zur Verfügung gestellt von Dr. Yu, Minneapolis (USA) |

Primer

| <i>Target</i> | <i>Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|---------------|----------------------------------|-------------------------------|
| eOPRK1 | ea_OPRK_fwd2 eOPRK_rev1 | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| eOPRM1 | eOPRM_fwd_5 eOPRM_rev_5 | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| MutK1 | eOPRK_Mut1fwd eOPRK_Mut1rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| MutK2.1 | eOPRK_Mut2.1fwd eOPRK_Mut2rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| MutK2.2 | eOPRK_Mut2.2fwd eOPRK_Mut2rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| MutK2.3 | eOPRK_Mut2.3fwd eOPRK_Mut2rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |

Material und Methoden

| | | |
|--------|--------------------------------|-------------------------------|
| MutM1 | eOPRM_Mut1fwd eOPRM_Mut1rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |
| eGAPDH | eGAPDH_fwd eGAPDH_rev | MWG Biotech AG (Ebersberg) |

Antikörper

| <i>Zielantigen</i> | <i>Antikörper Bezeichnung</i> | <i>Hersteller</i> |
|-----------------------|---|---|
| Erk1/2 | p44/42 MAPK (Erk1/2) Rabbit Ab #9102 | Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) |
| Rabbit-F _c | Anti-rabbit IgG HRP-linked Antibody #7074S | Cell Signalling (New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main) |
| MOR1 | Polyklonaler Peptidantikörper gegen die C-terminale Region des MOR1 (Kaninchen) | Eigene Herstellung |
| Biotin | Anti-Biotin (Kaninchen) | Eigene Herstellung |

1.7 Zellen, Zellkulturmedien, Additive

| <i>Produkt</i> | <i>Hersteller</i> |
|--|--|
| HEK 293 Zellen | CLS-Cell lines service (Eppelheim) |
| DMEM | PAN-Biotech GmbH (Aidenbach) |
| DMEH | Selbst hergestellt aus DMEM (s. oben) und 25 mM HEPES (s. unten) |
| Fetales Kälberserum (FKS) | PAA Laboratories GmbH (Cölbe) |
| Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate buffered saline; PBS) | Selbst hergestellt (vgl. Puffer), für Zellkultur steril filtriert |
| Penicillin/Streptomycin | PAN-Biotech GmbH (Aidenbach) |
| Enrofloxacin | ICN Biomedicals Inc. (Aurora, USA) |
| Glutamin | PAN-Biotech GmbH (Aidenbach) |
| Genectidinsulfat (G418) | Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe) |
| Poly-L-lysine hydrobromide | Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) |
| Opti-MEM serumreduziertes Medium | Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltram, USA) |

2. Klonierung der equinen Opioidrezeptoren

2.1 Primer und Template

Die equinen κ - und μ -Opioidrezeptoren wurden aus einer cDNA Bibliothek des Hippocampus kloniert, da Vorversuche zur Klonierung aus RNA Präparationen der Leber und Leukozyten mittels RT-PCR scheiterten. Im Hippocampus des Pferdes werden alle 3 Opioidrezeptoren exprimiert (Hellyer et al., 2003).

Die spezifischen Forward und Reverse Primer wurden mit Hilfe des Primer Design Tools (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) von den in GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) hinterlegten annotierten Gensequenzen des Pferdes, Esels und der Maus abgeleitet.

2.2 GAPDH PCR

Um die Integrität der verwendeten cDNA sicherzustellen, wurde diese zunächst mittels PCR auf das Vorhandensein des house-keeping Gens GAPDH getestet. Es wurde folgender Ansatz gewählt:

| | |
|---|--------------|
| Equine brain cDNA (1:10 verdünnt in H ₂ O) | 2 μ l |
| eGAPDH_fwd | 1 μ l |
| eGAPDH_rev | 1 μ l |
| dNTP's | 1 μ l |
| 10-fach PFU-Buffer | 5 μ l |
| PFU DNA-Polymerase | 0,5 μ l |
| H ₂ O | 39,5 μ l |

Es wurde eine für die Primer geeignete Anlagerungstemperatur von 55°C gewählt. Die Elongationszeit betrug 45 sec bei 25 Zyklen.

Das erwartete Fragment besitzt die Größe von 285 bp.

2.3 PCR Klonierung

Nach Bestätigung der Qualität der verwendeten cDNA, wurde diese für die weiteren Versuche verwendet. Die Klonierungsexperimente erfolgten mit folgenden Primern:

| | |
|--------------|---|
| ea_OPRK_fwd2 | 5'-ATG GAG TCG CCG GTT CA-3' |
| eOPRK_rev1 | 5'-TGC AGT AGT AAT CTG AGT TAA ACC T-3' |
| eOPRM_fwd_5 | 5'-ATG GAC AGC AGC ACC GTC-3' |
| eOPRM_rev_5 | 5'-TTA GGG CAA CGG AGC AGT TT-3' |

Der Ansatz der Reaktionen sah folgendermaßen aus:

| | |
|---|---------|
| Equine brain cDNA (1:10 verdünnt in H ₂ O) | 2 µl |
| fwd-Primer | 1 µl |
| rev-Primer | 1 µl |
| dNTP's | 1 µl |
| 10-fach PFU-Buffer | 5 µl |
| PFU DNA-Polymerase | 0,5 µl |
| H ₂ O | 39,5 µl |

Hier wurde ebenfalls eine Anlagerungstemperatur von 55°C gewählt. Aufgrund der erwarteten Länge des Fragmentes wurde die Elongationszeit auf 90 sec bei 25 Zyklen erhöht.

Die beiden DNA-Fragmente der Opioidrezeptoren besitzen folgende Länge:

| | |
|---------------|---------|
| <i>eOPRK1</i> | 1200 bp |
| <i>eOPRM1</i> | 1206 bp |

2.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die in den oben genannten PCR Experimenten erhaltenen Proben wurden in der Agarose-Gelelektrophorese auf vorhandene Banden in erwarteter Länge getestet.

Material und Methoden

Für ein 1,8% Agarose-Gel wurde der folgende Ansatz verwendet:

| | |
|--------------------|--------|
| Agarose | 0,9 g |
| TAE-Puffer | 50 ml |
| Roti-Safe GelStain | 3,5 µl |

Ein Kamm diente als Platzhalter für die Probestaschen. 20 µl des PCR Ansatzes wurden mit 4 µl 6-fach loading Dye versetzt und aufgetragen. Um die Länge der Fragmente zu ermitteln wurde die 100 bp+ DNA Leiter aufgetragen. Die Banden wurden bei einer Wellenlänge von 312 nm im UV Licht sichtbar gemacht.

2.5 Aufreinigung der PCR Produkte

Zeigte sich nach der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande in erwarteter Länge, wurde diese unter UV Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und extrahiert. Hierbei wurde entsprechend der Anleitung des Gel Extraktion Kits (Peqlab) verfahren. Dieser umfasst das Lösen des Gelstückes, die Bindung der DNA Fragmente an eine Silicamatrix und anschließende Waschschrte. Eluiert wurden die PCR Produkte mit H₂O höchster Reinheit. Sie wurden zur Sequenzierung an die Firma MWG-Eurofins (Ebersberg) weitergeleitet.

2.6 Klonierung in pJet und pcDNA3.1

Nach erfolgreicher Sequenzierung wurden die aufgereinigten PCR Produkte zunächst in den Klonierungsvektor pJET ligiert. Es wurde folgender Ansatz verwendet:

| | |
|---------------------|-------|
| PCR Produkt | 1 µl |
| pJET blunt | 1 µl |
| 2 x Reaktion Puffer | 10 µl |
| T4 DNA Ligase | 1 µl |
| H ₂ O | 7 µl |

Material und Methoden

Die Plasmide wurden wie nachfolgend beschrieben in kompetente *E. coli* vom Stamm JM109 transformiert und diese auf Ampicillin haltigen LB Agar Platten kultiviert. Das Plasmid pJet enthält ein Resistenzgen gegen Ampicillin. Gewachsene Kolonien wurden mit für die beiden equinen Opioidrezeptoren spezifischen Primer auf das Vorhandensein der relevanten DNA Fragmente in ihren Plasmiden getestet. Die Plasmide positiver Klone wurden aufgereinigt und zur Sequenzierung an die Firma MWG-Eurofins (Ebersberg) gesendet. Es wurden weiterführend Plasmide mit positiver Leserichtung verwendet.

Die Plasmide wurden mit den Restriktionsenzymen NotI und XbaI für 15 min bei 37°C verdaut. Anschließend wurde die Reaktion 5 min lang bei 60°C gestoppt. Der Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

| | |
|------------------|-------|
| Plasmid | 2 µl |
| 5 x FD Puffer | 2 µl |
| NotI | 1 µl |
| XbaI | 1 µl |
| H ₂ O | 14 µl |

Die erhaltenen Fragmente wurde in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die klonierte Rezeptor DNA aufgereinigt. Sie wurde anschließend über Nacht bei Raumtemperatur in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) subkloniert:

| | |
|--|-------|
| <i>eOPRM/eOPRK</i> (geschnitten mit XbaI und NotI) | 3 µl |
| pcDNA3.1(+) (geschnitten mit XbaI und NotI) | 1 µl |
| 10 x Ligase Puffer | 2 µl |
| T4 DNA Ligase | 1 µl |
| H ₂ O | 14 µl |

Der Ligationsansatz wurde in kompetente *E. coli* transformiert und diese auf einen Selektionsagar mit Ampicillin ausgestrichen, da das Plasmid pcDNA3.1(+) ein

Ampicillin Resistenzgen enthält. Die erhaltenen Kolonien wurden mittels PCR auf das Vorhandensein von Rezeptor DNA überprüft und sequenziert.

2.7 Transformation

Zur Transformation wurden kompetente *E. coli* des Stammes JM109 (Promega) verwendet. Diese wurden bei -85°C gelagert. Für die Transformation wurden sie langsam auf 4°C aufgetaut. Bei Erreichen des Taupunktes wurde $5\ \mu\text{l}$ des gewünschten Plasmids oder des Ligationsansatzes (s. oben) zugegeben. Nach 20 min Inkubation bei 4°C erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 45 sec. Anschließend wurden die Bakterien für 2 min auf 4°C inkubiert. Nach Zugabe von $450\ \mu\text{l}$ eiskaltem LB Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37°C geschüttelt. Jeweils $200\ \mu\text{l}$ unverdünnte und 1:10 verdünnte Bakteriensuspension wurden auf einer LB Agar Platte mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.8 Aufreinigung der Plasmide

Von Bakterienklonen die das gewünschte Plasmid enthielten, wurde eine Übernachtkultur in 300 ml LB Medium mit Ampicillin angeimpft. Die Bakterien wurden bei $6.000 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte nach Anleitung des Xtra Midi Plus Kits (Macharey und Nagel). Die Bakterien werden hierbei alkalisch lysiert. Anschließend wurden die Plasmide an eine Silicamatrix gebunden und mit spezifischen Puffern gewaschen. Es erfolgte weiterführend eine erste Elution und die Bindung an eine zweite Matrix. Nach weiteren Waschschritten wurden die Plasmide mit Tris-haltigem Elutionspuffer in ein steriles $1,5\ \text{ml}$ Reaktionsgefäß abgelöst und für die weiteren Versuche verwendet.

3. Zellmodell und Zellkultur

3.1 Zellmodell HEK 293 Zellen

Als Zellmodell zur Expression der equinen Opioidrezeptoren wurden HEK 293 Zellen gewählt. Bei diesen Zellen handelt es sich um eine Standard Zelllinie die für die Expression eukaryotischer Proteine geeignet ist. Sie ist in der Lage posttranslationale Modifikationen durchzuführen. Dies ist entscheidend für die Expression funktionstüchtiger Rezeptoren. HEK 293 Zellen wurden bereits in vielen Studien für die erfolgreiche Expression der Opioidrezeptoren verwendet (Gharagozlou et al., 2003; 2006). Die Zellen wurden in Wachstumsmedium mit 10% FKS in 75 cm² großen Kolben kultiviert und standen für die stabile Expression der Rezeptoren zur Verfügung.

3.2 Transfektion

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit der Calciumchlorid Methode. Dabei werden Zellen in einer Dichte von 2×10^5 Zellen/ml auf einer 10 cm Petrischale ausgesät und über Nacht wachsen gelassen. Das Medium wurde am nächsten Tag abgesaugt und die Zellen 1 h mit Wachstumsmedium ohne Zusätze bei 37°C inkubiert. 100 µL CaCl₂-Lösung wurden mit 25 µg Plasmid DNA in ein Polypropylenröhrchen pipettiert und mit TE-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. 1 ml 2 x HBS wurde hinzugegeben und durch Invertieren vorsichtig gemischt. Der Transfektionsansatz wurde 1 min lang bei RT inkubiert. Je 0,1 ml dieser Lösung wurden pro ml Medium zu den Zellen pipettiert. Die Lösung muss langsam und tropfenweise hinzupipettiert werden, dabei wird die Petrischale geschwenkt. Abschließend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für 4 h. Nach der Inkubation wurde das Medium abgesaugt und durch komplettes Wachstumsmedium ersetzt.

3.3 Selektion

Einen Tag nach der Transfektion wurde mit der Selektion stabiler Zellen begonnen. Hierzu wurde das Wachstumsmedium mit 4 mg/ml G418 versetzt. Dieser Stoff lässt die Zellen absterben, die kein Plasmid aufgenommen haben, da es ein Resistenzgen gegen Neomycin enthält. Die Zellen wurden so lange mit G418 inkubiert bis

einzelne Zellklone erkennbar sind. Diese wurden zunächst auf eine 6-Well Platte umgesetzt und dort in Medium ohne G418 expandiert. Waren sie dicht genug, wurden sie in einen 25 cm² großen Zellkulturkolben umgesetzt und weiter kultiviert. Die einzelnen Kolonien wurden mittels Radioligandenbindung auf Rezeptorexpression getestet. Kolonien mit einer physiologischen Rezeptorexpression wurden subkloniert und für die folgenden Experimente verwendet.

3.4 Membranpräparation

Für die Membranpräparation wurden Zellen, die den gewünschten Rezeptor exprimieren, aus einer 182,5 cm² Zellkulturflasche verwendet. Die Zellen wurden abgeklopft, pelletiert und bei -80°C gelagert. Für die Membranpräparation wurden die Zellpellets langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ml eiskaltem HB-light-Puffer resuspendiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zunächst für 10 sec mit dem Ultra-Turrax homogenisiert. Anschließend wurden die Kerne und nicht aufgebrochenen Zellen für 10 min bei 300 x g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein Sorvall-Tube überführt und die Membranen bei 20.000 x g für 30 min pelletiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt wurden die Membranen in der gewünschten Menge Bindungspuffer (TM-Puffer) resuspendiert und der Proteingehalt bestimmt.

3.5 Proteinbestimmung nach Lowry

Die Proteinbestimmung erfolgte entsprechend der Methode nach Lowry et al. (1951). Zunächst wurde eine Standardreihe mit 0, 25, 50, 75 und 100 µg/ml BSA in H₂O in einem Volumen von 100 µl hergestellt. Im Anschluss daran wurden zwei 1:10 Verdünnungen der Proben hergestellt und zu allen Ansätzen 400 µl Lowry A Reagenz hinzugegeben. Nach einer Inkubation für 10 min wurden 200 µl Lowry B Reagenz hinzugefügt und die Ansätze für weitere 30 min inkubiert. Die Farbreaktion wurde abschließend im Photometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Der Proteingehalt wurde durch Regression anhand der Standardkurve berechnet.

4. Pharmakologische Charakterisierung

4.1 Radioligandenbindung

Die Selektivität und Affinität der Opioidanalgetika an den klonierten Rezeptoren wurde in Radioligandenbindungsexperimenten mit [³H]Diprenorphin als Tracer bestimmt. Diprenorphin ist ein nichtselektiver Antagonist mit hoher Affinität, der an alle Opioidrezeptoren bindet (Raynor et al., 1994). Wird dessen Bindung mit steigenden Mengen an nicht-radioaktiv markierten Liganden verdrängt (heterologe Verdrängungs-experimente), so kann man aus den gewonnenen Verdrängungskurven die inhibitorischen Konstanten (K_i) der verschiedenen Opioide bestimmen. Dies setzt jedoch die Kenntnis der Dissoziationskonstante (K_d) des Diprenorphins an den jeweiligen Rezeptoren voraus. Diese wurde deshalb vorab in homologen Verdrängungsexperimenten ([³H]Diprenorphin vs. Diprenorphin) für alle 4 untersuchten Rezeptoren bestimmt (eMOR1, rMOR1, eKOR1, hKOR1). Die IC_{50} der Verdrängungskurven wurde durch nicht lineare Regressionsanalyse bestimmt. Mit der spezifischen K_d von Diprenorphin kann mit der Formel nach Cheng und Prussow (1973) aus der IC_{50} der Liganden die inhibitorische Konstante K_i berechnet werden:

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

| | |
|-------------|---|
| K_i = | Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitor Bindung |
| IC_{50} = | Wendepunkt der Dissoziationskurve bei halblogarithmischer Darstellung |
| $[L]$ = | Konzentration des Radioliganden |
| K_d = | Gleichgewichts-Dissoziationskonstante des Radioliganden |

Der negative dekadische Logarithmus des K_i Wertes (pK_i) gilt als Maß für die Affinität des Kompetitors und wurde verwendet, um die Affinität und Selektivität der getesteten Opioiden an den Rezeptoren des Pferdes mit denjenigen des Menschen bzw. der Ratte zu vergleichen.

Die Bestimmung der Verdrängungskurven erfolgte in 10-er Schritten. Jeder Ansatz wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Reaktionen enthielten in 200 μ l 60 - 100 μ g Membranprotein, suspendiert in TM-Puffer. Es wurden Membranen von Zellen für die Experimente verwendet, die eine Rezeptordichte von HEK

Material und Methoden

eMOR1: $1,2 \pm 0,2$ pM/mg; HEK rMOR1: $0,253 \pm 0,022$ pM/mg; HEK eKOR1: $0,9 \pm 0,05$ pM/mg; HEK hKOR1: $0,30 \pm 0,03$ pM/mg besitzen. Die Kompetitoren (Diprenorphin, Morphin, Buprenorphin, Butorphanol, Fentanyl, Levomethadon, Sufentanil, Pethidin, Remifentanyl) wurden in Konzentrationen von 10^{-12} bis 10^{-5} M eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde Naloxon (10^{-4} M) verwendet. Die totale Bindung (B_0) wurde in Abwesenheit eines Kompetitors gemessen. Zu jedem Ansatz wurde 1 nM [3 H]Diprenorphin hinzugefügt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Tracer und Kompetitor eingestellt hat. Die membrangebundene Radioaktivität wurde durch Filtration über GF/B Glasfaserfilter, die für 20 min in 0,1% PEG geblockt waren, bestimmt. Die Filter wurden anschließend 3 x mit 5 ml eiskaltem TM-Puffer gewaschen und in ein Szintillationsgefäß überführt. Zu den Filtern wurde jeweils 5 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben und diese über Nacht extrahiert. Nach einer Ruhezeit von 24 h wurde die Radioaktivität im Szintillationsmessgerät bestimmt. Die Daten wurden in Graph-Pad (Prism) ausgewertet.

4.2 GTP γ [^{35}S]-Bindung

Die intrinsische Aktivität der therapeutisch eingesetzten Liganden wurde mittels Rezeptor-vermittelter Aktivierung der G-Proteine bestimmt (Strange, 2010). Eine Aktivierung des Rezeptors führt zum Einbau von markiertem GTP γ [^{35}S] in die G_α -Untereinheit, das im Gegensatz zu GTP nicht hydrolysiert werden kann. Die Menge an gebundenen GTP γ [^{35}S] stellt daher ein Maß für die vom Rezeptor aktivierten G-Proteine dar.

Für den Assay wurde ein Zellpellet aufgetaut, in Membranpuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 5 mM MgCl₂, 10 μM PMSF, 10 mM Benzamidin) resuspendiert und mit GDP (10 μM) und EDTA (2 mM) für 30 min bei 30°C vorinkubiert. Die Membranen wurden auf Eis gestellt und die Reaktionsansätze pipettiert. Diese enthielten in einem Volumen von 200 μl die jeweiligen Liganden in maximal effektiven Konzentrationen (i.d.R. 10^{-5} M). Die basale Bindung wurde in Abwesenheit eines Liganden bestimmt. Nach Zugabe von je 10 μg Membranprotein und 1 nM GTP γ [^{35}S] wurden die Ansätze gemischt und bei 30°C für 45 min inkubiert. Die Reaktion wurde auf dem Eisbad gestoppt und die Membranen durch Filtration über GF/B Glasfaserfilter abgetrennt. Um unspezifische Bindungen zu

verhindern, wurden die Filter vorab für 30 min in 0,1% PEG Lösung inkubiert. Die Filter wurden 3-mal mit 5 ml eiskaltem TM-Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit wurde die membrangebundene Radioaktivität im β -Counter bestimmt. Die Ergebnisse wurden mit Excel (Microsoft) ausgewertet. Die Werte eines jeden Experiments wurden normalisiert, wobei die Pufferkontrolle auf 0, die Positivkontrolle (volle Agonisten; Fentanyl bei MOR1, U50,488 bei KOR) auf 100 % gesetzt wurde.

4.3 Bestimmung der MAP-Kinase Aktivität

Die Aktivierung nachgeschalteter Signalkaskaden wurde am Beispiel der Rezeptor-vermittelten Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 (MAP-Kinase) untersucht (Schulz et al., 2004).

Hierzu wurden stabil mit den Opioidrezeptoren transfizierte HEK 293 Zellen in einer Dichte von 1×10^5 Zellen / 12-Well Zellkulturplatten ausplattiert und über Nacht in komplettem Wachstumsmedium kultiviert. Im Anschluss daran wurden die Zellen 3 x mit PBS gewaschen und für 30 min bei 37°C in DMEH mit 0,1% BSA equilibriert. Die Aktivierung der ERK1/2 erfolgte durch Zugabe der nachfolgenden Opioide (Endkonzentration je $1 \mu\text{M}$) für 5 min bei 37°C. Am KOR1 wurden U50,488, Butorphanol und Buprenorphin am MOR1 Fentanyl, Levomethadon, Butorphanol und Buprenorphin getestet. Morphin wurde bei beiden Rezeptoren in einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ eingesetzt. Die Reaktionen wurden auf Eis gestoppt, das Medium abgesaugt und die Zellen mit 0,5 ml Laemmli Proben Puffer solubilisiert. Die Aktivierung der ERK1/2 wurde im Western Blot mit phosphospezifischen Antikörpern gegen pY 42 und pY 44 bestimmt.

4.4 Western Blot

Beim Western Blot werden Proteine einer Probe zunächst elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt und nach Transferierung auf eine Membran mit Antikörpern detektiert. Mithilfe phosphospezifischer Antikörper gegen Y 42 und Y 44 kann so der Aktivierte Zustand der ERK1/2 identifiziert werden.

4.4.1 SDS-PAGE

Die solubilisierten Zellen wurden zunächst für 10 sec mit Ultraschall behandelt, um die enthaltene DNA zu zerkleinern. Die intra- und intermolekularen Disulfidbrücken wurden anschließend für 5 min bei 95°C in Anwesenheit von DTT gespalten. Nach dem Abkühlen wurden unlöslichen Zellbestandteile für 3 min bei 5.000 x g pelletiert und je 10 µl des Überstandes in die Probestaschen des Polyacrylamidgels pipettiert. In die freien Geltaschen wurde Probenpuffer eingebracht. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte zunächst für 20 min bei 100 V (Sammelgel) und anschließend für 1 h bei 200 V (Trenngel).

Für die Bestimmung der ERK1/2 Phosphorylierung wurden folgende Polyacrylamidgele verwendet:

Sammelgel 10% (für 2 Gele):

| | |
|-----------------|--------|
| PAA; 30% | 1,7 ml |
| 1,25 M Tris-HCl | 1,0 ml |
| 10% SDS | 0,1 ml |
| Aq. bidest. | 7,0 ml |
| TEMED | 20 µl |
| 10% APS | 100 µl |

Trenngel 10% (für 2 Gele):

| | |
|----------------|---------|
| PAA; 30% | 5 ml |
| 1,5 M Tris-HCl | 3,75 ml |
| 10% SDS | 0,15 ml |
| Aq. bidest. | 6,1 ml |
| TEMED | 15 µl |
| 10% APS | 70 µl |

4.4.2 Western Blot

Die in der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (PAGE) aufgetrennten Proteine wurden anschließend elektrophoretisch mithilfe eines Semidry-Blotters auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen. Der Transfer erfolgte für 2 h bei einer Stromstärke von 0,8 mAmp pro cm² Membranfläche. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membranen für 30 min mit Roti-Block (10 % in Aq. bidest.) abgeblockt. Die Bindung des ersten Antikörpers gegen Y 42/pY 44 ERK1/2 (1:5000 in TBS/T mit 0,1 % BSA) erfolgte bei 4°C über Nacht im Kühlraum. Die Membranen wurden anschließend 4 x für je 10 min mit TBS/T

Material und Methoden

gewaschen, bevor sie für 1 weitere h mit dem 2. Antikörper gegen Kaninchen-IgG (HRP konjugiert, 1:10.000 in TBS/T mit 0,1% BSA) inkubiert wurden. Schließlich wurden die Membranen 4 x für je 10 min mit TBS/T gewaschen und entwickelt. Hierzu wurden die getrockneten Membranen für jeweils 1 min in ECL-Reagenz eingelegt:

| | | |
|-----------------------------------|--------|---------|
| Luminol in DMSO | 2,5 mM | 200 µl |
| p-Cumarsäure in DMSO | 400 µM | 89 µl |
| Tris-HCl | 100 mM | 2 ml |
| Aq. bidest. | - | 17,7 ml |
| 30% H ₂ O ₂ | 2,7 mM | 6,1 µL |

Die durch die Peroxidase angeregte Chemilumineszenz wurde im Fusion SL Chemilumineszenzdetektor gemessen.

5. Mutagenesestudien

5.1 Auswahl der Mutanten

Um die für die spezies-spezifische Opioidwirkung beim Pferd verantwortlichen Aminosäuren im KOR1 und MOR1 zu identifizieren, wurden zunächst die Primärsequenzen der Rezeptoren des Pferdes mit denjenigen anderer Spezies (Ratte, Maus, Mensch) verglichen. Dabei fanden sich nur wenige, beim Pferd isoliert auftretende Aminosäuren im Bereich der transmembranen Domänen. Beim equinen MOR1 war dies I 77 (TM 1), beim equinen KOR1 V 244 (TM 5), V 284 und V 285 (TM 6). Die genannten Aminosäuren wurden mit Hilfe der Site-Directed Mutagenese zu den entsprechenden Aminosäuren der Ratte (MOR1) und des Menschen (KOR1) zurückmutiert. Die mutierten equinen Rezeptoren wurden wie folgt bezeichnet:

MOR1: Mut M1 (I 77 L)

Material und Methoden

KOR1: Mut K1 (I 244 V)
Mut K2.1 (I 284 V)
Mut K2.2 (I 285 V)
Mut K2.3 (I 284 V/I 285 I)

5.2 Site-Directed Mutagenese

Um die gewünschte Mutation in die entsprechende Plasmid DNA einzubringen, wurde der Phusion Kit (Thermo-Fisher) verwendet. Hierbei wurden 5'phosphorylierte Primer eingesetzt. Die Vorwärtsprimer enthalten in der Mitte der Sequenz die gewünschte Mutation. Diese Primer benötigen eine Mindestlänge von 20 Basen. Folgende Primer wurden verwendet (mutagene Basen sind rot dargestellt):

| | |
|-----------------|---|
| eOPRK_Mut1fwd | PHO-CCT CAT CAT CAT TGT CTG CTA CAC CC |
| eOPRK_Mut1rev | PHO-ACA GGA ATC ACG AAG GCA AAG AC |
| eOPRK_Mut2.1fwd | PHO- GTG GCA GTC TTC GTC ATC TGT TG GAC |
| eOPRK_Mut2.2fwd | PHO-GTG GCA GTC TTC ATC GTC TGT TG |
| eOPRK_Mut2.3fwd | PHO-GTG GCA GTC TTC GTC GTC TGT TG |
| eOPRK_Mut2rev | PHO-CAC CAC AAG GAC AAG CCT GGT |
| eOPRM_Mut1fwd | PHO-AAT CAT GGC CCT CTA CTC CAT CGT |
| eOPRM_Mut1rev | PHO-GTG ATG GCT GTG ATC ATA GAA GGA CT |

Der Ansatz einer Mutagenese-PCR sah folgendermaßen aus:

| | |
|---|-------|
| <i>eOPRK1/eOPRM1</i> in pCDNA3.1 (+) 1:100 verdünnt | 2 µl |
| fwd-Primer | 1 µl |
| rev-Primer | 1 µl |
| dNTPs | 1 µl |
| 5 x HS Polymerase Puffer | 10 µl |

| | |
|----------------------------------|---------|
| Phusion Hot Start DNA Polymerase | 0,5 µl |
| Aq. bidest. | 34,5 µl |

Die Anlagerungstemperatur lag bei 68°C, die Elongation erfolgte für 35 Zyklen für 90 sec bei 72°C. Die Proben wurden wie oben beschrieben auf ein Agarosegel aufgetragen und die Länge der PCR Fragmente bestimmt. Positive Ansätze enthielten eine Bande von circa 6.000 bp Länge. Von den positiven PCR Produkten wurden je 5 µl zusammen mit 1 µl T4 Ligase in einer Rapid-Ligation über ihre Phosphatgruppen ligiert und in kompetente *E. coli* transformiert. Diese wurden auf LB Agar Platten mit Ampicillin ausplattiert und die Plasmide einzelner Kolonien präpariert (s. 2.8). Die erfolgreiche Mutation wurde durch Sequenzierung des relevanten Bereichs sichergestellt. Die mutierten Rezeptoren wurden wie oben beschrieben stabil in HEK 293 Zellen exprimiert und charakterisiert.

6. Rezeptordimerisierung

6.1 Transiente Transfektion

Für die Untersuchungen zur Rezeptordimerisierung wurden HEK 293 Zellen transient mit den entsprechenden Plasmiden der Rezeptoren transfiziert, um eine möglichst vergleichbare Rezeptordichte zu gewährleisten. Hierzu wurden je 1×10^5 HEK 293 Zellen auf einer 6-Well Platte ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurde das Wachstumsmedium mit 10% FKS abgesaugt und durch Opti-MEM ohne Zusätze ersetzt. Die Zellen wurden für 1 h in diesem Medium equilibriert, bevor 10 µg der gewünschten Plasmide (eMOR1, rMOR1, Mut M1 in pcDNA3.1) mit 5 µl Lipofectamin 2000 in 250 µl Opti-MEM pro Well 5 min lang vorinkubiert und zugegeben wurden. Nach 4 Stunden wurde Opti-MEM durch komplettes Wachstumsmedium ersetzt und die Zellen für 2 Tage kultiviert.

6.2 Quervernetzung der Rezeptordimere

Um die Dimere besser darstellen zu können, wurden die Zellen vor dem Ernten mit 10^{-4} M Naloxon für 16 h behandelt. Im Anschluss daran wurde das Wachstumsmedium abgesaugt und die Zellen 2-mal mit je 2 ml PBS gewaschen. Die Rezeptordimere wurden durch Zugabe von 30 mM des heterobifunktionellen Crosslinkers DSS in 1 ml PBS für 30 min bei 37°C kovalent verbunden. Die Zellen wurden schließlich 3-mal mit je 2 ml PBS gewaschen und in RIPA Puffer lysiert.

6.3 Immunpräzipitation

Um die Rezeptoren für den Western Blot aufzukonzentrieren, wurden sie immunpräzipitiert. Die Zelllysate wurden abzentrifugiert (5 min, bei 5.000 x g) und der Überstand für die Immunpräzipitation verwendet. Hierfür wurden je 20 µg anti-MOR1 Antikörper, 30 µl Protein A Sepharose und 40 µl Complete® Protease Inhibitor Cocktail in einem Gesamtvolumen von 1 ml hinzugefügt und über Nacht bei 4°C rotiert. Die Proben wurden 3-mal mit je 1 ml RIPA Puffer gewaschen, bevor sie in 100 µl Laemmli Probenpuffer aufgenommen wurden. Anschließend wurden die Proteine über 8% SDS-PAGE aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF Membran mit polyklonalen Peptidantikörpern gegen den C-Terminus des MOR1 des Pferdes und der Ratte angefärbt. Die Größe der Rezeptorbanden wurde durch einen biontinylierten Molekulargewichtsmarker ermittelt.

V Ergebnisse

1. Klonierung der Opioidrezeptoren

Die Klonierung der equinen Opioidrezeptoren mithilfe von Standard RT-PCR Techniken aus peripheren Geweben scheiterte, da das derzeit in GenBank verfügbare Pferdegenom und seine 2016 verfügbaren, annotierten mRNA Sequenzen unvollständig sind. Im Fall von *eOPRK1* fehlt der abgeleiteten mRNA Sequenz (Zugangs-Nr. XM_014728019.1) das erste Exon. Wir umgingen das Problem, indem wir einen Vorwärtsprimer von der abgeleiteten mRNA Sequenz des *OPRK1* des Esels (*Equus asinus*; Zugangsnummer XM_014838770.1) verwendeten. Der abgeleiteten mRNA Sequenz des *eOPRM1* fehlte dagegen das vierte und letzte Exon. Ein spezifischer Rückwärtsprimer konnte ausgewählt werden, indem das 4. Exon der Maus (Zugangsnummer NP_001289722) mit dem Pferdegenom verglichen wurde. Unter Verwendung dieser Primer war es möglich, die vollständige cDNA des *eOPRK1* und *eOPRM1* aus einer equinen Hippocampus cDNA Bibliothek zu amplifizieren (Abb. 2). Die cDNA Klone wurden sequenziert und die Sequenzen (siehe Anhang 2.) bei GenBank hinterlegt (Zugangsnummer KX_509996.1; KX_721505.1).

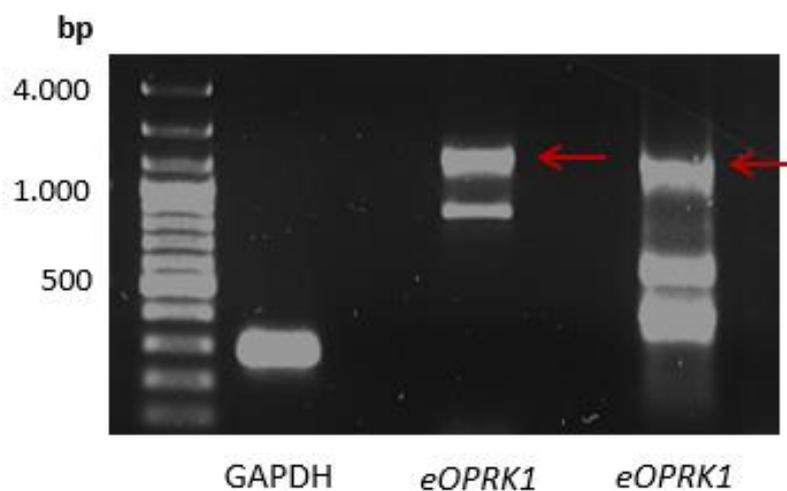


Abbildung 2: Darstellung der amplifizierten PCR Fragmente in der Gelelektrophorese. 20 μ l der PCR Ansätze wurden über ein 1,8 % Agarosegel aufgetrennt und unter UV Beleuchtung dargestellt. Die Integrität der equinen hippocampalen cDNA wurde durch GAPDH PCR getestet. Pfeile zeigen vollständige *eOPRK1* (1.220 bp) und *eOPRM1* (1.206 bp) PCR Fragmente an.

2. Molekulare Charakterisierung

eOPRK1 befindet sich auf Chromosom 9 des Pferdes, es enthält 3 Exons, ist 1.143 bp lang und kodiert für ein 380 Aminosäure langes Protein. Das Rezeptorprotein unterscheidet sich in 20 Aminosäuren von seinem menschlichen Ortholog (95% Homologie), wobei sich die meisten dieser Unterschiede in der N- und C-terminalen Region finden. Das equine *OPRM1*-Gen befindet sich auf Chromosom 31. Die mRNA enthält 4 Exons, ist 1.206 bp lang und kodiert für ein 401 Aminosäure langes Protein. Das Rezeptorprotein teilt 94% Identität mit dem MOR1 der Ratte und unterscheidet sich in 24 AA, die vorwiegend am N-Terminus lokalisiert sind (Abb. 3). Der KOR1 des Menschen und MOR1 der Ratte wurden als Vergleichsrezeptoren herangezogen, da die bisherigen Studien zur Rezeptorfunktion und -struktur hauptsächlich an diesen Rezeptoren vorgenommen wurden.

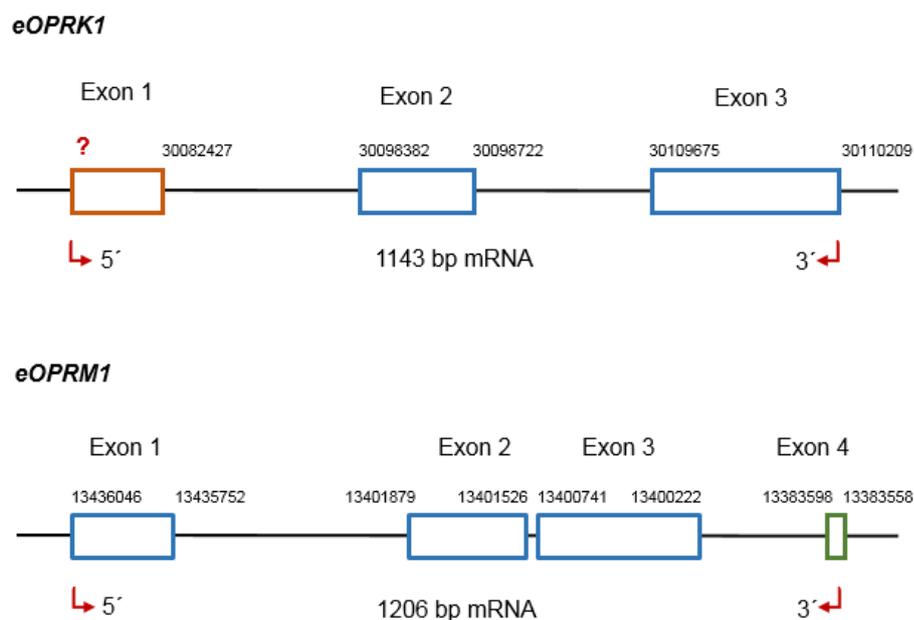


Abbildung 3: Klonierungsstrategie und genomische Organisation. Die Annotation des *OPRK1* markiert ein 350 bp langes Exon 2 und ein 534 bp langes Exon 3 (blaue Quadrate) auf der genomischen Sequenz des Pferdes (Sequenz ID: NC_009152.2). Die ersten 28 bp des Exon 1 (259 bp, oranges Quadrat) fehlen vollständig, die anschließende Sequenz ist unvollständig. Da die restliche Sequenz von Exon 1 mit dem von *Equus asinus* übereinstimmt (Sequenz-ID: NW_014637278.1), wurde der Vorwärtsprimer von diesem abgeleitet. Die Annotation des *OPRM1* markierte ein 294 bp langes Exon 1, ein 351 bp langes Exon 2 und ein 519 bp langes Exon 3 (blaue Quadrate). Das 40 bp lange Exon 4 (grünes Quadrat) konnte auf der genomischen Sequenz des Pferdes (Sequenz-ID: NC_009174.2) identifiziert werden, fehlt jedoch in der zuvor publizierten mRNA-Sequenz (Zugangsnummer XM_014738201.1).

Ergebnisse

Auffällig ist, dass sich die translatierten Proteine von *eOPRK1* und *eOPRM1* stark in ihren N- und C-terminalen Regionen sowie der extrazellulären Schleife 2 unterscheiden. Sie teilen 71% gleiche Aminosäuren im Bereich von TM 1 bis TM 7 (Abb. 4).

```
KOR1      1  MESPVQI--F RGEPTCAP  STCLLEPDSG WFPGWAEPDG NSSA----- ---GSEDAPL  49
MOR1      1  MDSSTVPANA SNCNDPPTHSSCSPPAPSPG SWVNFSHADG NLSDDPCGPNR TELGGSDS-L  59
          *:* . . . * *:* . . . * : . . . ** * * * . . . * *

                                TM I                                TM II
KOR1     50  EPAHISP--A IPVIITAVYS VVAVVGLVGN SLVMEVLIIRY TKMKTATNIY IFNLALADAL  107
MOR1     60  CPPTGSPSMI TAITIMAIYS IVCVVGLEGN FLVVMYVIVRY TKMKTATNIY IFNLALADAL  119
          * ** : * *:* * : * ** . ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                TM III
KOR1    108  VTIITMPFQST VYLMNSWPFQ DVLCKIVISI DYNNMFTSIF TLTMMSVDRY IAVCHPVKAL  167
MOR1    120  ATSTLFPQSV NYLMGTWPFQ TILCKIVISI DYNNMFTSIF TLCTMSVDRY IAVCHPVKAL  179
          . * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                TM IV
KOR1    168  DFRITPLKAKI INICIWLLSS SVGISAIVLG GTKVREDVDV IECSLQFPDD DYSWDDLEMK  227
MOR1    180  DFRITPRNAKI VNVCNWILSS AIGLPVMFMA TTKYRH--GS IDCITLFSHP TW-YWENLLK  236
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                TM V                                TM VI
KOR1    228  ICVFVFAFVI PVLIIIIICYT LMILRLKSVR LIFGSREKDR NLRRIITRLVL VVVAVFIIICW  287
MOR1    237  ICVFIFAFIM PVLIIITVCYG LMILRLKSVR MLSGSKEKDR NLRRIITRMVL VVVAVFIVCW  296
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

                                TM VII
KOR1    288  TPIHIFILVE ALGSTSHSTA ALSSYYFCIA LGYTNSSLNP ILYAFLDENF KRCFRDFCFP  347
MOR1    297  TPIHIYVLIK ALITIPETTF QTVSWHFCIA LGYTNSCLNP VLYAFLDENF KRCFRFCIP  356
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KOR1    348  IKMRMERQST SRVRNTLQDP -AYMKDVDGI NKPV----- -----  381
MOR1    357  TSSTIEQQNS TRVRQNTRDH PSTANTVDRT NHQLENLEAE TAPLP  401
          . * : * * : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
```

Abbildung 4: Gegenüberstellung der Primärsequenz des equinen KOR1 und MOR1: Die translatierten Proteinsequenzen wurden unter Verwendung des Programms Clustal Omega verglichen. Die in grau dargestellten transmembranen Domänen (TM I - VII) wurden unter Verwendung von TMPred (Hofmann und Stoffel, 1993) berechnet. Ein Stern (*) kennzeichnet Positionen, die einen einzelnen, vollständig konservierten Rest haben. Ein Doppelpunkt (:) zeigt unterschiedliche Aminosäuren mit stark ähnlichen Eigenschaften an. Ein Punkt (.) zeigt unterschiedliche Aminosäuren mit schwach ähnlichen Eigenschaften an.

3. Pharmakologische Charakterisierung

3.1 Rezeptoraffinität und -selektivität

Um speziesspezifische Unterschiede in der Affinität oder Selektivität der klinisch verwendeten Opioide aufzuzeigen, wurden die klonierten KOR1 und MOR1 des Pferdes stabil in HEK 293 Zellen exprimiert. Die Rezeptoraffinität und -selektivität wurde in heterologen Bindungsexperimenten mit [³H]Diprenorphin als

| Rezeptor | [³ H]Diprenorphin K _d (nM) | U50,488 | Morphin | Butorphanol pK _i | Buprenorphin | Levomethadon |
|----------|--|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------|--------------|
| eKOR1 | 4,8 ± 0,6 | 7,7 ± 0,1 | 6,3 ± 0,1 | 8,2 ± 0,1 | 11,6 ± 0,1 (hoch) | < 5 |
| hKOR1 | 1,3 ± 0,2 | 9,1 ± 0,1 | 6,2 ± 0,1 | 8,2 ± 0,1 | 12,6 ± 0,1 (hoch) | < 5 |

| Rezeptor | [³ H]Diprenorphin K _d (nM) | Fentanyl | Morphin | Butorphanol pK _i | Buprenorphin | Levomethadon |
|----------|--|-----------|-----------|--------------------------------|-------------------|--------------|
| eMOR1 | 7,3 ± 0,2 | 6,1 ± 0,1 | 7,1 ± 0,1 | 7,8 ± 0,1 | 11,4 ± 0,1 (hoch) | 9,3 ± 0,1 |
| rMOR1 | 1,7 ± 0,2 | 7,8 ± 0,1 | 7,4 ± 0,1 | 7,7 ± 0,1 | 12,2 ± 0,1 (hoch) | 9,9 ± 0,1 |

Tabelle 1. Vergleich der Dissoziationskonstanten von [³H]Diprenorphin und der pK_i der therapeutisch eingesetzten Opioide an den verschiedenen Rezeptoren. Die Daten stellen die Mittelwerte ± SD aus n = 3 unabhängigen Experimenten dar.

Ergebnisse

Radioligand und Verdrängung der Bindung mit steigenden Dosen der zu untersuchenden Opioidanalgetika bestimmt. Daraus berechneten wir die pK_i Werte jeder Substanz an den Rezeptoren unter Verwendung der individuellen K_d von Diprenorphin für jeden Rezeptor und verglichen die Ergebnisse mit denjenigen des Menschen (KOR1) und der Ratte (MOR1).

Fentanyl repräsentiert einen prototypischen μ -Rezeptor selektiven Liganden, der am equinen MOR1 eine ca. 50-fach niedrigere Affinität ($pK_i = 6,1$) im Vergleich zum Rezeptor der Ratte ($pK_i = 7,8$) besitzt (Abb. 5). Sowohl am κ -Rezeptor des Pferdes als auch dem des Menschen ist selbst in höchsten Konzentrationen keine Verdrängung von $[^3H]$ Diprenorphin messbar.

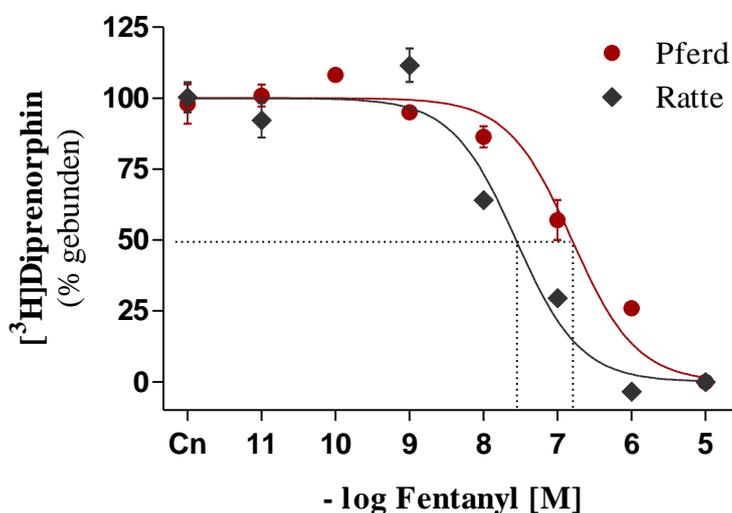


Abbildung 5: Heterologe Verdrängung von $[^3H]$ Diprenorphin mit steigenden Konzentration an Fentanyl an stabil den eMOR1 (Pferd) und rMOR1 (Ratte) exprimierenden HEK 293 Zellen. Die Daten wurden normalisiert und in Bezug auf die maximale Bindung von $[^3H]$ Diprenorphin (100 %) angegeben.

Morphin bindet an alle 3 Rezeptortypen, besitzt jedoch eine um den Faktor 10 höhere Selektivität zum μ -Rezeptor als zum κ -Rezeptor. Weder am MOR1 noch am KOR1 konnten Unterschiede in der Affinität zwischen den getesteten Spezies gefunden werden (Tabelle 1).

Levomethadon ist ein synthetisches μ -Opioid, das mit einer vergleichbar hohen Affinität zum MOR1 des Pferdes und der Ratte bindet. Levomethadon bindet nur schwach an den κ -Rezeptor des Pferdes und des Menschen (Tabelle 1).

Ergebnisse

Butorphanol ist ein Morphinan, das relativ selektiv zum κ -Rezeptor im Vergleich zum μ -Rezeptor (2,5-fach höhere Affinität) ist. Obwohl es beim Pferd eine besonders gute Wirkung beim viszeralem Schmerz zeigt, ist kein Unterschied in der Affinität zwischen KOR1 von Pferd und Mensch zu beobachten (Abb. 6):

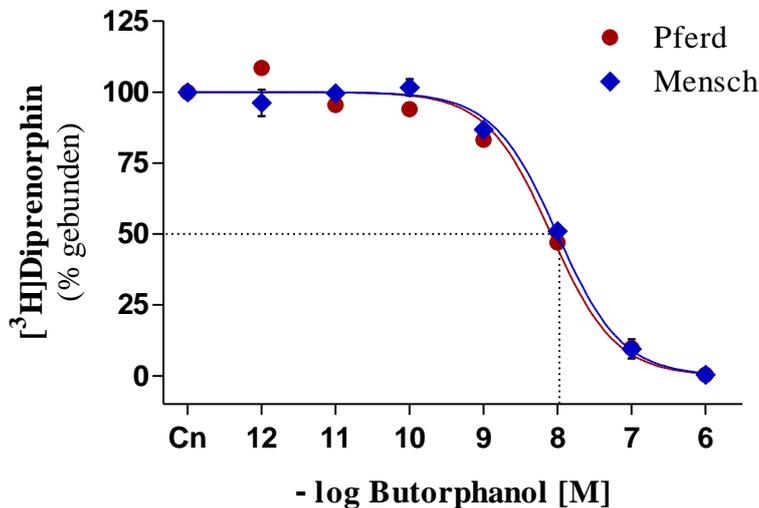


Abbildung 6: Heterologe Verdrängung von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin mit steigenden Konzentration an Butorphanol an stabil den eKOR1 (Pferd) und hKOR1 (Mensch) exprimierenden HEK 293 Zellen. Die Daten wurden normalisiert und in Bezug auf die maximale Bindung von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin (100 %) angegeben.

Buprenorphin ist ebenfalls ein Morphinan. Im Vergleich zu den bisher beschriebenen Opioiden besitzt Buprenorphin im gewählten experimentellen Ansatz zwei deutlich voneinander getrennte Bindungsstellen. Dabei ist kein Unterschied zwischen den untersuchten Rezeptoren (MOR1, KOR1) und Spezies (Pferd, Ratte, Mensch) zu beobachten. Der Anteil der hochaffinen Bindungsstelle beträgt etwa 30 % der Gesamtbindung. Die Affinität der hochaffinen Bindungsstelle liegt beim Pferd sowohl beim MOR1 und KOR1 um eine 10er Potenz niedriger als bei den Vergleichsspezies. Abb. 7 zeigt eine repräsentative Verdrängungskurve von Buprenorphin am equinen μ -Rezeptor.

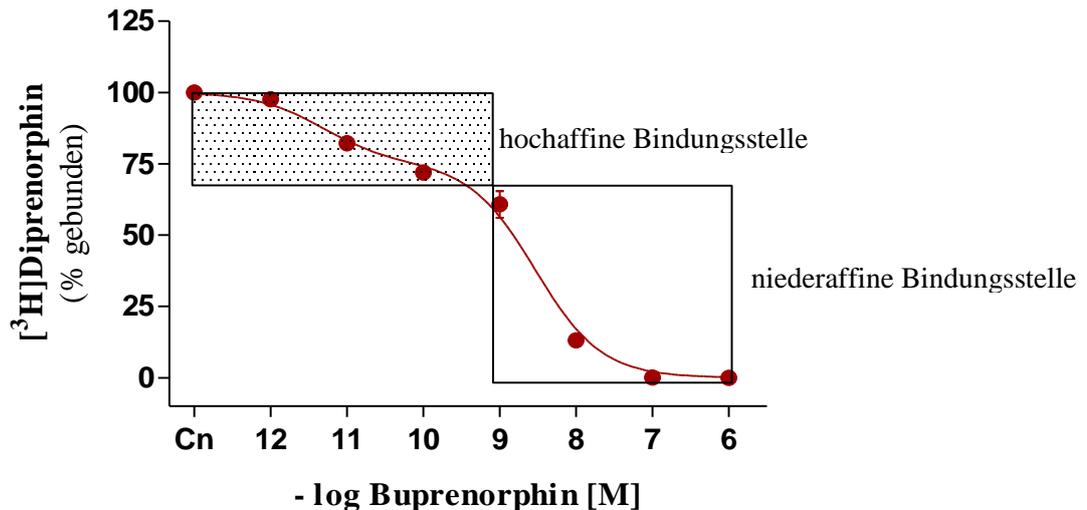


Abbildung 7: Exemparische Verdrängungskurve von Buprenorphin am equinen MOR1. Die beiden Bindungsstellen unterscheiden sich in ihrer Affinität um den Faktor 1000, wodurch sie in heterologen Verdrängungsexperimenten aufgelöst werden können.

Ein besonders deutlicher Unterschied in der Affinität von Opioiden am κ -Rezeptor wurde für die experimentelle Substanz U50,488 beobachtet, die einen vollen Agonisten an diesem Rezeptor darstellt. Sie besitzt eine ca. 25-fach niedrigere Affinität zum KOR1 des Pferdes als zum Menschen (Tabelle 1).

3.2 Intrinsische Aktivität

Die intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika wurde in zwei unterschiedlichen Messsystemen untersucht: 1) der Bestimmung der Rezeptor / G-Protein Kopplung mittels $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Bindung und 2) der Regulation nachgeschalteter Signalkaskaden (Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2). Beide Experimente wurden unter Verwendung von maximal wirksamen Konzentrationen der Opiode durchgeführt. Als Modellsubstanzen mit voller intrinsischer Aktivität (1) wurden U50,488 (KOR1) und Fentanyl (MOR1) verwendet.

Am KOR1 konnten wesentliche Unterschiede in der intrinsischen Aktivität der untersuchten Opiode im $\text{GTP}\gamma\text{S}$ -Assay aufgezeigt werden. Sowohl Morphin als auch Butorphanol stellen an equinen KOR1 im Vergleich zum humanen Rezeptor volle Agonisten dar. Buprenorphin dagegen besitzt am Rezeptor des Pferdes wie auch beim Menschen nur eine schwache partielle Aktivität (Abb. 8).

Ergebnisse

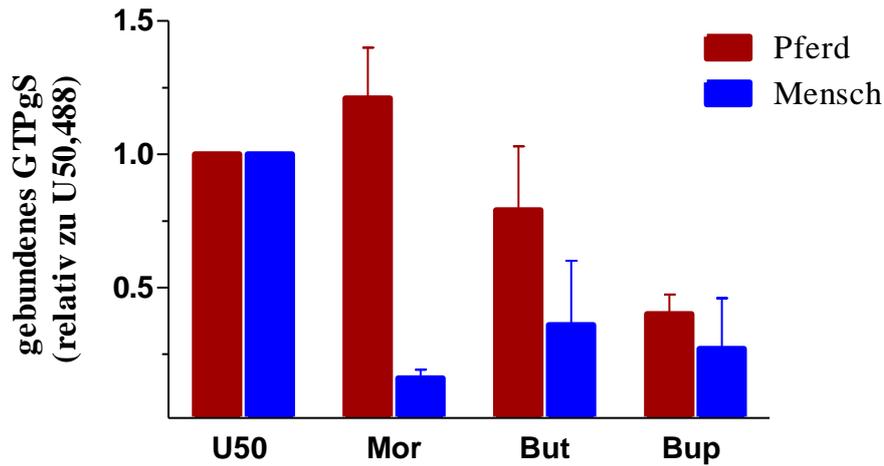


Abbildung 8: Rezeptor-vermittelte Aktivierung von G-Proteinen durch Opioidanalgetika, dargestellt als Einbau von radioaktiv markiertem GTP γ S. Die gewonnenen Ergebnisse wurden auf die intrinsische Aktivität von U50,488 normalisiert (1). eKOR1 (rot) und hKOR1 (blau). Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von $n > 3$ Experimenten dar.

Vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Bestimmung der ERK1/2 Aktivierung gewonnen. Wie in Abb. 9 dargestellt, führt die kurzzeitige Aktivierung des KOR1 durch den vollen Agonisten U50,488 zu einer starken Phosphorylierung der ERK1/2, sowohl beim Rezeptor des Pferdes als auch des Menschen. Während am hKOR1 Morphin, Butorphanol und Buprenorphin keine nennenswerte Phosphorylierung der ERK1/2 induzieren, führt die Aktivierung des equinen κ -Rezeptors durch Morphin und Butorphanol zu einer dem U50,488 vergleichbaren Phosphorylierung. Somit stellen auch in diesem Testsystem Morphin und Butorphanol volle Agonisten am eKOR1 dar.

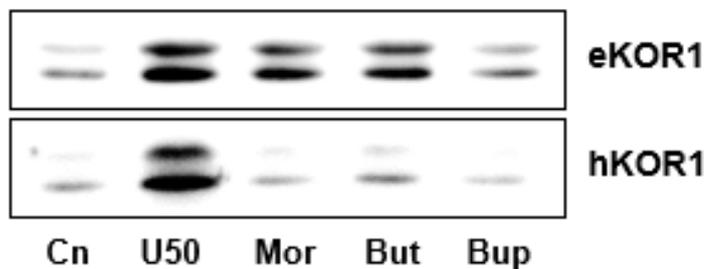


Abbildung 9: Bestimmung der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der ERK1/2 im Western Blot mithilfe phosphospezifischer Antikörper gegen pY 42 und pY 44. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Für den MOR1 des Pferdes wurde eine bedeutende tierartliche Besonderheit in der intrinsischen Aktivität von Morphin in der GTP γ S Bindung festgestellt. Im Vergleich zum μ -Rezeptor der Ratte, an dem Morphin lediglich einen partiellen Agonisten darstellt, besitzt es beim equinen MOR1 eine volle intrinsische Aktivität. Levomethadon ist am MOR1 beider Spezies ein voller Agonist, seine intrinsische Aktivität ist aber höher als die des Fentanyl. Bezogen auf die G-Protein Aktivierung stellt Levomethadon somit einen Superagonisten am MOR1 dar. Butorphanol und Buprenorphin dagegen weisen am μ -Rezeptor beider Spezies keine nennenswerte intrinsische Aktivität auf (Abb. 10).

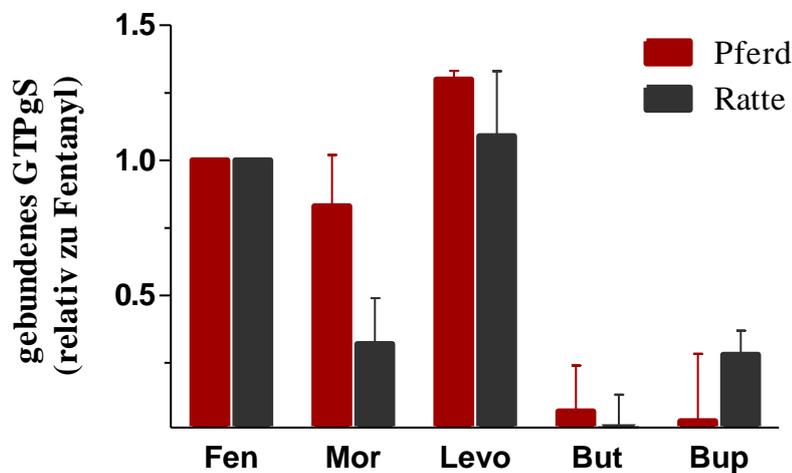


Abbildung 10: Rezeptor-vermittelte Aktivierung von G-Proteinen durch Opioidanalgetika, dargestellt als Einbau von radioaktiv markiertem GTP γ S. Die gewonnenen Ergebnisse wurden auf die intrinsische Aktivität von Fentanyl normalisiert (1). eMOR1(rot) und rMOR1 (schwarz). Die Daten stellen Mittelwerte \pm SEM von $n > 3$ Experimenten dar.

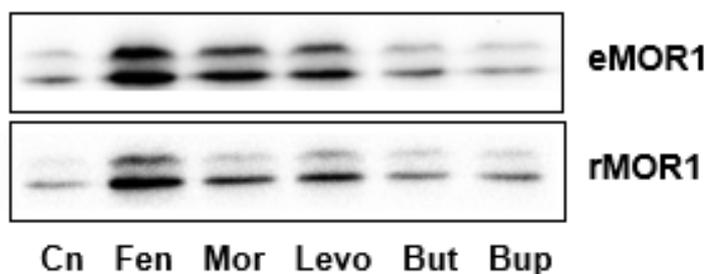


Abbildung 11: Bestimmung der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der ERK1/2 im Western Blot mithilfe phosphospezifischer Antikörper gegen pY 42 und pY 44. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von $n = 3$ unabhängigen Experimenten.

Ergebnisse

Qualitativ vergleichbare Ergebnisse wurden bei der Bestimmung der Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1/2 gewonnen. Auch hier stellt Morphin am MOR1 der Ratte im Vergleich zu Fentanyl nur einen partiellen Agonisten mit geringer intrinsischer Aktivität dar. Am μ -Rezeptor des Pferdes besitzt es eine deutlich höhere Fähigkeit, die ERK1/2 zu phosphorylieren. Die Phosphorylierung ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei Fentanyl. In diesem Messsystem stellt Levomethadon weder am eMOR1 noch am rMOR1 einen Superagonisten dar. Butorphanol und Buprenorphin sind nicht in der Lage, eine Phosphorylierung der ERK1/2 zu induzieren (Abb. 11).

4. Mutagenesestudien

Die molekularen Grundlagen der speziesspezifischen Unterschiede in der Pharmakologie von Opioidanalgetika wurden mittels Mutagenesestudien näher untersucht. Unser Ziel war es, mögliche Aminosäuresubstitutionen in der Primärstruktur der Opioidrezeptoren des Pferdes zu identifizieren, die für die beobachteten Unterschiede in der Affinität und intrinsischen Aktivität einzelner Liganden verantwortlich sind. Hierzu verglichen wir zunächst die an der Pharmakophore des KOR1 und MOR1 beteiligten Rezeptorstrukturen. Diese sind von den transmembranen Domänen für den κ - und μ -Rezeptor vor allem die TM 3, 6 und 7 (Wu et al., 2012; Manglik et al., 2012). Wie in Abb. 12 dargestellt, existieren in KOR1 insgesamt 4 Aminosäureunterschiede in TM 5 und 6 zwischen Pferd und Mensch. Von diesen verfolgten wir I 244 V (Mut K1), I 284 V (Mut K2.1) und I 285 V (Mut K2.2). Die Aminosäure V 231 I findet sich neben dem Pferd auch im KOR1 von Maus und Ratte und kann daher nicht für die beobachteten Änderungen in der intrinsischen Aktivität von Morphin und Butorphanol verantwortliche sein. Der Einfluss der 3. ICL sowie des N- und C-Terminus auf die Ligandenbindungsstelle gehen aus den derzeitigen Informationen zur Kristallstruktur des KOR1 nicht hervor. Sie wurden daher bei unseren Untersuchungen nicht berücksichtigt.

Ergebnisse

Die Bedeutung der zum menschlichen Rezeptor hin rückmutierten Aminosäuren (Mut K1, Mut K2.1, Mut K2.2) für die Zunahme der intrinsischen Aktivität von Butorphanol und Morphin wurden durch Bestimmung der ERK1/2 Aktivierung untersucht.

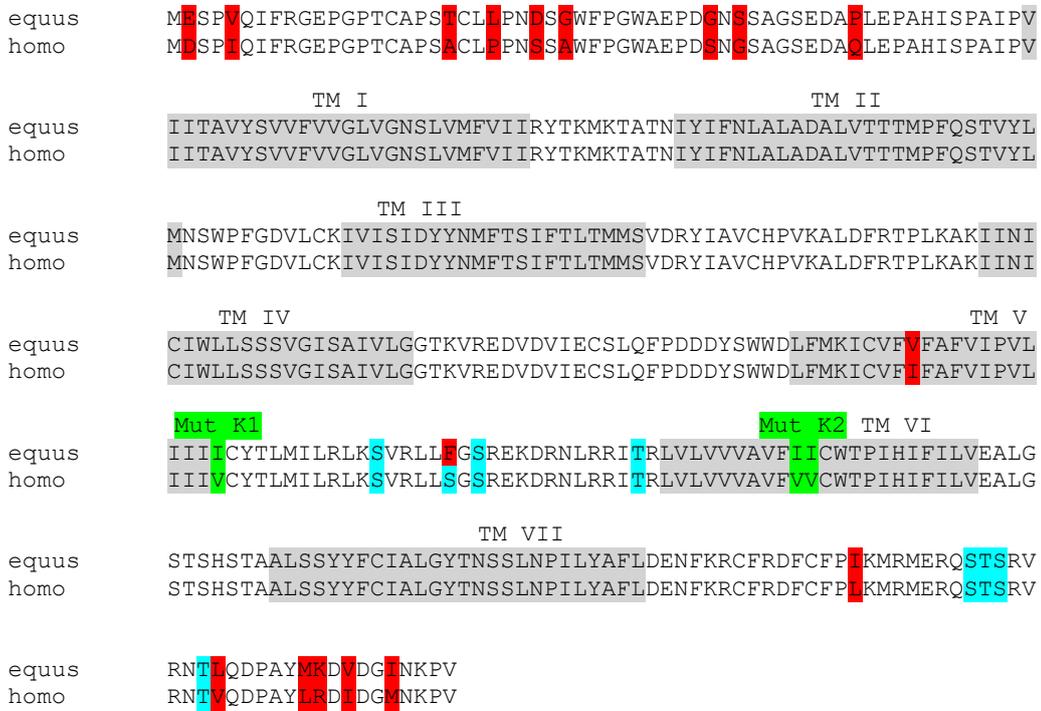


Abbildung 12: Sequenzvergleich des eKOR1 mit hKOR1. Die Aminosäureunterschiede zwischen den beiden Rezeptoren sind in Rot dargestellt. Die ausgewählten Ziele für die Mutagenesestudien sind grün hinterlegt. Die Phosphorylierungsstellen des Rezeptors, die eine Rolle in der Rezeptor Internalisierung und Regulation spielen, sind Blau markiert. TM = Transmembrane Domäne.

Mut K1 (I 244 V) hatte keinen Einfluss auf die Stärke der von sowohl Morphin als auch Butorphanol ausgelösten Phosphorylierung der ERK1/2. Die Mutation Mut K2.1 (I 284 V) in TM 6 führt zu einem Verlust der ERK1/2 Phosphorylierung nach Aktivierung des KOR1 mit Morphin, nicht aber mit Butorphanol. Die Mutation Mut K2.2 (I 285 V) alleine besitzt keinen Effekt auf die intrinsische Aktivität beider Opiode.

Ergebnisse

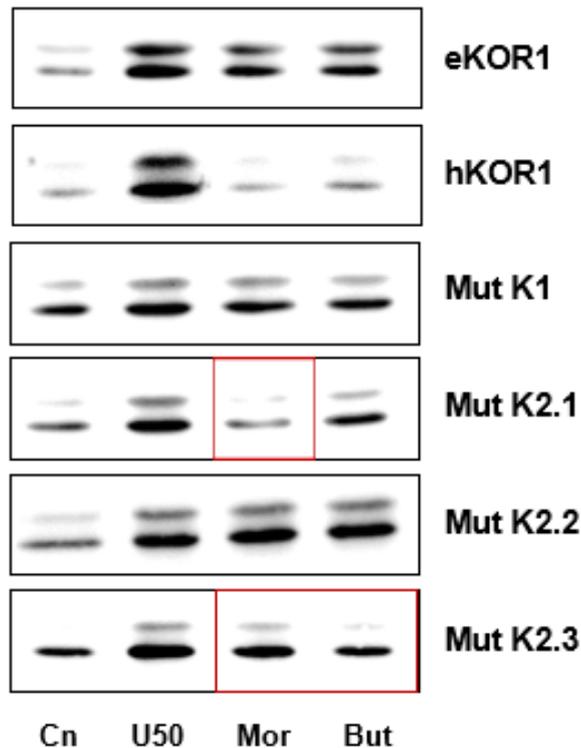


Abbildung 13: Bestimmung der Rezeptor-vermittelten Aktivierung der ERK1/2 im Western Blot mithilfe phosphospezifischer Antikörper gegen pY 42 und pY 44. Die ERK1/2 Phosphorylierung der verschiedenen Mutanten wird im Vergleich zum KOR1 des Pferdes und des Menschen dargestellt. Die Ergebnisse sind repräsentativ für n = 3 unabhängige Experimente. Die roten Umrandungen weisen auf die Abnahme der ERK1/2 Aktivierung in den Mutanten hin.

Die Rückmutation der beiden nebeneinanderliegenden Aminosäuren (Doppelmutante von Mut K2.1 und Mut K2.2 = Mut K2.3) führt zu einer Abnahme der Phosphorylierung von ERK1/2 sowohl nach Aktivierung des Rezeptors mit Morphin als auch mit Butorphanol. Die intrinsische Aktivität des beim KOR1 beider Spezies vollen Agonisten U50,488 wird durch die vorgenommenen Mutationen nicht beeinträchtigt. Somit besitzen die beim Pferd auftretenden Aminosäureunterschiede in der TM 6 einen Einfluss auf die Wirkstärke partieller Agonisten (Abb. 13).

Bei MOR1 sind keine Unterschiede in den TM zu beobachten, die an der Ausbildung der Ligandenbindungsstelle beteiligt sind. Es tritt lediglich eine einzige Substitution in TM 1 auf (I 77 L; Mut M1). Ein Abgleich der bisher bekannten Aminosäuresequenzen verschiedener Spezies ergab ein isoliertes Auftreten von I

Ergebnisse

77 des MOR1 bei Equiden, Goldhamster, Chinchilla und dem Kaninchen. Obwohl die TM 1 nicht direkt an der Ausbildung der Pharmakophore beteiligt ist, haben wir diese Aminosäuren im equinen Rezeptor zur entsprechenden Aminosäure der Ratte (L 77) zurückmutiert. Entsprechend des KOR1 besitzen die Sequenzunterschiede im N- und C-Terminus keinen Einfluss auf die Ligandenbindung. Der Aminosäureunterschied in der 3. ECL (H 215 Q) könnte theoretisch den Zugang der Opioide zur Pharmakophore beeinflussen und somit zum Abfall der Affinität von Fentanyl beitragen. Histidin an Stelle 215 tritt jedoch auch beim Hund auf und besitzt bei dieser Spezies keinen Einfluss auf die Affinität von Fentanyl (Ammer et al., 2018). Aus diesem Grund wurde dieser Aminosäureaustausch nicht weiterverfolgt (Abb. 14).

| | |
|--------|--|
| equus | MDSSTV P A N A S N C N D P F T H S S S C S P A P S P G S W N E S H A D G N L S D P C G E N R T E L G G S D S L C |
| rattus | MDSST P G N T S D C S D P L A Q A S C S P A P S P G S W N E S H A D G N L S D P C G E N R T E L G G S D S L C |
| equus | Mut M1 TM I TM II |
| equus | PETGSPSMITAITIMAIYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALA |
| rattus | POTGSPSMVITAITIMAIYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKMKTATNIYIFNLALADALA |
| equus | TM III |
| rattus | TSTLPPQSVNYLMGTWPFGLTILCKIVISIDYINMFTSIFTLCTMSVDRIYAVCHPVKALD |
| equus | TM IV |
| rattus | FRTPRNAKIVNVCNWILSSAIGLPVFMATTKYRSGSIDCTLTFSHPTWYWENLLKICVE |
| equus | TM V TM VI |
| rattus | IFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSSGSGKEKDRNLRRITRMVLVVAVFIVCWTPIH |
| equus | TM VII |
| rattus | IYVIKALITIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCLNPVLYAFLDENFKRCRFREFCIP TSST |
| equus | IEQQNSTRVQRNTRHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP |
| rattus | IEQQNSTRVQRNTRHPSTANTVDRTNHQLENLEAETAPLP |

Abbildung 14: Sequenzvergleich von MOR1 des Pferdes und der Ratte. Die zwischen den beiden Spezies unterschiedlichen Aminosäuren sind in Rot dargestellt. Die ausgewählte Aminosäure für die Mutagenesestudie ist grün hinterlegt. Die Phosphorylierungsstellen des Rezeptors in der 3. ICL und im C-Terminus sind blau markiert. Diese besitzen eine Rolle in der Regulation des Rezeptors, nicht aber für die Ligandenbindung. TM = Transmembrane Domäne.

Die Bedeutung von I 77 für die geringe Affinität von Fentanyl am equinen MOR1 wurde in Mut M1 mittels Radioligandenbindung untersucht. Dabei konnten wir eine Zunahme der Affinität von Fentanyl nach Rückmutation von I 77 L beobachten.

Ergebnisse

Wie in Abb. 15 dargestellt, sind die Verdrängungskurven von Fentanyl am rMOR1 und Mut M1 nahezu deckungsgleich. Sie sind im Vergleich zum equinen MOR1 um den Faktor 50 nach links verschoben. Die daraus berechnete pK_i für Fentanyl am Mut M1 entspricht mit 7,8 derjenigen Ratte (Tabelle 1).

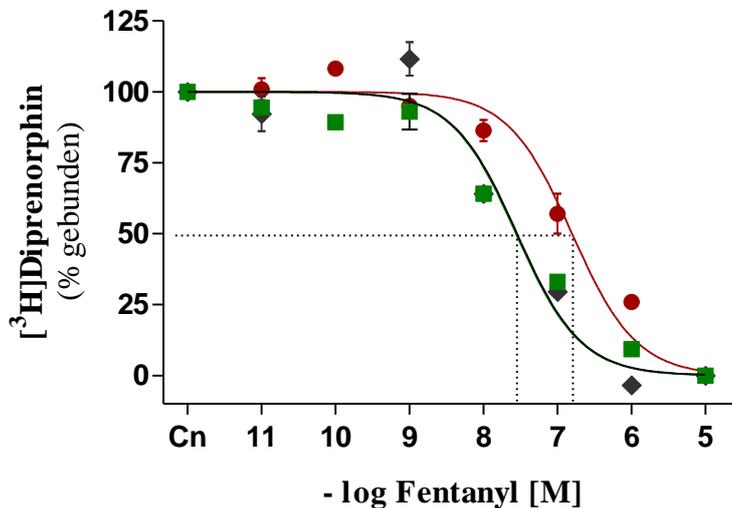
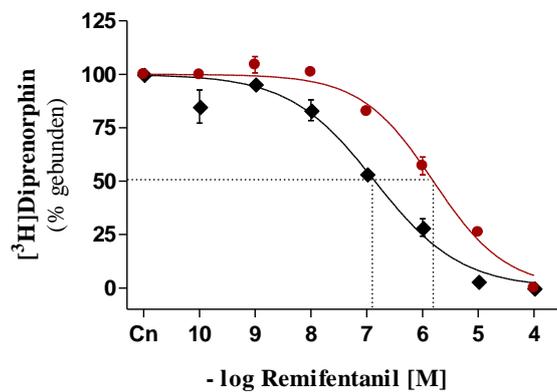
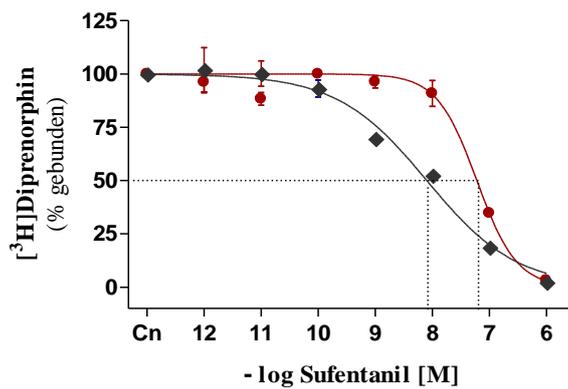
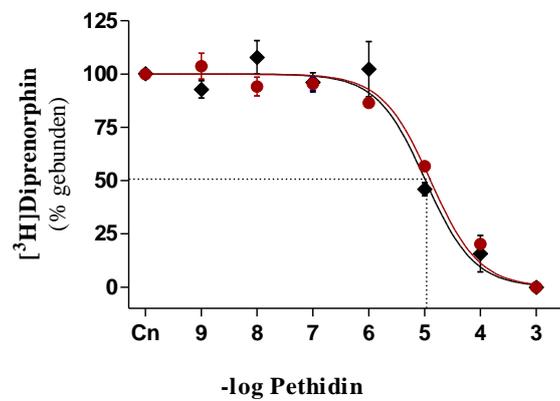


Abbildung 15: Heterologe Verdrängung von [3 H]Diprenorphin mit Fentanyl am MOR1 des Pferdes (rot), der Ratte (schwarz) und der equinen Mut M1 (grün). Die Verdrängungskurven bei rMOR1 und Mut M1 verlaufen deckungsgleich.

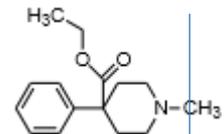
Die Frage, ob die isolierte Abnahme der Affinität von Fentanyl am equinen MOR1 mit seiner Struktur zusammenhängt, wurde durch Untersuchung weiterer Piperidinderivate wie Pethidin, Sufentanil und Remifentanyl beantwortet.

Pethidin stellt das einfachste Piperidinderivat dar und ist am N des Piperidinrings lediglich methyliert. Fentanyl, Sufentanil und Remifentanyl dagegen besitzen am N des Piperidinrings umfassendere Seitenketten. Wie in Abb. 16 dargestellt, sind die Verdrängungskurven für Pethidin am MOR1 des Pferdes und der Ratte identisch (pK_i 5,0 vs. 5,2). Sufentanil dagegen besitzt am equinen MOR1 nur eine niederaffine Bindungsstelle mit einem pK_i von 7,3. Am MOR1 der Ratte verläuft die Verdrängungskurve von [3 H]Diprenorphin mit einem Hill Koeffizienten von -0,55 flacher, was auf das Vorhandensein einer zusätzlichen hochaffinen Bindungsstelle hinweist. Diese besitzt eine pK_i von 9,6 und umfasst etwa 38,8% der gesamten Bindungskapazität.

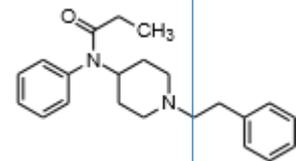
A



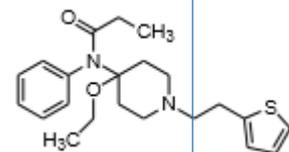
B



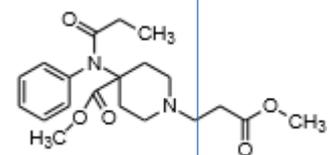
Pethidin



Fentanyl



Sufentanil



Remifentanil

Abbildung 16: Bestimmung der Affinität von Piperidinderivaten. A) Heterologe Verdrängung von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin mit verschiedenen Piperidinderivaten am MOR1 des Pferdes (rot) im Vergleich zur Ratte (schwarz). b) Strukturformeln der Piperidinderivate.

Ergebnisse

Die niederaffine Bindungsstelle bleibt mit einem pK_i von 7,5 unverändert. Remifentanyl wiederum besitzt am MOR1 beider Spezies eine hoch- und niederaffine Bindungsstelle. Diese nimmt beim Pferd etwa 41,5 % und bei der Ratte 49,5 % der Gesamt Rezeptoren ein. Sowohl die pK_i Werte der hoch- als auch niederaffinen Bindungsstellen für Remifentanyl sind am MOR1 des Pferdes um den Faktor 10 kleiner als bei der Ratte (pK_i hochaffin = 6,8 vs. 8,0; pK_i niederaffin = 5,2 vs. 6,2). Die Rückmutation von I 77 zu L 77 in Mut M1 führt dazu, dass sowohl Sufentanyl (pK_i der hochaffinen Bindungsstelle: 9,3 vs. 9,6; niederaffine Bindungsstelle: 7,6 vs. 7,5) als auch Remifentanyl (pK_i der hochaffinen Bindungsstelle: 7,8 vs. 8,0; niederaffine Bindungsstelle: 6,2 vs. 6,2) die pharmakologischen Profile des MOR1 der Ratte annehmen. Diese Daten weisen auf einen indirekten Einfluss von I 77 der TM 1 auf die Bindung der verschiedenen Pethidinderivate mit einer Seitenkette am equinen MOR1 hin.

5. Rezeptordimerisierung

Die Abnahme der Affinität von Fentanyl am equinen MOR1 könnte an einem Einfluss von I 77 auf die Rezeptordimerisierung liegen. Nach transients Expression der Rezeptoren in HEK 293 Zellen und anschließender Immun-

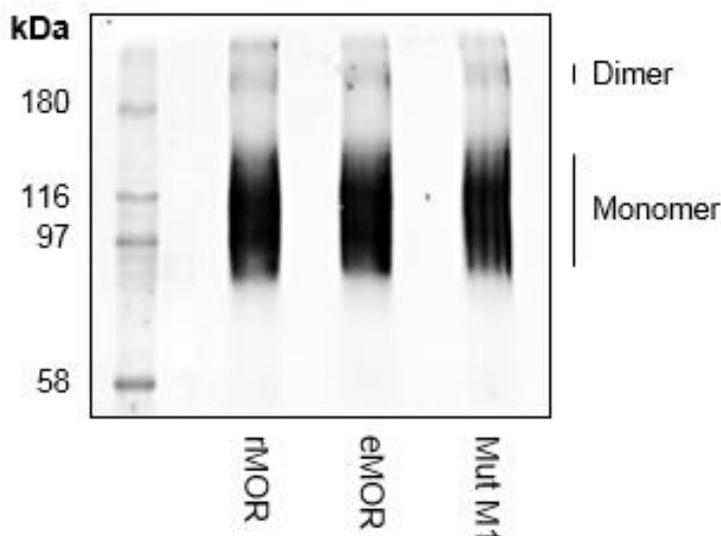


Abbildung 17: Darstellung der Rezeptordimerisierung im Western Blot. Die Rezeptoren rMOR, eMOR und eMOR Mut M1 wurden mit DSS quervernetzt, solubilisiert und nach Immunpräzipitation unter denaturierenden Bedingungen mit einem Antikörper gegen eine identische C-terminale Region des MOR1 angefärbt. kDa, Molekulargewichtsmarker.

Ergebnisse

präzipitation konnte nur ein geringer Anteil an Rezeptoren als Dimere identifiziert werden. Der Großteil der Rezeptoren liegt als Monomer vor, die sich aufgrund ihrer Glykosylierung im Western Blot als breite Bande mit einem relativen Molekulargewicht von 80 - 120 kDa darstellt. Zwischen dem MOR1 der Ratte und des Pferdes sowie des mutierten MOR1 des Pferdes (Mut M1) ist kein Unterschied in der Menge an Dimeren zu beobachten (Abb. 17).

VI Diskussion

Die therapeutische Anwendung von Opioidanalgetika beim Pferd weist einige klinisch relevante tierartliche Besonderheiten auf. Anhand der klonierten Opioidrezeptoren konnten wir erstmals speziesspezifische Besonderheiten im pharmakologischen Profil von Morphin, Fentanyl und Butorphanol aufzeigen, die auf molekularer Ebene mit bestimmten Aminosäuren in der Primärstruktur des μ - und κ -Opioidrezeptors in Verbindung gebracht werden können. Neben den Antihistaminika (Lim et al., 2008) stellen Opioidanalgetika somit eine der wenigen Stoffgruppen dar, bei denen umfangreiche speziesspezifische Wirkunterschiede auf pharmakodynamische Besonderheiten zurückgeführt werden können. Weitaus häufiger werden pharmakokinetische Besonderheiten beobachtet. Als bekanntestes Beispiel hierfür ist der *MDR1* Gendefekt der Collies mit seinen Auswirkungen auf die Umverteilung von z.B. Ivermectin in das Gehirn zu nennen (Neff et al., 2004).

Klonierung der Rezeptoren und molekulare Charakterisierung

Obwohl es in den letzten Jahren umfangreiche Bestrebungen zur Aufklärung des Genoms unserer Haustiere gab (z.B. Bovine Genome Project [Tellam et al., 2009]; The NHGRI Dog Genome Project [Ostrander und Kruglyak, 2000]), sind die molekularen Angriffspunkte für die meisten Tierarzneimittel nach wie vor unbekannt. Auch das mitochondriale Genom des Pferdes wurde im Jahr 1994, das Gesamtgenom von der Stute „Twilight“ 2006 kloniert und im Jahr 2015 annotiert (Xu und Arnason, 1994; Wade et al., 2009; Hestand et al. 2015). Beim Versuch die Opioidrezeptoren zu klonieren mussten wir jedoch feststellen, dass das in GenBank hinterlegte Genom des Pferdes (NCBI Reference Sequence: NC_001640.1) und die 2016 verfügbaren, davon abgeleiteten mRNA Sequenzen für *eOPRK1* (XM_014728019.1) und *eOPRM1* (XM_014738201.2) unvollständig und lückenhaft waren. So fehlte beim *eOPRK1* das komplette Exon 1 in der abgeleiteten mRNA, das auch durch Sequenzabgleich mit dem Genom nur bruchstückhaft vorhanden war. Wir umgingen diesen Nachteil, indem wir das Exon 1 auf der publizierten mRNA Sequenz des Esels (XM_014838770.1) identifizierten und davon Vorwärtsprimer ableiteten. Beim *eOPRM1* fehlte in der predicted mRNA Sequenz das komplette Exon 4, das wir durch Sequenzabgleich von Exon 4 der Maus mit der DNA Sequenz von Chromosom 31 des Pferdegenoms identifizieren

Diskussion

konnten. Mit davon abgeleiteten Rückwärtsprimern konnten wir schließlich die vollständige cDNA des *eOPRM1* klonieren. Vergleichbare Schwierigkeiten mussten unter anderem bei der Klonierung des eLH/eCG und Adenosin A2A Rezeptors mit unterschiedlichen Strategien gelöst werden (Saint-Dizier et al., 2004; Brandon et al., 2006).

Die mRNA des *eOPRK1* besteht aus 3 Exons, die auf Chromosom 9 lokalisiert sind. Die des *eOPRM1* aus 4 Exons auf Chromosom 31. Beide mRNAs kodieren für Proteine aus der Klasse der Rezeptoren mit 7 transmembranen Domänen und entsprechen der Rezeptorisoform 1 des humanen κ - (*OPRK1*) und μ -Rezeptors der Ratte (*OPRM1*). Diese stellen die bei diesen Spezies dominierenden Rezeptorformen dar (Simonin et al., 1995; Zastawny et al., 1994). Aufgrund der gewählten Klonierungsstrategie kann derzeit keine Aussage über die Existenz weiterer Transkriptvarianten gemacht werden, wie sie vor allem für den μ -Rezeptor von Mensch (Kasai und Ikeda, 2011), Maus (Doyle et al., 2007) und Ratte (Xu et al., 2011) beschrieben sind.

Die translatierten Proteine des equinen KOR1 und MOR1 weisen mit 63 % eine hohe Homologie untereinander auf und werden den G-Protein gekoppelten Rezeptoren der Klasse A (Rhodopsin), Subfamilie 4, zugeordnet (Joost und Methner, 2002). Während die 7 transmembranen Domänen sowie die 2. und 3. ICL kaum Sequenzunterschiede aufweisen, sind der N- und C-Terminus sowie die 3. ECL sehr variabel. Vor allem der konservierte Bereich der transmembranen Domänen ist an der Ausbildung der Pharmakophore beteiligt. Diese wird beim κ -Rezeptor unter anderem durch die Aminosäurereste von D 138, Y 139, E 297, Y 312, W 287, H 291 und I 294 gebildet (Wu et al., 2012). An der Ausbildung der Ligandenbindungsstelle des μ -Rezeptors sind ebenfalls diese konservierten Aminosäuren (D 147, Y 148, Y 326, W 293, H 297 und I 296; Nummerierung bezogen auf die Anordnung im μ -Rezeptor) beteiligt (Manglik et al., 2012). Der variable N-Terminus und 3. ECL sind nicht direkt an der Ausbildung der Pharmakophore beteiligt, können aber indirekt deren Konformation und den Zugang von extrazellulär für einige Liganden beeinflussen (Manglik et al., 2012). Die 3. ICL der Rezeptoren ist ebenfalls hoch konserviert und für die Kopplung an G-Proteine verantwortlich. Aufgrund der Sequenzübereinstimmung kann eine Signalübertragung hauptsächlich durch G_i - und G_o -Proteine und Regulation der

klassischen Effektorsysteme wie Adenylylzyklasen, Ca²⁺- und K⁺-Kanäle erwartet werden (Minami und Satoh, 1995). Der C-Terminus schließlich ist für die Regulation der Rezeptoren durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen verantwortlich (Law et al., 2000). Die Übereinstimmung der C-Termini der equinen Rezeptoren mit denjenigen des Menschen (KOR1) und der Ratte (MOR1) lassen auch beim Pferd die Entwicklung einer schnellen Toleranz nach wiederholter Verabreichung von Opioidanalgetika mit hoher intrinsischer Aktivität erwarten (Dang und Christie, 2012). Die klonierten Opioidrezeptoren des Pferdes stimmen daher grundsätzlich im Aufbau mit denjenigen anderer Spezies überein.

Pharmakologisches Profil der Opioide beim Pferd

Im Vergleich zu anderen Spezies weisen Opioidanalgetika beim Pferd einige Besonderheiten in der Anwendung auf. Insbesondere sind hier die gute Wirksamkeit von Butorphanol und Morphin beim viszeralem Schmerz sowie die schwache analgetische Wirksamkeit von Fentanyl zu nennen. Durch die pharmakologische Charakterisierung der beim Pferd therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika anhand der klonierten und stabil in HEK 293 Zellen exprimierten κ - und μ -Rezeptoren konnten wir die molekularen Hintergründe dieser tierartigen Besonderheiten auf pharmakodynamischer Ebene beleuchten. Pharmakokinetische Einflussfaktoren, wie z.B. eine verlängerte Wirkdauer von Alkaloiden beim Pflanzenfresser werden hierbei nicht berücksichtigt.

Butorphanol nimmt unter den Opioidanalgetika eine Sonderstellung ein, da es nur in der Tiermedizin umfangreich eingesetzt wird (Kalpravidh et al., 1984). Beim Menschen ist es in den USA als Stadol[®] für die Behandlung von Wehenschmerzen, als Zusatz für die balancierte Anästhesie und als präoperatives Analgetikum, zum Teil auch als Nasenspray, zugelassen (Anonymus, 2018). Eine breite Anwendung beim Menschen wird durch die geringe analgetische Wirkung beim traumatischen Schmerz und der bereits in geringen Dosierungen auftretenden, durch κ -Rezeptoren vermittelten, dysphorischen Wirkungen verhindert (Pfeiffer et al., 1986). Beim Pferd besitzt es eine ausgeprägte analgetische und motilitätshemmende Wirkung beim viszeralem Schmerz, die durch Aktivierung von κ -Rezeptoren vermittelt wird (Menozzi et al., 2012). Über μ -Rezeptoren wird nur eine schwach analgetische Wirkung vermittelt (Ide et al., 2008). Die geringe sedative Wirkung wird mit einem

Diskussion

α_2 -Agonisten verstärkt und zur Sedation beim Pferd ausgenutzt (Schatzman et al., 2001). Es stellt sich daher die Frage, wie das günstige pharmakologische Profil beim Pferd erklärt werden kann? Butorphanol ist ein gemischter κ/μ -Agonist mit einer relativen κ -Selektivität von 2,5. Bei therapeutischen Dosierungen werden daher vornehmlich κ -Rezeptoren aktiviert. Unsere Untersuchungen zeigten keine Unterschiede in der Affinität zu den equinen Rezeptoren gegenüber KOR1 des Menschen und MOR1 der Ratte auf (Tabelle 1). Im Gegensatz dazu stellt Butorphanol am KOR1 des Pferdes im Vergleich zum Menschen einen vollen Agonisten dar (Abb. 8, 9). Die geringe intrinsische Aktivität am klonierten KOR1 des Menschen wurde auch nach Expression in Neuro2A Zellen bestätigt (DiMattio et al., 2015). Somit kann aus pharmakodynamischer Sicht die gute klinische Wirksamkeit von Butorphanol beim viszeralem Schmerz mit seiner hohen intrinsischen Aktivität am κ -Rezeptor dieser Spezies erklärt werden. Die gute Verträglichkeit ergibt sich dabei aus der Tatsache, dass bei therapeutischen Dosierungen die über den μ -Rezeptor vermittelten Nebenwirkungen aufgrund seiner partiellen Aktivität und relativen κ -Selektivität nur schwach ausgeprägt sind. Der schwache partielle Agonismus am MOR1 kann jedoch in stark schmerzhaften Situationen von Nachteil sein, da Butorphanol in diesen Fällen die Wirkung von β -Endorphin, Enkephalinen und Endomorphinen am μ -Rezeptor antagonisieren und somit endogene Schmerzmechanismen blockieren kann (Commiskey et al., 2005).

Morphin besitzt eine gute Wirksamkeit beim traumatischen und viszeralem Schmerz des Pferdes, wird aber aufgrund seiner exzitatorischen ZNS Wirkung, Steigerung der kardiopulmonalen Aktivität, langanhaltenden Lokomotionssteigerung und konstipatorischen Wirkung selten klinisch eingesetzt (Kalpravidh et al., 1984; Gozalo-Marcilla et al., 2015). Um die unerwünschten Wirkungen zu umgehen, kann es epidural und/oder zusammen mit α_2 -Agonisten angewendet werden (Muir et al., 1979; Doherty et al., 1997). Die bereits in geringer therapeutischer Dosierung auftretenden Nebenwirkungen werden durch μ -Rezeptoren vermittelt. Dies kann durch seine volle agonistische Aktivität am MOR1 des Pferdes erklärt werden, die sich von der partiellen Aktivität der Ratte unterscheidet (Abb. 10, 11). Eine vergleichbar starke Ausprägung unerwünschter Wirkungen von Morphin wird beim Menschen beobachtet, bei dem es wie beim Pferd ebenfalls einen vollen Agonisten am μ -Rezeptor darstellt (Toll et al., 1998). Am klonierten KOR1 des Pferdes nimmt

Diskussion

Morphin eine Ausnahmestellung ein. Hier wirkt es im Vergleich zu anderen Spezies ebenfalls als voller Agonist (Abb. 8,9), wodurch seine gute Wirksamkeit beim viszeralem Schmerz erklärt werden kann (Chen et al., 1993; Meng et al., 1993; Toll et al., 1998; Gharagozlou et al., 2006; Menozzi et al., 2012). Aufgrund seiner um den Faktor 7 höheren Affinität zum MOR1 wird sein Einsatz bei der Behandlung des Kolikschmerzes durch die unerwünschten Wirkungen seitens des μ -Rezeptors eingeschränkt.

Für Fentanyl konnte ebenfalls ein klinisch bedeutender Unterschied in seiner Wirkung am μ -Rezeptor des Pferdes aufgedeckt werden. Fentanyl ist ein selektiver μ -Rezeptor Agonist, der beim Pferd wie bei allen anderen Spezies einen vollen Agonisten darstellt (Raynor et al., 1994; Toll et al., 1998; Gharagozlou et al., 2006). Beim Pferd jedoch besitzt Fentanyl am MOR1 eine etwa 50-fach niedrigere Affinität im Vergleich zum Rezeptor der Ratte (Tabelle 1). Dies resultiert in einer nur geringen Wirksamkeit beim somatischen Schmerz in therapeutisch verträglichen Dosierungen, bei denen noch keine Stimulation der Lokomotion beobachtet werden kann (Nugent et al., 1982; Sanchez et al., 2007; Wetmore et al., 2016). Bei transdermaler Applikation von Fentanyl konnte bisher ebenfalls kein analgetischer Effekt bestätigt werden (Sanchez und Robertson, 2014). Die geringe analgetische Wirksamkeit wird somit nicht durch die kurze terminale Eliminationshalbwertszeit vermittelt (Thomasy et al., 2007), sondern resultiert aus seiner niedrigen Affinität zum Rezeptor. Diese würde im Vergleich zu anderen Spezies höhere Dosierungen erfordern, um eine vergleichbare Wirksamkeit zu erhalten. Dem stehen jedoch in der Praxis die ausgeprägten Verhaltensänderungen entgegen.

Remifentanil und Sufentanil stellen ebenfalls selektive Agonisten am μ -Rezeptor dar. Beim Pferd besitzen beide Piperidinderivate keine therapeutische Bedeutung. Obwohl auch sie am klonierten MOR1 des Pferdes eine um den Faktor 15 (Remifentanil) bzw. 10 (Sufentanil) niedrigere Affinität besitzen, werden sie aufgrund ihrer stark exzitatorischen Wirkung auf das motorische System häufig missbräuchlich zu Dopingzwecken eingesetzt (Tobin et al., 1988).

Pethidin besitzt nur eine geringe analgetische Aktivität (0,1 im Vergleich zu Morphin) und wird beim Pferd aufgrund seiner kurzen Wirkdauer nur selten therapeutisch eingesetzt (Foreman und Rümmler, 2013).

Diskussion

Eine Alternative zur Therapie traumatischer Schmerzen beim Pferd könnte Levomethadon sein. Aktuell ist Levomethadon lediglich zur Neuroleptanalgesie beim Pferd zugelassen. Es ist ebenfalls ein selektiver MOR1 Agonist, der mit sehr hoher Affinität an den Rezeptor bindet. Im GTP γ S Assay stellt es sowohl am μ -Rezeptor der Ratte als auch beim Pferd einen vollen Agonisten dar (Abb. 10). Die im Vergleich zu Fentanyl nur partielle Aktivierung der ERK1/2 (Abb. 11) kann durch eine schnelle Desensibilisierung der Rezeptoren in intakten Zellen erklärt werden. Die schnelle Desensibilisierung der Rezeptoren wird durch Phosphorylierung vermittelt, die zur Abkopplung und Internalisierung des Rezeptors führt (Koch et al., 2005). Aus pharmakodynamischer Sicht wäre Levomethadon zur Behandlung traumatischer Schmerzen geeignet. Warum es nicht zur Schmerztherapie zugelassen ist, liegt einerseits an der im Vergleich zu anderen Spezies nur kurzen Wirkdauer, andererseits am Auftreten unerwünschter Wirkungen seitens des Herzens, des motorischen und gastrointestinalen Systems.

Buprenorphin wird als gemischter partieller Agonist an μ - und Antagonist an κ -Rezeptoren des Menschen (Zhu et al., 1997; Toll et al., 1998) beschrieben und ist derzeit für die postoperative Analgesie in Kombination mit einer Sedierung beim Pferd zugelassen. Dieses Opioidanalgetikum besitzt an beiden Rezeptoren eine hohe Affinität, die beim Pferd im Vergleich zu Mensch und Ratte um den Faktor 10 niedriger ist. Unsere Ergebnisse zeigen, dass Buprenorphin am klonierten MOR1 des Pferdes sowohl im GTP γ S-Assay als auch in der ERK1/2 Regulation keine deutlich messbare intrinsische Aktivität aufweist. Am KOR1 konnten wir nur im GTP γ S-Assay eine geringe partielle Aktivität nachweisen. Trotz der geringen Aktivität am MOR1 werden in therapeutischen Dosierungen die für μ -Opioide bekannten Nebenwirkungen beobachtet (Carregaro et al., 2006). Die analgetische Wirksamkeit ist dabei sowohl beim Fohlen als auch erwachsenen Pferd verschwindend gering (Carregaro et al., 2007; Love et al. 2013; Risberg et al., 2015). Buprenorphin wird in der Pferdepraxis daher hauptsächlich zur Narkoseprämedikation (Taylor et al. 2016) und Sedation zusammen mit einem α_2 -Agonisten eingesetzt (Love et al., 2011; Cruz et al., 2011; Taylor et al., 2014).

Strukturelle Grundlagen

Die Aufklärung der Kristallstrukturen des κ -Rezeptors (Wu et al., 2012) und μ -Rezeptors (Manglik et al., 2012) lieferte neue Einsichten in die Struktur/Funktionsbeziehung von Opioidrezeptoren. Dieser Meilenstein in der Strukturbiologie gelang nur aufgrund der langwierigen und intensiven Vorarbeiten von Brian Kobilka, für die er im Jahr 2012 zusammen mit Robert Lefkowitz den Nobelpreis bekam. Die Schwierigkeit in der Darstellung der Kristallstruktur von G-Protein gekoppelten Rezeptoren liegt in der hohen Flexibilität der Rezeptoren und den geringen energetischen Unterschieden zwischen dem aktiven und inaktiven Rezeptorzustand. Nur in Gegenwart eines Antagonisten oder Agonisten, Abtrennung der N- und C-termini sowie der 3. ICL und Bindung von Cholesterin konnten die Rezeptoren für die Kristallisation stabilisiert werden. Einen weiteren Fortschritt erbrachte die Stabilisation des hochaffinen Rezeptorzustandes durch Bindung eines Nanobodies gegen die intakte 3. ICL, durch die der G-Protein gekoppelte Zustand des Rezeptors imitiert wird (Rasmussen et al., 2011). Damit konnten der aktive Zustand des μ -Rezeptors der Maus (Huang et al., 2015) und des κ -Rezeptors des Menschen (Che et al., 2018) dargestellt werden. Anhand der nun verfügbaren Kristallstrukturen konnten Homologie-Modelle der hier klonierten equinen Opioidrezeptoren erstellt werden.

Opioidrezeptoren sind aufgrund der Vielzahl an verfügbaren Liganden mit unterschiedlicher chemischer Struktur (Peptide, Morphinane, Piperidine, Diphenylverbindungen etc.), Affinität, Selektivität und intrinsischer Aktivität (Agonisten, partielle Agonisten, kompetitive Antagonisten, inverse Agonisten) von besonderem Interesse für die Aufklärung der Interaktion von Liganden mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren (Filizola und Devi, 2013). Diese Studien sind von enormen Interesse für die Entwicklung von Opioidanalgetika ohne Abhängigkeitspotenzial für die Humanmedizin (Manglik et al., 2016; Spahn et al., 2017). Das Besondere an Opioidrezeptoren ist, dass nur wenige Aminosäureseitenketten für die Bindung aller Opioide verantwortlich sind (Opioidsignatur). Darüber hinaus sind an der Interaktion mit individuellen Opioiden noch zusätzliche Aminosäureseitenketten beteiligt, die entweder die Stärke der Interaktion zwischen Ligand und Rezeptor (Affinität, Rezeptorselektivität) oder das Ausmaß der Konformationsänderung hin zum aktiven Rezeptorzustand (intrinsische Aktivität) beeinflussen (Cui et al., 2013;

Diskussion

Martinez-Mayorga et al., 2013; Che et al., 2018). Aus Molecular Docking Studien ist zudem bekannt, dass ein Ligand mehrere energetisch unterschiedliche Bindungsstellen in einem Rezeptor oder Rezeptordimer besitzen kann (Subramanian et al., 2000).

Die für das Pferd aufgedeckten tierartlichen Besonderheiten in der Affinität von Fentanyl am MOR1 und intrinsischen Aktivität von Butorphanol und Morphin am KOR1 konnten in unseren Mutationsstudien auf einige definierte Aminosäureunterschiede zurückgeführt werden. Zu unserer Überraschung sind diese weder beim KOR1 (I 284 V; I 285 V) noch beim MOR1 (I 77 L) direkt an der Interaktion mit den verschiedenen Liganden beteiligt. Diese Aminosäuren sind evolutiv konserviert und bei Pferd, Mensch und Ratte identisch (Wu et al., 2012; Manglik et al. 2012).

Am equinen KOR1 bewirkte die Rückmutation von I 284 zu V 284 des Menschen (Mut K2.1) eine Abnahme der intrinsischen Aktivität von Morphin. Die Doppelmutante Mut K2.3 (I 284 V; I 285 V) verringerte darüber hinaus auch die intrinsische Aktivität von Butorphanol (Abb. 13). D.h., I 284 sowie I 284 und I 285 sind dafür verantwortlich, dass Morphin bzw. Butorphanol am KOR1 des Pferdes als volle Agonisten wirken. Die beiden Aminosäuren I 284 und I 285 finden sich im KOR1 aller Equiden, einiger Nagetiere und Carnivora. Eine zum Menschen homologe Sequenz mit V 284 und V 285 besitzen Affen und Paarhufer wie Rind und Schwein. Nachdem die Seitenkette von I 284 nach außen in Richtung der transmembranen Domäne 5 gerichtet ist, könnte sie mit der Seitenkette von V 239 der transmembranen Domäne 5 in Wechselwirkung treten (Abb. 18). Dadurch könnte nach Bindung eines Agonisten der hochaffine Rezeptorzustand stabilisiert und die Konformation der 3. ICL beeinflusst werden. Warum I 284 alleine nicht ausreicht, um die intrinsische Aktivität von Butorphanol zu erhöhen, kann derzeit nicht erklärt werden. Grundsätzlich sind strukturelle Einflüsse auf die intrinsische Aktivität von Liganden schwierig zu erfassen (Cui et al., 2013).

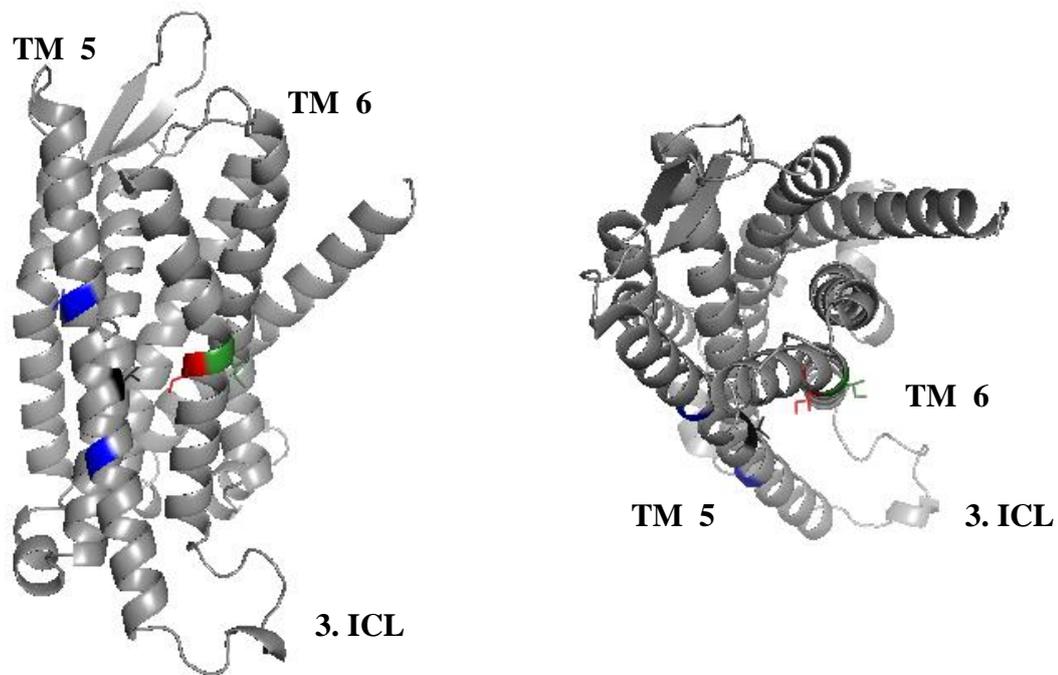


Abbildung 18: Modell des equinen KOR1 (berechnet mit Swissmodel am Template des hKOR1, pbp-Nr.: 4DJH) von vorne und von oben. Mut K2.1 ist in Rot, Mut K2.2 in Grün dargestellt. Die beiden anderen nicht funktionellen Aminosäureaustausche im KOR1 des Pferdes sind in Blau dargestellt. Der mögliche Interaktionspartner für I 284 in TM 5 (V 239) ist in Schwarz hervorgehoben. Links, Seitenansicht, rechts; Ansicht des Rezeptors von oben. TM = transmembrane Domäne. Darstellung erstellt mit dem Programm pymol (Schrodinger, USA).

Weitaus einfacher ist es, den Einfluss von Aminosäureseitenketten in der Bindungstasche auf die Bindungsstärke eines Liganden zu bestimmen. Obwohl wir für Fentanyl eine um den Faktor 50 niedrigere Affinität am equinen MOR1 im Vergleich zum Rezeptor der Ratte nachweisen konnten, sind die beiden Rezeptoren im für die Ligandenbindung relevanten Bereich der transmembranen Domänen bis auf I 77 L in der transmembranen Domäne 1 identisch. Ein dem I 77 L vergleichbarer Aminosäureaustausch in der ersten transmembranen Domäne findet sich ebenfalls im MOR1 anderer Equiden (Esel, Przewalski Pferd), Kaninchen, Chinchilla und Goldhamster. Ob sich I 77 bei diesen Spezies ebenfalls wie beim Pferd auf die klinische Wirksamkeit der genannten Piperidinderivate bei traumatischen Schmerzen auswirkt, ist in der verfügbaren Literatur nicht bekannt.

Aus Röntgenstrukturanalysen geht jedoch hervor, dass dieser Bereich nicht an der Ausbildung der Pharmakophore für Fentanyl beteiligt ist (Subramanian et al., 2000). Es stellt sich daher die Frage, welchen Einfluss die Transmembrane Domäne 1 auf die Bindungsstärke von Fentanyl besitzt, da die Rückmutation zu L 77 der

Diskussion

Ratte (Mut M1) die Affinität wieder anhebt. Vergleichbare Ergebnisse konnten für Piperidinderivate mit einer Seitenkette wie Remifentanyl und Sufentanyl erhoben werden. Bei Pethidin, einem Piperidinderivat ohne Seitenkette, konnte kein Affinitätsunterschied zwischen eMOR1 und rMOR1 gezeigt werden.

Für diese N-Phenylpropanamid Seitenkette am Stickstoff des Piperidinrings von Fentanyl wurde in einer Molekularen Docking Studie eine flexible zusätzliche Bindung an Aminosäurereste in den transmembranen Domänen 2, 3 und 7 beschrieben (Subramanian et al., 2000). Wie aus unseren homologen Modellen ersichtlich ist (Abb. 19), reicht die Seitenkette von I 77 in Richtung der transmembranen Domäne 7. Allerdings sind die für die Bindung der Seitenkette von Fentanyl relevanten Aminosäuren S 331, N 334 und P 335 nicht in direkter Nachbarschaft zu I 77 gelegen. Dennoch könnte I 77 die Orientierung des zum Zytosol hin gelegenen Abschnittes der transmembranen Domäne 7 verändern und so die Bindung der Seitenkette der Piperidinderivate beeinflussen.

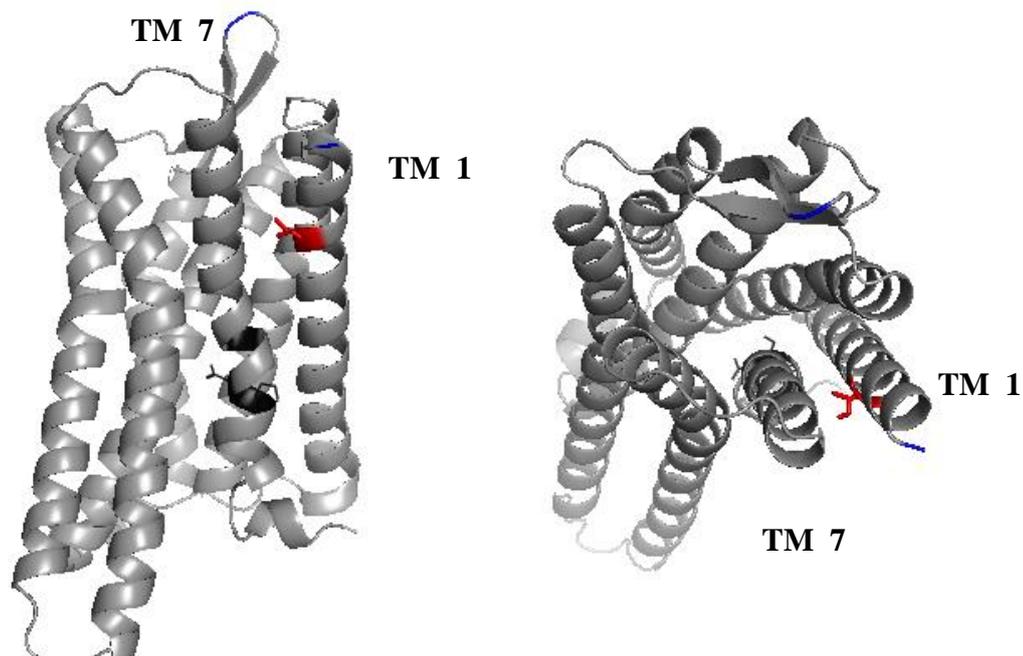


Abbildung 19: Modell des eMOR1 (berechnet mit Swissmodel am Template des murinen MOR1, pbp-Nr.: 4DKL) von vorne und von oben. Rot ist Mut 1 mit der Seitenkette dargestellt, blau sind die wenigen unterschiedlichen Aminosäuren zwischen den beiden Rezeptoren. Schwarz sind die Aminosäuren in TM 7 hervorgehoben, die an der Bindung der Fentanylseitenkette beteiligt sind. Die terminalen Regionen des Rezeptors sind nicht in der Darstellung der Kristallstruktur enthalten. Darstellung erstellt mit dem Programm pymol (Schrodinger, USA). Links; Seitenansicht, rechts; Ansicht von oben.

Diskussion

Welchen Einfluss I 77 in der transmembranen Domäne 1 des equinen MOR1 genau auf die Bindungsaffinität von Fentanyl nimmt, kann zur Zeit nur spekuliert werden. Möglich wäre eine Lageverschiebung des N-Terminus, die den Zugang von Fentanyl in die Bindungstasche beeinflusst. Diese Frage kann jedoch derzeit nicht beantwortet werden, da G-Protein gekoppelte Rezeptoren für die Kristallisation am N-Terminus trunkiert werden müssen (Wu et al., 2012; Manglik et al., 2012).

Eine weitere Möglichkeit wäre ein Einfluss auf die Ausbildung von Homo- oder Heterodimeren, die indirekt die Anordnung der transmembranen Domänen und damit die Konformation der Pharmakophore beeinflussen könnte (Williams et al., 2013). In der Tat liegen Opioidrezeptoren nach Expression in heterologen Systemen als Homodimere vor (Jordan et al., 2000; Wu et al., 2012). Dabei wurde für den MOR1 eine Interaktion der beiden Rezeptoren zwischen TM 1 und TM 2 beschrieben (Shang und Filizola, 2015). Unsere Untersuchungen zur Dimerisierung konnten allerdings keine Unterschiede in der Dimerisierung zwischen dem MOR1 der Ratte und des Pferdes aufdecken (Abb. 17).

Obwohl derzeit keine konkrete Aussage über die strukturellen Konsequenzen der hier dargestellten speziesspezifischen Besonderheiten der equinen Opioidrezeptoren möglich ist, bieten die beiden Rezeptoren eine einmalige Möglichkeit die Bedeutung des N-Terminus und der transmembranen Domäne 1 für die Konformation der Pharmakophore am MOR1 zu liefern. Des Weiteren können mit den aufgezeigten Unterschieden in der Bindungsaffinität der verschiedenen Piperidinderivate am equinen MOR1 die molekularen Determinanten der Rezeptoraktivierung untersucht werden. Dies wird derzeit mithilfe von Molecular Docking Studien in Kooperation mit der Universität Regensburg durchgeführt. Der equine KOR1 eignet sich zudem als Modellsystem für die Bestimmung der Auswirkungen der transmembranen Domäne 6 auf die Aktivierung von G-Proteinen.

Die vorliegende Untersuchung verdeutlicht die Komplexität der Pharmakologie von Opioidanalgetika. Ihr klinischer Einsatz ist ein Spagat zwischen Lipophilie des Liganden, Pharmakokinetik, Rezeptorselektivität und intrinsischer Aktivität. Dazu können wie hier beim Pferd aufgezeigt noch speziesspezifische Unterschiede in der Pharmakodynamik kommen. Obwohl unsere Untersuchungen keinen Rückschluss auf die analgetische Wirksamkeit von Opioidanalgetika beim Pferd erlauben,

Diskussion

können sie die empirisch bekannten Besonderheiten in der Wirkung von Fentanyl, Morphin und Butorphanol erklären. Als Fazit aus vorgelegten Untersuchungen geht hervor, dass die gute Wirksamkeit von Butorphanol beim Kolikschmerz des Pferdes auf seine volle intrinsische Aktivität am KOR1 zurückgeführt werden kann. Dagegen würden Morphin und Levomethadon als volle Agonisten am MOR1 für die Behandlung von traumatischen Schmerzen in Frage kommen. Ihr klinischer Einsatz wird jedoch durch die Ausbildung unerwünschter Wirkungen auf die Lokomotion, den Gastrointestinaltrakt und das Herz/Kreislaufsystem beschränkt. Die Ausbildung unerwünschter Wirkungen beim Pferd scheint nicht mit der intrinsischen Aktivität der Liganden am MOR1 zu korrelieren, da sie auch durch die schwach analgetisch wirksamen gemischten Agonisten/Antagonisten Butorphanol und Buprenorphin ausgelöst werden. Aus diesem Grund kann Fentanyl beim Pferd nicht hoch genug dosiert werden, damit es eine den anderen Spezies vergleichbare analgetische Wirkung zeigt. Auswege aus diesem Dilemma können alternative Applikationswege wie z.B. die epidurale Applikation von Morphin, Fentanyl und Remifentanyl sein oder eine Verstärkung der analgetischen und sedativen Wirkung durch Kombination mit einem α_2 -Agonisten. Dadurch wird indirekt auch einer gesteigerten Lokomotion entgegengewirkt. Schließlich bietet sich auch die Entwicklung peripher wirksamer Opiode für das Pferd an, wie sie aktuell z.B. für κ -Agonisten in der Humanmedizin zur Behandlung von Tumorschmerzen vorangetrieben wird (Suzuki et al., 2017).

VII Zusammenfassung

Opioide sind stark wirksame Analgetika und zeigen beim Pferd klinisch relevante tierartliche Wirkunterschiede, die nicht ausschließlich auf pharmakokinetische Besonderheiten zurückzuführen sind. Ziel dieses Projektes war es, die therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika an den klonierten κ - und μ -Opioidrezeptoren des Pferdes zu charakterisieren, um mögliche Hinweise auf pharmakodynamische Besonderheiten zu gewinnen. Aufgrund der unvollständigen Sequenz des Pferdegenoms mussten bei der Klonierung verschiedene Schwierigkeiten überwunden werden. Die isolierten und verifizierten cDNA Sequenzen des equinen *OPRK1* (KX_509996.1) und *OPRM1* (KX_721505.1) wurden in der GenBank hinterlegt, in den Expressionsvektor pcDNA3.1 subkloniert und die Rezeptoren in HEK 293 Zellen exprimiert. Die Affinität und Selektivität der Rezeptoren wurden in heterologen Verdrängungsexperimenten mit [³H]Diprenorphin, die intrinsische Aktivität durch die Bestimmung der Rezeptor/G-Protein Kopplung (GTP γ [³⁵S]-Bindung) und intrazellulären Signaltransduktion (MAP-Kinase Aktivierung) bestimmt. Unsere Daten können die gute Wirksamkeit von Butorphanol und Morphin beim viszeralem Schmerz des Pferdes damit erklären, dass sie im Vergleich zum humanen Rezeptor am equinen KOR1 als volle Agonisten wirken. Die geringe klinische Wirksamkeit von Fentanyl beim traumatischen Schmerz des Pferdes kann durch eine 50-fach geringere Affinität am MOR1 des Pferdes im Vergleich zur Ratte erklärt werden. Weiterführende Mutationsstudien konnten sowohl am equinen KOR1 (I 284 V, I 285 V) als auch MOR1 (I 77 L) die hierfür verantwortlichen Aminosäureunterschiede identifizieren. Die Ergebnisse stellen eines der wenigen Beispiele für tierartliche Unterschiede von Arzneistoffen dar, die ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren vermitteln. Sie liefern die experimentellen Voraussetzungen für die Entwicklung besser wirksamer und verträglicherer Opioidanalgetika beim traumatischen Schmerz des Pferdes. Darüber hinaus tragen sie wesentlich zur Aufklärung der Struktur-Funktionsbeziehung G-Protein gekoppelter Rezeptoren bei.

VIII Summary

Opioids are highly effective analgesics and show clinically relevant specific differences in the horse, which are not exclusively due to pharmacokinetic peculiarities. The aim of this project was to characterize the therapeutically used opioid analgesics at the cloned κ - and μ -opioid receptors of the horse in order to gain possible indications of pharmacodynamic peculiarities. Due to the incomplete sequence of the horse genome, various difficulties had to be overcome in the cloning. The isolated and verified cDNA sequences of equine *OPRK1* (KX_509996.1) and *OPRM1* (KX_721505.1) were deposited in the GenBank, subcloned into the expression vector pcDNA3.1 and the receptors expressed in HEK 293 cells. The affinity and selectivity of the receptors were determined in heterologous displacement experiments with [³H]Diprenorphine, the intrinsic activity through the determination of receptor/G-protein coupling (GTP γ [³⁵S]-binding) and intracellular signal transduction (MAP-kinase activation). Our data can explain the good efficacy of butorphanol and morphine in the visceral pain of the horse by acting as full agonists compared to the human receptor on equine KOR1. The low clinical efficacy of fentanyl in the horse's traumatic pain can be explained by a 50-fold lower affinity for the horse's MOR1 compared to the rat. Further mutation studies identified for both the equine KOR1 (I 284 V, I 285 V) and MOR1 (I 77 L) relevant amino acid differences. The results represent one of the few examples of animal differences in drugs that mediate their action via G protein-coupled receptors. They provide the experimental prerequisites for the development of better effective and more tolerated opioid analgesics in the traumatic pain of the horse. In addition, they contribute significantly to the elucidation of the structure-function relationship of G-protein coupled receptors.

IX Literaturübersicht

Afsharimani, B., et al. (2011). "Morphine and tumor growth and metastasis." *Cancer Metastasis Rev* 30(2): 225-238.

Ammer, H., et al. (2018). "Cloning and Pharmacological Characterization of canine Opioid Receptors." Manuskript in Vorbereitung.

Anonymus (2018) <https://www.fda.gov/>

Ballantyne, J. C. and M. D. Sullivan (2017). "Discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment." *Pain* 158(12): 2290-2300.

Bennett, R. C., et al. (2002). "Use of opioids for pain and anesthetic management in horses." *Vet Clin North Am Equine Pract.* 2002 Apr;18(1):47-60.

Bockaert, J. (1991). "G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions." *Curr Opin Neurobiol* 1(1): 32-42.

Brandon, C. I., et al. (2006). "Cloning and pharmacological characterization of the equine adenosine A2A receptor: a potential therapeutic target for the treatment of equine endotoxemia." *J Vet Pharmacol Ther* 29(4): 243-253.

Broom, D. C., et al. (2002). "Behavioral effects of delta-opioid receptor agonists: potential antidepressants?" *Jpn J Pharmacol* 90(1): 1-6.

Brownstein, M. J. (1993). "A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12): 5391-5393.

Busillo, J. M., et al. (2010). "Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling." *J Biol Chem* 285(10): 7805-7817.

Butcher, A. J., et al. (2011). "Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code." *J Biol Chem* 286(13): 11506-11518.

Carregaro, A. B., et al. (2006). "Cardiopulmonary effects of buprenorphine in horses." *Am J Vet Res* 67(10): 1675-1680.

Literaturübersicht

Carregaro, A. B., et al. (2007). "Effects of buprenorphine on nociception and spontaneous locomotor activity in horses." *Am J Vet Res* 68(3): 246-250.

Chavkin, C., et al. (1982). "Dynorphin is a specific endogenous ligand of the kappa opioid receptor." *Science*. 215(4531):413-5.

Che, T., et al. (2018). "Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor." *Cell* 172(1-2): 55-67 e15.

Chen, Y., et al. (1993). "Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain." *Mol Pharmacol* 44(1): 8-12.

Cheng, Y. and W. H. Prusoff (1973). "Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction." *Biochem Pharmacol* 22(23): 3099-3108.

Cherezov, V., et al. (2007). "High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor." *Science* 318(5854): 1258-1265.

Commiskey, S., et al. (2005). "Butorphanol: effects of a prototypical agonist-antagonist analgesic on kappa-opioid receptors." *J Pharmacol Sci* 98(2): 109-116.

Connor, M. and M. D. Christie (1999). "Opioid receptor signalling mechanisms." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26(7): 493-499.

Corbett, A. D., et al. (2006). "75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail." *Br J Pharmacol* 147 Suppl 1: S153-162.

Cruz, F. S., et al. (2011). "Sedative and cardiopulmonary effects of buprenorphine and xylazine in horses." *Can J Vet Res* 75(1): 35-41.

Cui, X., et al. (2013). "Ligand interaction, binding site and G protein activation of the mu opioid receptor." *Eur J Pharmacol* 702(1-3): 309-315.

Dahan, A., et al. (2006). "Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia." *Br J Anaesth*. 96(5):627-32.

Dang, V. C. and M. J. Christie (2012). "Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons." *Br J Pharmacol* 165(6): 1704-1716.

Literaturübersicht

Dhawan, B. N., et al. (1996). "International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors." *Pharmacol Rev* 48(4): 567-592.

DiMattio, K. M., et al. (2015). "Intrinsic relative activities of kappa opioid agonists in activating Galpha proteins and internalizing receptor: Differences between human and mouse receptors." *Eur J Pharmacol* 761: 235-244.

Doherty, T. J., et al. (1997). "Effect of high volume epidural morphine, ketamine and butorphanol on halothane minimum alveolar concentration in ponies." *Equine Vet J* 29(5): 370-373.

Doyle, G. A., et al. (2007). "Identification of five mouse mu-opioid receptor (MOR) gene (Oprm1) splice variants containing a newly identified alternatively spliced exon." *Gene* 395(1-2): 98-107.

Evans, C. J., et al. (1992). "Cloning of a delta opioid receptor by functional expression." *Science* 258(5090): 1952-1955.

Filizola, M. and L. A. Devi (2012). "Structural biology: How opioid drugs bind to receptors." *Nature* 485(7398): 314-317.

Filizola, M. and L. A. Devi (2013). "Grand opening of structure-guided design for novel opioids." *Trends Pharmacol Sci* 34(1): 6-12.

Foreman, J. H. and R. Ruemmler (2013). "Efficacy of intramuscular meperidine hydrochloride versus placebo in experimental foot lameness in horses." *Equine Vet J Suppl*(45): 48-53.

Fulton, B. S., et al. (2008). "Synthesis and pharmacological evaluation of hydrophobic esters and ethers of butorphanol at opioid receptors." *Bioorg Med Chem Lett* 18(16): 4474-4476.

Gharagozlou, P., et al. (2003). "Activity of opioid ligands in cells expressing cloned mu opioid receptors." *BMC Pharmacol* 3: 1.

Gharagozlou, P., et al. (2006). "Pharmacological profiles of opioid ligands at kappa opioid receptors." *BMC Pharmacol* 6: 3.

Goldstein, A. and A. Naidu (1989). "Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures." *Mol Pharmacol* 36(2): 265-272.

Literaturübersicht

Gozalo-Marcilla, M., et al. (2015). "Partial intravenous anaesthesia in the horse: a review of intravenous agents used to supplement equine inhalation anaesthesia. Part 2: opioids and alpha-2 adrenoceptor agonists." *Vet Anaesth Analg* 42(1): 1-16.

Granier, S., et al. (2012). "Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole." *Nature* 485(7398): 400-404.

Gudermann, T., et al. (1996). "Diversity and selectivity of receptor-G protein interaction." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 429-459.

Guinard L. Encyclopedie cadeac veterinaire, "effets apparents du morphinisme chez les solipèdes" therapeutique et pharmacodynamie, Tome 1. 401, Paris, 1899.

Hellyer, P. W. (1997). "Management of acute and surgical pain." *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 12(2): 106-114.

Hellyer, P. W., et al. (2003). "Comparison of opioid and alpha-2 adrenergic receptor binding in horse and dog brain using radioligand autoradiography." *Vet Anaesth Analg* 30(3): 172-182.

Hestand, M. S., et al. (2015). "Annotation of the Protein Coding Regions of the Equine Genome." *PLoS One* 10(6): e0124375.

Hofman, K. & Stoffel, W. (1993). "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 374,166.

Huang, W., et al. (2015). "Structural insights into micro-opioid receptor activation." *Nature* 524(7565): 315-321.

Ide, S., et al. (2008). "Abolished thermal and mechanical antinociception but retained visceral chemical antinociception induced by butorphanol in mu-opioid receptor knockout mice." *Neuropharmacology* 54(8): 1182-1188.

Janecka, A., et al. (2004). "Opioid receptors and their ligands." *Curr Top Med Chem* 4(1): 1-17.

Joost, P. and A. Methner (2002). "Phylogenetic analysis of 277 human G-protein-coupled receptors as a tool for the prediction of orphan receptor ligands." *Genome Biol* 3(11): RESEARCH0063.

Jordan, B. A., et al. (2000). "Opioids and their complicated receptor complexes." *Neuropsychopharmacology* 23(4 Suppl): S5-S18.

Kalpravidh, M., et al. (1984). "Analgesic effects of butorphanol in horses: dose-response studies." *Am J Vet Res* 45(2): 211-216.

Kalpravidh, M., et al. (1984). "Effects of butorphanol, flunixin, levorphanol, morphine, and xylazine in ponies." *Am J Vet Res* 45(2): 217-223.

Kaneko, S., et al. (1994). "Ca²⁺ channel inhibition by kappa opioid receptors expressed in *Xenopus* oocytes." *Neuroreport* 5(18): 2506-2508.

Kasai, S. and K. Ikeda (2011). "Pharmacogenomics of the human micro-opioid receptor." *Pharmacogenomics* 12(9): 1305-1320.

Keith, D. E., et al. (1996). "Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization." *J Biol Chem* 271(32): 19021-19024.

Koch, T., et al. (2005). "Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance." *Mol Pharmacol* 67(1): 280-287.

Lai, H. W., et al. (1995). "G_z coupling to the rat kappa-opioid receptor." *FEBS Lett* 360(1): 97-99.

Law, P. Y., et al. (2000). "Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40: 389-430.

Lim, H. D., et al. (2008). "Phenylalanine 169 in the second extracellular loop of the human histamine H₄ receptor is responsible for the difference in agonist binding between human and mouse H₄ receptors." *J Pharmacol Exp Ther* 327(1): 88-96.

Lim, H. D., et al. (2010). "Molecular determinants of ligand binding to H₄R species variants." *Mol Pharmacol* 77(5): 734-743.

Lord, J. A., et al. (1977). "Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors." *Nature* 267(5611): 495-499.

Love, E. J., et al. (2006). "Morphine administration in horses anaesthetized for upper respiratory tract surgery." *Vet Anaesth Analg* 33(3): 179-188.

Love, E. J., et al. (2011). "Assessment of the sedative effects of buprenorphine administered with 10 µg/kg detomidine in horses." *Vet Rec* 168(14): 379.

Love, E. J., et al. (2011). "Assessment of the sedative effects of buprenorphine administered with 20 µg/kg detomidine in horses." *Vet Rec* 168(15): 409.

Literaturübersicht

Love, E. J., et al. (2012). "Effects of acepromazine, butorphanol and buprenorphine on thermal and mechanical nociceptive thresholds in horses." *Equine Vet J* 44(2): 221-225.

Love, E. J., et al. (2013). "Postcastration analgesia in ponies using buprenorphine hydrochloride." *Vet Rec* 172(24): 635.

Lowry, O.H., et al. (1951). "Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent." *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.

Macey, T. A., et al. (2006). "Mu opioid receptor activation of ERK1/2 is GRK3 and arrestin dependent in striatal neurons." *J Biol Chem* 281(45): 34515-34524.

Manglik, A., et al. (2012). "Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist." *Nature* 485(7398): 321-326.

Manglik, A., et al. (2016). "Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects." *Nature* 537(7619): 185-190.

Martinez-Mayorga, K., et al. (2013). "Ligand/kappa-opioid receptor interactions: insights from the X-ray crystal structure." *Eur J Med Chem* 66: 114-121.

McQuay, H. (1999). "Opioids in pain management." *Lancet* 353(9171): 2229-2232.

Meng, F., et al. (1993). "Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21): 9954-9958.

Menzio, A., et al. (2012). "Inhibition of motility in isolated horse small intestine is mediated by kappa but not micro opioid receptors." *Equine Vet J* 44(3): 368-370.

Minami, M. and M. Satoh (1995). "Molecular biology of the opioid receptors: structures, functions and distributions." *Neurosci Res* 23(2): 121-145.

Mollereau, C., et al. (1994). "ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization." *FEBS Lett* 341(1): 33-38.

Muir, W. W., et al. (1979). "Hemodynamic and respiratory effects of xylazine-morphine sulfate in horses." *Am J Vet Res* 40(10): 1417-1420.

Muir, W. W. and J. T. Robertson (1985). "Visceral analgesia: effects of xylazine, butorphanol, meperidine, and pentazocine in horses." *Am J Vet Res* 46(10): 2081-2084.

Literaturübersicht

Nakanishi, S., et al. (1979). "Nucleotide sequence of cloned cDNA for bovine corticotropin-beta-lipotropin precursor." *Nature* 278(5703): 423-427.

Neff, M. W., et al. (2004). "Breed distribution and history of canine *mdr1-1Delta*, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(32): 11725-11730.

Nobles, K. N., et al. (2011). "Distinct phosphorylation sites on the beta(2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of beta-arrestin." *Sci Signal* 4(185): ra51.

Nugent, T. E., et al. (1982). "Effects of enkephalins versus opiates on locomotor activity of the horse." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 35(3): 405-419.

Ostrander, E. A. and L. Kruglyak (2000). "Unleashing the canine genome." *Genome Res* 10(9): 1271-1274.

Pan, Y. X. (2005). "Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters." *DNA Cell Biol* 24(11): 736-750.

Pascoe, P. J. and P. M. Taylor (2003). "Effects of dopamine antagonists on alfentanil-induced locomotor activity in horses." *Vet Anaesth Analg* 30(3): 165-171.

Pert, C. B. and S. H. Snyder (1973). "Opiate receptor: demonstration in nervous tissue." *Science* 179(4077): 1011-1014.

Pfeiffer, A., et al. (1986). "Psychotomimesis mediated by kappa opiate receptors." *Science* 233(4765): 774-776.

Poklis, A. (1995). "Fentanyl: a review for clinical and analytical toxicologists." *J Toxicol Clin Toxicol* 33(5): 439-447.

Preston, K. L., et al. (1988). "Butorphanol-precipitated withdrawal in opioid-dependent human volunteers." *J Pharmacol Exp Ther* 246(2): 441-448.

Rasmussen, S. G., et al. (2011). "Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex." *Nature* 477(7366): 549-555.

Raynor, K., et al. (1994). "Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors." *Mol Pharmacol* 45(2): 330-334.

Literaturübersicht

Risberg, A. I., et al. (2015). "Antinociceptive effect of buprenorphine and evaluation of the nociceptive withdrawal reflex in foals." *Vet Anaesth Analg* 42(3): 329-338.

Riviere, P. J. (2004). "Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain." *Br J Pharmacol* 141(8): 1331-1334.

Saint-Dizier, M., et al. (2004). "Cloning and functional expression of the equine luteinizing hormone/chorionic gonadotrophin receptor." *J Endocrinol* 183(3): 551-559.

Sanchez, L. C. and S. A. Robertson (2014). "Pain control in horses: what do we really know?" *Equine Vet J* 46(4): 517-523.

Sanchez, L. C., et al. (2007). "Effect of fentanyl on visceral and somatic nociception in conscious horses." *J Vet Intern Med* 21(5): 1067-1075.

Schatzman, U., et al. (2001). "Analgesic effect of butorphanol and levomethadone in detomidine sedated horses." *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med* 48(6): 337-342.

Schulz, R., et al. (2004). "Opioid control of MAP kinase cascade." *Eur J Pharmacol* 500(1-3): 487-497.

Schulz, S., et al. (1998). "Immunolocalization of two mu-opioid receptor isoforms (MOR1 and MOR1B) in the rat central nervous system." *Neuroscience* 82(2): 613-622.

Shang, Y. and M. Filizola (2015). "Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling." *Eur J Pharmacol* 763:206-13

Simon, E. J. (1973). "In search of the opiate receptor." *Am J Med Sci* 266(3): 160-168.

Simonin, F., et al. (1995). "kappa-Opioid receptor in humans: cDNA and genomic cloning, chromosomal assignment, functional expression, pharmacology, and expression pattern in the central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(15): 7006-7010.

Skarda, R. T. and W. W. Muir, 3rd (2003). "Comparison of electroacupuncture and butorphanol on respiratory and cardiovascular effects and rectal pain threshold after controlled rectal distention in mares." *Am J Vet Res.* Feb;64(2):137-44.

Spahn, V., et al. (2017). "A nontoxic pain killer designed by modeling of pathological receptor conformations." *Science* 355(6328): 966-969.

Standifer, K. M. and G. W. Pasternak (1997). "G proteins and opioid receptor-mediated signalling."

Strange, P. G. (2010). "Use of the GTPgammaS ([³⁵S]GTPgammaS and Eu-GTPgammaS) binding assay for analysis of ligand potency and efficacy at G protein-coupled receptors." *Br J Pharmacol* 161(6): 1238-1249.

Subramanian, G., et al. (2000). "Molecular docking reveals a novel binding site model for fentanyl at the mu-opioid receptor." *J Med Chem* 43(3)

Suzuki, S., et al. (2017). "Discovery of Peripheral kappa-Opioid Receptor Agonists as Novel Analgesics." *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 65(11): 1085-1088.

Taylor, P., et al. (2014). "Evaluation of sedation for standing clinical procedures in horses using detomidine combined with buprenorphine." *Vet Anaesth Analg* 41(1): 14-24.

Taylor, P. M., et al. (2016). "A multicentre, prospective, randomised, blinded clinical trial to compare some perioperative effects of buprenorphine or butorphanol premedication before equine elective general anaesthesia and surgery." *Equine Vet J* 48(4): 442-450.

Tellam, R. L., et al. (2009). "Unlocking the bovine genome." *BMC Genomics* 10: 193.

Thomasy, S. M., et al. (2007). "Influence of general anaesthesia on the pharmacokinetics of intravenous fentanyl and its primary metabolite in horses." *Equine Vet J* 39(1): 54-58.

Tobin, T., et al. (1988). "Immunoassay detection of drugs in racing horses. IV. Detection of fentanyl and its congeners in equine blood and urine by a one step ELISA assay." *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 60(1): 97-115.

Literaturübersicht

Toll, L., et al. (1998). "Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications." *NIDA Res Monogr* 178: 440-466.

Wade, C. M., et al. (2009). "Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse." *Science* 326(5954): 865-867.

Waldhoer, M., et al. (2004). "Opioid receptors." *Annu Rev Biochem* 73: 953-990.

Wetmore, L. A., et al. (2016). "Effects of fentanyl administration on locomotor response in horses with the G57C mu-opioid receptor polymorphism." *Am J Vet Res* 77(8): 828-832.

Williams, J. T., et al. (2013). "Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance." *Pharmacol Rev* 65(1): 223-254.

Wu, H., et al. (2012). "Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic." *Nature* 485(7398): 327-332.

Xu, J., et al. (2011). "Identification and characterization of seven new exon 11-associated splice variants of the rat mu opioid receptor gene, OPRM1." *Mol Pain* 7: 9.

Xu, X. and U. Arnason (1994). "The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, *Equus caballus*: extensive heteroplasmy of the control region." *Gene* 148(2): 357-362.

Zastawny, R. L., et al. (1994). "Cloning, characterization, and distribution of a mu-opioid receptor in rat brain." *J Neurochem* 62(6): 2099-2105.

Zhu, J., et al. (1997). "Activation of the cloned human kappa opioid receptor by agonists enhances [35S]GTPgammaS binding to membranes: determination of potencies and efficacies of ligands." *J Pharmacol Exp Ther* 282(2): 676-684

X Anhang

1. Abbildungsverzeichnis

| | |
|---|------|
| Abbildung 1: Schematische Darstellung des humanen κ -Opioidrezeptors mittels Snakeplot | S.4 |
| Abbildung 2: Darstellung der amplifizierten PCR Fragmente in der Gelelektrophorese | S.35 |
| Abbildung 3: Klonierungsstrategie und genomische Organisation | S.36 |
| Abbildung 4: Sequenzvergleich zwischen eKOR1 und eMOR1 | S.37 |
| Abbildung 5: Vergleich der Verdrängungskurven von Fentanyl | S.39 |
| Abbildung 6: Vergleich der Verdrängungskurven von Butorphanol | S.40 |
| Abbildung 7: Verdrängungskurve von Buprenorphin am equinen MOR1 | S.41 |
| Abbildung 8: Vergleich des gebundenen GTP γ S am KOR1 | S.42 |
| Abbildung 9: Vergleich der κ -Rezeptor-vermittelten Aktivierung der MAPK | S.42 |
| Abbildung 10: Vergleich des gebundenen GTP γ S am MOR1 | S.43 |
| Abbildung 11: Vergleich der μ -Rezeptor-vermittelten Aktivierung der MAPK | S.43 |
| Abbildung 12: Sequenzvergleich von eKOR1 mit hKOR1 | S.45 |
| Abbildung 13: Vergleich der Aktivierung der MAP-Kinase bei den Mutanten des eKOR1 | S.46 |
| Abbildung 14: Sequenzvergleich von eMOR1 mit rMOR1 | S.47 |
| Abbildung 15: Vergleich der Dissoziationskurven von Fentanyl am mutierten eMOR1 | S.48 |
| Abbildung 16: Bestimmung der Affinität von Piperidinderivaten | S.49 |
| Abbildung 17: Darstellung der Rezeptordimerisierung im Western Blot | S.50 |
| Abbildung 18: Modell des equinen κ -Rezeptor | S.60 |
| Abbildung 19: Modell des equinen μ -Rezeptor | S.61 |

2. GenBank Einträge der equinen Opioidrezeptoren

Equus caballus kappa-type opioid receptor (OPRK1) mRNA, complete cds

GenBank: KX509996.1

```

LOCUS       KX509996                1143 bp    mRNA    linear
MAM 07-SEP-2016
DEFINITION Equus caballus kappa-type opioid receptor (OPRK1)
mRNA, complete
            cds.
ACCESSION  KX509996
VERSION    KX509996.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Equus caballus (horse)
  ORGANISM Equus caballus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla;
Equidae; Equus.
REFERENCE  1  (bases 1 to 1143)
  AUTHORS  Muehlhaupt,M.H., Koutnik,S. and Ammer,H.
  TITLE    Cloning and functional characterisation of equine
opioid receptors
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2  (bases 1 to 1143)
  AUTHORS  Muehlhaupt,M.H., Koutnik,S. and Ammer,H.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (06-JUL-2016) Department of Veterinary
Sciences,
            Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy,
University of
            Munic, Koeniginstr. 16, Munich 80539, Germany
FEATURES             Location/Qualifiers
     source           1..1143
                     /organism="Equus caballus"
                     /mol_type="mRNA"
                     /db_xref="taxon:9796"
                     /chromosome="9"
                     /tissue_type="brain"
     gene           1..1143
                     /gene="OPRK1"
     CDS           1..1143
                     /gene="OPRK1"
                     /note="7tm_1; 7 transmembrane receptor
(rhodopsin family)"
                     /codon_start=1
                     /product="kappa-type opioid receptor"
                     /protein_id="AOI94164.1"
                     /db_xref="GeneID:102150753"

/translation="MESPVQIFRGEFGPTCAPSTCLLPNDSGWFPGWAEPDGNSSAGS
EDAPLEPAHISPAIPVITAVYSVVFVVGVLVGNLVMFVIIRYTKMKTATNIYIFNLA
LADALVTTTTPFQSTVYLMNSWPFQDVLCKIVISIDYYNMFTSIFTLTMMSVDRYIAV
CHPVKALDFRTPLKAKIINICIWLLSSSVGISAIVLGGTKVREDVDVIECSLQFPDDD

```

Anhang

YSWWDLFMKICVFVFAFVIPVLI III CYTLMILRLKSVRLLEFGSREKDRNLRRITRLV
LVVVAVFIIICWTPIHIFILVEALGSTSHSTAALSSYYFCIALGYTNSSLNPILYAFLD
ENFKRCFRDFCFPIKMRMERQSTSRVRNTLQDPAYMKDVGINKPV"

ORIGIN

```
1 atggagtcgc cggttcagat cttccgcggg gagccggggc ccacctgccc cccgagcacc
61 tgcctgctcc ccaacgacag cggctgggtc cggggtggg ccgagccgga cggcaacagc
121 agcgcgggct ccgaggacgc gcctctggag cccgcgcaca tctccccggc catcccggtc
181 atcatcacgg cggctctactc cgtgggtggtc gtcgtgggct tagtgggcaa ctctctggtc
241 atgttcgtga tcatccgata cacgaagatg aagacagcaa ctaacattta tatatttaac
301 ctggctttgg cagatgcttt agttactaca accatgccct tccagagcac ggtctatctg
361 atgaattcct ggccatttgg ggatgtgttg tgcaagatag tcatttccat tgactactat
421 aacatgttta ccagcatatt caccttgacc atgatgagtg tggaccgata cattgctgtg
481 tgccaccctg tcaaggcttt ggacttccgc acacccttga aggcaaagat catcaatatac
541 tgtatthtggc ttctgtcttc atctgttggc atatctgcaa tagttcttgg aggaacccaaa
601 gtcaggggaag acgtggatgt catcgagtgc tccttgcagt tcccggatga tgattactcc
661 tggatgggacc tcttcatgaa gatctgcgtc ttogtctttg ccttcgtgat tcctgtcctc
721 atcatcatta tctgctacac cctgatgatc ctgcgcttaa agagcgtccg actccttttt
781 ggctcccggag agaaagatcg caacctccgt cggatcacca ggcttgcct tgtggtgggtg
841 gcagtcttca tcatctgttg gactcccatt cacattttta ttcttgggga ggctctgggg
901 agtacctccc acagcacggc tgcctctcc agctattact tctgcatcgc cttaggttac
961 accaacagca gctgaaccc cattctttat gcctttcttg atgaaaactt caagcgggtg
1021 ttcagggact tctgctttcc cattaagatg aggatggagc gacagagcac tagtagagtc
1081 agaaatacac ttcaggatcc tgcttaccatg aaggatgttg atgggataaa taaaccagta
1141 tga
```

Equus caballus mu-type opioid receptor (OPRM1) mRNA, complete cds

GenBank: KX721505.1

```

LOCUS      KX721505                1206 bp    mRNA    linear
MAM 28-JAN-2017
DEFINITION Equus caballus mu-type opioid receptor (OPRM1) mRNA,
complete cds.
ACCESSION  KX721505
VERSION    KX721505.1
KEYWORDS   .
SOURCE     Equus caballus (horse)
  ORGANISM Equus caballus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata;
            Euteleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Laurasiatheria; Perissodactyla;
            Equidae; Equus.
REFERENCE  1 (bases 1 to 1206)
  AUTHORS  Muehlhaupt,M.H., Koutnik,S. and Ammer,H.
  TITLE    Cloning and functional characterisation of equine
            opioid receptors
  JOURNAL  Unpublished
REFERENCE  2 (bases 1 to 1206)
  AUTHORS  Muehlhaupt,M.H., Koutnik,S. and Ammer,H.
  TITLE    Direct Submission
  JOURNAL  Submitted (17-AUG-2016) Department of Veterinary
            Sciences,
            Institute of Pharmacology, Toxicology and Pharmacy,
            University of
            Munich, Koeniginstr. 16, Munich 80539, Germany
COMMENT    ##Assembly-Data-START##
            Sequencing Technology :: Sanger dideoxy sequencing
            ##Assembly-Data-END##
FEATURES   Location/Qualifiers
   source   1..1206
            /organism="Equus caballus"
            /mol_type="mRNA"
            /db_xref="taxon:9796"
            /chromosome="31"
            /tissue_type="brain"
   gene   1..1206
            /gene="OPRM1"
   CDS    1..1206
            /gene="OPRM1"
            /note="7tm_1; 7 transmembrane receptor;
            rhodopsin family"
            /codon_start=1
            /product="mu-type opioid receptor"
            /protein_id="APW83745.1"

/translation="MDSSTVPANASNCNDPPTHSSSCSPAPSPGSWVNFHADGNLSD
PCGPNRTELGGSDSLCPPTGSPSMITAITIMAIYSIVCVVGLFGNFLVMYVIVRYTKM
KTATNIYIFNLALADALATSTLPPFQSVNYLMGTWPFGTILCKIVISIDYNNMFTSIFT
LCTMSVDRIYIAVCHPVKALDFRTPRNAKIVNVCNWILSSAIGLPVMFMATTKYRHGSI
DCTLTFSHPTWYWENLLKICVFIFAFIMPVLIITVCYGLMILRLKSVRMLSGSKEKDR

```

Anhang

NLRIRITRMVLVVVAVFIVCWTPIHIVYIIKALITIPETTFQTVSWHFCIALGYTNSCL
NPVLYAFLDENFKRCFRFCIPTSSSTIEQQNSTRVVRQNRDHPSTANTVDRTNHQLEN
LEAETAPLP"

ORIGIN

```
1 atggacagca gcaccgtccc cgcaaacgcc agcaattgca atgatccctt tacgcactct
61 tcaagttgct cccagcacc cagccccggt tcctgggtca acttctccca cgcagatggc
121 aacctctccg acccatgcbg tccgaaccgt accgaactgg gcgggagcga cagcctgtgc
181 cctccgaccg gcagtccttc tatgatcaca gccatcacia tcatggccat ctactccatc
241 gtatgcgtgg tgggtctctt cggaaacttc ctggatcatgt atgtgattgt cagatacacc
301 aaaatgaaga ctgccacca catctatatt ttcaatcttg ctctggcaga tgccttagca
361 accagcacc tgccattcca gagtgtaaat tacctaattg gaacatggcc atttggaaacc
421 atcctctgca agatcgtgat ctccatagat tactataata tggccaccag catattcacc
481 ctctgtacta tgagtgttga tcgctacatt gcagtctgcc atccccgcaa ggccctggat
541 ttccgtactc cccgcaatgc caaaatcgtc aacgtctgca actggatcct ctcttcagcc
601 attggtctgc ctgtaatggt catggcaaca acaaaataca ggcatggttc catagactgt
661 aactaacaat tctctcacc aacatggtac tgggaaaacc tgctgaaaat ctgtgttttc
721 atctttgcct tcatcatgcc ggtcctcatc attacggtgt gttatggact gatgatctta
781 cgcctcaaga gtgtccgtat gctctctggc tccaaagaaa aagacagaaa cctgagaaga
841 atcaccagga tgggtcttgt ggttgtggct gtgttcattg tctgctggac tcccattcac
901 atttatgtca tcattaaagc cttgattacg atcccagaaa ctactttcca gaccgtctct
961 tggcacttct gcattgctct aggttacaca aatagctgcc tgaaccagc cctttatgca
1021 tttctggatg aaaacttcaa acgatgcttc agagagtct gtatcccaac ttcctccacc
1081 attgagcagc aaaactctac tcgagttcgt cagaacacta gagaccacc ctccacggcc
1141 aatacagtgg ataggactaa ccatcagcta gaaaatctgg aagcagaaac tgctccggtg
1201 cccta
```

XI Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater Hermann Ammer, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Seine stetige Diskussionsbereitschaft, konstruktive Kritik und sein umfassendes Fachwissen waren für das Gelingen der Versuche und dieser Arbeit unverzichtbar. Dank seiner breiten Kenntnis der verwendeten Methoden und Hintergründe, war die Zeit am Institut sehr lehrreich. Das positive und motivierende Klima in der Arbeitsgruppe lag ebenfalls zu großen Teilen an seiner Person.

Darüber hinaus gilt mein Dank Sarah Koutnik und Sarah Bolda für die schöne Zeit und die vielen interessanten und konstruktiven fachlichen Gespräche. Bei Sarah Koutnik möchte ich mich darüber hinaus für die Einführung in die verwendeten Methoden, die Erklärungen im Laboralltag und die Hilfestellung bei der Versuchsdurchführung bedanken.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU, die ich während meiner Zeit am Institut kennen lernen durfte, möchte ich ebenfalls danken und viel Erfolg bei ihren zukünftigen Tätigkeiten wünschen.

Ich möchte mich ebenfalls bei meinen Freunden, meiner Familie und besonders bei meinen Eltern bedanken. Durch ihre Unterstützung hatte ich die Möglichkeit dieses Projekt umzusetzen und diese Arbeit anzufertigen.