

**Klonierung und pharmakologische Charakterisierung
der caninen Opioidrezeptoren**

von Elena Katharina Gerdes

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

**Klonierung und pharmakologische Charakterisierung
der caninen Opioidrezeptoren**

von Elena Katharina Gerdes
aus Heidelberg

München 2024

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department
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. Herbert Kaltner

Tag der Promotion: 10. Februar 2024

Diese Arbeit widme ich meinem verstorbenen Vater

Prof. Dr. Hans-Hermann Gerdes.

Vielen Dank für den wissenschaftlichen Samen, den du gesät hast

und aus dem auch diese Arbeit gewachsen ist.

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	
<i>Abkürzungsverzeichnis</i>	1
<i>I Einleitung</i>	1
<i>II Literaturübersicht</i>	2
1. Opioidrezeptoren	2
1.1. Einteilung und Entdeckungsgeschichte der Rezeptoren	2
1.2. Vorkommen und Funktion	4
1.3. Molekularer Aufbau	4
1.4. Signaltransduktion und Effektorsysteme	5
1.5. Liganden	6
2. Opioideinsatz beim Hund	7
2.1. Synthetische Opioide	7
2.1.1. Methadon	7
2.1.2. Fentanyl	8
2.2. Morphinane	8
2.2.1. Morphin	8
2.2.2. Buprenorphin	9
2.2.3. Butorphanol	9
2.2.4. Naloxon und Naltrexon	10
<i>III Fragestellung</i>	12
<i>IV Material und Methoden</i>	13
1. Materialien	13
1.1. Geräte	13
1.2. Verbrauchsmaterialien	15
1.3. Zellen, Zellkulturmedien, Additive	16
1.4. Chemikalien	16
1.5. Puffer	18
1.6. Gebrauchsfertige Substanzen und Lösungen	19
1.7. Antikörper	21
2. Klonierung der caninen Opioidrezeptoren	22
2.1. Strategie und Template	22
2.2. Rezeptor Klonierung mittels PCR	22

Inhaltsverzeichnis

2.2.1. GAPDH PCR.....	22
2.2.2. Primer und Rezeptor-Klonierung.....	23
2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese	24
2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte	25
2.3. Vektorklonierung in den pJET 1.2	25
2.3.1. Ligation in pJET 1.2	26
2.3.2. Transformation.....	26
2.3.3. Aufreinigung der Plasmide	26
2.4. HA-Tag der Rezeptoren.....	27
2.5. Vektorklonierung in das Plasmid pcDNA 3.1(+)	28
2.5.1. Restriktionsverdau	28
2.5.2. Ligation	28
2.5.3. Sequenzierung.....	29
3. Zellmodell HEK 293-Zellen	29
3.1. Zellkultur.....	29
3.2. Stabile Transfektion der HEK 293-Zellen	30
3.3. Verifikation der stabilen Transfektion	31
3.3.1. Western Blot.....	31
3.3.2. Immuncytochemie.....	31
4. Pharmakologische Charakterisierung.....	33
4.1. Radioligandenbindung	33
4.1.1. Membranpräparation.....	33
4.1.2. Proteinbestimmung nach Lowry	33
4.1.3. Kompetitiver Bindungsassay mit [³ H]Diprenorphin	34
4.1.4. Ermittlung der K _d des Radioliganden und der K _i der kompetitiven Liganden.....	35
4.2. MAP-Kinase Aktivität	36
4.2.1. MAP-Kinase Assay	37
4.2.2. SDS-PAGE Elektrophorese	38
4.2.3. Western Blot.....	39
V Ergebnisse.....	42
1. Klonierung und sequenzielle Analyse der Opioidrezeptoren.....	42
1.1. Molekulare Charakterisierung	42
1.2. Rezeptorklonierung	43
1.3. Speziespezifische Unterschiede der Opioidrezeptoren	43
2. Stabile Transfektion der Zellen	47
3. Pharmakologische Charakterisierung.....	48

Inhaltsverzeichnis

3.1. Rezeptoraffinität und Selektivität	48
3.1.1. Fentanyl	49
3.1.2. Morphin	50
3.1.3. Butorphanol	51
3.1.4. Buprenorphin	52
3.1.5. Levomethadon	54
3.1.6. Zusammenfassung der Bindungsdaten	55
3.2. Intrinsische Aktivität	56
3.2.1. Intrinsische Aktivitäten der Opioidanalgetika am μ MOR	59
3.2.2. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am κ MOR	60
3.2.3. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am δ KOR	61
3.2.4. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am hKOR	62
3.3. Ligandenprofile von Opioidanalgetika an caninen Opioidrezeptoren	63
VI Diskussion	64
1. Klonierung und molekulare Charakterisierung der caninen Opioidrezeptoren ...	64
2. Pharmakologisches Profil	66
2.1. Selektivität	66
2.2. Effekt	67
3. Bedeutung für die klinische Anwendung.....	69
4. Ausblick	69
VII Zusammenfassung	70
VIII Summary.....	72
IX Literaturverzeichnis	74
X Abbildungsverzeichnis	81
XI Tabellenverzeichnis	82
XII Danksagung	

Abkürzungsverzeichnis

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
cKOR	κ -Opioidrezeptor des Hundes
cMOR	μ -Opioidrezeptor des Hundes
cn	Kontrolle
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTC	Kupfersulfat-Tartrat-Natrium-Carbonat-Lösung
DMEH	DMEM mit HEPES
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOR	δ -Opioidrezeptor
ECL	Extrazelluläre Schleife
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase
Fen	Fentanyl
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HB	Homogenisierungspuffer

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	N-[2-Hydroxyethyl]piperatin-N'-[2-ethansulfonsäure]
hKOR	κ -Opioidrezeptor des Menschen
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
ICL	Intrazelluläre Schleife
kb	Kilobasenpaare
K _d	Dissoziationskonstante des Radioliganden
K _i	Dissoziationskonstante des kompetitiven Liganden
KOR	κ -Opioidrezeptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
min	Minute
MOR	μ -Opioidrezeptor
mRNA	Messenger RNA
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte-Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
rMOR	μ -Opioidrezeptor der Ratte
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
sek	Sekunde
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TM	Transmembrane Domäne
UV	Ultraviolett

I Einleitung

Tierartliche Unterschiede in der Arzneimittelwirkung wurden bisher auf Unterschiede in der Pharmakokinetik zurückgeführt, die z.B. eine Dosisanpassung erfordern [2]. Bei den Opioidanalgetika werden jedoch zudem stoffspezifische Unterschiede in der Wirkung und im Nebenwirkungsprofil beobachtet, die nicht durch pharmakokinetische Besonderheiten im Arzneimittelmetabolismus erklärt werden können und die sich z.B. in unterschiedlichen Indikationsgebieten oder angepassten Analgesieschemata äußern. Die Ursachen hierfür sind bis heute unbekannt, sodass die Anwendung von Opioidanalgetika in der Tiermedizin nach wie vor auf klinischen Beobachtungen und nicht auf der Basis der *evidence-based medicine* erfolgt [3]. Um mögliche Gründe für stoffspezifische Ursachen in der Opioidwirkung zu finden, wurde in den letzten Jahren begonnen, strukturelle Unterschiede auf Ebene der Opioidrezeptoren zu suchen. In der Tat konnte für den μ -Opioidrezeptor (MOR) in verschiedenen Hundegenomen ein *single nucleotide polymorphism* beschrieben werden, der eine mögliche Rolle in den aversiven Eigenschaften von Opioidanalgetika spielen könnte [4].

Mit der Klonierung und Annotation des Hundegenoms in den Jahren 2004 und 2012 wurden die Voraussetzungen für die molekulare Charakterisierung der Opioidrezeptoren des Hundes geschaffen [5, 6]. Ziel des vorliegenden Dissertationsvorhabens war es daher, die Primärstruktur der für die analgetische Wirkung der Opioide verantwortlichen μ - und κ -Opioidrezeptoren (MOR; KOR) des Hundes zu klonieren und die pharmakologischen Profile der bei dieser Spezies therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika zu charakterisieren. So soll die Grundlage für eine rationale Anwendung von Opioidanalgetika beim Hund und die Ableitung geeigneter Indikationsgebiete und Dosierungsschemata geschaffen werden.

II Literaturübersicht

1. Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die zur Unterdrückung der Schmerzweiterleitung in der Neuraxis von Säugetieren gefunden werden. Sie stellen die natürlichen Bindungsstellen für endogene Opioide dar, die nach ihrer Aktivierung die Erregbarkeit von Neuronen über eine Hemmung der cAMP Produktion, eine Blockade spannungsabhängiger Calciumkanäle oder eine Öffnung von Kaliumkanälen herabsetzen [7].

Aber auch einige exogene Stoffe besitzen die Fähigkeit, an die Rezeptoren zu binden. Schon seit mehreren Tausend Jahren nutzen Menschen die Wirkung des Rohopiums, gewonnen aus dem Saft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), zur Sedation, Schmerzstillung und um Rauschzustände hervorzurufen [8]. Um die 40 Alkaloide konnten bis zum heutigen Tag im Rohopium nachgewiesen werden. Viele davon besitzen pharmakologische Eigenschaften und werden für die Verwendung als Arzneimittel (Morphin, Codein) oder als Rohstoff (Thebain) für die Herstellung halbsynthetischer Opioide (Oxycodon, Naltrexon) gewonnen [9].

Der Einsatz von Opioidanalgetika in der Humanmedizin ist in den letzten beiden Jahrzehnten stark angestiegen [10]. Auch im Bereich der Tiermedizin werden Opioide zunehmend als wichtiges Werkzeug in der akuten und chronischen Schmerzbehandlung von sowohl Hunden und Katzen [11] als auch von Pferden eingesetzt [12]. Des Weiteren kommen Opioide in der Narkoseprämedikation zum Einsatz. Im Vergleich zur Humanmedizin weisen einige Wirkstoffe jedoch beim Tier ein unterschiedliches Indikationsgebiet auf.

1.1. Einteilung und Entdeckungsgeschichte der Rezeptoren

Im Jahre 1973 konnten Opioidrezeptoren erstmals mittels radioaktiv markiertem Naloxon in Gehirn-Lysaten der Ratte nachgewiesen werden [13]. Kurz darauf folgte die Identifikation von Enkephalin als erstes endogenes Opioid [14]. Die Entdeckungen von β -Endorphin [15] und Dynorphin [16] folgten als weitere endogene Liganden.

Opioidrezeptoren wurden dabei als Bestandteil endogener opioiderger Systeme identifiziert, die unter anderem in der Nozizeption eine Rolle spielen.

Die Einteilung der unterschiedlichen Rezeptoren wurde in den Folgejahren anhand von neu synthetisierten, selektiven Liganden und ihrer anatomischen Lokalisation vorgenommen. So wurden die Rezeptoren mit μ = Morphin [17], κ = Ketocyclazocin [17] und δ = Vas deferens [18] benannt. In der heutigen Nomenklatur sind laut der *International Union of Basic and Clinical Pharmacology* (IUPHAR) mehrere Bezeichnungen möglich, die sich zu verschiedenen Zeitpunkten in der Entwicklung etabliert haben (Tabelle 1):

Vor Klonierung	Nach Klonierung	IUPHAR 2000
μ	MOR	MOP
κ	KOR	KOP
δ	DOR	DOP

Tabelle 1: Bezeichnungen der Opioidrezeptoren, die Endung -OR steht für „opioid receptor“ und die Endung -OP für „opioid Peptide, Tabelle adaptiert nach Pathan und Williams, 2012 [19].

Zudem können mit einem Präfix noch die tierartlichen Rezeptoren unterschieden werden. So werden die humanen Rezeptoren mit einem „h“, die Rattenrezeptoren mit einem „r“ und die caninen Rezeptoren mit einem „c“ gekennzeichnet.

Zu Beginn der 1990er Jahren gelang die Klonierung der Opioidrezeptoren aus dem Gehirn von Maus und Ratte. Zunächst wurde der DOR isoliert [20], gefolgt vom MOR [21] und vom KOR [22], ihre genomischen Strukturen bei Mensch, Ratte und Maus wurden aufgeklärt.

Die erste Splicevariante des MOR (humaner MOR 1A) wurde von Bare et al. beschrieben [23] und Pan et al. klärten nach der Jahrhundertwende eine Vielzahl weiterer Splicevarianten bei Mensch, Maus und Ratte auf [24-28]. Mit der Entdeckung der MOR-1A-Varianten von Ratte und Maus [29, 30] fielen erstmals Unterschiede in der G-Protein-Kopplung der unterschiedlichen Rezeptorvarianten auf. Es entwickelte sich die Idee, dass die Expression von Splicevarianten einen signifikanten Beitrag zur gewebespezifischen Funktion der Opioidrezeptoren leistet. Die pathophysiologische Bedeutung von Splicevarianten ist jedoch bis zum heutigen Tag ungeklärt [31].

Die Gruppe der Opioidrezeptoren wurde 1994 noch um den Nociceptin-Rezeptor (NOP) erweitert [32]. Er besitzt ~60% Übereinstimmung mit den anderen Opioidrezeptoren, hat aber eine sehr geringe Affinität zu endogenen Opioiden und morphinähnlichen Strukturen [33]. Bei Betrachtung der medizinischen Wirkweise verschiedener Opioide, wird der Nociceptin-Rezeptor daher im Allgemeinen nicht berücksichtigt.

1.2. Vorkommen und Funktion

Opioidrezeptoren werden in verschiedenen Neuronen des zentralen Nervensystems exprimiert. Sie werden aber auch in allen anderen ektodermalen Geweben wie dem Vas deferens, dem Kniegelenk, dem Gastrointestinaltrakt, dem Herzen, dem Immunsystem und in Tumoren angetroffen [34].

Ihre pharmakologisch gesehen wichtigste Funktion ist die Opioid-induzierte Analgesie auf spinaler und supraspinaler Ebene [19]. Aber auch die peripheren Rezeptoren rücken in der Schmerztherapie immer mehr in das Zentrum der Aufmerksamkeit [34]. So konnte gezeigt werden, dass der exprimierte KOR in den sensiblen Neuronen des Gastrointestinaltraktes vor allem eine viszerale Analgesie hervorruft [35].

In Knockout-Mauslinien wurden die Bedeutung von Opioidrezeptoren auf psychische Funktionen untersucht [36]. Außerdem ist bekannt, dass Opioidrezeptoren in der Neurogenese sowie bei Lern- und Erinnerungsvermögen eine Rolle spielen [37].

1.3. Molekularer Aufbau

Opioidrezeptoren gehören als G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) zur größten Proteinfamilie für Arzneimittelrezeptoren des humanen Genoms [38]. Lokalisiert in der Zellmembran sorgen sie dafür, dass extrazelluläre Signale in intrazelluläre Informationen übersetzt werden und zelluläre Reaktionen auslösen [39]. Die Bindungsstelle (Pharmakophore) befindet sich in einem Tunnel gebildet aus dem extrazellulären Amino-(N)-Terminus und den 7 transmembranen Domänen, die durch 3 extrazelluläre Schleifen (extracellular loop; ECL) und 4 intrazelluläre Schleifen (intracellular loop; ICL) miteinander verbunden sind [40]. Intrazellulär schließt sich der Carboxyl-(C)-Terminus an, der vor allem im Zusammenhang mit der ICL3 für die Bindung und Aktivierung der

nachgeschalteten G-Proteine verantwortlich ist. Die intrinsische Aktivität einzelner Liganden spiegelt sich dabei in ihrer Eigenschaft wider, Serin- und Threonin-Seitenketten am C-terminalen Ende des Rezeptors zu phosphorylieren [41-43]. In den letzten Jahren wurde aus dieser Eigenschaft das Modell des „Liganden abhängigen Phosphorylierungs-Barcodes“ entwickelt, wobei die verschiedenen Opioidanalgetika durch unterschiedliche Phosphorylierungsmuster charakterisiert sind, sodass tierartliche Besonderheiten untersucht werden können [44].

Um die Ligandenbindungsstelle am N-Terminus besser zu verstehen, wurden 2012 erstmals die Rezeptorkristallstrukturen der inaktiven MOR, DOR und KOR durch Kopplung an einen Antagonisten aufgeklärt [45-47]. Um weitere Einblicke in die Signalübertragung bei Ligandenbindung zu erlangen, verblieb jedoch die schwierige Aufgabe den Rezeptor in seiner wesentlich instabileren, aktivierten Form abzubilden. Schließlich gelang es durch den Einsatz von Nanobodies, kleinen Antikörpern, die den Rezeptor in seiner aktiven Form stabilisieren, diesen Schritt für den MOR [48] und KOR [49] zu bewerkstelligen.

1.4. Signaltransduktion und Effektorsysteme

Opioidrezeptoren vermitteln ihre Information über heterotrimere G-Proteine, die aus einer α - Untereinheit und einem funktionellen $\beta\gamma$ -Dimer bestehen [50]. Nach Aktivierung können sowohl die α -Untereinheit als auch die $\beta\gamma$ -Untereinheit nachgeschaltete Effektorsysteme wie Adenylylzyklasen, Ca^{2+} -Kanäle und K^{+} -Kanäle regulieren [51]. Die Aktivierung von G-Proteinen oder die Regulation nachgeschalteter Effektorsysteme wird für die Bestimmung der intrinsischen Rezeptorfunktion herangezogen, wie z.B. die dosisabhängige Stimulation des Guanosintriphosphat-Einbaus, die Inhibition der intrazellulären cAMP Produktion und die Hemmung von Ca^{2+} - oder die Aktivierung von K^{+} -Strömen [52].

Welche Effektorwege durch das G-Protein aktiviert werden, liegt an der Ausstattung einzelner Zelltypen mit Subtypen der α -, β - und γ -Untereinheiten. Neben den klassischen Pertussistoxin-sensitiven, inhibitorischen G-Proteinen leiten Opioidrezeptoren ihre Information auch über G-Proteine der G_q -Familie weiter [53]. Diese können sogenannte „nicht-klassische“ Effektorsysteme wie die Mitogen-

aktivierten Proteinkinasen (MAPK) und die extrazellulär-regulierten Kinasen 1 und 2 (ERK1/2) entweder direkt oder indirekt aktivieren und somit mitogene Signale modulieren [54]. Aufgrund der hohen Sensitivität kann die opioiderge Regulation der ERK1/2 zur Bestimmung der intrinsischen Aktivität von Opioidliganden herangezogen werden [55].

1.5. Liganden

Die Liganden der Opioidrezeptoren lassen sich in endogene, natürlich vorkommende, halbsynthetische und synthetische Stoffe unterteilen. Die endogenen Liganden werden dabei in drei Gruppen unterteilt: Endorphine, Enkephaline und Dynorphine. Sie werden aus unterschiedlichen Vorläuferpeptiden prozessiert und weisen unterschiedliche Affinitäten gegenüber den drei Opioidrezeptoren auf. Allein Dynorphin bindet an alle drei Rezeptortypen [56]. Die endogenen Opioide stellen die natürlichen Liganden der drei Opioidsysteme dar. Ihre biologische Funktion ist bis heute jedoch nicht restlos aufgeklärt. Neben ihrer Bedeutung in endogenen Schmerzmechanismen spielen sie zum Beispiel auch eine Rolle im Überlebensverhalten [57].

Opiate bilden die Gruppe der natürlich vorkommenden Schlafmohnalkaloide, sowie ihrer halbsynthetischen Derivate, die jeweils als exogene Stoffe an den Opioidrezeptoren eine Wirkung entfalten. Diese Gruppe bezeichnet man auch als Morphiane und ihr zugeordnet sind Stoffe wie Morphin, Buprenorphin, Butorphanol, Codein und Heroin.

Zusätzlich gibt es die Gruppe der synthetischen Opioide. Sie sind chemisch anders aufgebaut als die Morphine, entfalten aber dennoch eine Wirkung an den Rezeptoren. Zu dieser Gruppe gehören Diphenylpropylamin (L- und D-Levomethadon), aber auch Piperinderivate wie Fentanyl, Remifentanyl, Sufentanyl und Pethidin [58].

Die Liganden können weiter auch anhand ihrer Selektivität an den verschiedenen Rezeptoren und auch anhand ihrer intrinsischen Aktivität (Agonist, partieller Agonist, Antagonist, inverser Agonist) eingeteilt werden [59]. Die biologische Wirkung als Medikament ist daher äußerst komplex, neben den üblichen Einflussfaktoren wie Pharmakokinetik und Gewebegängigkeit (Lipophilie, Transporter), spielt vor allem die

Wirkung des Liganden am Rezeptor eine große Rolle. Dieses Phänomen wird mittlerweile als *ligand biasing* zusammengefasst, und kann zum Teil durch observierte Unterschiede in den nachgeschalteten Signalkaskaden erklärt werden [60].

2. Opiodeinsatz beim Hund

In den *Pain Management Guidelines* der *American Animal Hospital Association* [61] werden Opiode grundsätzlich als effektivste Analgetika in der akuten Schmerzversorgung genannt. Eine Studie aus dem Jahr 2013 [62] zeigt im Vergleich zu einer Studie aus dem Jahr 1999 [63] einen deutlichen Anstieg in der Verschreibung von Opioidanalgetika im Rahmen der intraoperativen Analgesie. Die Autoren eines kürzlich erschienenen Reviews [3] interpretieren dies als Beweis für eine positive Entwicklung im Sinne des Tierwohls. Mit dem steigenden Gebrauch von Opioidanalgetika steigt jedoch auch der Bedarf gründlich evaluierter Tierarzneimittel im Sinne der *evidence-based medicine*. Die Einsatzgebiete der verschiedenen Opiode unterscheiden sich jedoch teilweise gravierend. Im Folgenden werden die einzelnen therapeutisch verwendeten Opioidanalgetika beim Hund mit ihren Eigenschaften besprochen. Nebenwirkungen aller Opiode sind Symptome wie Erbrechen, Salivation, Bronchospasmen, Obstipation und bei manchen Spezies auch Bradykardie, Miosis, Atemdepression und paradoxe Erregungserscheinungen [64].

2.1. Synthetische Opiode

2.1.1. Methadon

Methadon (ATC Code: N02AC06) ist ein von Pethidin abgeleitetes vollsynthetisches Opioid, das als Racemat (D- und L-Enantiomer) vorliegt. Das Levomethadon ((-)-Methadon; R-Methadon; L-Methadon) stellt die eigentlich analgetisch wirksame Komponente am MOR dar, während D-Methadon antagonistische Wirkung am NMDA-Rezeptor besitzt. Beim Menschen stellt L-Methadon einen vollen Agonisten am MOR und DOR dar, während es am KOR als partieller Agonist klassifiziert wird [65]. Als Injektionslösung ist Methadon entweder als Racemat (z.B. *Comfortan 10 mg/ml, Injektionslösung für Hunde und Katzen*) oder als L-Methadon zusammen mit dem

Parasympatholytikum Fenpipramid (*L-Polamivet 2,5/0,125 mg/ml, Injektionslösung für Pferde und Hunde*) verfügbar. Es kann entweder intramuskulär (i.m.) oder subkutan (s.c.) verabreicht werden, wobei die i.m. Verabreichung eine zuverlässige und bessere Absorption zulässt [66]. Das Racemat ist zur Analgesie bei Hund und Katze sowie zur Prämedikation bei der Allgemeinanästhesie oder Neuroleptanalgesie bei Hunden und Katzen in Kombination mit einem Neuroleptikum zugelassen. Levomethadon hat dagegen eine Zulassung zur Narkoseprämedikation und zur Neuroleptanalgesie in Kombination mit Xylazin oder Acepromazin. Verglichen mit Buprenorphin zeigte Levomethadon eine bessere postoperative Analgesie [67] und auch eine bessere intraoperative Analgesie als nach der Gabe von Morphin [68].

2.1.2. Fentanyl

Fentanyl (ATC Code: QN02AB03) ist ebenfalls ein von Pethidin abgeleitetes, voll synthetisches Opioid. Beim Menschen konnte Fentanyl als voller Agonist am MOR und DOR, beim KOR als partieller Agonist [65] und am Ratten-MOR als voller Agonist [69] klassifiziert werden. Es zeichnet sich im Vergleich zu Morphin durch eine höhere Wirkpotenz mit deutlich kürzerer Wirkdauer aus. Es steht als *Fentadon 50µg/ml Injektionslösung für Hunde* in der Veterinärmedizin zur Verfügung. Zugelassen ist es für die intraoperative Analgesie sowie zu Behandlung von postoperativen Schmerzen. Mehrere Studien zeigten eine gute analgetische Wirkung bei anästhesierten Hunden [70, 71]. Zur Neuroleptanalgesie bei Hunden wird es oft in Kombination mit Neuroleptika angewandt [64]. Zusätzlich zu den üblichen Nebenwirkungen kann nach der Behandlung mit Fentanyl eine Opioid-induzierte Hyperalgesie entstehen [72].

2.2. Morphinane

2.2.1. Morphin

Morphin (ATC Code: N02AA01) ist am humanen MOR und DOR als voller Agonist und am hKOR, rMOR und rKOR als partieller Agonist klassifiziert [21, 65, 69]. In der Veterinärmedizin steht aktuell kein zugelassenes Präparat zur Verfügung, dies muss bei Bedarf aus der Humanmedizin umgewidmet werden. Beim Hund hat Morphin eine sedativ/hypnotische Wirkung und senkt die Körpertemperatur signifikant herab [64].

Außerdem ist im Vergleich zu anderen Spezies eine relativ kurze Wirkdauer von 1–2 Stunden zu beobachten [73]. Bei der Applikation von Morphin kommt es bei Hunden außerdem zur Histaminfreisetzung aus Mastzellen und basophilen Granulozyten, die mit Rötung der Haut und der Lefzen bis hin zu anaphylaktischen Reaktionen einhergeht. Wird Morphin beim Hund angewandt, sollte es deshalb langsam verabreicht werden [74].

2.2.2. Buprenorphin

Buprenorphin (ATC Code: QN02AE01) wird aus dem Opium-Alkaloid Thebain gewonnen und wurde am humanen MOR und KOR als partieller Agonist beschrieben [65, 75]. In der Veterinärmedizin steht es als Injektionspräparat verschiedener Firmen mit identischer Zulassung, z.B. als *Bupredine Multidose 0,3mg/ml Injektionslösung für Hunde, Katzen und Pferde*, zur Verfügung. Es ist für die postoperative Analgesie und zur Verstärkung der sedativen Wirkung zentral wirksamer Tierarzneimitteln zugelassen. Auf Grund seiner langen Wirkdauer wird es häufig als postoperatives Analgetikum eingesetzt, obwohl bisher nur eine ausreichende analgetische Wirkung bei Weichteiloperationen wie der Ovariohysterectomie nachgewiesen wurde [76].

In der Humanmedizin wird Buprenorphin zur Behandlung der Opioidabhängigkeit eingesetzt. Durch seine hohe Affinität am MOR ist es in der Lage, andere Opioide zu verdrängen [77]. Buprenorphin gilt zudem als sicheres Opioidanalgetikum, da es bei der Maus bezogen auf die Ausbildung einer Atemdepression bei Überdosierung einen sogenannten *Ceiling-effect* (Sättigung) aufweist [78].

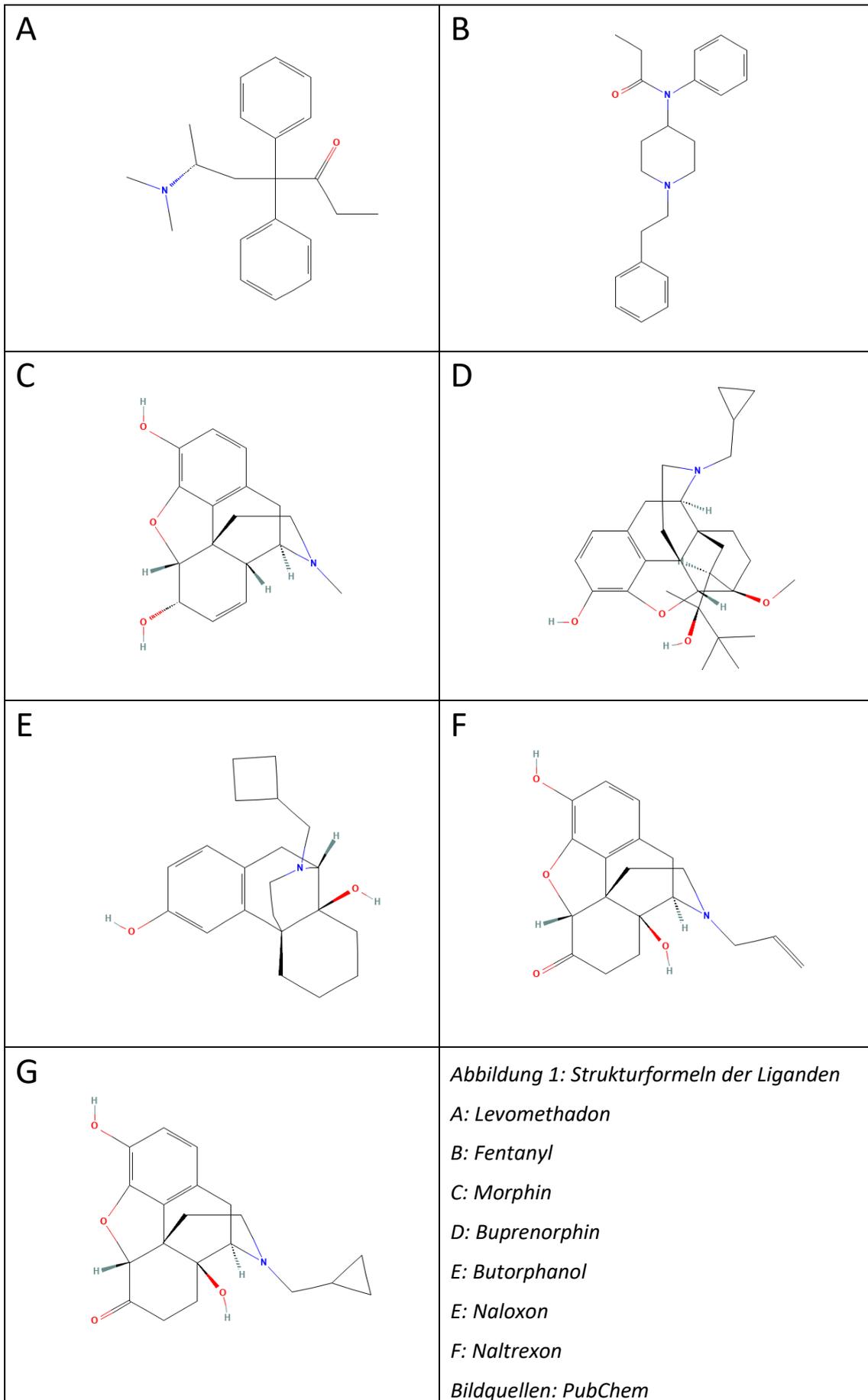
2.2.3. Butorphanol

Butorphanol (ATC Code: QN02AF01) wird in der Veterinärmedizin häufig eingesetzt, da es nicht den betäubungsmittelrechtlichen Bestimmungen unterliegt. Ursache hierfür ist ein nur schwacher partieller Agonismus am humanen MOR und KOR, wodurch Butorphanol nicht suchtauslösend wirkt [79]. Für die Tiermedizin liegen verschiedene Injektionspräparate mit identischer Zulassung, wie z.B. *Butorgesic 10mg/ml Injektionslösung für Pferde, Hunde und Katzen*, vor. Diese sind für die Linderung leichter bis mäßiger viszeraler Schmerzen und leichter bis mäßiger Schmerzen nach

weichteilchirurgischen Eingriffen zugelassen sowie zur Sedation in Kombination mit Medetomidin und zur Narkoseprämedikation in Kombination mit Acepromazin. Als Bestandteil von Narkosen wird es zusammen mit Medetomidin und Ketamin eingesetzt. Beim Hund zeigt es bei gleichem analgetischem Effekt wie Morphin keine Histaminausschüttung [80], als alleinige Analgesie postoperativ erwies sich die Wirkung jedoch als nicht ausreichend [81].

2.2.4. Naloxon und Naltrexon

Naloxon (ATC Code: A06AH04) und Naltrexon (ATC Code: N07BB04) sind Derivate des Oxycodons. Ihre aktiven (-)-Isomere stellen kompetitive Antagonisten dar, die sich in ihrer Affinität gegenüber den drei Opioidrezeptortypen unterscheiden. Die um den Faktor 4 längere Halbwertszeit von Naltrexon beim Menschen konnte beim Hund nicht belegt werden [82]. Weder Naloxon noch Naltrexon sind als zugelassenes Tierarzneimittel in der Europäischen Union verfügbar. Umgewidmete Präparate werden zur Antagonisierung der Opioidwirkung bei Narkoseprämedikation und bei Intoxikationen eingesetzt.



III Fragestellung

Opioide werden beim Hund zur Behandlung vielseitiger Schmerzzustände eingesetzt. Die zur Verfügung stehenden Wirkstoffe und Tierarzneimittel weisen dabei unterschiedliche Indikationsgebiete auf. Von der Allgemeinanästhesie über die Narkoseprämedikation zusammen mit Sedativa und Neuroleptika bis hin zum intra- und postoperativen Schmerzmanagement bei chirurgischen Eingriffen, wie z.B. Weichteiloperationen, und der orthopädischen Chirurgie. Im Vergleich zu anderen Spezies geht die Anwendung von Opioiden beim Hund jedoch mit einer Reihe spezifischer 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 und Experimente durchgeführt:

- molekulare Klonierung der κ - und μ -Opioidrezeptoren (*cOPRK1*; *cOPRM1*) aus einer cDNA-Bibliothek des Gehirnes eines Hundes
- stabile Expression der Rezeptoren in HEK 293 Zellen
- funktionelle Charakterisierung der therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika mittels Radioligandenbindung
- Bestimmung der vom Rezeptor aktivierten Signalmechanismen
- Vergleich der pharmakodynamischen Eigenschaften von Opioiden beim Hund mit denjenigen von Mensch und Ratte

IV Material und Methoden

1. Materialien

1.1. Geräte

Gerät	Hersteller
Anschlussgerät für Gelelektrophoresekammer	Biometra GmbH; Göttingen
Autoklav Syntec 2540 EL	Biomedis Laborservice GmbH; Gießen
Brutschrank Sanyo MCO-17AI CO2 Incubator	Sanyo Electric Co., Ltd.; Moriguchi, Japan
Chemilumineszenz- und Fluoreszenzsystem Fusion SL4 400 WL	Vilber Lourmat; Eberhardzell
Eismaschine AF 100	Scotsman ICE Systems Frimont S.P.A; Mailand, Italien
Flüssigkeitsabsaugsystem BVC01	Vacuubrand GmbH & Co. KG; Wertheim
Gefrierschrank -20°C Liebherr Premium NoFrost, Modell GNP 3666	Liebherr Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen
Gefrierschrank -80°C GFL 6485	GFL, Gesellschaft für Labortechnik mbH; Burgwedel
Gelelektrophoresekammer für Agarosegelelektrophorese Easy Cast TM Modell B1	Owl, Separation Systems; Rochester, USA
Gelelektrophoresekammer- und Semi-dry Blot, Power supply 1000/500	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Gelgießstand und Elektrophoresesystem Mini Protean® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH; München
Kühlschrank Liebherr T 1410 Comfort	Liebherr Hausgeräte GmbH; Ochsenhausen
MaxQ 6000 Inkubationsschüttler	Thermo Fisher Scientific Inc.;; Waltram, MA, USA
Mikroskop Labovert	Leitz; Wetzlar
Mikrowelle 900 & Grill	SEVERIN Elektrogeräte GmbH; Sundern
PCR-Thermocycler T Professional BASIC	Biometra GmbH; Göttingen
pH-Meter VWR® pHenomenal® pH 1100L	VWR; Erlangen
Photometer Genesys 10S UV-Vis Spectrometer	Thermo Fisher Scientific Inc.;; Waltram, MA, USA
Pipetten 1–10, 10–100, 100–1000, 500–5000µl	Eppendorf AG; Hamburg

Pipettierhilfe Pipetus® 100–240 Volt	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG; Eberstadt
Rüttelplatte Mini Rocking Platform	Biometra GmbH; Göttingen
Schüttler REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
Schüttler TPM-2	Sarstedt AG & Co.; Nümbrecht
Scintillationsmesssystem LS 6500	Beckman-Coulter; Krefeld
Semi-dry Blotter Multiphor II	Pharmacia LKB; Uppsala, Schweden
Sterilbank Laminar Flow, Modell 6.12 S	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH; Sonnenbühl-Genkingen
Sterilisator UL50	Memmert GmbH & Co. KG; Schwabach
Stickstoffbehälter Cryogenie GT40 IATA-BVT N°1039/147	Air Liquide Kryotechnik GmbH; Düsseldorf
Thermomixer compact	Eppendorf AG; Hamburg
Ultraschall Processor Vibra Cell™	Sonics & Materials Inc.; Danbury, USA
Vakuum Filtrationseinheit	Millipore; Schwalbach
Vakuumpumpe VNC1	Vacuubrand GmbH & Co. KG; Wertheim
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG; Zürich, Schweiz
Vortex Heidolph REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG; Schwabach
Waage Mettler Feinwaage H54AR/9	Mettler Toledo GmbH; Gießing
Waage Sartorius excellence E200D	Sartorius GmbH; Göttingen
Wasserbad 3047	Köttermann Labortechnik; Ketze-Hänigsen
Wasserbad VWR B2 18	VWR; Erlangen
Zellhomogenisator Kinematica® 8/EU 9452	Bachofer; Reutlingen
Zentrifuge Eppendorf Centrifuge 5418R	Eppendorf AG; Hamburg
Zentrifuge Mega Star 600R	VWR; Erlangen
Zentrifuge Sorvall RC 6+	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltham, USA

1.2. Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Deckgläser rund Ø 15mm	Paul Mariefeld GmbH & Co. KG; Lauda-Königshofen
Einmalküvetten Halbmikro PS 1,6 ml	Kuhnle GmbH; Karlsruhe
Filterpapier Blotting papers, grade 556, Whatman™	Cytiva Europe GmbH; Freiburg im Breisgau
Frischhaltefolie	Cofresco Frischhalteprodukte GmbH & Co. KG; Minden
Glaspasteurpipetten	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindlingen-Arnhofen
Immobilon-FL PVDF Membran 0,45µM	Merck GmbH; Schwalbach
Mikroglasfilterpapier (Glass-Mikrofibre Discs grade MGB)	Munktell & Filtrak GmbH; Bärenstein
Objektträger Mikroskop-Objektträger	VWR; Erlangen
Parafilm „M“® Laboratory film	Pechiney Plastic Packaging; Chicago, IL., USA
PCR-Einzelgefäße mit angehängtem Deckel 0,2 ml (781300)	Brand GmbH & Co. KG; Wertheim
Pipettenspitzen 1-2/10-100/100- 1000/500-5000 µl	Eppendorf AG; Hamburg
Safe-Lock Tubes 1,5/2,0 ml	Eppendorf AG; Hamburg
Schraubtubes 1,5/2,0 ml (APEX® Screwcap Microcentrifugation Tubes)	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindling-Arnhofen
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	Josef Peske GmbH & Co. KG; Aindling-Arnhofen
Spritzenvorsatzfilter Sartorius Minisart NML	Sartorius Stedim Biotech GmbH; Göttingen
Zellkultur Schalen Ø 100 mm	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zellkultur Testplatten 6/12/24 Well	TPP®; Trasadingen, Schweiz
Zellkulturflaschen mit Filterkappen 25/75/125 cm ²	VWR; Erlangen
Zentrifugenröhrchen PP 15/50 ml	TPP®; Trasadingen, Schweiz

1.3. Zellen, Zellkulturmedien, Additive

Produkt	Abkürzung	Hersteller
Dimethylsulfoxid	DMSO	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium DMEM with 4,5 g/L glucose, with L-Glutamine, with sodium pyruvate	DMEM	VWR; Erlangen
Dulbecco's phosphatgebufferte Salzlösung (DPBS)	PBS	VWR; Erlangen
Fetales Kälberserum	FKS	PAA Laboratories GmbH; Cölbe
Geneticindisulfat	G418	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Humane embryonale Nierenepithelzellen	HEK293	DSMZ; Braunschweig
Penicillin und Streptomycin Solution 100X	P/S	Anprotec; Bruckberg

1.4. Chemikalien

Produkt	Abkürzung	Hersteller
[³ H]Diprenorphin		Hartmann Analytik GmbH, Braunschweig
Agarose Basic		AppliChem GmbH; Darmstadt
Ammoniumpersulfat	APS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Ampicillin Natriumsalz		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Bovines Serumalbumin Albumin Fraktion V ≥98%	BSA	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Buprenorphin-HCl	Bup	Merck GmbH; Schwalbach
Butorphanoltartrat	But	Merck GmbH; Schwalbach
Cu(II)-Sulfat	CuSO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Na ₂ HPO ₄	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Diprenorphin		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Dithiotreitol	DTT	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Eisessigsäure	CH ₃ CO ₂ H	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen

Ethylendiaminessigsäure (Na ⁺ -EDTA)	EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Fentaylcitrat	Fen	Merck GmbH; Schwalbach
Glycin		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kaliumchlorid	KCl	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat	KH ₂ PO ₄	Merck GmbH; Schwalbach
LB-Agar (Lennox)		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
LB-Medium (Lennox)		Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Levomethadon-HCl	Levo	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	Merck GmbH; Schwalbach
N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-Ethansulfonsäure)	HEPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin	TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Naloxon HCl	NaI	Merck GmbH; Schwalbach
Natriumcarbonat	Na ₂ CO ₃	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumchlorid	NaCl	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	NaH ₂ PO ₄	E. Merk; Darmstadt
Natriumdodecylsulfat	SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	NaHPO ₄	Merck GmbH; Schwalbach
Natriumhydroxid	NaOH	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Poly-L-Lysin Hydrobromid 70000-15000	PLL	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Salzsäure rauchend, 37%	HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
TRIS Base	Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe

Tween-20		Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
U50, 488	U50	Merck GmbH; Schwalbach
U69, 593		Merck GmbH; Schwalbach
ϵ -Aminocapronsäure	EACA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen

1.5. Puffer

Bezeichnung	Abkürzung/ pH Wert	Zusammensetzung
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
Elektrophoresepuffer (SDS-Gelelektrophorese)		Tris 0,025 M Glycin 0,2 M SDS 0,003 M Aq. bidest
Homogenisierungs-Puffer	HB-light pH = 7,4	Tris 5 mM EGTA 1 mM DTT 1 mM Aq. bidest
Kathodenpuffer (Western Blot)	pH = 7,6	E-Amino-n-Capronsäure 2,6 g MeOH 100 ml Aq. bidest. 400 ml
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
Lowry Reagenz A		CTC 10 ml NaOH 0,8M 10 ml 5% SDS 20 ml
Lowry Reagenz B		Folin-Reagenz 1ml Ad. bidest. 6 ml
PB-Puffer 0,1M	pH = 7,4	NaH ₂ PO ₄ x 8H ₂ O 0,075 M NaHPO ₄ x H ₂ O 0,025 M Aq. bidest 1000 ml

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.
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 5 mM	pH = 7,4	Tris 5mM 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
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

1.6. Gebrauchsfertige Substanzen und Lösungen

Produkt	Hersteller
6 x DNA Loading Dye	Fermentas GmbH ; St. Leon-Rot
Ampuwa®	Fresenius Kabi AG; Bad Homburg
Biotinylated Molecular Weight Marker mol wt 6,500-180,000 Da	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
Canine cDNA Hippocampus Best. Nr. DG-201	Firma Zyagen; San Diego, CA, USA
CloneJET PCR Cloning Kit Best. Nr. K1231	Thermo Fisher Scientific Inc. ; Waltram, MA, USA
Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics GmbH; Penzberg
dNTP Set 100 mM Solutions	Fermentas GmbH; St. Leon-Rot
DPX Mounting Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen

Expressionsvektor pcDNA3.1(+) Best. Nr. V79020	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA
Folin-Ciocalteu's Phenol Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
GenLadder 100bp +1.5kbp ready to use Best. Nr. AC-GN-00128	Anprotec; Bruckberg
jetPrime® Kit Best. Nr. 89129-920	VWR; Erlangen
JM109 Competent Cells Best. Nr. L2005	Promega GmbH; Walldorf
Normales Ziegenserum	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
NoStain™ Protein Markierungsreagenz	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA
NotI 10u/µl	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA
NucleoBond® Xtra Midi Plus 740412.50	Macherey und Nagel, GmbH & Co. KG; Düren
OmniPur® EGTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH; Taufkirchen
peqGOLD Gel Extraction Kit Best. Nr. 12-2501-02	VWR; Erlangen
Pfu-DNA-Polymerase	Promega GmbH; Mannheim
Primer	Eurofins; Ebersberg
Probenpuffer nach Lämml 2xKonzentrat	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Roti®-GelStain ready-to-use	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Rotiblock® Blockierungsreagenz für Western Blot und ELISA	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1) 30% Acrylamidstammmlösung mit 0,8% Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
Rotiszint® eco plus LSC-Universalcocktail	Carl Roth GmbH & Co. KG; Karlsruhe
SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling Technology; Frankfurt am Main
T4-DNA-Ligase	Promega GmbH; Mannheim
Taq Polymerase	Fermentas; Waltham, MA, USA
XbaI 10u/µl	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA

Zamboni Fixierlösung	Morphisto GmbH; Offenbach
----------------------	---------------------------

1.7. Antikörper

Antikörper	Zielantigen	Spezies	Hersteller
@HA-Tag	HA	Kaninchen	Eigene Herstellung
@Rabbit IgG HRP Conjugate 1 mg/ml (W401B29303402)	IgG	Ziege	Promega; Madison, USA
@Rabbit IgG Alexa Fluor 405	IgG	Ziege	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA
@WGA Alexa Flour 647	N-acetylglucosamine und N-acetylneuraminsäure	/	Thermo Fisher Scientific Inc.; Waltram, MA, USA
@pERK 1/2	pERK 1/2	Kaninchen	Cell Signaling Technology; Frankfurt am Main

2. Klonierung der caninen Opioidrezeptoren

2.1. Strategie und Template

Als Template wurde eine cDNA-Bibliothek aus dem Hippocampus eines männlichen Beagles von der Firma Zyagen, San Diego, CA, U.S.A., Best. Nr. DG-201, verwendet. Im Vergleich zu anderen Ausgangsmaterialien bietet diese den Vorteil, dass nur die kodierenden Bereiche der DNA vorliegen. Die Sequenz in der Genbibliothek ist somit deutlich komprimierter als das Gesamtgenom beispielsweise aus lysiertem Gewebe als Ausgangsmaterial. Für die Klonierung der Opioidrezeptoren ist der Hippocampus bestens geeignet, da dort alle Opioidrezeptoren exprimiert sind [83].

In der NCBI-Datenbank befand sich eine hypothetische Sequenz der caninen MOR und KOR (XM_014112874.1). Durch das Design von spezifischen Primern, die an beiden Seiten der Zielsequenzen ansetzen, konnten diese in der Polymerase-Kettenreaktion gezielt amplifiziert werden. Die Primer wurden mit Hilfe des NCBI Primer-Blast Tools unter Zuhilfenahme publizierter Sequenzen des Mäusegenoms (*Mus musculus*; txid10090) auf das annotierte Genom vom Hund (*Canis lupus familiaris*; txid9615) angepasst.

Die Opioidrezeptoren wurden zunächst mithilfe der cDNA-Bibliothek kloniert und in den Vektor pJET 1.2 (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA, Best. Nr. K1231) eingebracht. Dieser wurde vervielfältigt und als Template für eine PCR mit Primern genutzt, welche die Rezeptorsequenz um ein HA-Tag (YPYDVPDYA) und jeweils eine Schnittstelle für Restriktionsenzyme erweitern. Diese PCR-Produkte wurden anschließend in den eukaryotischen Expressionsvektor pcDNA 3.1(+) (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA, Best. Nr. V79020) eingebracht, vervielfältigt, sequenziert und zum Transfizieren der Zellen genutzt.

2.2. Rezeptor Klonierung mittels PCR

2.2.1. GAPDH PCR

Zur Integritätsprüfung der cDNA-Bibliothek wurde diese zunächst auf das *house-keeping*-Gen GAPDH getestet [84]. Die verwendeten Primer, der PCR-Ansatz und die

Amplifikationsbedingungen sind in den Tabelle 2 bis Tabelle 4 aufgeführt, die erwartete Fragmentlänge liegt bei 101bp:

cGAPDH_fwd	GGC ACA GTC AAG GCT GAG AAC
cGAPDH_rev	CCA GCA TCA CCC CAT TTG AT

Tabelle 2: Primer für die canine GAPDH-PCR.

10x Taq Puffer	5 μ l
Taq Polymerase	0,5 μ l
dNTP's 10mM	1 μ l
cGAPDH_fwd (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	1 μ l
cGAPDH_rev (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	1 μ l
Canine cDNA Hippocampus (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	1 μ l
PCR H ₂ O	40,5 μ l

Tabelle 3: Ansatz GAPDH-PCR.

Vorzyklus	96°C	3 min	} 30x
Denaturierung	94°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	55°C	1 min	
Amplifikation	72°C	1 min	
Reaktionsabbruch	72°C	3 min	

Tabelle 4: Programm GAPDH-PCR.

2.2.2. Primer und Rezeptor-Klonierung

Nach der erfolgreichen Integritätsprüfung der cDNA-Bibliothek wurden die Rezeptoren mit den folgenden Primerpaaren, Ansätzen und Programmen kloniert:

cMOR_fwd	AGA CGC GTG GAA CCT GAA AA
cMOR_rev	TTA GGG CAA TGG AGA AGTT TCT G
cKOR_fwd	ATG GAG TCC CCG GTC CAG A
cKOR_rev	GCT TCC ACT GAC CTG GGT G

Tabelle 5: Primer für die Klonierung der caninen OPRs.

10 x Pfu Puffer mit Magnesium	5 μ l
Pfu Polymerase	0,5 μ l
dNTP's 10mM	1 μ l
Primer_fwd (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	1 μ l
Primer_rev (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	1 μ l
Canine cDNA Hippocampus (1:10 verdünnt in PCR H ₂ O)	2,5 μ l
PCR H ₂ O	39 μ l

Tabelle 6: Ansatz PCR-Klonierung canine OPRs.

Vorzyklus	96°C	3 min	} 30x
Denaturierung	94°C	1 min	
Primer- Hybridisierung	55°C	1 min	
Amplifikation	72°C	2 min	
Reaktionsabbruch	72°C	5 min	

Tabelle 7: Programm PCR-Klonierung canine OPRs.

Die erwartete Fragmentlänge des cMOR beträgt 1206 bp, während die des cKOR 1143 bp beträgt.

2.2.3. Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe der vervielfältigten Fragmente aus der PCR zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1,8 % Agarosegel hergestellt. Hierfür wurde folgende Rezeptur verwendet:

Agarose	0,9 g
TAE-Puffer	50 ml
Roti®GelStain	3,5 μ l

Tabelle 8: Herstellung eines 1,8 % Agarosegels.

Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst und aufgeköcht, bei einer Temperatur < 70°C mit Roti®GelStain versetzt und in den Gelschlitten gegossen. Es wurde ein Kamm eingesetzt,

um Probenaschen vorzubereiten. Nach dem Aushärten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt und diese mit TAE-Puffer aufgefüllt. Für ein besseres Ergebnis, vor allem bei längeren Auftrennzeiten, wurden 5 µl Roti®GelStain pro 100 ml Laufpuffer hinzugegeben.

Von den PCR-Produkten wurden je 20 µl mit 4 µl *6x loading dye* vermischt und in eine Probenasche gegeben. Zusätzlich wurde eine 100 bp +1,5kbp DNA-Leiter als Längenstandard (Anprotec, Bruckberg, Best. Nr. AC-GN-00128) aufgetragen. Die Elektrophorese lief bei 80 V für 45 Minuten und das Gel wurde anschließend unter UV-Licht (312 nm) ausgewertet.

2.2.4. Aufreinigung der PCR-Produkte

Wurde in der Agarose-Gelelektrophorese eine Bande in erwarteter Länge nachgewiesen, folgte eine Extraktion der entsprechenden Bande aus dem Gel. Diese wurde mittels eines Skalpells unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und gemäß der Anleitung des peqGold Gel Extraction Kits (VWR, Erlangen; Best. Nr. 12-2501-02) aufgereinigt. Hierbei wird zunächst das Gelstück, welches die DNA enthält, gelöst. Das entstandene Lysat wird auf einer Zentrifugationssäule gebunden, gewaschen und anschließend mit Aqua bidest. aus der Säule gelöst.

Die Sequenzierung der Proben wurden bei der Firma MWG-Eurofins (Ebersberg) in Auftrag gegeben.

2.3. Vektorklonierung in den pJET 1.2

Der pJET 1.2 ist ein *blunt end*-Klonierungsvektor, der sich zur Klonierung von PCR-Produkten ohne Schnittstellen eignet. Enthalten ist eine Domäne mit einem letalen Restriktionsenzym, das *E. coli*-Bakterien abtötet. Diese wird durch den Einbau des PCR-Produktes zerstört, so dass nur solche Klone wachsen, die ein Insert besitzen. Außerdem besitzt der Vektor eine Ampicillin-Resistenz für die Selektion auf Agarplatten sowie im Flüssigmedium.

2.3.1. Ligation in pJET 1.2

Für die Ligation wurde das CloneJET PCR Cloning Kit verwendet. Folgender Ansatz wurde pipettiert:

PCR-Produkt	1 μ l
pJET blunt	1 μ l
2x Reaktionspuffer	10 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
PCR H ₂ O	7 μ l

Tabelle 9: Ansatz für die Ligation von PCR-Produkten in pJET 1.2.

2.3.2. Transformation

In einer Hitzeschocktransformation werden kompetente *E. Coli*-Bakterien genutzt, um das fertige Plasmid zu vervielfältigen. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben und dadurch eine Ampicillin-Resistenz besitzen, werden zunächst auf einer LB-Agarplatte mit Ampicillin und anschließend in einem ampicillinhaltigen Flüssigmedium selektiv inkubiert.

Kompetente *E. coli* des Stammes JM109 (Promega, Walldorf, Best. Nr. L2005) wurden zum Taupunkt gebracht und mit 5 μ l des Ligationsansatzes versetzt. Das Reaktionsgefäß wurde 20 min auf Eis vorinkubiert, 45 Sekunden bei 42°C erhitzt und sofort wieder auf Eis gestellt. Es wurden 400 μ l kaltes LB Medium zupipettiert und alles zusammen 2 min auf Eis gelagert, bevor die Suspension 1 h bei 37°C schüttelnd inkubiert wurde. Auf einer LB Agarplatte mit 50 μ g/ml Ampicillin wurden 200 μ l des Ansatzes unverdünnt und 1:10 verdünnt ausgestrichen und in Anwesenheit einer Negativkontrolle über Nacht bei 37°C inkubiert.

Bei erfolgreicher Negativkontrolle am nächsten Tag wurde von einer der Platten (je nach Dichte) eine gut isolierte Kolonie gewählt, diese mit einer Pipettenspitzen aufgenommen, und in LB Medium mit 50 μ g/ml Ampicillin über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.3.3. Aufreinigung der Plasmide

Die Übernachtskultur wurde bei 5000 x g für 15 min zentrifugiert und gemäß der Anleitung mit dem Xtra Midi Plus Kit von Machery und Nagel (Düren, Best. Nr.

740412.50) aufgereinigt. Nach einer alkalischen Lyse der Bakterien wird das Plasmid an eine Silicamatrix gebunden und gewaschen. Zur weiteren Aufreinigung wurde die DNA mit Isopropanol gefällt, an eine weitere Silicamatrix gebunden, schlussendlich mit TRIS-Puffer eluiert und in einem sterilem Reaktionsgefäß aufgefangen.

2.4. HA-Tag der Rezeptoren

Um die exprimierten Rezeptoren nachweisen zu können, wurden diese mit einem Haemagglutinin Epitop (HA-Tag) versehen. So ist es möglich, die Rezeptoren mithilfe eines Antikörpers zu markieren, der gezielt auf diesen Tag ausgerichtet ist, ohne dass spezifische Antikörper für die Rezeptoren benötigt werden.

Nach erfolgreicher Sequenzierung folgte eine weitere PCR mit folgendem Primerpaar, Ansatz und Programm:

HA_cMOR_fwd	5' TCT GCGGCCGC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GACAGCAGCTCCGTC
HA_cMOR_rev	TAG TCTAGA TTAGGGCAATGGAGAAGTTTCTG
HA_cKOR_fwd	5' TCT GCGGCCGC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA GAT TAC GCT GAGTCCCCGGTCCAGA
HA_cKOR_rev	TAG TCTAGA GCTTCCACTGACCTGGGTG

Tabelle 10: Primer für die PCR-Verlängerung der caninen OPRs mit dem HA-Tag. Blau die Schnittstellen der Restriktionsenzyme (fwd: NotI, rev: XbaI). Grün die Sequenz des HA-Tag.

Der Ansatz ist analog zu dem in Tabelle 6, als Template diente der ligierte pJet Vektor mit der enthaltenen Rezeptor-DNA in der Verdünnung 1:100. Die Reaktionsbedingungen waren wie folgt:

Vorzyklus	96°C	3 min	} 30x
Denaturierung	94°C	1 min	
Primer-Hybridisierung	60°C	1 min	
Amplifikation	72°C	2 min	
Reaktionsabbruch	72°C	5 min	

Tabelle 11: Programm PCR-Verlängerung der caninen OPRs mit dem HA-Tag.

2.5. Vektorklonierung in das Plasmid pcDNA 3.1(+)

Als eukaryotischer Expressionsvektor wurde das Plasmid pcDNA 3.1(+) verwendet. Es beinhaltet einen CMV-Promoter für eine hochgradige Expression und eine BGH-Domäne, die eine bessere mRNA-Stabilität gewährleistet. Zusätzlich enthält es eine Ampicillin- und eine Geneticin™-Resistenz für das Selektieren der positiven Klone in Flüssigmedium und auf Agarplatten sowie für die spätere Selektion stabil transfizierter Zellen.

2.5.1. Restriktionsverdau

Um ein PCR-Produkt in den Vektor einzubringen, wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *XbaI* geschnitten. Die entsprechenden Schnittstellen am PCR-Produkt wurden schon im Primerdesign berücksichtigt und entsprechend angefügt.

<i>NotI</i>	1 µl
<i>XbaI</i>	1 µl
10 x Reaktionspuffer	2 µl
Vektor	1 µl
PCR H ₂ O	ad 20 µl

Tabella 12: Pipettierschema Restriktiver Enzymverdau.

Der Verdau wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und abschließend 5 min bei 60°C hitzeinaktiviert. Es folgten eine Agarose-Gelelektrophorese (Abschnitt IV2.2.3) und bei erwarteter Fragmentelänge eine Gelextraktion (Abschnitt IV2.2.4).

2.5.2. Ligation

Mit den aufgereinigten PCR-Produkten und den geschnittenen Vektoren wurde eine Ligation angesetzt. Diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei –20°C gelagert.

Ligase	1 μ l
10 x Ligasepuffer	2 μ l
PCR-Produkt	3 μ l
Vektor	1 μ l
PCR H ₂ O	ad 20 μ l

Tabelle 13: Pipettierschema Ligation.

Im Anschluss an die Ligation wurde das Plasmid mittels Hitzeschocktransformation in kompetente Bakterien eingebracht, vervielfältigt (Abschnitt IV2.3.2) und anschließend aufgereinigt (Abschnitt IV2.3.3).

2.5.3. Sequenzierung

Zur Überprüfung der Plasmide und um Punktmutationen auszuschließen wurden die aufgereinigten Proben zum Sequenzieren an die Firma MWG-Eurofins in Ebersberg gesendet. Hierbei wurden die Standardprimer T7 und BGH verwendet. Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte mit dem Programm Geneious (Biomatters Inc., Boston, MA, USA).

3. Zellmodell HEK 293-Zellen

3.1. Zellkultur

Die nachfolgend beschriebenen Versuche wurden mit transfizierten HEK 293 Zellen durchgeführt. Diese werden in der Rezeptorforschung zur transienten und stabilen Expression von eukaryoten Proteinen verwendet [85]. Die Zellen besitzen die Fähigkeit posttranslationale Modifikationen durchzuführen, und sind somit als Zellmodell für die Studie von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren geeignet.

Die Zellen wurden von der *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH* (DSMZ, Best. Nr. ACC 305) bezogen und zweifach passagiert. Hiervon wurden mehrere Zellstocks angelegt und bei einer Temperatur von -198°C gelagert. Diese stehen als P₀-Stämme zur Verfügung und können bei Bedarf aufgetaut werden. Die Zelllinien wurden bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5 % CO₂ inkubiert. Bei Erreichen einer Zelldichte von

70 % erfolgte regelmäßig eine Passagierung im Verhältnis 1:5 und 1:10. Nach maximal 30 Passagen wurden die Zellen verworfen und ein neuer Zellstock der P₀ aufgetaut [85]. Als Nährmedium diente DMEM (*Dulbecco's Modified Egel's Medium*), das mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) sowie 1% Penicillin und Streptomycin ergänzt wurde.

3.2. Stabile Transfektion der HEK 293-Zellen

Um die Vektor-DNA mit den klonierten Rezeptoren in Wildtyp-Zellen einzubringen, wurde das jetPrime[®] Kit von Polyplus (VWR Erlangen, Best. Nr. 89129-920) verwendet. Zunächst wurden 1 x 10⁶ Zellen auf einer 10 cm Petrischale ausgesät und 24 h bei 37°C inkubiert. Von der gewünschten DNA wurden 10 µg in 500 µl JetPrime Puffer verdünnt und 10 Sekunden gevortext. Es wurden 20 µl JetPrime Reagenz zupipettiert und 10 Sekunden gemischt, darauf folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Die am Vortag ausgesäten Zellen wurden aus dem Brutschrank genommen und die Reagenz-DNA-Mischung tropfenweise zugegeben. Die Platte wurde 4 h bei 37°C inkubiert, bevor ein Medienwechsel folgte.

Nach dieser transienten Transfektion der Zellen (Tag 0), wurden die Zellen bis zum Tag 2 weiter kultiviert. Es folgte eine Selektion stabil transfizierter Zellen mit Geneticin[™] (G418) [86]. Nach einem Medienwechsel wurde G418 langsam zugetropft, dabei wurde die Platte vorsichtig geschwenkt. Die Konzentration im Medium betrug zunächst 500 µg/ml. Über einen Zeitraum von 2 bis 4 Wochen, erfolgten regelmäßige Medienwechsel bei Bedarf (z.B. viele tote Zellen, Umschlag des pH-Indikators). Die Konzentration von G418 wurde bei einer geringen Absterberate sukzessive auf bis zu 1.000 µg/ml erhöht.

Das Plasmid pcDNA 3.1(+) enthält unter anderem ein Resistenzgen gegen das Aminoglykosid Geneticin. Nach Zugabe von G418 sterben Zellen, welche die Vektor-DNA entweder nicht aufgenommen haben oder nicht exprimieren. Somit entstehen auf der Petrischale gut zu isolierende Kolonien.

In einer 12-Well-Platte wurde je 1 ml Nährmedium pro Well vorgelegt. Die Klone wurden unter dem Mikroskop lokalisiert und mit einer Pipette in die Platte übertragen. Über einen Zeitraum von 2 bis 3 Wochen wurden einzelne Klone zunächst in der Platte

kultiviert und ab einer Konfluenz ab 70 %, erst in 25 cm²- und anschließend auf 75 cm²-Zellkulturflaschen übertragen.

3.3. Verifikation der stabilen Transfektion

3.3.1. Western Blot

Zum Test der erfolgreichen Transfektion wurde zunächst ein Western Blot mit Zelllysaten der Klone durchgeführt. Es wurden 2×10^5 Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und bei $2200 \times g$ 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zelllysate zweifach mit PBS gewaschen. Hierzu wurden 500 µl PBS in das Tube gegeben, gevortext und erneut abzentrifugiert und dekantiert. Abschließend wurden die Zelllysate mit 250 µl Laemmli Puffer versetzt. Die Proben wurden mittels SDS-Page-Elektrophorese und Western Blot ausgewertet (Abschnitte IV4.2.2, IV4.2.3). Der verwendete primäre Antikörper erlaubt eine spezifische Bindung an den HA-Tag, den die Rezeptoren tragen, und ermöglicht somit eine Aussage darüber, ob der transfizierte Rezeptor im Zelllysat vorhanden sind.

3.3.2. Immuncytochemie

Nachdem einige rezeptorstarke Klone im Western Blot vorselektiert wurden, folgte eine Kontrolle in der Immuncytochemie. Auch hier wurde der HA-Tag an den Rezeptoren verwendet, um eine zuverlässige Aussage darüber zu treffen, ob alle Zellen der Zelllinie die Rezeptoren tragen.

Hierzu wurden Deckgläser in *12-Well-Platten* mit 150 µl einer 100 µg/ml Poly-L-Lysin-Lösung für 5 min inkubiert, nachfolgend zweimalig mit 500 µl PBS gewaschen, und anschließend für mindestens 1h getrocknet. Zellen wurden in einer Dichte von 150.000 Zellen/Well ausgesät und über Nacht bei 37°C in einer 5% CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Am Folgetag wurde die Platte in ein Eisbad gesetzt und das Medium wurde vorsichtig abgenommen. Anschließend wurde die Platte zweimalig mit 500 µl eiskaltem PBS gewaschen und 30 min mit 500µl Zamboni-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Die Präparate wurden dann fünfmalig mit 500 µl PBS gewaschen, 10 min mit 150 µl WGA Alexa-Fluor 647 5 µg/ml lichtgeschützt inkubiert und dreimalig 5 min mit 500 µl PBS

gewaschen. Ab hier folgten alle weiteren Inkubationsschritte lichtgeschützt. Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurden die Präparate 1 h in 500 μ l 3% NGS-haltigem PB-Puffer geblockt. Die Blocklösung wurde abgenommen, 500 μ l des HA-Tag Antikörpers 2 μ g/ml in 1% NGS-haltigem PB-Puffer einpipettiert und 1 h inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 500 μ l PB-Puffer für 5 min wurde Anti-Kaninchen-IgG Alexa Fluor 405 1 μ g/ml in 1 % NGS-haltigem PB-Puffer einpipettiert und für 1 h inkubiert. Die Präparate wurden erneut dreimalig mit 500 μ l PB-Puffer 5 min gewaschen und auf Objektträgern mit *DPX Mounting Medium* eingebettet.

Über Nacht wurden die Präparate im Kühlschrank gelagert und anschließend am konfokalen Mikroskop ausgewertet.

4. Pharmakologische Charakterisierung

4.1. Radioligandenbindung

Die Radioligandenbindung ist die Methode der Wahl zum Nachweis und zur Charakterisierung von Rezeptoren und ihren Liganden. In der vorliegenden Arbeit wurden damit heterologe Verdrängungsexperimente durchgeführt, um die Affinität und Selektivität verschiedener therapeutischer verwendeter Pharmaka an den klonierten caninen Opioidrezeptoren zu bestimmen [87].

4.1.1. Membranpräparation

Zellen aus einer 75 cm²-Zellkulturflasche wurden durch Abklopfen und Abspülen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Reaktionsgefäß übertragen und bei 300 x *g* für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet anschließend bei -20°C gelagert.

Für die Präparation der Membranen wurden die Zellpellets langsam auf Eis aufgetaut und mit 10 ml eiskaltem HB-light-Puffer resuspendiert. Alle weiteren Schritte erfolgten bei 4°C. Mit einem Ultra-Turrax wurden die Zellen für 10 Sekunden homogenisiert und das Zelllysat bei 300 x *g* für 10 min abzentrifugiert, um Zellkerne und nicht aufgebrochene Zellen zu entfernen. Der Überstand wurde in ein *Sorvall-Tube* überführt und bei 20.000 x *g* für 30 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 6 ml TM-Puffer (Bindungspuffer) aufgenommen und der Proteingehalt mittels Lowry Assay bestimmt (wie in Abschnitt 4.1.2 beschrieben).

4.1.2. Proteinbestimmung nach Lowry

Der Assay nach Lowry beruht auf einer Biuretreaktion [88], bei der proteingebundenes Cu(II) zu Cu(I) reduziert wird. Das Cu(I) wiederum reduziert das Folin-Ciocalteu-Reagenz. Dies ermöglicht eine deutlich sensitivere Messung des Proteingehalts als die Bradford-Reaktion [89].

Für den Assay wurde zunächst eine BSA-Standardreihe im Doppelansatz mit den Konzentrationen 0, 25, 50, 75 und 100 µg/ml angelegt. Die zu messenden Proben wurden 1/50 verdünnt und ebenfalls im Doppelansatz vorbereitet. Zu allen Proben und

der Standardreihe wurden je 400 µl Lowry Reagenz A zupipettiert und die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Lowry Reagenz B in jedes Reaktionsgefäß hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 750 nm.

4.1.3. Kompetitiver Bindungsassay mit [³H]Diprenorphin

Für die Verdrängungsexperimente wurde [15,16-³H]Diprenorphin verwendet (Fa. Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Best. Nr. ART1566). Diprenorphin ist sowohl am µ- als auch am κ-Rezeptor ein voller Antagonist [69, 90]. Das radioaktiv-markierte Diprenorphin dient dabei als Tracer und wird im Experiment durch die getesteten Liganden verdrängt. Durch die Messung der verbleibenden Radioaktivität ist es möglich, die Konzentration der gebundenen, unmarkierten Liganden zu ermitteln.

Für den Bindungsassay wurde der Proteingehalt der Membranpräparationen bestimmt und diese auf 625 µg/ml Membranprotein (Endkonzentration im Experiment 100 µg/Tube) mit eiskaltem TM-Puffer eingestellt. Die Kompetitoren wurden in einer Log₁₀-Verdünnungsreihe in den Konzentrationen 10⁻⁵ bis 10⁻¹¹ M vorbereitet. Die Bestimmung erfolgte im Doppelansatz. Die zu untersuchenden Kompetitoren waren Fentanyl, Morphin, Buprenorphin, Butorphanol und Levomethadon. Zusätzlich wurde in jedem Versuch die totale Bindung sowie die maximal mögliche Verdrängung des Radioliganden mit Naloxon (100 µM) bestimmt, da Naloxon an allen Opioidrezeptoren eine sehr hohe Affinität hat.

In je zwei Reaktionsgefäße wurde folgender Ansatz pipettiert, wobei dem basalen Wert zusätzlicher Puffer ohne Kompetitor hinzugegeben wurde:

Kompetitor	20 µl
Membranprotein (625 µg/ml)	160 µl
[³ H]Diprenorphin 1 nM	20 µl

Tabelle 14: Ansatz für den kompetitiven Bindungsassay.

Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert, sodass sich ein Gleichgewicht zwischen Tracer und Kompetitor einstellte. Am nächsten Tag wurden Whatman GF/B

Glasfaserfilter (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, Best. Nr. WHA1822025) für 10 min in 0,1 % PEG-Lösung blockiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem TM-Puffer gestoppt und die Ansätze mit Hilfe der Filter abfiltriert. Die Filter wurden zweimalig mit 5 ml eiskaltem TM-Puffer gewaschen, in Szintillationsgefäße überführt und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (RotiSzint®eco plus; Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Best. Nr. 0016.3) versetzt. Nach einer Equilibrierungszeit von 24 h wurde die Proben im Beta-Counter (Beckman Coulter, LS 6500) gemessen.

4.1.4. Ermittlung der K_d des Radioliganden und der K_i der kompetitiven Liganden

Die Affinität zwischen Ligand und Rezeptor wird durch die Dissoziationskonstante der Kompetitor Bindung K_i beschrieben, wobei ein niedriger Wert von K_i mit einer hohen Affinität der Bindung einhergeht.

Um die Dissoziationskonstante eines Liganden (K_i) zu berechnen, bedarf es nach Cheng and Prussow [91] der Kenntnis der Dissoziationskonstante (K_d) von Diprenorphin an den unterschiedlichen Rezeptoren. In einem kompetitiven Verdrängungsexperiment mit radioaktiv markiertem und unmarkiertem Diprenorphin wurde die Verdrängung des Radioliganden an den Rezeptoren gemessen und anschließend deren K_d mit der Formel nach DeBlasi [92] berechnet. Die Durchführung erfolgte analog zu dem beschriebenen Versuch in Abschnitt IV4.1.3.

$$K_d = IC_{50} - [L]$$

Formel nach DeBlasi für die Berechnung der K_d des Radioliganden

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

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

Formel nach Cheng und Prussow für die Berechnung der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante der Kompetitoren

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

Der negative dekadische Logarithmus der Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (pK_i) wird hierbei üblicherweise verwendet, um die Rezeptoraffinität von verschiedenen Liganden zu vergleichen. Im Gegensatz zum K_i Wert skaliert dieser nicht invers mit der Affinität und typische Werte erstrecken sich nicht über viele Größenordnungen.

Zur Auswertung der Daten und Berechnung der Werte wurde GraphPad PRISM (GraphPad Software Inc, Boston, MA, U.S.A.) genutzt. Mit den Werten wurde eine nicht-lineare Regressionsanalyse durchgeführt, die zur Berechnung der IC_{50} genutzt wurde.

4.2. MAP-Kinase Aktivität

Die extrazellulären, signal-regulierten Kinasen ERK1 (pY44) und ERK2 (pY42) sind Bestandteil des MAPK-Signalweges, einer komplexen und umfangreichen Kaskade in Zellen. Auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren wie Opioidrezeptoren können diesen MAPK-Weg über verschiedene Signalwege aktivieren und eine Phosphorylierung der ERK1/2 induzieren [93]. Am Beispiel des humanen DOR (hDOR) konnte gezeigt werden, dass es zu einer G-Protein-abhängigen, aber auch zu einer Arrestin-abhängigen Phosphorylierung der ERK1/2 kommen kann [94]. In Abhängigkeit von dem gekoppelten G-Protein (G_i , G_q , G_s) werden unterschiedliche Kaskadewege aktiviert [95]. Alle Aktivierungswege führen schlussendlich zu einer Phosphorylierung der ERK1/2, weshalb der MAP-Kinase Assay eine gute Möglichkeit darstellt, um die intrinsische Aktivität von Opioiden an den Rezeptoren zu messen [96].

4.2.1. MAP-Kinase Assay

HEK 293-Zellen wachsen adhärent, lassen sich aber durch Klopfen und Abspülen leicht von ihrem Untergrund lösen. Um dies zu unterbinden, mussten für den Assay zunächst 12-Well-Platten beschichtet werden. In jede Vertiefung wurden 250 µl einer 100 µg/ml Poly-L-Lysin-Lösung gegeben. Diese wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung aspiriert und jedes Well zweimalig mit 500 µl sterilem PBS gewaschen. Die Platte wurde daraufhin mindestens 1 h getrocknet, bis keine Spuren von Flüssigkeit mehr sichtbar waren.

Die Zellsuspension wurde während des Passagierens gezählt und eine Verdünnung von 200.000 Zellen/ml angelegt. Anschließend wurde unter ständigem Schwenken randomisiert 1 ml pro Well in der Platte gesät, und über Nacht im Brutschrank bei 37°C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert.

Am nächsten Tag folgte eine optische Kontrolle am Mikroskop, um ein gleichmäßiges Wachstum sicherzustellen. Die Versuche wurden bei einer Konfluenz von 70–90 % durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen dreimalig mit 500 µl PBS gewaschen. Um ein Ablösen der Zellen zu verhindern wurde der Puffer vorsichtig über den Rand eingegeben. Anschließend wurden die Wells mit 1 ml serumreduziertem Medium (DMEM mit 0,1 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin) befüllt. Die Platte wurde 30 min bei 37°C in einer 5 % CO₂-Atmosphäre inkubiert. Nach der Entnahme aus dem Brutschrank wurde die Platte sofort in ein Eisbad gesetzt.

Die Liganden wurden zunächst in Wasser vorverdünnt und anschließend im Wachstumsmedium verdünnt, so dass ein Mischungsverhältnis von 1:100 von wässriger Lösung zu Medium vorlag. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Liganden betrug bei Morphin 10 µM, bei allen anderen Liganden 1 µM.

cMOR / rMOR	cKOR / hKOR
Fentanyl	U69, 593
Morphin	Morphin
Buprenorphin	Buprenorphin
Butorphanol	Butorphanol
Levomethadon	Naloxon

Tabelle 15: Liganden im MAP-Kinase Assay.

Die Wells wurden je 3-mal mit 500 µl eiskalten DMEH (DMEM + 25 µM HEPES) gewaschen. Hierzu wurde das Medium vorsichtig über den Rand pipettiert und nach vorsichtigem Schwenken wieder aspiriert. Da die Phosphorylierung der ERK1/2 auch durch mechanische Manipulation erfolgen kann [97], ist ein behutsamer Umgang mit der Platte wichtig. In jedes Well wurden 500 µl der vorbereiteten Liganden pipettiert, alle Werte wurden im Doppelansatz erhoben. Auf jeder Platte wurde immer ein Basalwert (Medium ohne Ligand) bestimmt, um in der späteren Auswertung eine Bezugsgröße zu haben. Die Platte wurde 5 min in einem 37°C Wasserbad inkubiert und die Reaktion im Eisbad gestoppt. Die Liganden wurden abgenommen und die Zellen in 250 µl 1x Laemmli Puffer mit 1 mM Natriumorthovanadat solubilisiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Auswertung bei -20°C gelagert.

4.2.2. SDS-PAGE Elektrophorese

Für die Auswertung der phosphorylierten ERK1/2 müssen diese zunächst durch eine Elektrophorese aufgetrennt werden. In der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese wird die Eigenladung der Proteine durch Anlagerung von SDS überdeckt [98], sodass die Auftrennung der Proteine ausschließlich entsprechend ihres Molekulargewichtes erfolgt.

Am Vortag der Elektrophorese wurden Polyacrylamidgele vorbereitet und über Nacht in einer feuchten Kammer bei 4°C vollständig auspolymerisiert. Für die Gelherstellung wurde das Sammelgel gegossen, mit Wasser überschichtet und für 30 min polymerisiert. Das Wasser wurde abgenommen, eine Schicht Trenngel wurde aufgetragen und mit einem Kamm für 15 Probestaschen versehen.

Trenngel 10%	3 Gele	Sammelgel	3 Gele
Aq. bidest	6,1 ml	Aq. bidest	7 ml
1,5 M TRIS; pH: 8,8	3,75 ml	1,25 M TRIS; pH: 6,8	1 ml
10 % SDS	150 μ l	10 % SDS	100 μ l
30 % Rotiphorese Gel	5 ml	30 % Rotiphorese Gel	1,7 ml
TEMED	15 μ l	TEMED	20 μ l
10 % APS	70 μ l	10 % APS	100 μ l

Tabelle 16: Rezepturen zur Herstellung der Western-Blot-Gele.

Die Proben des MAP-Kinase Assays wurden aufgetaut und mit einer Ultraschallsonde 5–10 Sekunden geschallt, um die DNA zu fragmentieren. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 min erhitzt, um intra- und intermolekulare Disulfidbrücken zu zerstören. Die Proben wurden für 10 min bei Raumtemperatur abgekühlt und 5 min bei 2200 x g zentrifugiert.

Die Gele wurden in den Elektrophorese-Schlitten eingespannt, der dann mit Elektrophorese-Puffer befüllt wurde. Der Kamm wurde vorsichtig entfernt und die Taschen wurden mit je 10 μ l einer Probe beladen. In der Elektrophorese-Kammer wurden die Gele mit dem Stromgeber 18 min bei 100 V und 36 min bei 200 V aufgetrennt, bis die Front des Sample Buffers durchgelaufen war.

4.2.3. Western Blot

Zur weiteren Auswertung wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel mittels Semi-dry blotting auf eine PVDF-Membran übertragen. Membranen und Filterpapiere wurden auf die Größe 8 cm x 5 cm zugeschnitten. Die Membranen wurden 45 Sekunden in Methanol aktiviert, 2 min mit Aqua bidest. gewaschen und 3 min in Anode II Puffer equilibriert. Die Filterpapiere wurden in die entsprechenden Puffer eingelegt und mindestens 15 min unter ständigem Schütteln inkubiert.

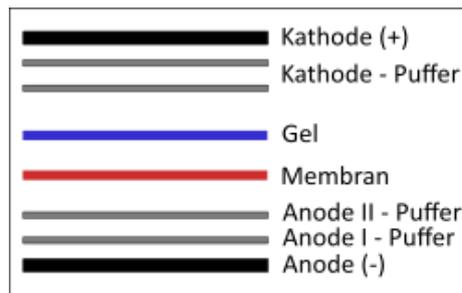


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schichtung eines Semi-dry Blots.

Die Gele wurden aus den Glasplatten gelöst und 5 min in Anode II Puffer equilibriert. Filterpapiere, Membranen und Gele wurden auf dem Bett des Blotters zu einem Turm geschichtet (Abbildung 2) und mit $0,8 \text{ mA/cm}^2$ für 60 min geblottet. Vor und während des Proteintransfers ist es wichtig, dass die Membranen nicht austrocknen, da dies zu einem hohen Hintergrundrauschen führen kann.

Für die spätere Auswertung wurde No-Stain™ der Fa. Thermo Fisher Scientific Inc. genutzt (Best. Nr. A44717), um die Proben basierend auf dem Proteingehalt zu normalisieren. Das Markierungsreagenz bindet kovalent an Lysin-Seitenketten und kann durch UV-Licht (312 nm) sichtbar gemacht werden. Dies ermöglicht eine zeitgleiche Auswertung des Totalproteins sowie der zu untersuchenden Bande mit spezifischen Antikörpern über die *Enhanced Chemiluminescence* (ECL). Für die quantitative Auswertung des Western Blots ist diese Methode besonders geeignet, da weder Strippen, ein Neuauftrag der Proben, noch der deutlich verschobene lineare Bereich von Housekeeping-Proteinen eine Fehlerquelle darstellen können [99, 100].

Für die Färbung wurden für eine Membran 10 ml 1 x No-Stain™ labeling Buffer verdünnt und dieser mit je $10 \mu\text{l}$ No-Stain™ Activator und $10 \mu\text{l}$ No-Stain™ Derivatizer versetzt. Die Membranen wurden zweimalig mit 20 ml Aqua bidest. gewaschen und 10 min in der vorbereiteten No-Stain™-Lösung unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden diese dreimalig mit 20 ml Aqua bidest. gewaschen und für 30 min unter ständigem Schütteln in 10 ml 1x Roti®-Block inkubiert. Zu diesem Zeitpunkt kann der Blot mit UV-Licht beleuchtet werden, um den vollständigen Proteintransfer zu bestätigen.

Der primäre Antikörper pERK1/2 wurde 1:2000 in TBS/T verdünnt und mit 0,1 % BSA zur Stabilisierung der Antikörper versehen. Die Membranen wurden mit der

Antikörperlösung über Nacht bei 4°C inkubiert und am nächsten Tag dreimalig mit 20 ml TBS/T gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, Anti-Kaninchen-IgG-POX. Dieser wurde 1:5000 in TBS/T verdünnt und ebenfalls mit 0,1 % BSA versetzt. Die Proben wurden erneut dreimalig mit TBS/T gewaschen und danach entwickelt.

Von SignalFire™ ECL Reagent A und B wurden je 2 ml gemischt, der Blot aus der Waschlösung genommen und mit dem ECL-Reagenz bedeckt. Nach einer zweiminütigen Inkubationszeit wurde die Transfermembran aus der Lösung genommen und auf die Platte des Fusion SL (Vilber Deutschland GmbH, Eberhardzell) gelegt und mit Frischhaltefolie bedeckt, um ein Austrocknen der Membran zu verhindern. Zuerst wurde ein Bild mit dem ECL-Signal aufgenommen. Die Folie wurde danach entfernt und die Membran mit UV-Licht belichtet, um ein Bild des Totalproteins zu generieren.

Zur Auswertung und Normalisierung der Bilder wurde die Software Image Lab der Fa. Bio Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, verwendet.

1.2. Rezeptorklonierung

Abbildung 4 zeigt die PCR-Produkte der klonierten *cOPRK1* und *cOPRM1* aus der hippocampalen cDNA eines männlichen Beagles. Zur Überprüfung der Integrität der cDNA-Bibliothek wurde die canine GAPDH (101 bp) als sogenanntes „Housekeeping Gene“ mit amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,8 % Agarosegel aufgetrennt, um kürzere Fragmente von den kompletten Rezeptoren abzutrennen. Schatten von solchen kürzeren Fragmenten sind in der Laufspur des *cOPRM1* zu sehen und wurden im Weiteren dadurch eliminiert, dass ausschließlich die Bande mit der richtigen Länge in eine Gelextraktion isoliert wurde.

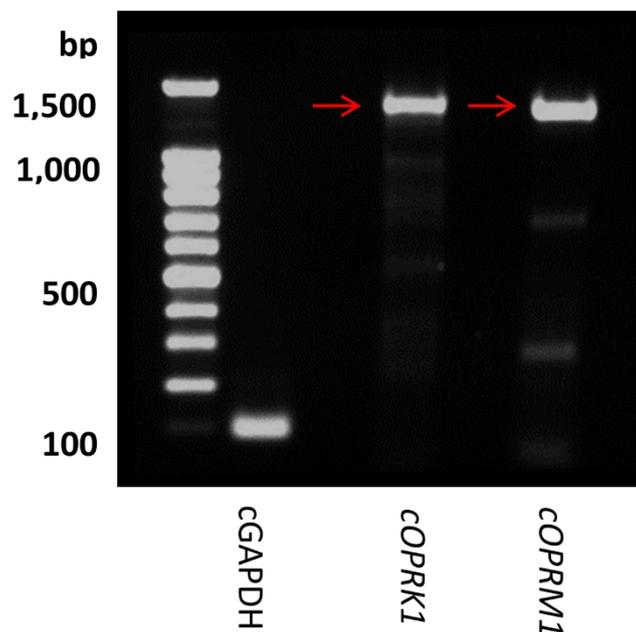


Abbildung 4: Darstellung der PCR-Fragmente in der Gelelektrophorese. Die Amplifikate wurden in einem 1,8% Agarosegel aufgetrennt und mit UV-Licht (312 nm) abgelichtet. Die roten Pfeile markieren den *cOPRM1* (1206 bp) und den *cOPRK1* (1143 bp). Zur Überprüfung der Integrität wurde auf das Vorhandensein von caniner GAPDH (101 bp) getestet.

1.3. Speziespezifische Unterschiede der Opioidrezeptoren

Mit den gewonnenen Daten der Sequenzierung lassen sich Sequenzvergleiche der Primärstruktur der Rezeptoren anfertigen. Hierbei weisen canine MOR und KOR ~60% Übereinstimmungen in ihrer translatierten Primärsequenz auf. Mithilfe der hinterlegten Daten aus der GenBank lässt sich dies mit anderen Spezies wie Mensch, Ratte und Pferd vergleichen. Auch bei diesen Spezies zeigt sich eine ähnliche Übereinstimmung der

MOR- und KOR-Sequenzen. Die größten Unterschiede liegen jeweils in den N- und C-terminalen Bereichen. Die transmembranen Domänen, die auch an der Ausbildung der Pharmakophore beteiligt sind, unterscheiden sich dagegen weniger stark (Abbildung 5).

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die caninen Rezeptoren mit dem KOR des Menschen und dem MOR der Ratte verglichen, da diese beiden Vergleichsrezeptoren bereits in vielen publizierten Studien hinreichend untersucht und charakterisiert wurden.

Die Primärsequenz des MOR der Ratte und des Hundes sind zu ~94 % identisch. Der größte Unterschied liegt auch hier im N-terminalen Bereich. Im Bereich der transmembranen Domänen I bis VII (TMI bis TMVII) finden sich zwei unterschiedliche Aminosäuren. Der C-Terminus unterscheidet sich in drei Aminosäuren (Abbildung 6, links).

Der KOR des Menschen und des Hundes stimmen zu ~93 % überein. Auch hier liegen die größten Unterschiede im N-Terminus. Der Bereich zwischen TMI und TMVII weist fünf Aminosäuren auf, welche nicht übereinstimmen. Der C-Terminus unterscheidet sich darüber hinaus an vier weiteren Positionen (Abbildung 6, rechts).

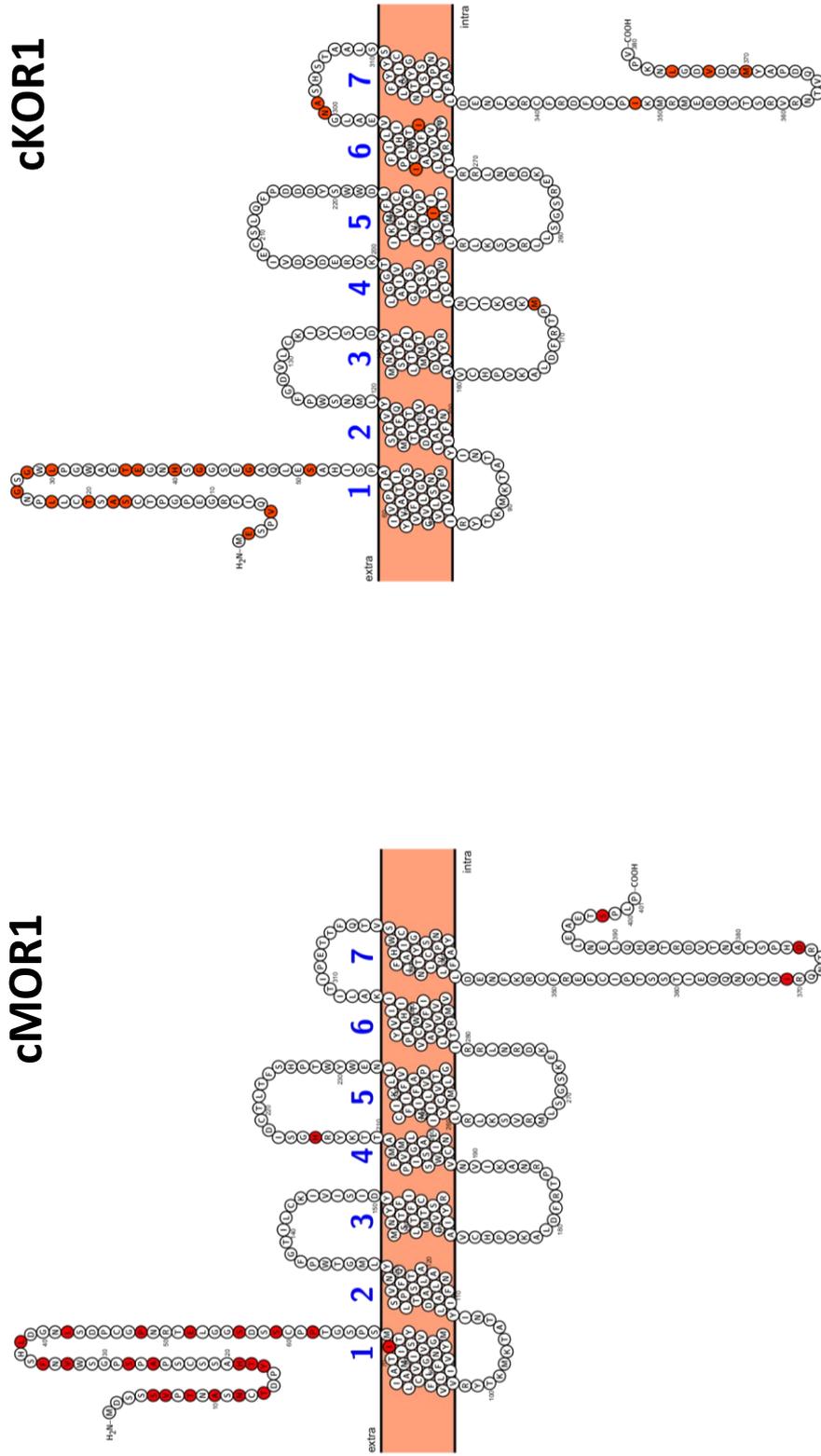


Abbildung 6: Snake plot des caninen MOR (links) und KOR (rechts).

Die einzelnen transmembranen Domänen sind mit 1 - 7 bezeichnet. Aminosäuren sind mit dem single letter code dargestellt. Die für den Hund im Vergleich zum Mensch / zur Ratte spezifischen Aminosäuren sind in Rot eingezeichnet. Erstellt mit dem Online-Tool Protter [1].

2. Stabile Transfektion der Zellen

Die stabil transfizierten Zellen wurden in der Immuncytochemie auf den Einbau von den Rezeptoren geprüft. Hierzu wurden von einigen Klonen ein Präparat angefertigt und dieses großflächig unter dem Mikroskop gesichtet. Eine beispielhafte Aufnahme ist der Abbildung 7 zu entnehmen.

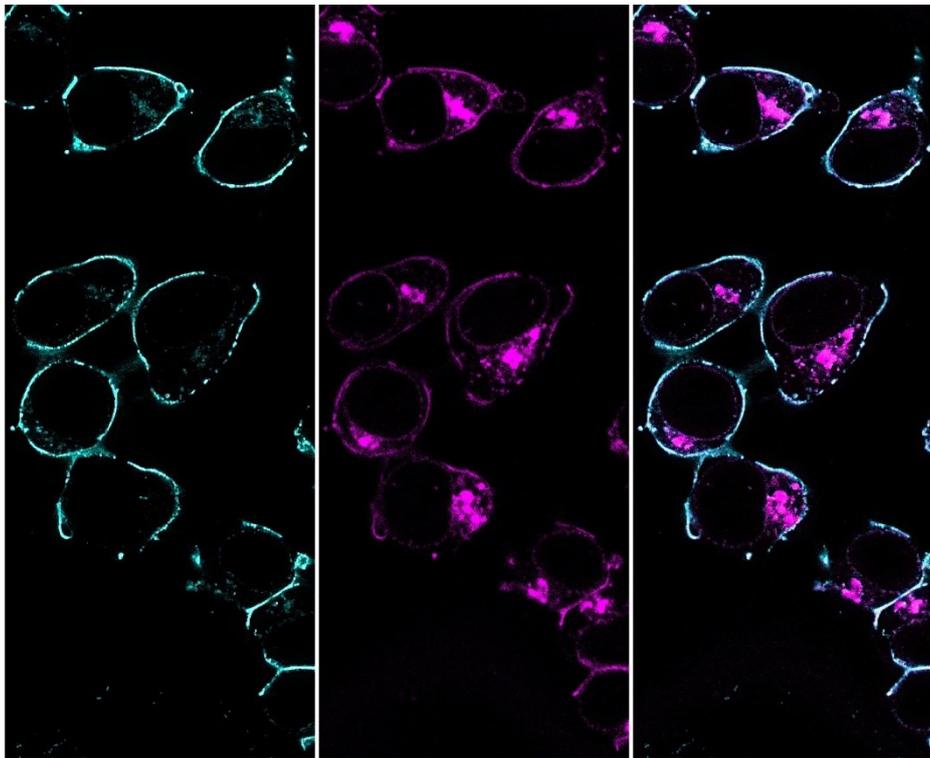


Abbildung 7: Konfokales Bild von stabil rMOR exprimierenden Zellen. Links in blau dargestellt, sind Rezeptoren, die von einem HA-Tag Antikörper markiert wurden. In der Mitte in pink sind die angefärbten Zellmembranen sichtbar. Das rechte Bild zeigt die Überlagerung der beiden Kanäle.

3. Pharmakologische Charakterisierung



Abbildung 8: Modell der pharmakologischen Charakterisierung von Liganden an den Opioidrezeptoren

3.1. Rezeptoraffinität und Selektivität

Die speziesspezifischen Besonderheiten in der Primärstruktur der Rezeptoren wurden im nächsten Schritt auf ihre Auswirkung auf die Selektivität und Affinität von Opioidanalgetika getestet. In heterologen Bindungsexperimenten mit [³H]Diprenorphin als Radiotracer wurden Membranen aus HEK293-Zellen, die stabil die relevanten Rezeptoren exprimieren getestet. Die cMOR und cKOR exprimierenden Zellen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit generiert. Die rMOR und hKOR exprimierenden Zellen standen in der Arbeitsgruppe bereits zur Verfügung.

Für die Berechnung der pK_i und damit der Affinität der einzelnen Opioidanalgetika an den Rezeptoren mussten zunächst die jeweiligen Dissoziationskonstanten (K_d) von Diprenorphin in homologen Verdrängungsexperimenten erarbeitet werden. Anschließend wurden die Liganden in heterologen Verdrängungsexperimenten getestet, und der pK_i Wert wurde errechnet.

Es wurden die Affinitäten der vier am häufigsten in der Tiermedizin eingesetzten Opioidanalgetika Morphin, Levomethadon, Buprenorphin und Butorphanol bestimmt. Für den MOR wurde zusätzlich der selektive Agonist Fentanyl, für den KOR der experimentelle Agonist U50, 488 [65] mitbestimmt.

3.1.1. Fentanyl

Fentanyl ist ein selektiver, voller Agonist am MOR. Wie aus (Abbildung 9) ersichtlich, verdrängt Fentanyl die Bindung von [³H]Diprenorphin am cMOR und rMOR monophasisch mit gleicher Steigung und einer vergleichbaren IC₅₀. Fentanyl besitzt also an beiden Rezeptoren eine einzige hochaffine Bindungsstelle mit einer vergleichbaren Affinität. An cKOR und hKOR ist die Bindungsaffinität von Fentanyl so klein, dass sie innerhalb der Sensitivität des Tests nicht bestimmt werden konnte, was jedoch die hohe Selektivität der Bindung an MOR über KOR unterstreicht.

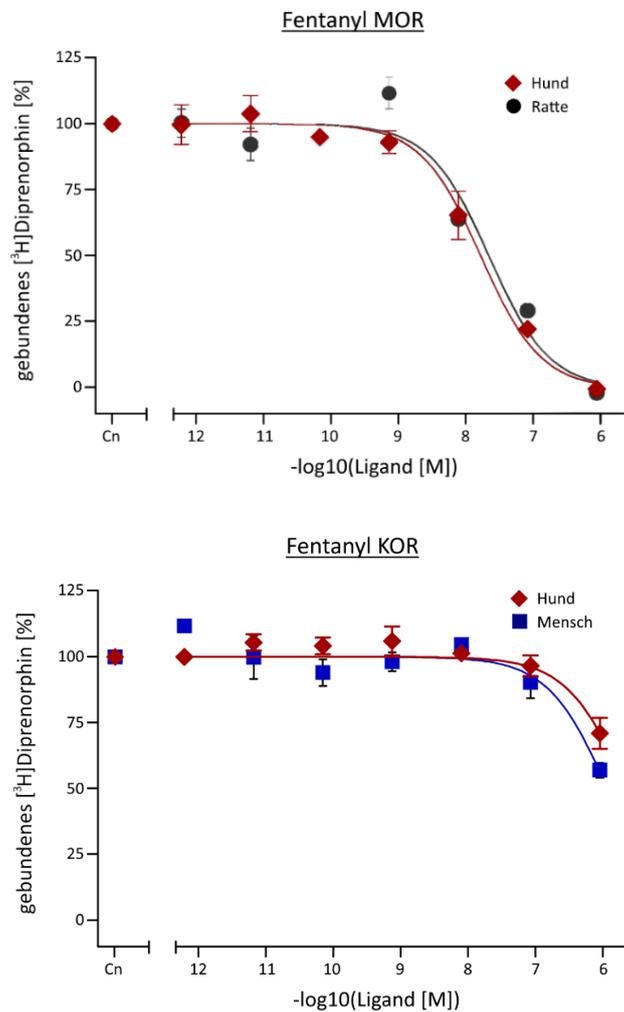


Abbildung 9: Heterologe Verdrängung mit Fentanyl von [³H]Diprenorphin mit steigenden Konzentrationen an Fentanyl am MOR (oben) und KOR (unten). Die Negativkontrolle wurde abgezogen und die Wertewurden auf die maximale Bindung von [³H]Diprenorphin (100%) bezogen. Die Daten vom Hund sind in Rot, die von der Ratte am MOR sind in Schwarz und die des Menschen am KOR in Blau dargestellt.

3.1.2. Morphin

Morphin ist ein nicht-selektiver Agonist, der sowohl an den KOR als auch an den MOR jedoch in unterschiedlichen halbmaximalen Konzentrationen bindet. Seine Affinität ist am cMOR im Vergleich zum cKOR um einen Faktor von 63 größer, während der Unterschied zwischen rMOR und hKOR nur bei einer Größenordnung liegt. Dies liegt daran, dass Morphin am cMOR eine deutlich höhere Affinität als am rMOR aufweist: Die Verdrängungskurve von [³H]Diprenorphin, verläuft beim cMOR flacher als beim rMOR und weist auf die Anwesenheit von unterschiedlichen Bindungsstellen von Morphin am cMOR hin (Abbildung 10).

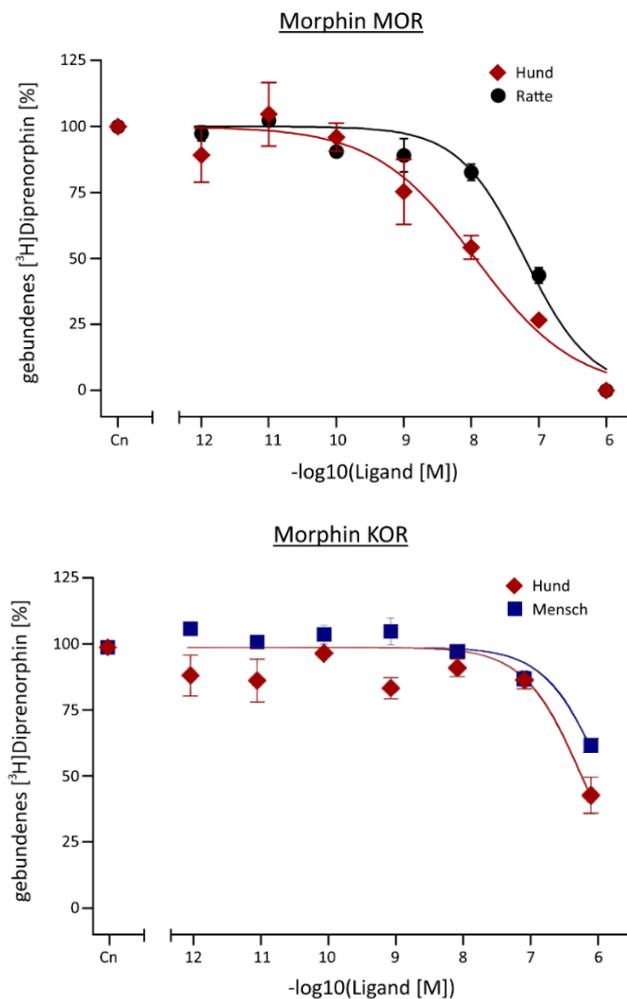


Abbildung 10: Heterologe Verdrängung mit Morphin von [³H]Diprenorphin mit steigenden Konzentrationen an Morphin am MOR (oben) und KOR (unten). Die Negativkontrolle wurde abgezogen und die Werte wurden auf die maximale Bindung von [³H]Diprenorphin (100%) bezogen. Die Daten vom Hund sind in Rot, die von der Ratte am MOR sind in Schwarz und die des Menschen am KOR in Blau dargestellt.

3.1.3. Butorphanol

Butorphanol wird beim Menschen als partieller Agonist am MOR und KOR mit einer in etwa vergleichbaren Affinität zu beiden Rezeptortypen klassifiziert. Am caninen MOR konnten wir dagegen eine um den Faktor 10 höhere Affinität zum cMOR als zum rMOR nachweisen, während seine Affinität zum cKOR im Vergleich zum hKOR marginal niedriger ist (

Abbildung 11).

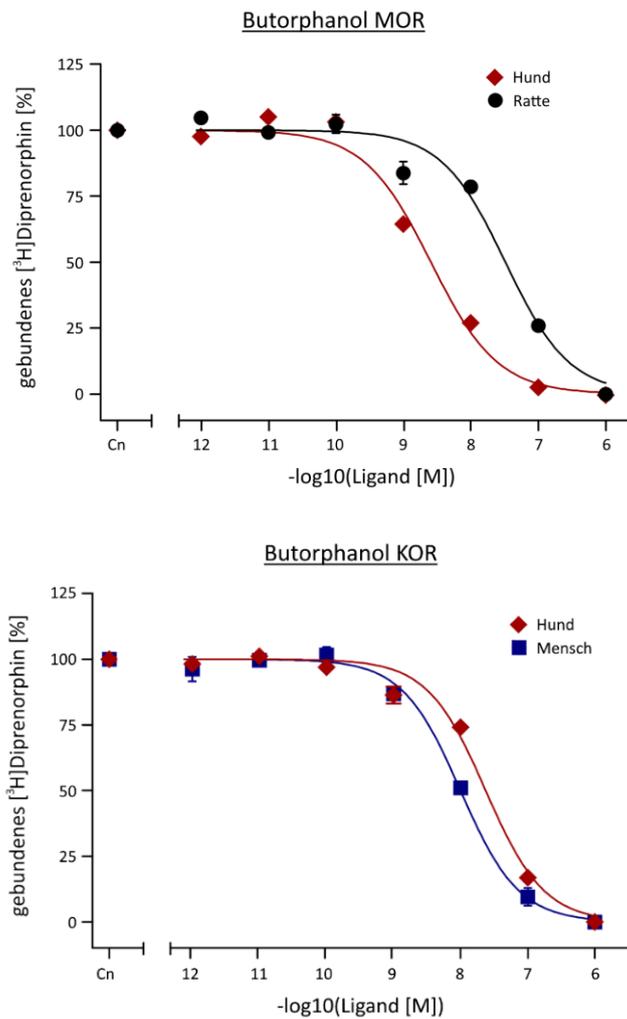


Abbildung 11: Heterologe Verdrängung mit Butorphanol von [³H]Diprenorphin mit steigenden Konzentrationen an Butorphanol am MOR (oben) und KOR (unten). Die Negativkontrolle wurde abgezogen und die Werte wurden auf die maximale Bindung von [³H]Diprenorphin (100%) bezogen. Die Daten vom Hund sind in Rot, die von der Ratte am MOR und des Menschen am KOR in Schwarz dargestellt.

3.1.4. Buprenorphin

Buprenorphin wird beim Menschen als partieller Agonist am hMOR und als Antagonist am hKOR beschrieben. Am cMOR weist Buprenorphin eine dem hMOR vergleichbare biphasische Verdrängungskurve auf, die auf einen hoch- und niederaffinen Rezeptorzustand hinweist. Nachdem sich mindestens die Hälfte aller Rezeptoren in einem niederaffinen Zustand befinden, sind unter den gewählten experimentellen Bedingungen messbar beide Gruppen sichtbar [92]. Für die Beurteilung der funktionellen Aktivität eines Rezeptors wird die hochaffine, G-Protein-gekoppelte Bindungsstelle verwendet.

Die Verdrängungskurve von Buprenorphin am hKOR nimmt ebenfalls einen biphasischen Verlauf ein, auch wenn die hochaffine Bindungsstelle eine geringere Kapazität aufweist. Im Vergleich dazu weist die Verdrängungskurve am cKOR einen einphasigen Verlauf mit einer weitaus höheren halbmaximalen Konzentration auf. Dies weist darauf hin, dass Buprenorphin am KOR des Hundes im Vergleich zum Rezeptor des Menschen nur eine hochaffine Bindungsstelle erkennt.

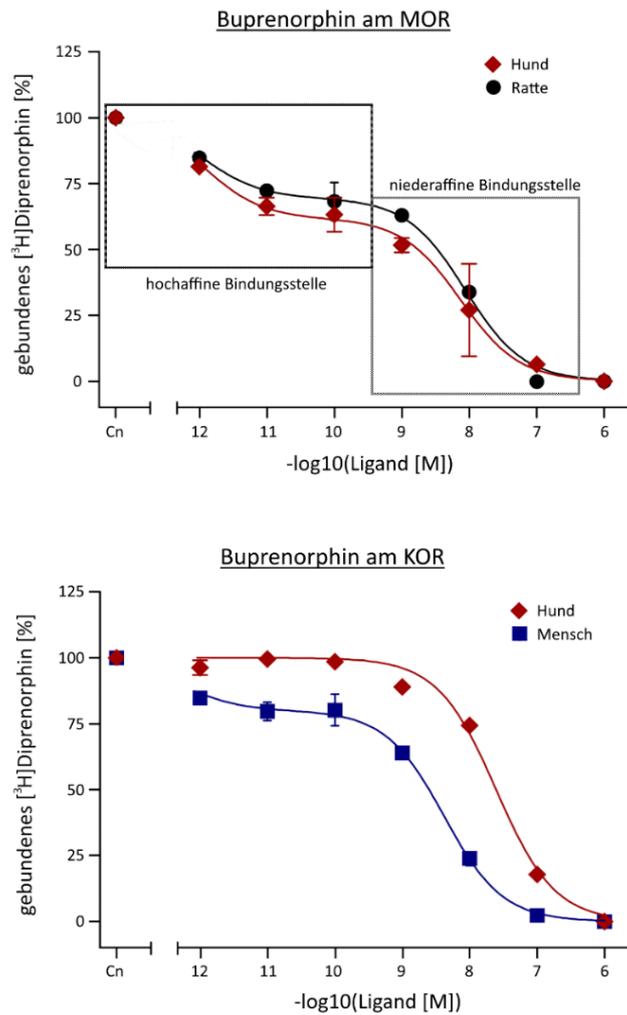


Abbildung 12: Heterologe Verdrängung mit Buprenorphin von [³H]Diprenorphin mit steigenden Konzentrationen an Buprenorphin am MOR (oben) und KOR (unten). Die Negativkontrolle wurde abgezogen und die Werte wurden auf die maximale Bindung von [³H]Diprenorphin (100%) bezogen. Die Daten vom Hund sind in Rot, die von der Ratte am MOR und des Menschen am KOR in Schwarz dargestellt.

3.1.5. Levomethadon

Levomethadon besitzt eine hohe Affinität gegenüber dem MOR der Ratte. In therapeutischer Dosierung stellt Levomethadon daher einen selektiven MOR-Agonisten dar. Wie in Abbildung 13 dargestellt, weisen die Verdrängungskurven keinen Unterschied zwischen cMOR und rMOR auf und zeigen eine vergleichbare Affinität. Die monophasischen Verdrängungskurven mit gleicher Steigung weisen hier zudem auf die Anwesenheit einer einzigen hochaffinen Bindungsstelle in den stabil transfizierten HEK293-Zellen hin. An cKOR und hKOR ist die Bindungsaffinität von Levomethadon so klein, dass sie innerhalb der Sensitivität des Tests nicht bestimmt werden konnte, was jedoch die hohe Selektivität der Bindung an MOR über KOR unterstreicht.

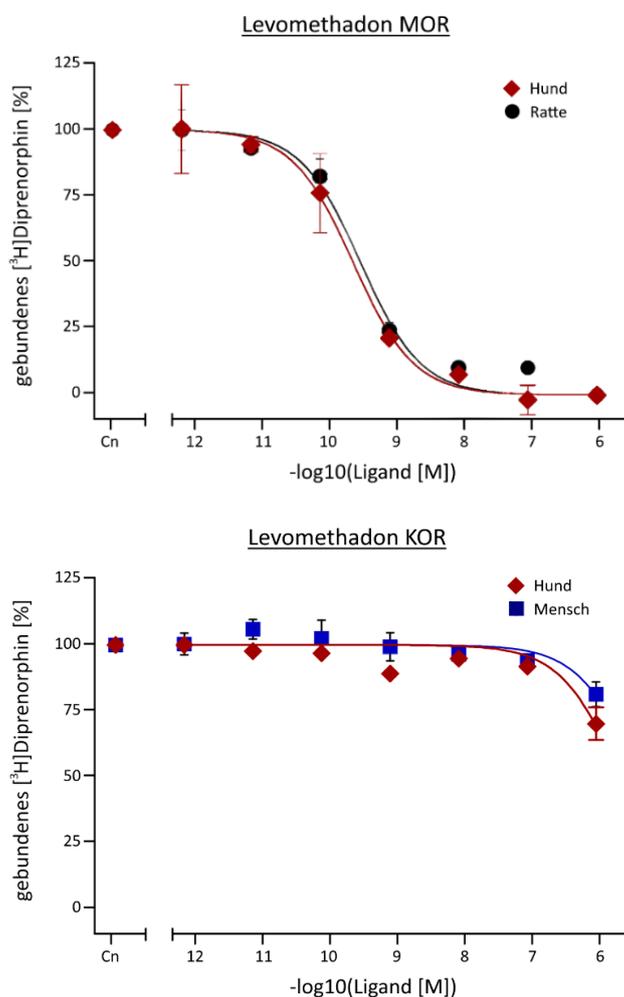


Abbildung 13: Heterologe Verdrängung mit Levomethadon von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin mit steigenden Konzentrationen an Levomethadon am MOR (oben) und KOR (unten). Die Negativkontrolle wurde abgezogen und die Werte wurden auf die maximale Bindung von $[^3\text{H}]$ Diprenorphin (100%) bezogen. Die Daten vom Hund sind in Rot, die von der Ratte am MOR sind in Schwarz und die des Menschen am KOR in Blau dargestellt.

6.1.6. Zusammenfassung der Bindungsdaten

Die aus den Bindungsexperimenten ermittelten halbmaximalen inhibitorischen Konzentrationen wurden anhand der Dissoziationskonstanten von Diprenorphin an den jeweiligen Rezeptoren des Hundes, des Menschen und der Ratte entsprechend der Formel von Cheng und Prussow in inhibitorische Konstanten umgerechnet, die in Tabelle 17 zusammengefasst sind.

Rezeptor	³ [H]Diprenorphin K _D (nM)	U50,488	Morphin	Buprenorphin	Butorphanol	Levomethadon
		pK _i				
cKOR	1.4 ± 0.4	8.5 ± 0.1	6.4 ± 0.1	7.6 ± 0.1	7.8 ± 0.1	< 5
hKOR	1.3 ± 0.2	9.1 ± 0.1	6.2 ± 0.1	12.6 ± 0.1*	8.3 ± 0.1	< 5

Rezeptor	³ [H]Diprenorphin K _D (nM)	Fentanyl	Morphin	Buprenorphin	Butorphanol	Levomethadon
		pK _i				
cMOR	1.7 ± 0.2	7.8 ± 0.1	8.2 ± 0.1	12.7 ± 0.1*	8.7 ± 0.1	9.5 ± 0.1
rMOR	1.7 ± 0.2	7.8 ± 0.1	7.4 ± 0.1	12.2 ± 0.1*	7.7 ± 0.1	9.9 ± 0.1

*Tabelle 17: Vergleich der pK_i-Werten von therapeutisch eingesetzten Opioiden und Darstellung der Dissoziationskonstanten von [³H]Diprenorphin an den unterschiedlichen Zelllinien. Die Affinitäten, die sich bei den caninen Rezeptoren unterscheiden sind rot hervorgehoben. *: Bezieht sich auf die hoch-affine Bindungsstelle.*

3.2. Intrinsische Aktivität

In der vorliegenden Arbeit wurde die intrinsische Aktivität im MAP-Kinase Assay bestimmt. Dabei wurden alle experimentellen Werte im Doppelansatz bestimmt und dreifach wiederholt.

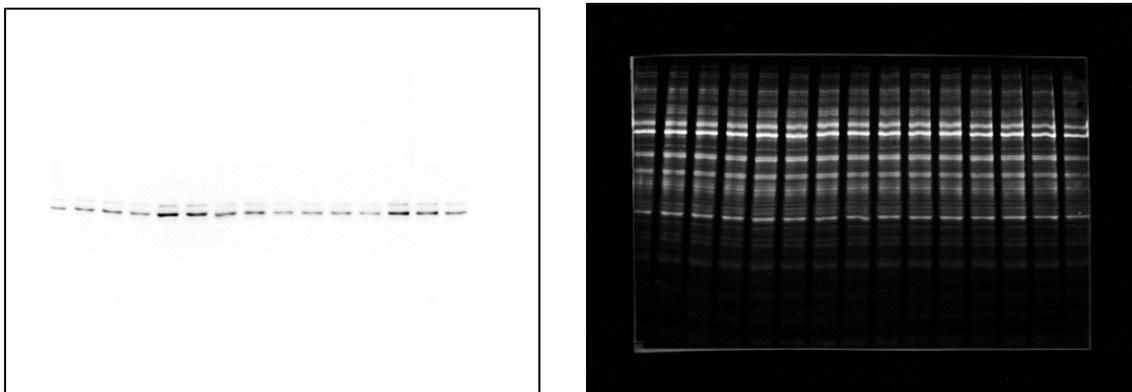


Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung eines Western Blots für die Bestimmung der Aktivierung der ERK1/2 in stabil cMOR exprimierenden HEK293-Zellen. Links abgebildet ist das ECL Signal des pY44/42 Antikörpers nach Vorbehandlung der Zellen mit unterschiedlichen Opioiden. Rechts abgebildet die Proteinfärbung mit NoStain, aufgenommen unter UV-Licht (312 nm).

Für die Auswertung wurden die Banden der ERK 1 und 2 zusammengefasst und mit dem Programm ImageLab der Fa. Biorad Laboratories GmbH (ImageLab Software, Hercules, CA, USA) ausgewertet. Dazu wird die Fläche unter der Kurve eines Signals ausgelesen und anhand der Proteinbanden normalisiert. Der basale Mittelwert wurde abgezogen und alle Werte auf den Mittelwert eines vollen Agonisten (Fentanyl für MOR [69], U69, 593 für KOR [102]) bezogen.

Die so erhobenen Daten wurden mit dem Programm Origin (Origin Lab Inc., Northampton, MA, U.S.A.) statistisch ausgewertet. Dabei wurde zunächst mittels des Shapiro-Wilk-Tests ($\alpha=0.05$) auf Normalverteilung getestet, was bei allen Datensets gegeben war. Danach wurden die Daten mit einem One-Way-ANOVA mit post hoc Tukey Test weiter ausgewertet. Hierbei werden die Daten auf ihre Varianz getestet und die Gruppen unter Einbezug der Varianz miteinander verglichen. Die Interpretation der Daten wurde mit Hilfe des p -Wertes vorgenommen. Eine Werteverteilung wird hierbei als signifikant anders zu einer anderen angenommen, wenn $p < 0,05$ liegt. Die Ergebnisse dieser Auswertung sind graphisch in Abbildung 15 bis Abbildung 18 dargestellt und

finden sich in Tabelle 18 (p-Wert) und Tabelle 19 (Mittelwert). Hier lassen insbesondere die ermittelten p-Werte eine differenzierte Interpretation zu [103].

	rMOR	cMOR	cKOR	hKOR
Fentanyl/U69 593	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-6}$	0	$1,8 \times 10^{-9}$
Morphin	$3,2 \times 10^{-6}$	$4,4 \times 10^{-4}$	$3,3 \times 10^{-7}$	$5,9 \times 10^{-6}$
Buprenorphin	$9,7 \times 10^{-3}$	0,90	0,29	$1,3 \times 10^{-3}$
Butorphanol	$5,2 \times 10^{-3}$	0,54	$2,4 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-6}$
Levomethadon	$3,1 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-7}$	–	–
Naloxon	–	–	$1,6 \times 10^{-3}$	$5,2 \times 10^{-8}$

Tabelle 18: Gruppenvergleich der p-Werte der MAP-Kinase-Aktivität unterschiedlicher Opioidagonisten und -antagonisten verglichen mit nicht stimulierte Zellen nach dem post hoc Tukey Test.

	rMOR	cMOR	cKOR	hKOR
basal	0,0% ± 2,7%	0,0% ± 4,5%	0,0% ± 1,9%	0,0% ± 4,1%
Fentanyl/U69, 593	100% ± 5,4%	100,0% ± 2,1%	100,0 % ± 3,8%	100,0% ± 4,3%
Morphin	77,1% ± 6,6 %	70,0% ± 7,1%	83,9% ± 11,1%	73,0% ± 3,7%
Buprenorphin	43,1% ± 4,1%	14,8% ± 4,7%	24,1% ± 4,8%	50,9% ± 2,8%
Butorphanol	45,9% ± 6,8%	24,4% ± 7,2%	105,6% ± 12,7%	78,5% ± 6,9%
Levomethadon	96,8% ± 16,1%	113,4% ± 21,7%	–	–
Naloxon	–	–	49,1% ± 7,2%	93,0% ± 16,8%

Tabelle 19: Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) der MAP-Kinase Aktivität durch die Opioidagonisten und -antagonisten bezogen auf Fentanyl (MOR) und U69, 593 (KOR) nach der One-Way-ANOVA.

Unter Einbeziehung der aus der Literatur entnommenen Klassifizierung der Liganden am MOR der Ratte und KOR des Menschen wurden die in dieser Dissertation erhobenen p-Werte und Mittelwerte genutzt, um die intrinsische Aktivität der therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika an den caninen Opioidrezeptoren zu beschreiben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst:

	rMOR	cMOR	cKOR	hKOR
Fentanyl/ U69, 593	volle Aktivität	volle Aktivität	volle Aktivität	volle Aktivität
Morphin	starke partielle Aktivität	starke partielle Aktivität	starke partielle Aktivität	starke partielle Aktivität
Buprenorphin	mittlere partielle Aktivität	keine Aktivität	geringe partielle Aktivität	mittlere partielle Aktivität
Butorphanol	mittlere partielle Aktivität	keine Aktivität	volle Aktivität	starke partielle Aktivität
Levomethadon	volle Aktivität	volle Aktivität	-	-
Naloxon	-	-	mittlere partielle Aktivität	volle Aktivität

Tabelle 20: Zusammenfassung der intrinsischen Aktivitäten der verschiedenen Opioidrezeptoren.

3.2.1. Intrinsische Aktivitäten der Opioidanalgetika am cMOR

Im MAP-Kinase Assay zeigten Fentanyl und Levomethadon am cMOR eine volle intrinsische Aktivität. Buprenorphin und Butorphanol dagegen weisen keine statistisch signifikante Aktivität am Rezeptor verglichen mit nicht-stimulierten Zellen auf. Morphin zeigt mit 70,0 % \pm 7,1 % der Fentanyl-Aktivität dagegen eine starke partielle Aktivität (Abbildung 15).

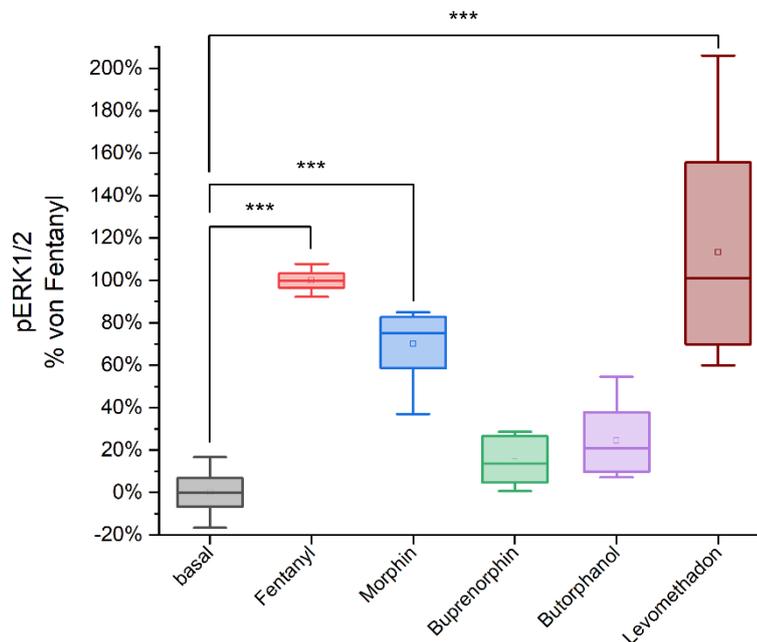


Abbildung 15: Intrinsische Aktivität am MOR des Hundes der verschiedenen Opioidanalgetika, bestimmt im MAP-Kinase Assay an stabil mit dem cMOR transfizierten Zellen. Die intrinsischen Aktivitäten von Fentanyl, Morphin und Levomethadon unterscheiden sich signifikant von unstimulierten Zellen (basal). Morphin zeigt beim Hund eine starke partielle Aktivität, die 70,0 % \pm 7,1 % der maximalen Rezeptoraktivität aufweist. Buprenorphin und Butorphanol weisen keine intrinsische Aktivität auf. ***: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,001$.

3.2.2. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am rMOR

Im MAP-Kinase Assay an Zellen, die den rMOR stabil exprimieren, zeigen Fentanyl und Levomethadon volle Aktivität, während Morphin im Vergleich ein Aktivitätslevel von $77,1 \% \pm 6,6 \%$ aufweist. Buprenorphin und Butorphanol zeigen eine partielle Aktivität von $43,1 \% \pm 4,1 \%$ bzw. $45,9 \% \pm 6,8 \%$. (Abbildung 16).

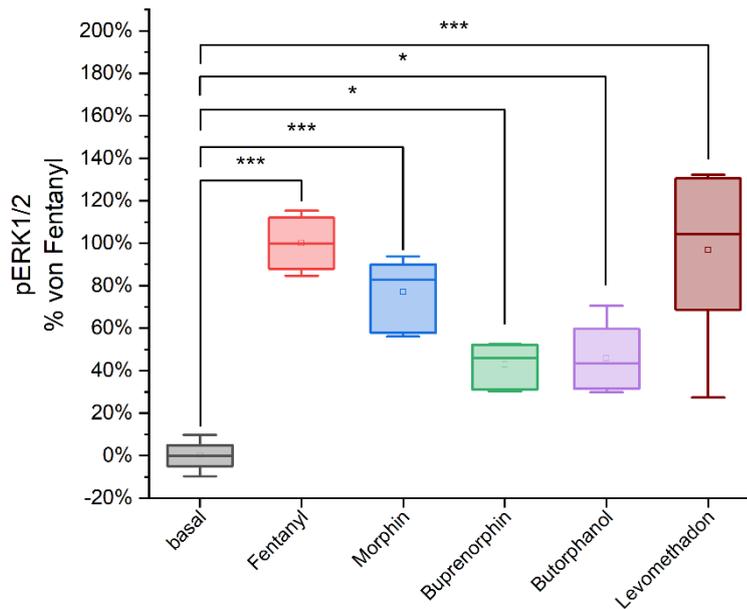


Abbildung 16: Intrinsische Aktivität am MOR der Ratteder verschiedenen Opioidanalgetika, bestimmt im MAP-Kinase Assay. Fentanyl, Morphin, Buprenorphin, Butorphanol und Levomethadon weisen im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (basal) eine signifikante intrinsische Aktivität auf. Dabei weisen Morphin, Buprenorphin und Butorphanol eine partielle, Fentanyl und Levomethadon eine volle Aktivität auf. *: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,05$; ***: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,001$.

3.2.3. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am cKOR

Im MAP-Kinase Assay wurde bei U69, 593 und Butorphanol volle Aktivität beobachtet. Morphin zeigt dagegen eine etwas geringere Aktivität als U69, 593 und kann den Rezeptor zu $83,9\% \pm 11,1\%$ aktivieren. Naloxon zeigt in diesem System eine mittelstarke partielle Aktivität von $49,1\% \pm 7,2\%$, während Buprenorphin eine sehr schwache Aktivität von $24,1\% \pm 4,8\%$ aufweist (Abbildung 17).

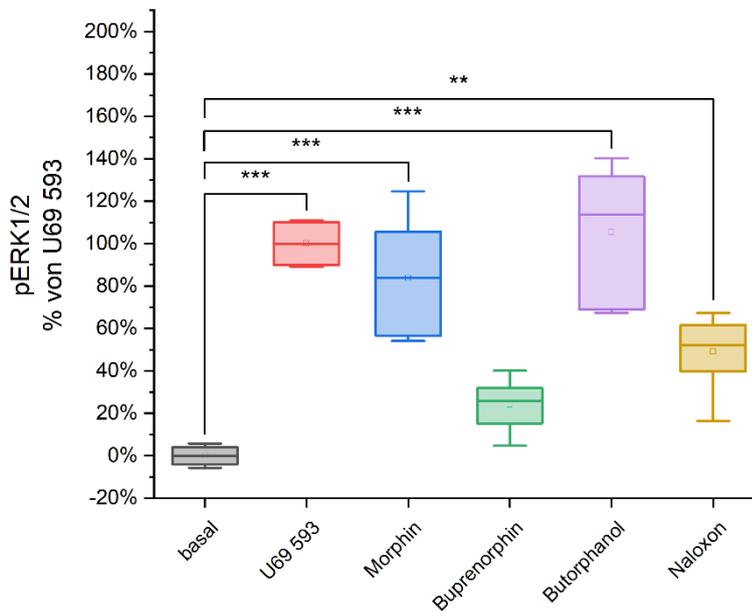


Abbildung 17: Intrinsische Aktivität am KOR des Hundes der verschiedenen Opioidanalgetika, bestimmt im MAP-Kinase Assay Fentanyl, Morphin, Butorphanol und Naloxon weisen eine signifikante intrinsische Aktivität (basal) im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf. **: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,01$; ***: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,001$.

3.2.4. Intrinsische Aktivität der Opioidanalgetika am hKOR

Im MAP-Kinase Assay an stabil den hKOR exprimierenden Zellen weisen U69, 593 und Naloxon eine volle intrinsische Aktivität auf. (Abbildung 18) Morphin (73,0 % \pm 3,7 %) und Butorphanol (78,5 % \pm 6,9 %) zeigen eine starke partielle Aktivität, und Buprenorphin eine mittlere partielle Aktivität (50,9 % \pm 2,8 %).

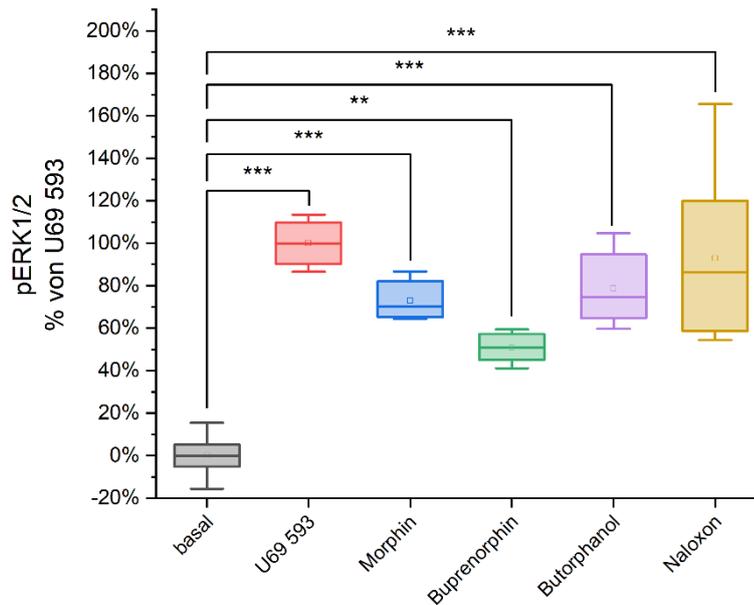


Abbildung 18: Intrinsische Aktivität am KOR des Menschen der verschiedenen Opioidanalgetika, bestimmt im MAP-Kinase Assay. Morphin, Buprenorphin, Butorphanol und Naloxon weisen im MAK Assay eine statistisch signifikante intrinsische Aktivität im Vergleich zu nicht-stimulierten Zellen (basal) auf. **: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,01$; ***: signifikant unterschiedlich bei $p < 0,001$.

3.3. Ligandenprofile von Opioidanalgetika an caninen Opioidrezeptoren

Weder die Rezeptoraffinität noch das separat betrachtete Aktivierungsprofil allein gibt eine Auskunft über die funktionelle Aktivität eines Liganden am Rezeptor. Ein Ligand kann etwa an einen Rezeptor binden, ihn aber nicht aktivieren. Durch seine Bindung ist er dann ausschließlich in der Lage, endogene Liganden oder exogene Arzneistoffe an der Bindung zu blockieren. Man spricht in diesem Fall von kompetitiven Antagonisten. Andererseits kann ein Ligand auch durch die Bindung zur Aktivierung eines Rezeptors führen. Diese kann so stark ausgeprägt sein, dass der Rezeptor maximal aktiviert wird, was einen vollen Agonisten charakterisiert. Ein Ligand kann aber auch einen Rezeptor nur teilweise aktivieren, in diesem Fall spricht man von partiellen Agonisten.

Damit können aus den hier erhobenen Daten individuelle Ligandenprofile für die therapeutisch verwendeten Opioidanalgetika beim Hund erstellt werden. Die Selektivität wird dabei als Quotient der Affinitäten an den unterschiedlichen Rezeptortypen bestimmt.

	Selektivität cMOR/cKOR	Intrinsische Aktivität		Klassifikation
		cMOR	cKOR	
Fentanyl	> 1,000	voll	–	voller μ -Agonist
Morphin	63	partiell	partiell	partieller μ -/ k-Agonist
Buprenorphin	125,000	keine	partiell	μ -Antagonist/ partieller k-Agonist
Butorphanol	8	keine	voll	μ -Antagonist/ k-Agonist
Levomethadon	> 50,000	voll	–	voller μ -Agonist

Tabelle 21: Ligandenprofile der getesteten Opiode an den caninen Opioidrezeptoren.

VI Diskussion

1. Klonierung und molekulare Charakterisierung der caninen

Opioidrezeptoren

Die caninen *OPRM1* und *OPRK1* wurden aus einer hippocampalen cDNA-Bibliothek kloniert und die annotierten Sequenzen wurden in der GenBank hinterlegt (MOR: KP676946.1; KOR: KP676947.1) und mit anderen Spezies verglichen.

In den letzten Jahren wurden bereits die Genome des Pferdes [6, 104], des Hundes [105], des Schweines [106], der Katze [107, 108] und des Rindes [109] entschlüsselt und automatisch annotiert. Dies sollte die Klonierung orthologer Gene erleichtern. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich jedoch, dass die publizierten Genome unvollständig sind. Dies wurde auch in einer vorangegangenen Arbeit zur Klonierung der equinen Opioidrezeptoren beobachtet [110]. In beiden Fällen fehlten den hypothetischen Gensequenzen (*predicted Sequences*) wesentliche Abschnitte, die zunächst für eine erfolgreiche Klonierung ergänzt werden mussten. Dies betrifft vermutlich auch weitere, noch nicht klonierte Opioidrezeptoren. Beispielsweise ist die aktuell in der GenBank hinterlegte predicted Sequence des MOR der Katze (XM_019831412.2) mit 1861 bp angegeben, was nicht zur Länge bereits validierten Opioidrezeptoren anderer Spezies passt.

Die molekularen Grundlagen der Opioidwirkung ist seit Jahren Gegenstand intensiver Untersuchungen, da die Ursachen stoffspezifischer Wirkunterschiede und chronischer Opioidwirkungen nach wie vor unbekannt sind. Die Identifikation von Splicevarianten und Rezeptormutationen sowie die Aufklärung der Kristallstrukturen der inaktiven und aktiven Rezeptorkonformationen haben dabei wesentliche Hinweise auf die Bedeutung einzelner Aminosäuren für die Rezeptorfunktion und Opioidwirkung geliefert. Dies führte zur Entwicklung neuer Opioidanalgetika mit besserem Nebenwirkungsprofilen [111-113]. Die klinische Veterinärpharmakologie kann hierbei einen wesentlichen Beitrag zur Aufklärung der Struktur/Wirkungsbeziehung von Opioidrezeptoren liefern. Durch die Kenntnis tierartlicher Besonderheiten in der Arzneimittelwirkung kann gezielt nach Variationen in der Rezeptorstruktur gesucht werden, die hierfür verantwortlich sein können. Mit Aufklärung der Primärsequenz und der funktionellen Charakterisierung

der caninen Opioidrezeptoren wurde ein erster Schritt im sogenannten vom „Phänotyp zum Genotyp“ Ansatz geleistet.

Wesentlich für die Interpretation der vorliegenden Ergebnisse ist, dass bisher noch keine Splicevarianten bei den Opioidrezeptoren des Hundes beschrieben wurden. Für den *OPRM1* des Menschen wurden bisher insgesamt 12 C-terminale Varianten, 1 N-terminale Variante und je 4 Varianten mit trunkierter transmembraner Domäne 1 oder 6 beschrieben, die unterschiedliche funktionelle Eigenschaften aufweisen [114]. Darüber hinaus existieren unzählige *single nucleotide Polymorphisms* (SNP), die mit verschiedenen Krankheitszuständen und Unterschieden in der Arzneimittelwirkung assoziiert wurden [115]. Beim Hund existiert lediglich eine Studie, in der die genomische Struktur des *OPRM1* bei 75 verschiedenen Hunden untersucht und einzelne SNP's nachgewiesen wurden [4]. Splicevarianten sind bisher nicht bekannt.

In der Pharmakokinetik sind umfangreiche rasse- und speziesspezifische Polymorphismen bekannt, die meist einen Einfluss auf die Wirkdauer eines Arzneistoffes besitzen. So beeinflusst zum Beispiel der *MDR1*-Gendefekt bei englischen Hütehunden die Umverteilung von Wirkstoffen wie z.B. Ivermectin [116]. Ob Unterschiede in den pharmakodynamischen Eigenschaften von Opioidanalgetika nicht nur speziesspezifisch, sondern auch rassespezifisch sein können, ist bisher ungeklärt. Um diese zu beantworten, könnten neue experimentelle Ansätze wie die Analyse einer bestehenden Gendatenbank mit 2000 Individuen aus über 300 verschiedenen Rassen behilflich sein [117].

2. Pharmakologisches Profil

In der vorliegenden Arbeit wurden die Ligandenprofile therapeutisch beim Hund eingesetzter Opioidanalgetika anhand der klonierten caninen Opioidrezeptoren erstellt. Diese wurden mit denjenigen verglichen, die parallel dazu am hKOR und rMOR erarbeitet wurden, da für beide Rezeptoren zahlreiche Literatur existiert. Zwischen den Opioidrezeptoren von Mensch und Ratte gibt es hierbei wenige Unterschiede in der Ligandenselektivität, sodass dieser Ansatz einen Gesamtvergleich mit jeweils beiden Spezies erlaubt [118].

2.1. Selektivität

Die mit Hilfe der Radioligandenbindung erhobenen pK_i -Werte wurden mit den Werten in der Datenbank der IUPHAR verglichen. Dabei fallen bei einigen Wirkstoffen selbst innerhalb einer Spezies Abweichungen auf, die aus unterschiedlichen Literaturangaben hervorgehen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit die Ligandenprofile in einem festen Testsystem bestimmt, um eine Vergleichbarkeit untereinander zu gewährleisten.

Zu Literaturwerten, die in anderen Testabläufen bestimmt wurden, zeigen sich hier hingegen zum Teil Abweichungen im genauen Wert der Affinität (siehe Tabelle 22).

	rMOR / hMOR		rKOR / hKOR	
	Gemessen	Literatur	Gemessen	Literatur
Fentanyl/50,488	7,8	9,2–9,4 [65, 69]	9,1	7,8–9,7 [21, 22, 65, 90, 119-122]
Morphin	7,4	7,9–9,0 [59, 65, 69]	6,2	6,7–7,3 [21, 22, 65]
Buprenorphin	12,2	8,8 [65]	12,6	9,1–10,2 [65, 121]
Butorphanol	7,7	9,9 [79]	8,3	9,9 [79]
Levomethadon	9,9	9,2 [65]	–	–

Tabelle 22: Unterschiede in der Ligandenselektivität verschiedener Opiode.

Diese Unterschiede können durch die Verwendung von anderer Radioliganden und deren Konzentration, ein abweichendes Zellmodell oder durch die Verwendung von Zelllysaten anstatt von Membranen bedingt sein.

Wie in den Ergebnissen in Tabelle 17 ersichtlich, ist ein wesentliches Resultat, dass Morphin am MOR des Hundes eine weitaus höhere Affinität im Vergleich zum rMOR besitzt. Die Affinität am KOR ist dagegen unverändert. Daraus lässt sich schließen, dass Morphin beim Hund eine höhere Selektivität gegenüber dem MOR als beim Menschen und bei der Ratte aufweist.

Buprenorphin zeigt bei beiden Spezies eine sehr hohe Affinität am MOR, während die Affinität am cKOR sehr gering ist. Auch erkennt Buprenorphin am cKOR keinen niederaffinen Rezeptorzustand. Zusammenfassend kann man beim Hund von einer stark MOR-selektiven Bindung ausgehen.

2.2. Effekt

Die intrinsische Aktivität wurde im MAP-Kinase Assay bestimmt und erbrachte teilweise bedeutende Unterschiede in der Klassifikation einzelner Opioidanalgetika beim Hund. Hervorzuheben sind hier, dass Morphin am MOR des Hundes einen sehr starken partiellen Agonisten, fast einen vollen Agonisten darstellt. Butorphanol dagegen stellt am cKOR im Vergleich zum humanen KOR einen vollen Agonisten dar, während es am humanen Rezeptor lediglich eine schwache agonistische Aktivität aufweist. Dagegen besitzt Butorphanol am cMOR kaum agonistische Aktivität. Ebenfalls interessant ist, dass Buprenorphin am caninen MOR einen Antagonisten darstellt. Am cKOR konnte nur eine sehr geringe intrinsische Aktivität nachgewiesen werden, diese fällt deutlich geringer aus als die Aktivität am humanen KOR.

Bei der hier vorgenommenen Klassifizierung der Opioidanalgetika muss das verwendete Testsystem berücksichtigt werden. Der MAP-Kinase Assay ist sehr sensitiv. Den experimentellen Bedingungen, insbesondere der Inkubationszeit, kommt daher eine wesentliche Bedeutung bei der Interpretation der Ergebnisse zu [123]. In diesem Zusammenhang wurde ein *ceiling effect* beschrieben, bei dem das maximale Signal erreicht wird. In der Literatur gibt es jedoch auch Hinweise dafür, dass es in Abhängigkeit der unterschiedlichen Aktivierungswege des MAP-Kinase-Weges zu zeitabhängigen Unterschieden im maximalen Signal kommen kann [124]. Aus diesem Grund wurden für die vorliegende Arbeit separate Vorversuche zu verschiedenen Inkubationszeiten vorgenommen, um eine möglichst für alle zu testenden Liganden geeignete

Inkubationsdauer auszuwählen. Ein zeitabhängiges Aktivierungsprofil könnte daher noch feinere Unterschiede z.B. in der partiellen Aktivität einzelner Liganden aufschlüsseln. Hier bilden neu entwickelte Testverfahren eine gute Möglichkeit für zukünftige Messungen, da sie mittels Fluoreszenzmessung auf einer *96-Well Platte* einen größeren Probendurchsatz erlauben [125].

Auch stellt das Konzept des *ligand biasing* in Frage, ob die Klassifizierung der intrinsischen Aktivität ausschließlich anhand einer einzelnen Methode vorgenommen werden kann. Selbst in HEK293-Zellen sind mehrere alternative Aktivierungen des ERK1/2 Signalweges möglich [126]. Denkbar ist aber auch, dass andere Effektorsysteme unterschiedliche Daten liefern. In diesem Zusammenhang ist jedoch unwahrscheinlich, dass sich ein Ligand in einem System als Agonist, und in einem anderen System als Antagonist erweist: Das Prinzip des *ligand biasing* beschreibt schließlich nur die Favorisierung eines Signalweges im Vergleich zu anderen [127].

Letztlich zeigten sich bei Naloxon auch noch überraschende Ergebnisse. Ursprünglich wurde dieser Ligand als Kontrollantagonist mitgetestet, mit der Erwartung, dass er keine intrinsische Aktivität besitzen sollte [120]. In dieser Arbeit wurde aber am cKOR eine partielle Aktivität und am hKOR eine volle Aktivität gemessen. Zahlreiche Studien lieferten jedoch Hinweise, dass Naloxon in einzelnen Systemen einen inversen oder selektiven Agonisten darstellt. Hieraus entwickelte sich die Hypothese, dass einzelne Antagonisten unter bestimmten Bedingungen eine negative intrinsische Aktivität aufweisen [127]. So wurde Naloxon nach Vorbehandlung von Zellen mit einem Opioidagonisten als inverser Agonist identifiziert [128-130]. Aber auch eine konstitutive Aktivität von Rezeptoren besitzt einen Einfluss auf die intrinsische Aktivität von Liganden. In Zelllinien, die hohe Konzentrationen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren exprimieren, kann die damit einhergehende erhöhte konstitutive Aktivität einen Einfluss auf die Ligandenaktivität besitzen [131].

3. Bedeutung für die klinische Anwendung

Für Fentanyl, Morphin, Butorphanol und Levomethadon konnten die aus der klinischen Anwendung beim Hund bekannten Profile bestätigt werden. Für Buprenorphin allerdings werfen die Ergebnisse der vorgestellten Experimente die Frage auf, ob der häufige klinische Einsatz dieses Wirkstoffs, vor allem zur Behandlung postoperativer Schmerzzustände, gerechtfertigt ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass Buprenorphin am MOR des Hundes keine intrinsische Aktivität aufweist. Die geringe Aktivität am KOR ist möglicherweise eine Erklärung für die leicht analgetische Wirkung bei viszeralen Schmerzen. Zusätzlich ist unter Berücksichtigung der Rezeptoraffinität davon auszugehen, dass bei der Verabreichung von Buprenorphin ein großer Teil des Medikaments an den MOR gebunden wird, ohne eine analgetische Wirkung zu entfalten.

4. Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit identifizierten Besonderheiten im Ligandenprofil von Opioidanalgetika beim Hund liefern die Basis für weitergehende Untersuchungen zur Struktur/Wirkungsbeziehung und zur Aufklärung tierartlicher Unterschiede in der Arzneimittelwirkung. Durch gezielte Mutation einzelner Aminosäuren könnte es gelingen, neue Einblicke in die funktionellen Eigenschaften von Opioidanalgetika zu gewinnen. Die im Rahmen dieser Doktorarbeit erstellten Protokolle zur konfokalen Mikroskopie, ermöglichen außerdem zukünftig weiteren Aufschluss über die Ligandenvermittelte Regulation der Rezeptorfunktion nach längerfristiger Opioidbehandlung der Zellen.

VII Zusammenfassung

Opioidanalgetika weisen beim Hund tierartige Unterschiede im Wirkprofil auf, die nicht durch pharmakokinetische Besonderheiten im Arzneimittelmetabolismus erklärt werden können. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war es daher, die caninen μ und κ -Opioidrezeptoren (*OPRM1* und *OPRK1*) zu klonieren und die Ligandenprofile der therapeutisch eingesetzten Opioidanalgetika an den exprimierten Rezeptoren zu charakterisieren.

Die Klonierung der caninen Opioidrezeptoren erfolgte mit speziell abgeleiteten PCR-Primern, da das Hundegenom nur unvollständig sequenziert war und die annotierten Opioidrezeptorgene fehlerhaft waren. Die isolierten cDNA-Sequenzen des *OPRM1* und des *OPKR1* konnten daraufhin strukturell mit anderen Spezies verglichen werden.

In einem nächsten Schritt wurden die pharmakologischen Wirkprofile von Opioidanalgetika anhand der stabil in HEK 293-Zellen exprimierten MOR und KOR charakterisiert. Dabei wurde die Affinität mit Hilfe der Radioligandenbindung und die intrinsische Aktivität anhand der stimulierten MAP-Kinase Aktivität bestimmt. Daraus wurden individuelle Ligandenprofile für den Hund erstellt und mit denjenigen für den MOR der Ratte und den KOR des Menschen verglichen. Trotz einiger Aminosäuresubstitutionen in den caninen Opioidrezeptoren waren keine funktionellen Unterschiede in den Ligandenprofilen der vollen μ -Agonisten (Fentanyl und Levomethadon), jedoch eine Auswirkung auf die funktionellen Eigenschaften partieller Agonisten zu beobachten. Vor allem bei Morphin ist am caninen MOR eine, um den Faktor 6,3 höhere Affinität im Vergleich zum Rezeptor der Ratte und eine starke partielle Aktivität zu beobachten. Morphin stellt beim Hund ebenfalls einen starken partiellen Agonisten am KOR dar, wenn auch bei einer um den Faktor 63 niedrigeren Affinität verglichen mit dem MOR. Butorphanol weist dagegen eine um den Faktor 3,2 niedrigere Affinität am KOR des Hundes im Vergleich zum Rezeptor des Menschen auf, stellt jedoch beim Hund einen vollen Agonisten an diesem Rezeptor dar. Am MOR des Hundes zeigt Butorphanol dagegen keine intrinsische Aktivität obwohl es eine um den Faktor 10 höhere Affinität als am KOR aufweist. Schließlich weist Buprenorphin am MOR des Hundes keine nennenswerte intrinsische Aktivität auf, obwohl es eine vergleichbare

Affinität zum Rezeptor der Ratte besitzt. Am KOR des Hundes besitzt Buprenorphin dagegen nur eine äußerst niedrige Affinität und geringe partielle intrinsische Aktivität.

Zusammenfassend können die erarbeiteten Ligandenprofile die tierartlichen Unterschiede in den Indikationsgebieten der zugelassenen Tierarzneimittel erklären. Butorphanol besitzt einerseits gute analgetische Eigenschaften beim viszeralem Schmerz, wirkt aber andererseits in den klinisch verwendeten Dosierungen stark sedativ. Dies konnte hier durch seine volle intrinsische Aktivität am KOR bei gleichzeitig hoher Affinität und keiner signifikanten intrinsischen Aktivität am MOR erklärt werden. Der klinische Einsatz von Buprenorphin dagegen ist beim Hund zu hinterfragen, da es nur einen schwachen partiellen Agonisten am KOR und Antagonisten am MOR darstellt.

VIII Summary

Opioid analgesics exhibit species-specific differences in their efficacy profile in dogs, which cannot be explained by pharmacokinetic characteristics in drug metabolism. Therefore, the objective of the present work was to clone the canine μ and κ opioid receptors (OPRM1 and OPRK1) and to characterize the ligand profiles of the therapeutically used canine opioid analgesics at the expressed receptors.

Cloning of the canine opioid receptors was performed using specially derived PCR primers because the canine genome was incompletely sequenced and the annotated opioid receptor genes were erroneous. The isolated cDNA sequences of OPRM1 and OPRK1 could then be compared structurally with other species.

In a next step, the pharmacological action profiles of opioid analgesics were characterized using MOR and KOR stably expressed in HEK 293 cells. Affinity was determined using radioligand binding and intrinsic activity was determined using stimulated MAP kinase activity. From this, individual ligand profiles were generated for the dog and compared with those for the rat MOR and the human KOR. Despite some amino acid substitutions in the canine opioid receptors, no functional differences were observed in the ligand profiles of the full μ -agonists (fentanyl and levomethadone), but an effect on the functional properties of partial agonists was observed. In particular for morphine, by a factor of 6.3 higher affinity is observed at the canine MOR compared to the rat receptor and additionally a strong partial activity is detected. Morphine is also a strong partial agonist at the KOR in dogs, albeit with a 63-fold lower affinity compared with MOR. Butorphanol, on the other hand, has a 3.2-fold lower affinity at the canine KOR compared with the human receptor, but represents a full agonist at this receptor in the dog. In contrast, at the canine MOR, butorphanol shows no intrinsic activity, although it has a factor of 10 higher affinity than at the KOR. Finally, buprenorphine has no appreciable intrinsic activity at the canine MOR, although it has comparable affinity for the rat receptor. In contrast, at the canine KOR, buprenorphine has extremely low affinity and only weak partial intrinsic activity.

In summary, the elaborated ligand profiles can explain the animal-species differences in the indications of the approved veterinary drugs. On the one hand, butorphanol has good analgesic properties in visceral pain, on the other hand it has a strong sedative

effect at the clinically used doses. This is shown here by its full intrinsic activity at the KOR with simultaneous high affinity and no significant activity at the MOR. The clinical use of buprenorphine, on the other hand, is to be questioned for dogs because it is only a weak partial agonist at the KOR and antagonist at the MOR.

IX Literaturverzeichnis

1. Omasits, U., et al., *Protter: interactive protein feature visualization and integration with experimental proteomic data*. *Bioinformatics*, 2014. **30**(6): p. 884-6.
2. Toutain, P.L., A. Ferran, and A. Bousquet-Mélou, *Species differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics*. *Handb Exp Pharmacol*, 2010(199): p. 19-48.
3. Bradbrook, C.A. and L. Clark, *State of the art analgesia- recent developments in pharmacological approaches to acute pain management in dogs and cats. Part 1*. *Vet J*, 2018. **238**: p. 76-82.
4. Hawley, A.T. and L.A. Wetmore, *Identification of single nucleotide polymorphisms within exon 1 of the canine mu-opioid receptor gene*. *Vet Anaesth Analg*, 2010. **37**(1): p. 79-82.
5. Parker, H.G., et al., *Genetic structure of the purebred domestic dog*. *Science*, 2004. **304**(5674): p. 1160-4.
6. Kalbfleisch, T.S., et al., *Improved reference genome for the domestic horse increases assembly contiguity and composition*. *Commun Biol*, 2018. **1**: p. 197.
7. Holden, J.E., Y. Jeong, and J.M. Forrest, *The endogenous opioid system and clinical pain management*. *AACN Clin Issues*, 2005. **16**(3): p. 291-301.
8. Brownstein, M.J., *A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993. **90**(12): p. 5391-3.
9. Singh, A., I.M. Menéndez-Perdomo, and P.J. Facchini, *Benzylisoquinoline alkaloid biosynthesis in opium poppy: an update*. *Phytochemistry Reviews*, 2019. **18**(6): p. 1457-1482.
10. Berterame, S., et al., *Use of and barriers to access to opioid analgesics: a worldwide, regional, and national study*. *Lancet*, 2016. **387**(10028): p. 1644-56.
11. Simon, B.T. and P.V. Steagall, *The present and future of opioid analgesics in small animal practice*. *J Vet Pharmacol Ther*, 2017. **40**(4): p. 315-326.
12. Clutton, R.E., *Opioid analgesia in horses*. *Vet Clin North Am Equine Pract*, 2010. **26**(3): p. 493-514.
13. Pert, C.B. and S.H. Snyder, *Opiate receptor: demonstration in nervous tissue*. *Science*, 1973. **179**(4077): p. 1011-4.
14. Hughes, J., et al., *Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor*. *Life Sci*, 1975. **16**(12): p. 1753-8.
15. Li, C.H., D. Chung, and B.A. Doneen, *Isolation, characterization and opiate activity of beta-endorphin from human pituitary glands*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1976. **72**(4): p. 1542-7.
16. Goldstein, A., et al., *Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1979. **76**(12): p. 6666-70.
17. Martin, W.R., et al., *The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1976. **197**(3): p. 517-32.
18. Lord, J.A., et al., *Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors*. *Nature*, 1977. **267**(5611): p. 495-9.
19. Pathan, H. and J. Williams, *Basic opioid pharmacology: an update*. *Br J Pain*, 2012. **6**(1): p. 11-6.

20. Evans, C.J., et al., *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1952-5.
21. Chen, Y., et al., *Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(1): p. 8-12.
22. Meng, F., et al., *Cloning and pharmacological characterization of a rat kappa opioid receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 9954-8.
23. Bare, L.A., E. Mansson, and D. Yang, *Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain*. FEBS Lett, 1994. **354**(2): p. 213-6.
24. Pan, Y.X., et al., *Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 14084-9.
25. Pasternak, G.W., *Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(2): p. 67-70.
26. Pan, L., et al., *Identification and characterization of six new alternatively spliced variants of the human mu opioid receptor gene, Oprm*. Neuroscience, 2005. **133**(1): p. 209-20.
27. Pan, Y.X., et al., *Identification of four novel exon 5 splice variants of the mouse mu-opioid receptor gene: functional consequences of C-terminal splicing*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(3): p. 866-75.
28. Pan, Y.X., et al., *Involvement of exon 11-associated variants of the mu opioid receptor MOR-1 in heroin, but not morphine, actions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4917-22.
29. Bolan, E.A., Y.X. Pan, and G.W. Pasternak, *Functional analysis of MOR-1 splice variants of the mouse mu opioid receptor gene Oprm*. Synapse, 2004. **51**(1): p. 11-8.
30. Pasternak, D.A., et al., *Identification of three new alternatively spliced variants of the rat mu opioid receptor gene: dissociation of affinity and efficacy*. J Neurochem, 2004. **91**(4): p. 881-90.
31. Chakrabarti, S., N.-J. Liu, and A.R. Gintzler, *Relevance of Mu-Opioid Receptor Splice Variants and Plasticity of Their Signaling Sequelae to Opioid Analgesic Tolerance*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2021. **41**(5): p. 855-862.
32. Mollereau, C., et al., *ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization*. FEBS Lett, 1994. **341**(1): p. 33-8.
33. Butour, J.L., et al., *Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids*. Eur J Pharmacol, 1997. **321**(1): p. 97-103.
34. Stein, C., M. Schäfer, and H. Machelska, *Attacking pain at its source: new perspectives on opioids*. Nature Medicine, 2003. **9**(8): p. 1003-1008.
35. Rivière, P.J., *Peripheral kappa-opioid agonists for visceral pain*. Br J Pharmacol, 2004. **141**(8): p. 1331-4.
36. Lutz, P.E. and B.L. Kieffer, *Opioid receptors: distinct roles in mood disorders*. Trends Neurosci, 2013. **36**(3): p. 195-206.
37. Kibaly, C., et al., *Non-nociceptive roles of opioids in the CNS: opioids' effects on neurogenesis, learning, memory and affect*. Nat Rev Neurosci, 2019. **20**(1): p. 5-18.
38. Yang, D., et al., *G protein-coupled receptors: structure- and function-based drug discovery*. Signal Transduct Target Ther, 2021. **6**(1): p. 7.

39. Lagerström, M.C. and H.B. Schiöth, *Structural diversity of G protein-coupled receptors and significance for drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(4): p. 339-57.
40. Law, P.Y., Y.H. Wong, and H.H. Loh, *Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2000. **40**: p. 389-430.
41. Busillo, J.M., et al., *Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling*. J Biol Chem, 2010. **285**(10): p. 7805-17.
42. Butcher, A.J., et al., *Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code*. J Biol Chem, 2011. **286**(13): p. 11506-18.
43. Nobles, K.N., et al., *Distinct phosphorylation sites on the β (2)-adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin*. Sci Signal, 2011. **4**(185): p. ra51.
44. Mann, A., et al., *Agonist-induced phosphorylation bar code and differential post-activation signaling of the delta opioid receptor revealed by phosphosite-specific antibodies*. Scientific Reports, 2020. **10**(1): p. 8585.
45. Granier, S., et al., *Structure of the delta-opioid receptor bound to naltrindole*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 400-4.
46. Manglik, A., et al., *Crystal structure of the micro-opioid receptor bound to a morphinan antagonist*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 321-6.
47. Wu, H., et al., *Structure of the human kappa-opioid receptor in complex with JDTic*. Nature, 2012. **485**(7398): p. 327-32.
48. Huang, W., et al., *Structural insights into μ -opioid receptor activation*. Nature, 2015. **524**(7565): p. 315-21.
49. Che, T., et al., *Structure of the Nanobody-Stabilized Active State of the Kappa Opioid Receptor*. Cell, 2018. **172**(1-2): p. 55-67.e15.
50. Bockaert, J., *G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, function and interactions*. Curr Opin Neurobiol, 1991. **1**(1): p. 32-42.
51. Ji, T.H., M. Grossmann, and I. Ji, *G protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17299-302.
52. Sunahara, R.K., C.W. Dessauer, and A.G. Gilman, *Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1996. **36**: p. 461-80.
53. Sanchez, G.A., et al., *Coincident Regulation of PLC β Signaling by Gq-Coupled and μ -Opioid Receptors Opposes Opioid-Mediated Antinociception*. Mol Pharmacol, 2022. **102**(6): p. 269-279.
54. Gutstein, Howard B., et al., *Opioid Effects on Mitogen-activated Protein Kinase Signaling Cascades* Anesthesiology, 1997. **87**(5): p. 1118-1126.
55. Zheng, H., H.H. Loh, and P.-Y. Law, *Agonist-selective signaling of G protein-coupled receptor: Mechanisms and implications*. IUBMB Life, 2010. **62**(2): p. 112-119.
56. Janecka, A., J. Fichna, and T. Janecki, *Opioid receptors and their ligands*. Curr Top Med Chem, 2004. **4**(1): p. 1-17.
57. Ballantyne, J.C. and M.D. Sullivan, *Discovery of endogenous opioid systems: what it has meant for the clinician's understanding of pain and its treatment*. Pain, 2017. **158**(12): p. 2290-2300.
58. Corbett, A.D., et al., *75 years of opioid research: the exciting but vain quest for the Holy Grail*. Br J Pharmacol, 2006. **147 Suppl 1**: p. S153-62.

59. Goldstein, A. and A. Naidu, *Multiple opioid receptors: ligand selectivity profiles and binding site signatures*. Mol Pharmacol, 1989. **36**(2): p. 265-72.
60. Faouzi, A., B.R. Varga, and S. Majumdar, *Biased Opioid Ligands*. Molecules, 2020. **25**(18).
61. Epstein, M.E., et al., *2015 AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats*. J Feline Med Surg, 2015. **17**(3): p. 251-72.
62. Hunt, J.R., et al., *Prescription of perioperative analgesics by UK small animal veterinary surgeons in 2013*. Vet Rec, 2015. **176**(19): p. 493.
63. Capner, C.A., B.D. Lascelles, and A.E. Waterman-Pearson, *Current British veterinary attitudes to perioperative analgesia for dogs*. Vet Rec, 1999. **145**(4): p. 95-9.
64. Löscher, W., A. Richter, and H. Potschka, *Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren*. 9 ed. 2014.
65. Toll, L., et al., *Standard binding and functional assays related to medications development division testing for potential cocaine and opiate narcotic treatment medications*. NIDA Res Monogr, 1998. **178**: p. 440-66.
66. Ingvast-Larsson, C., et al., *Clinical pharmacology of methadone in dogs*. Vet Anaesth Analg, 2010. **37**(1): p. 48-56.
67. Hunt, J.R., et al., *Comparison of premedication with buprenorphine or methadone with meloxicam for postoperative analgesia in dogs undergoing orthopaedic surgery*. J Small Anim Pract, 2013. **54**(8): p. 418-24.
68. Monteiro, E.R., et al., *Effects of acepromazine-morphine and acepromazine-methadone premedication on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs*. Vet Anaesth Analg, 2016. **43**(1): p. 27-34.
69. Raynor, K., et al., *Pharmacological characterization of the cloned kappa-, delta-, and mu-opioid receptors*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(2): p. 330-4.
70. Simões, C.R., et al., *Effects of a prolonged infusion of fentanyl, with or without atropine, on the minimum alveolar concentration of isoflurane in dogs*. Vet Anaesth Analg, 2016. **43**(2): p. 136-44.
71. Suarez, M.A., et al., *Effect of fentanyl and lidocaine on the end-tidal sevoflurane concentration preventing motor movement in dogs*. Am J Vet Res, 2017. **78**(1): p. 12-16.
72. Zöllner, C., *[Do opioids induce hyperalgesia?]*. Anaesthesist, 2010. **59**(11): p. 983-6, 988-93.
73. BRANSON, K.R., et al., *Duration of analgesia induced by epidurally administered morphine and medetomidine in dogs*. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 1993. **16**(3): p. 369-372.
74. Guedes, A.G., E.P. Rudé, and M.A. Rider, *Evaluation of histamine release during constant rate infusion of morphine in dogs*. Vet Anaesth Analg, 2006. **33**(1): p. 28-35.
75. Huang, P., et al., *Comparison of pharmacological activities of buprenorphine and norbuprenorphine: norbuprenorphine is a potent opioid agonist*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **297**(2): p. 688-95.
76. Steagall, P.V., et al., *Pharmacokinetics and analgesic effects of intravenous, intramuscular or subcutaneous buprenorphine in dogs undergoing ovariohysterectomy: a randomized, prospective, masked, clinical trial*. BMC Veterinary Research, 2020. **16**(1): p. 154.

77. Shulman, M., J.M. Wai, and E.V. Nunes, *Buprenorphine Treatment for Opioid Use Disorder: An Overview*. *CNS Drugs*, 2019. **33**(6): p. 567-580.
78. Dahan, A., et al., *Buprenorphine induces ceiling in respiratory depression but not in analgesia*. *Br J Anaesth*, 2006. **96**(5): p. 627-32.
79. Fulton, B.S., et al., *Synthesis and pharmacological evaluation of hydrophobic esters and ethers of butorphanol at opioid receptors*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2008. **18**(16): p. 4474-6.
80. Schurig, J.E., R.L. Cavanagh, and J.P. Buyniski, *Effect of butorphanol and morphine on pulmonary mechanics, arterial blood pressure and venous plasma histamine in the anesthetized dog*. *Arch Int Pharmacodyn Ther*, 1978. **233**(2): p. 296-304.
81. Camargo, J.B., et al., *Post-operative analgesic effects of butorphanol or firocoxib administered to dogs undergoing elective ovariohysterectomy*. *Vet Anaesth Analg*, 2011. **38**(3): p. 252-9.
82. Pace, N.L., et al., *Pharmacokinetics of naloxone and naltrexone in the dog*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1979. **208**(2): p. 254-6.
83. Valentino, R.J. and N.D. Volkow, *Untangling the complexity of opioid receptor function*. *Neuropsychopharmacology*, 2018. **43**(13): p. 2514-2520.
84. Barber, R.D., et al., *GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues*. *Physiol Genomics*, 2005. **21**(3): p. 389-95.
85. Thomas, P. and T.G. Smart, *HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2005. **51**(3): p. 187-200.
86. Southern, P.J. and P. Berg, *Transformation of mammalian cells to antibiotic resistance with a bacterial gene under control of the SV40 early region promoter*. *J Mol Appl Genet*, 1982. **1**(4): p. 327-41.
87. Flanagan, C.A., *GPCR-radioligand binding assays*. *Methods Cell Biol*, 2016. **132**: p. 191-215.
88. Gornall, A.G., C.J. Bardawill, and M.M. David, *Determination of serum proteins by means of the biuret reaction*. *J Biol Chem*, 1949. **177**(2): p. 751-66.
89. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. *J Biol Chem*, 1951. **193**(1): p. 265-75.
90. Simonin, F., et al., *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*, 1995. **92**(15): p. 7006-10.
91. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant (K₁) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction*. *Biochem Pharmacol*, 1973. **22**(23): p. 3099-108.
92. DeBlasi, A., K. O'Reilly, and H.J. Motulsky, *Calculating receptor number from binding experiments using same compound as radioligand and competitor*. *Trends Pharmacol Sci*, 1989. **10**(6): p. 227-9.
93. Schulz, R., D.A. Eisinger, and A. Wehmeyer, *Opioid control of MAP kinase cascade*. *Eur J Pharmacol*, 2004. **500**(1-3): p. 487-97.
94. Xu, C., et al., *Serine 363 of the {delta}-opioid receptor is crucial for adopting distinct pathways to activate ERK1/2 in response to stimulation with different ligands*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 24): p. 4259-70.
95. Goldsmith, Z.G. and D.N. Dhanasekaran, *G protein regulation of MAPK networks*. *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3122-42.

96. Roskoski, R., Jr., *ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation*. Pharmacol Res, 2012. **66**(2): p. 105-43.
97. Laboureau, J., et al., *ERK activation by mechanical strain is regulated by the small G proteins rac-1 and rhoA*. Exp Dermatol, 2004. **13**(2): p. 70-7.
98. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
99. Taylor, S.C., et al., *A defined methodology for reliable quantification of Western blot data*. Mol Biotechnol, 2013. **55**(3): p. 217-26.
100. Pillai-Kastoori, L., A.R. Schutz-Geschwender, and J.A. Harford, *A systematic approach to quantitative Western blot analysis*. Anal Biochem, 2020. **593**: p. 113608.
101. Kim, K.S., et al., *The complete nucleotide sequence of the domestic dog (Canis familiaris) mitochondrial genome*. Mol Phylogenet Evol, 1998. **10**(2): p. 210-20.
102. Lahti, R.A., et al., *[3H]U-69593 a highly selective ligand for the opioid kappa receptor*. Eur J Pharmacol, 1985. **109**(2): p. 281-4.
103. Wasserstein, R.L., A.L. Schirm, and N.A. Lazar, *Moving to a World Beyond "p < 0.05"*. The American Statistician, 2019. **73**(sup1): p. 1-19.
104. Xiufeng, X. and Ú. Árnason, *The complete mitochondrial DNA sequence of the horse, Equus caballus: extensive heteroplasmy of the control region*. Gene, 1994. **148**(2): p. 357-362.
105. Ostrander, E.A. and L. Kruglyak, *Unleashing the canine genome*. Genome Res, 2000. **10**(9): p. 1271-4.
106. Schook, L.B., et al., *Swine Genome Sequencing Consortium (SGSC): a strategic roadmap for sequencing the pig genome*. Comp Funct Genomics, 2005. **6**(4): p. 251-5.
107. Pontius, J.U., et al., *Initial sequence and comparative analysis of the cat genome*. Genome Res, 2007. **17**(11): p. 1675-89.
108. Buckley, R.M., et al., *A new domestic cat genome assembly based on long sequence reads empowers feline genomic medicine and identifies a novel gene for dwarfism*. PLoS Genet, 2020. **16**(10): p. e1008926.
109. Tellam, R.L., et al., *Unlocking the bovine genome*. BMC Genomics, 2009. **10**: p. 193.
110. Muelhaupt, M., *Klonierung und pharmakologische Charakterisierung der equinen Opioidrezeptoren*. 2018.
111. Manglik, A., et al., *Structure-based discovery of opioid analgesics with reduced side effects*. Nature, 2016. **537**(7619): p. 185-190.
112. Owusu Obeng, A., I. Hamadeh, and M. Smith, *Review of Opioid Pharmacogenetics and Considerations for Pain Management*. Pharmacotherapy, 2017. **37**(9): p. 1105-1121.
113. Mizoguchi, H. and H. Fujii, *Exploring μ -Opioid Receptor Splice Variants as a Specific Molecular Target for New Analgesics*. Curr Top Med Chem, 2020. **20**(31): p. 2866-2877.
114. Piltonen, M., et al., *Alternative Splicing of Opioid Receptor Genes Shows a Conserved Pattern for 6TM Receptor Variants*. Cell Mol Neurobiol, 2021. **41**(5): p. 1039-1055.
115. Sebold, M., et al., *Association of the OPRM1 A118G polymorphism and Pavlovian-to-instrumental transfer: Clinical relevance for alcohol dependence*. J Psychopharmacol, 2021. **35**(5): p. 566-578.

116. Neff, M.W., et al., *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, 2004. **101**(32): p. 11725-30.
117. Meadows, J.R.S., et al., *Genome sequencing of 2000 canids by the Dog10K consortium advances the understanding of demography, genome function and architecture*. Genome Biol, 2023. **24**(1): p. 187.
118. Rothman, R.B., et al., *Ligand selectivity of cloned human and rat opioid mu receptors*. Synapse, 1995. **21**(1): p. 60-4.
119. Chavkin, C., et al., *Salvinorin A, an active component of the hallucinogenic sage salvia divinorum is a highly efficacious kappa-opioid receptor agonist: structural and functional considerations*. J Pharmacol Exp Ther, 2004. **308**(3): p. 1197-203.
120. Zhu, J., et al., *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, 1997. **282**(2): p. 676-84.
121. Li, S., et al., *Molecular cloning and expression of a rat kappa opioid receptor*. Biochem J, 1993. **295 (Pt 3)**(Pt 3): p. 629-33.
122. Vonvoigtlander, P.F., R.A. Lahti, and J.H. Ludens, *U-50,488: a selective and structurally novel non-Mu (kappa) opioid agonist*. J Pharmacol Exp Ther, 1983. **224**(1): p. 7-12.
123. De Neve, J., et al., *Comprehensive overview of biased pharmacology at the opioid receptors: biased ligands and bias factors*. RSC Med Chem, 2021. **12**(6): p. 828-870.
124. Ahn, S., et al., *Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(34): p. 35518-25.
125. Asghar, J., et al., *Development of a novel cell-based, In-Cell Western/ERK assay system for the high-throughput screening of agonists acting on the delta-opioid receptor*. Front Pharmacol, 2022. **13**: p. 933356.
126. Eisinger, D.A. and H. Ammer, *Down-regulation of c-Cbl by morphine accounts for persistent ERK1/2 signaling in delta-opioid receptor-expressing HEK293 cells*. J Biol Chem, 2009. **284**(50): p. 34819-28.
127. Berg, K.A. and W.P. Clarke, *Making Sense of Pharmacology: Inverse Agonism and Functional Selectivity*. Int J Neuropsychopharmacol, 2018. **21**(10): p. 962-977.
128. Cruz, S.L., J.E. Villarreal, and N.D. Volkow, *Further evidence that naloxone acts as an inverse opiate agonist: implications for drug dependence and withdrawal*. Life Sci, 1996. **58**(26): p. P1381-9.
129. Raehal, K.M., et al., *In vivo characterization of 6beta-naltrexol, an opioid ligand with less inverse agonist activity compared with naltrexone and naloxone in opioid-dependent mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **313**(3): p. 1150-62.
130. Wang, D., X. Sun, and W. Sadee, *Different effects of opioid antagonists on mu-, delta-, and kappa-opioid receptors with and without agonist pretreatment*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **321**(2): p. 544-52.
131. Poli, G., et al., *Discovery of Novel μ -Opioid Receptor Inverse Agonist from a Combinatorial Library of Tetrapeptides through Structure-Based Virtual Screening*. Molecules, 2019. **24**(21).

X Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformeln der Liganden	11
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Schichtung eines Semi-dry Blots.	40
Abbildung 3: Genomische Organisation der caninen Opioidrezeptoren	42
Abbildung 4: Darstellung der PCR-Fragmente in der Gelelektrophorese	43
Abbildung 5: Vergleich der Aminosäuresequenz	45
Abbildung 6: Snake plot des caninen MOR (links) und KOR (rechts).	46
Abbildung 7: Konfokales Bild von stabil rMOR exprimierenden Zellen	47
Abbildung 8: Modell der pharmakologischen Charakterisierung	48
Abbildung 9: Heterologe Verdrängung mit Fentanyl	49
Abbildung 10: Heterologe Verdrängung mit Morphin	50
Abbildung 11: Heterologe Verdrängung mit Butorphanol.....	51
Abbildung 12: Heterologe Verdrängung mit Buprenorphin.....	53
Abbildung 13: Heterologe Verdrängung mit Levomethadon.....	54
Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung eines Western Blots.....	56
Abbildung 15: Intrinsische Aktivität am MOR des Hundes	59
Abbildung 16: Intrinsische Aktivität am MOR der Ratte	60
Abbildung 17: Intrinsische Aktivität am KOR des Hundes.....	61
Abbildung 18: Intrinsische Aktivität am KOR des Menschen	62

XI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bezeichnungen der Opioidrezeptoren.....	3
Tabelle 2: Primer für die canine GAPDH-PCR.	23
Tabelle 3: Ansatz GAPDH-PCR.	23
Tabelle 4: Programm GAPDH-PCR.	23
Tabelle 5: Primer für die Klonierung der caninen OPRs.	23
Tabelle 6: Ansatz PCR-Klonierung canine OPRs.....	24
Tabelle 7: Programm PCR-Klonierung canine OPRs.	24
Tabelle 8: Herstellung eines 1,8 % Agarosegels.	24
Tabelle 9: Ansatz für die Ligation von PCR-Produkten in pJET 1.2.	26
Tabelle 10: Primer für die PCR-Verlängerung der caninen OPRs mit dem HA-Tag.....	27
Tabelle 11: Programm PCR-Verlängerung der caninen OPRs mit dem HA-Tag.	27
Tabelle 12: Pipettierschema Restriktiver Enzymverdau.....	28
Tabelle 13: Pipettierschema Ligation.	29
Tabelle 14: Ansatz für den kompetitiven Bindungsassay.....	34
Tabelle 15: Liganden im MAP-Kinase Assay.	37
Tabelle 16: Rezepturen zur Herstellung der Western-Blot-Gele.	39
Tabelle 17: Vergleich der pK_i -Werten von therapeutisch eingesetzten Opioiden.....	55
Tabelle 18: Gruppenvergleich der p-Werte der MAP-Kinase-Aktivität.....	57
Tabelle 19: Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) der MAP-Kinase Aktivität	57
Tabelle 20: Zusammenfassung der intrinsischen Aktivitäten	58
Tabelle 21: Ligandenprofile der getesteten Opioide.....	63
Tabelle 22: Unterschiede in der Ligandenselektivität verschiedener Opioide.	66

XII Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meinem Doktorvater, Hermann Ammer, ohne den dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre. Durch den fachlichen Austausch und die intensive Betreuung, wurde es mir ermöglicht, ein umfangreiches Wissen in der wissenschaftlichen Arbeitsweise zu erlangen.

Auch den ehemaligen Gruppenmitglieder, Sarah Koutnik-Abele und Maximilian Muelhaupt, möchte ich für die geleistete Vorarbeit in der Etablierung der Methoden, die auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, danken. Insbesondere Sarah lernte mich in die umfangreichen Methoden ein, und war bei zahlreichen Rückfragen stets sehr engagiert und behilflich.

Meinen jetzigen Kollegen, Karina Schechner und Moritz Lattner, möchte ich für die stetige Unterstützung in der Laborarbeit, sowie die zahlreichen konstruktiven Diskussionen danken, die oft auch in der Mittagspause auf dem Weg zur Mensa stattfanden. Beim Anfertigen dieser Dissertation, lieferte Karina weiterhin viele hilfreiche Kommentare.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der LMU München, möchte ich für ihre hilfsbereite Art danken. Zusammen bilden sie die Grundlage für das wissenschaftliche Arbeiten und sind unentbehrlich. Im Laufe meiner Zeit am Institut ergaben sich häufig nette Gespräche, aus denen sich auch Freundschaften entwickelten.

Die ersten Erfahrungen im Labor, konnte ich bereits im Studium sammeln. Für die Einarbeitung in die Laborarbeit gilt deshalb auch mein Dank Sandra Kirsch und Julia Holl, die im Rahmen eines VetResearch-Projektes mein Interesse an der wissenschaftlichen Arbeit weckten.

Auch möchte ich mich bei meiner Familie für die stetige Unterstützung bedanken. Sie hatten bei jeglichen Problemen immer ein offenes Ohr.

Der Fels in der Brandung ist mein Freund Severin, der auch während dieser Doktorarbeit mein treuer Begleiter in allen Höhen und Tiefen dieser intensiven Zeit war. Vielen Dank.