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

Vorstand: Univ.- Prof. Dr. Rüdiger Schulz

Regulation der Adenylatzyklasen und der extrazellulär-signalregulierten Proteinkinasen durch den δ-Opioidrezeptor in HEK293 Zellen

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

von
Stephanie Janowski
aus
München

München 2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. A. Stolle
Referent:	Univ.-Prof. Dr. R. Schulz
Korreferent:	Prof. Dr. M. Goldberg

Tag der Promotion: 15. Juli 2005

Meinen Eltern,
die mir das Studium der Tiermedizin ermöglicht haben

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung **1**

1.1 Opioidrezeptoren 1
1.2 G-Proteine 2
1.3 Effektorsysteme 4
1.3.1 Adenylatzyklasen 5
1.3.2 Extrazellulär-signalregulierte Proteinkinasen (ERKs) 6

2. Fragestellung **8**

3. Material und Methoden **9**

3.1 Zellkultur 9
3.1.1 Zellinie 9
3.1.2 Kulturbedingungen 9
3.1.3 Zellkulturmedium 9
3.1.4 Passagieren der Zellen 9
3.1.5 Zellzählung 10
3.1.6 Behandlung der Zellen mit Pharmaka 10
3.1.7 MTT-Test 11
3.1.8 Kryokonservierung der Zellen 12
3.1.9 Auftauen der Zellen 12
3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien 13
3.2.1 Transformation und Anzucht von Bakterien 13
3.2.2 Charakterisierung von Plasmid-DNA 14
3.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA 14
3.2.2.2 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA 15
3.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese von DNA 16
3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA zur Transfektion 17
3.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration 18
3.2.5 Transfektion von HEK-DOR Zellen 18
3.3 Rezeptoraffinitätsbestimmung verschiedener Opioide durch heterologe Verdrängung 19
3.3.1 Membranpräparation 20

3.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry 21
3.3.3 Radioligandenbindung 22
3.4 Bestimmung von cAMP in intakten HEK-DOR Zellen 23
3.4.1 cAMP-Akkumulation in HEK-DOR Zellen 23
3.4.2 ELISA-Technik 24
3.4.2.1 Affinitätsreinigung eines Ziege-anti-Kaninchen Antiserums 25
3.4.2.2 cAMP-ELISA 25
3.5 Bestimmung der ERK-Phosphorylierung in intakten HEK-DOR Zellen 27
3.5.1 Stimulierung der ERKs in HEK-DOR Zellen 27
3.5.2 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese 28
3.5.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese 28
3.5.4 Proteinblotting und Detektion der Proteinbanden 29
3.5.4.1 Proteintransfer 30
3.5.4.2 Blocken unspezifischer Bindungsstellen 30
3.5.4.3 Inkubation der Membranen mit spezifischen Antiseren 30
3.5.4.4 Optische Detektion der Proteinbanden 31
3.5.4.5 Densitometrische Bestimmung 32
3.6 Statistische Auswertung 32

4. Ergebnisse 33

4.1 Einfluß verschiedener Opioide auf die Adenylatzyklase-Aktivität in HEK-DOR Zellen 33
4.2 Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen 33
4.2.1 Opioide bewirken eine Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen 33
4.2.2 Zeitabhängige Stimulation der ERKs durch DADLE 35
4.2.3 Auswirkung verschiedener Lösungsmittel auf die ERK-Phosphorylierung 35
4.2.4 Exposition von HEK-wt Zellen mit Opioiden . 37
4.3 Effekt von Naloxon auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklasen und Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen 37
4.4 Konzentrationsabhängige Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch verschiedenen Opioide in HEK-DOR Zellen 40
4.5 Stimulation der ERKs durch Deltorphin II in HEK293 Zellen 44
4.6 Bestimmung der Bindungsaffinität der verschiedenen Opioide am δ-Opioidrezeptor 46

4.7 Einfluss von Pertussistoxin auf die opioidvermittelte Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs 48
4.8 Abklärung der PTX-vermittelten Hemmung der ERK Phosphorylierung 48
4.8.1 Stimulation der ERKs durch Gα□-unabhängige Mechanismen wird durch PTX gehemmt 48
4.8.2 Auswirkung von PTX auf die Zellzahl und Zellaktivität 50
4.9 Einfluß von EBP50 auf die opioidvermittelte Effektorregulation in HEK-DOR Zellen 52
4.10 Einfluß von Neomycin auf die Adenylatzyklase- und ERK-Regulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen 52
4.11 Auswirkung von 1-Butanol auf die Hemmung der Adenylatzyklasen und der ERK Stimulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen 56
4.12 Auswirkungen einer gleichzeitigen Neomycin und 1-Butanol Behandlung auf die Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs in HEK-DOR Zellen 56
4.13 Effekt von Phosduzin auf die Effektorregulation in opioidexponierten HEK-DOR Zellen 59
4.14 Einfluss einer ERK-Aktivierung auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität 62
4.14.1 Effekt von Tyrphostin AG 1478 auf die Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität 62
4.14.2 Effekt des MEK Inhibitors PD 098059 auf die opioidinduzierte Hemmung der Adenylatzyklasen 62
4.15 Einfluß der Adenylatzyklase-Hemmung auf die Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen 65
4.16 Einfluß der Adenylatzyklase Typ II auf die Stimulation der ERKs durch Opioide in HEK-DOR Zellen 67
4.17 Auswirkung des PKA Inhibitors H89 auf die Hemmung der Adenylatzyklasen und ERK-Stimulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen 67

5. Diskussion **71**

6. Zusammenfassung **82**

7. Summary **84**

8. Literaturverzeichnis **86**

9. Danksagung **100**

10. Lebenslauf **101**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	- Abbildung
AC	- Adenylatzyklase
AC II	- Adenylatzyklase vom Typ II
APS	- Ammoniumpersulfat
ADP	- Adenosindiphosphat
AK	- Antikörper
ATP	- Adenosintriphosphat
B_0	- Probenpuffer
BES	- N'N-bis-Aminoethansulfonsäure
BSA	- Bovines Serumalbumin
But	- Butanol
cAMP	- zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	- komplementäre DNA
Cn	- Kontrollen
Da	- Dalton
DA	- DADLE
DADLE	- D-Ala^2, D-Leu^5-Enkephalin
DMEH	- DMEM mit HEPES
DMEM	- Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	- Dimethylsulfoxid
DNA	- Desoxyribonukleinsäure
DOR	- δ-Opioidrezeptor
DP	- DPDPE
DPDPE	- D-Pen^2,D-Pen^5-Enkephalin
DTT	- Dithiothreitol
EBP50	- Ezrin-Radixin-Moesin-bindendes Protein 50
EC	- effektive Konzentration
ECL	- Enhanced Chemilumineszenz-Lösung

EDTA	- Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	- Epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	- Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
Emax.	- Konzentration eines Liganden für einen maximalen Effekt
ERK	- Extrazellulär-Signalregulierte Proteinkinase
entmin.	- entmineralisiertes Wasser
entmin. steril.	- entmineralisiertes steriles Wasser
Etor	- Etorphin
FKS	- Fetales Kälberserum
Fors	- Forskolin
GAP	- GTPase aktivierendes Protein
$G\alpha_i$	- inhibitorisches G-Protein
$G\alpha_s$	- stimulatorisches G-Protein
GDP	- Guanosindiphosphat
G-Protein	- Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	- Guanosintriphosphat
GTPase	- Guanosintriphosphatase
h	- Stunde
H89	- N-[-2-(p-bromrcinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolin-sulfonamid
HEK	- "Human Embryonic Kidney"
HEK-DOR	- HEK Zellen mit δ-Opioidrezeptor
HEK-DOR/ACII	- HEK-DOR Zellen mit transienter Expression der ACII
HEK-DOR/EBP50	- HEK-DOR Zellen mit transienter Expression von EBP50
HEK-DOR/Phd	- HEK-DOR Zellen mit transienter Expression von Phd
HEK-wt	- HEK Zellen vom Wildtyp
HEPES	- N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N'-[2-ethansulfonsäure]
IBMX	- 3-Isobutyl-1-methylxanthin
IgG	- Immunglobulin G
K_d	- Dissoziationskonstante

K_i	- inhibitorische Konstante
LB	- Luria-Bertani
M	- mol/l
MAP	- mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	- Minuten
Mor	- Morphin
MTT	- 3-(4,5-Dimethyl-3-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
m/v	- Gewichts-Volumen-Prozent
Neo	- Neomycin
OD	- optische Dichte
p	- phosphoryliert
PAA	- Polyacrylamid
PAGE	- Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	- Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung
PD 098059	- 2-(2'-amino-3'-methoxyphenyl)-oxanaphtalen
PEG	- Polyethylenglykol
PGE1	- Prostaglandin E1
Phd	- Phosduzin
PKA	- Proteinkinase A
PKC	- Proteinkinase C
PMA	- Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PTX	- Pertussis Toxin
SDS	- Natriumdodecylsulfat
SD	- Standardfehler des Mittelwertes
Std.	- Standard
TAE	- Tris-Acetat-EDTA
TBS-T	- Tris-gepufferte Natriumchloridlösung mit Tween 20

TEMED	- N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TMB	- Tetramethylbenzidin
Tris	- Tris(hydroxymethyl)-aminoethan
Tyr	- Tyrphostin AG1478
V	- Volt
v/v	- Volumen-Volumen-Prozent

1. Einleitung

Opiate sind vornehmlich für ihre starke analgetische Wirkung bekannt. Dabei können diese Substanzen sowohl auf das zentrale wie auch periphere Nervensystem wirken und dabei zahlreiche andere Effekte hervorrufen. So kann eine Morphinbehandlung neben der Analgesie eine zentral bedingte Atemdepression oder eine verminderte Darmmotilität zur Folge haben (Jaffe und Martin, 1990). Die unterschiedlichen Opiatwirkungen werden über spezielle Rezeptoren vermittelt, die durch den Opioidantagonisten Naloxon blockiert werden. Da diese Rezeptoren nicht nur durch Opiate, sondern auch durch körpereigene Endorphine (Peptide) aktiviert werden, bezeichnet man sie einheitlich als Opioidrezeptoren. Auf zellulärer Ebene beruhen diese einzelnen Opioideffekte auf einer komplexen Signalverarbeitung, die eine Aktivierung von Opioidrezeptoren und Rezeptor-assoziierten, GTP-bindenden Proteinen (G-Proteine) sowie verschiedene zelluläre Effektoren umfaßt.

1.1 Opioidrezeptoren

Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR). Sie sind durch sieben transmembrane Domänen und ihrer Interaktion mit G-Proteinen charakterisiert. Während die in den extrazellulären Raum reichenden Rezeptordomänen der Bindung der Opioide dienen, interagieren die intrazellulären Domänen mit verschiedenen G-Proteinen (Quock et al. 1999). Anhand ihrer unterschiedlichen Genloci (Giros et al., 1995), Primärstruktur und pharmakologischen Eigenschaften lassen sich drei Opioidrezeptortypen (μ, δ, κ) unterscheiden (Evans et al., 1992). Diese Rezeptortypen weisen hohe Homologien in der Aminosäuresequenz der transmembranen Domänen auf, während größere Sequenzunterschiede innerhalb der dritten intrazellulären Schleife und des distalen C-Terminus zu finden sind (Law et al., 2000). Obwohl gerade diese Rezeptordomänen ausschlaggebend für die Bindung unterschiedlicher G-Proteine sind (Hedin et al., 1993), scheinen die verschiedenen Opioidrezeptortypen dennoch gleiche G-Proteine zu bevorzugen (Hedin et al., 1993).

1.2 G-Proteine

GDP/GTP-bindende (G-) Proteine sind vornehmlich an der Plasmamembran lokalisiert, wo sie sowohl mit Rezeptoren als auch mit verschiedenen Effektoren interagieren können. Dabei dienen sie nicht nur der Signalvermittlung vom Rezeptor zu zellulären Effektoren (Gilman, 1987), sondern auch als Signalverstärker. G-Proteine sind heterotrimere Polypeptide, die sich aus drei Untereinheiten (α, β und γ) zusammensetzen. Diese Untereinheiten existieren in zahlreichen Isoformen (Standifer und Pasternak, 1997), die untereinander kombiniert zu einer Vielzahl unterschiedlicher G-Proteine führt. Aufgrund der funktionellen Eigenschaften und Lokalisation der jeweiligen α-Untereinheit werden G-Proteine daher in vier Typen eingeteilt.

Typen	Subtypen
G_s	$G\alpha_s$, $G\alpha_{olf}$
G_i	$G\alpha_{i1\text{-}3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_z$, $G\alpha_{gust}$
G_q	$G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$, $G\alpha_{15}$, $G\alpha_{16}$
G_{12}	$G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$

Tabelle 1. Einteilung der G–Proteine (nach Fields und Casey, 1997).

So umfassen G_s-Proteine alle Heterotrimere, deren Gα-Untereinheiten zu einer Aktivierung von Adenylatzyklasen führt (Abb.1). Im Gegensatz dazu bewirken inhibitorische $G_{i/o}$-Proteine eine Hemmung dieser Zyklasen. G_q-Proteine hingegen zeichnen sich durch die Aktivierung von Phospholipasen C aus und $G\alpha_{12}$-Proteine vornehmlich durch einem Na^+/H^+-Austausch und einer Stimulation von Phospholipasen D (Dhanasekaran et al., 1994; Huang et al., 2004).

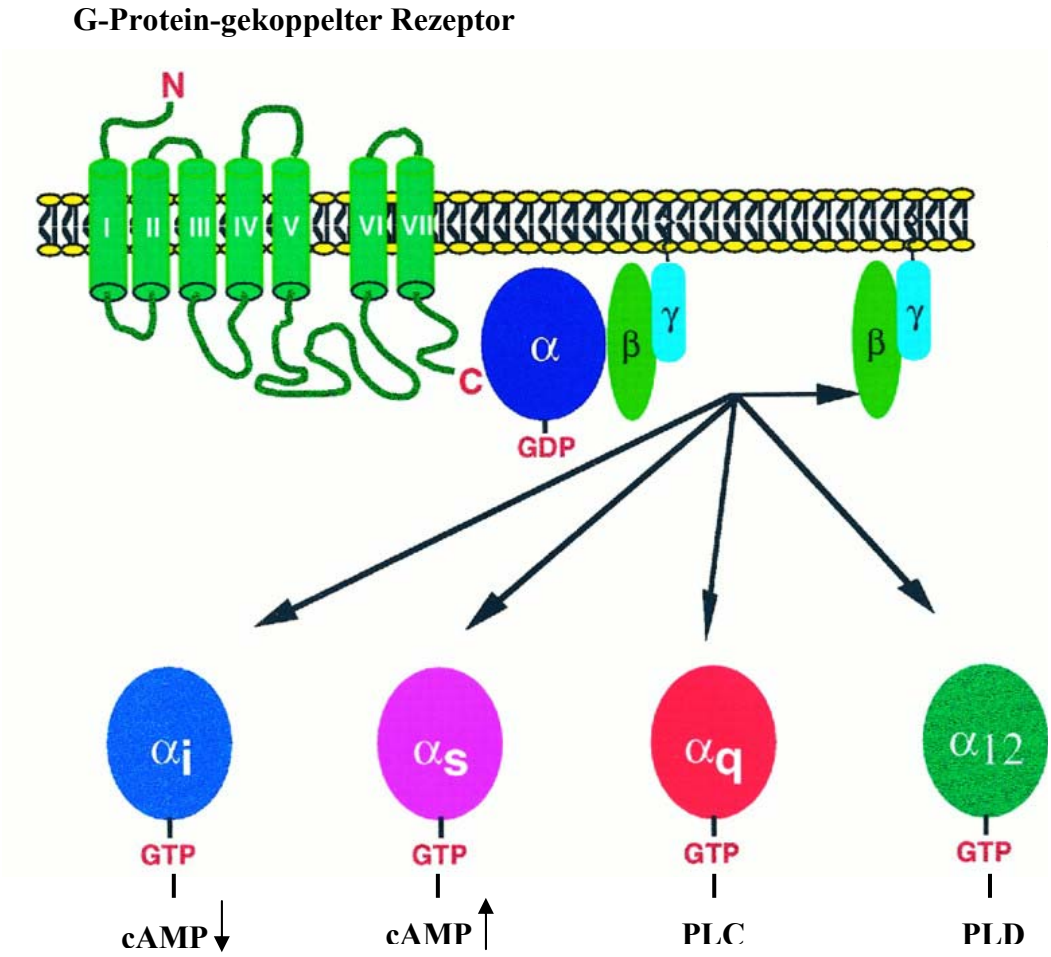


Abb. 1. G-Protein-vermittelte Effektorregulation (nach Gutkind et al. 1998).
cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, PLC = Phospholipase C, PLD = Phospholipase D

Die Aktivität der G-Proteine wird durch Austausch und Hydrolyse von Guanosintriphosphat (GTP) nach Dissoziation und Reassoziation der G-Proteinuntereinheiten kontrolliert. Die Bindung eines Agonisten führt zu einer Interaktion des Rezeptors mit inaktiven Guanosindiphosphat (GDP)-gebundenen G-Proteinen (Abb. 2). Durch diese Interaktion wird GDP durch GTP an der α-Untereinheit ausgetauscht, wodurch eine Dissoziation der Gα- von der βγ-Untereinheit resultiert. Jede dieser Untereinheiten kann nun mit verschiedenen zellulären Effektoren interagieren und somit zu unterschiedlichen Zellantworten führen (Fields und Casey, 1997). Nach einer Aktivierung des Effektormoleküls wird durch die intrinsische GTPase-Aktivität der Gα-Untereinheit (Coleman et al., 1994) GTP zu GDP hydrolysiert und die Gα-Untereinheit somit inaktiviert. Nach einer Reassoziation der GDP-

gebundenen Gα- mit der βγ-Untereinheiten steht das G-Protein für einen erneuten Aktivierungszyklus zur Verfügung (Neer et al., 1994).

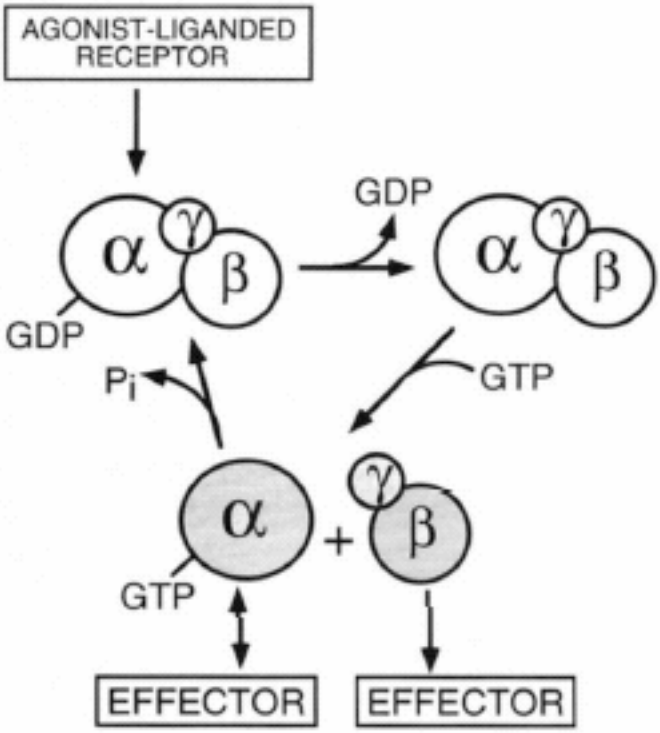


Abb. 2. Zyklus der G-Protein Aktivierung (Neer et al., 1994).

1.3 Effektorsysteme

Zelluläre Effektoren können durch aktivierte G-Proteine reguliert werden und rufen eine komplexe Zellantwort auf die Stimulation eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors hervor. Während Adenylatzyklasen die am längsten bekannte, durch Opioidrezeptoren kontrollierte zelluläre Komponente darstellen (Satoh und Minami, 1995), ist entdeckt worden, daß Opioide über die Regulation von Extrazellulär-signalregulierten Proteinkinasen (ERKs) sogar mitogene Effekte induzieren können (Yuen et al., 2004).

1.3.1 Adenylatzyklasen

Adenylatzyklasen (AC) sind membranständige Enzyme, die Adenosintriphosphat (ATP) unter Abspaltung von Diphosphat zu zyklischem Adenosin-3'-5'-monophosphat (cAMP) katalysieren (Eckstein et al., 1981; Taussig und Gilman, 1995; Abb. 4). Dabei stellt cAMP einen wichtigen „Second Messenger“ dar, der unter anderem durch die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) Einfluß auf das Wachstum und die Differenzierung von Zellen nehmen kann (Gottesman und Fleischmann, 1986).

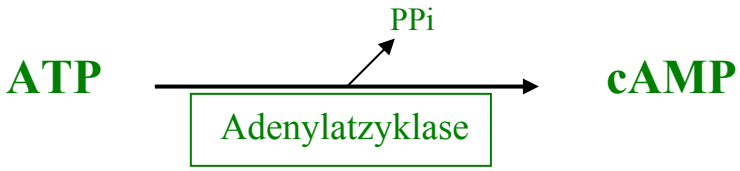


Abb. 3. Katalyse von cAMP durch Adenylatzyklasen.
ATP = Adenosintriphosphat, cAMP = zyklisches Adenosinmonophosphat, PPi = Diphosphat

Inzwischen konnten mindestens neun Adenylatzyklase-Isoformen identifiziert werden (Sunahara et al., 1996), die die Synthese von cAMP in einer Zelle kontrollieren. Verschiedene Studien haben gezeigt, daß die Aktivität der Adenylatzyklase dabei primär durch die Interaktion dieser Enzyme mit aktivierten G-Proteinen vermittelt wird (Tang und Hurley, 1998). So werden Adenylatzyklasen nach der Stimulation G_s-gekoppelter Rezeptoren durch die direkte Bindung der $G\alpha_s$-Untereinheiten aktiviert (Sunahara et al., 1996), was mit einer erhöhten cAMP-Synthese in der Zelle resultiert. Die Interaktion mit aktivierten $G\alpha_i$-Untereinheiten hingegen führt zu einer Hemmung der Adenylatzyklasen (Tausig et al., 1994). Eine Besonderheit stellen allerdings hierbei die Adenylatzyklase-Isoformen II und IV dar. Neben einer Regulation durch $G\alpha_s$-Untereinheiten weisen diese Zyklasen zusätzlich eine Bindungsstelle für $G\beta\gamma$ auf (Chen et al., 1995). Durch eine Interaktion mit $G\beta\gamma$-Dimeren können diese Zyklase-Isoformen ebenso aktiviert werden (Federmann et al., 1992). Da die Aktivität der Adenylatzyklasen durch GTP-gebundene $G\alpha$-Untereinheiten kontrolliert wird (Tang und Hurley, 1997), terminiert die GTPase Aktivität der $G\alpha$-Untereinheiten die

Funktion der Adenylatzyklasen. Durch den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen (Beavo et al., 1994) wird darüberhinaus jegliche cAMP-vermittelte Zellantwort beendet.
Neben der vorrangigen Regulation durch G-Proteine können alternative Mechanismen die Aktivierung der Adenylatzyklasen beeinflussen (Tang und Hurley, 1998). So kann die Phosphorylierung der Zyklasen durch verschiedene Proteinkinasen (Chen et al., 1997; Tan et al., 2001; Ding et al., 2004) unterstützend und hemmend auf die Aktivität von Adenylatzyklasen wirken.

1.3.2 Extrazellulär signalregulierte Proteinkinasen (ERKs)

Die extrazellulär-signalregulierten Proteinkinasen (ERKs) sind zytosolische Kinasen, die nach ihrer Stimulation in den Zellkern wandern. Dort können sie über die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren die DNA-Synthese und somit die Zellteilung regulieren (Blenis et al., 1993). Da die ERKs wesentlich an der Umsetzung zahlreicher extrazellulärer Signale in Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt sind, werden sie zur Familie der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen; Lopez-Ilasaca et al., 1998) gezählt.
Es exsistieren zwei ERK-Isoformen (ERK1/2), die vornehmlich durch Wachstumsfaktoren, z.B. den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF), über die Stimulation bestimmter Tyrosinkinase-assoziierter Rezeptoren (RTK) aktiviert werden (Pawson, 1995). Die Aktivierung der ERKs erfolgt dabei über eine komplexe, in allen Zellen gleich zusammengesetzte Signalkaskade (Cobb und Goldsmith, 1995), die verschiedene Phosphorylierungsvorgänge durch unterschiedliche Kinasen umfasst. So bewirkt die Aktivierung von RTKs eine Phosphorylierung der c-Raf-1 Kinase, die wiederum durch Phosphorylierung die MAP-Kinase Kinase MEK aktiviert. Die aktivierte MEK übernimmt schließlich die Phosphorylierung und Aktivierung der ERK1/2 (Crespo et al., 1994, Abb. 4).
Auch die Stimulation von GPCRs führt über diese konservierte Raf-MEK-ERK-Signalkaskade zu einer Phosphorylierung und Aktivierung der Kinasen (Lopez-Ilasace, 1998). Obgleich auch diese Effektorregulation durch GPCRs die Aktivierung der G-Proteine vorraussetzt, bewirken die verschiedenen G-Protein-Untereinheiten nicht direkt, sondern durch die Aktivierung vorgeschaltener Signalkomponenten eine Initiierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade (Abb. 4). Dabei scheinen abhängig vom Rezeptortyp und der jeweiligen Zellausstattung unterschiedliche Enzyme an der Aktiverung der Signalkaskade beteiligt zu

sein. So kann eine Stimulation der ERK-Kaskade durch den G-Protein gekoppelten Bradykinin B_2 Rezeptor über Phospholipasen erfolgen (LaMorte et al., 1993), die entweder über Proteinkinase C oder über die Aktivierung von cSrc-Tyrosin-Kinasen Raf-1 aktivieren (Kolch et al., 1993). Der Angiotensin 1 (AT1)-Rezeptor bewirkt hingegen über das Freisetzen membrangebundener Wachstumfaktoren und anschließender Aktivierung von entsprechenden Wachstumsfaktor-Rezeptoren eine Stimulation der Raf-MEK-ERK-Signalkaskade (Daub et al., 1997). Darüberhinaus können auch noch verschiedene Tyrosinkinasen (Pyk2), kleine GTP-regulierte Proteine (Ras) und zahlreiche Adapterproteine (Shc, Grb2) in einer Stimulation der ERKs durch GPCRs involviert sein (van Biesen et al., 1996).

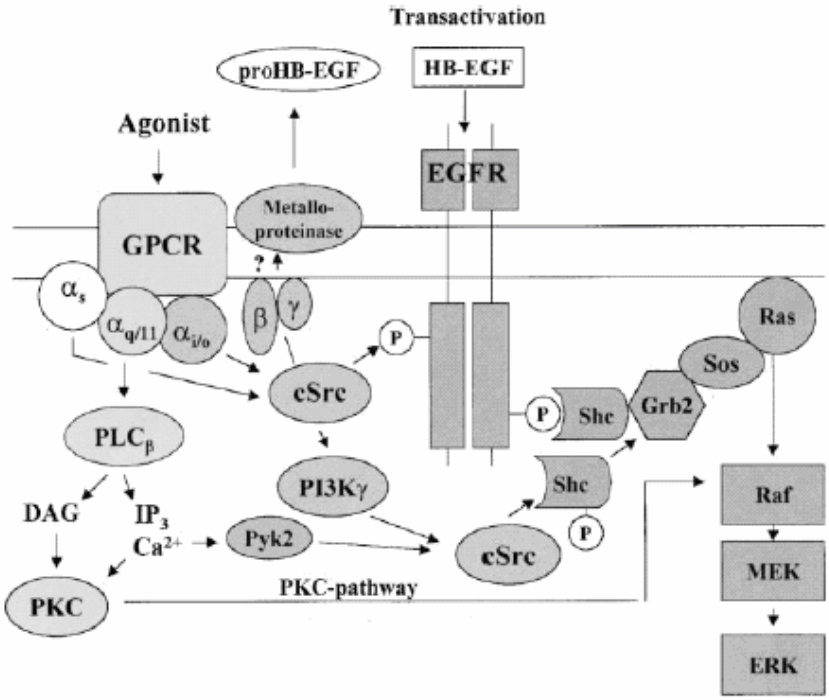


Abb. 4. Vereinfachtes Modell der ERK-Aktivierung durch GPCRs (nach Liebmann, 2001).

Viele verschiedene Signalkomponenten wie Phospholipase C (PLC), Proteinkinase C (PKC), cSrc-Kinasen, EGF-Rezeptoren sowie unterschiedliche Adapterproteine können an der Aktivierung der Raf-MEK-ERK-Kaskade durch GPCRs beteiligt sein.

2. Fragestellung

Opioidrezeptoren sind $G_{i/o}$-gekoppelte Rezeptoren (Quock et al. 1999). Die Stimulation dieser Rezeptoren resultiert unter anderem in einer Hemmung von Adenylatzyklasen in unterschiedlichen Zellmodellen (Sharma et al., 1975) und in Zellen des zentralen Nervensystems (Law et al., 1981). Verschiedene *invivo* (Ortiz et al., 1995; Berhow et al., 1996) und *invitro* Studien (Li und Chang, 1996; Avidor-Reiss et al., 1996) konnten aber auch zeigen, daß eine Aktivierung der inhibitorisch-wirkenden Opioidrezeptoren eine Stimulation der ERKs zur Folge hat. Allerdings wurden die Studien zur jeweiligen Effektorregulation (Adenylatzyklase, ERKs) unter nicht einheitlichen experimentellen Bedingungen durchgeführt. So waren nicht nur unterschiedliche Zellsysteme (NG108-15, CHO, Cos-7) und Gehirnareale analysiert worden, sondern auch verschiedene Opioidrezeptortypen und unterschiedliche Opioide (Alkaloide, Peptide). Da die Regulation von zellulären Effektoren aber sehr rezeptor- und zellspezifisch verläuft, und auch verschiedene Opioide mit den Rezeptortypen sehr unterschiedlich reagieren können, konnte aus diesen Untersuchungen keine eindeutige Aussage über die Regulation der ERKs und Adenylatzyklasen durch Opioidrezeptoren erhalten werden.

In der vorliegenden Studie sollte daher an einem einheitlichen, gut charakterisierten Zellsystem (HEK 293, humane embryonale Nierenepithelzellen) die Regulation der ERKs und der Adenylatzyklasen durch den δ-Opioidrezeptor studiert werden. Um dabei auch eventuelle Opioid-spezifische Unterschiede zu erfassen, wurden sowohl Enkephalin-Derivate als auch Alkaloid-Opioide zur Stimulation des Opioidrezeptors verwendet. Da bereits vermutet wurde, daß unterschiedliche Effektoren durch verschiedene G-Proteine kontrolliert werden können (Tsu et al., 1995), sollte darüberhinaus untersucht werden, ob die Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch δ-Opioidrezeptoren auf unterschiedlichen G-Protein-Untereinheiten beruht. Außerdem war von Interesse, ob sich diese beiden durch δ-Opioidrezeptor-kontrollierten Effektorsysteme gegenseitig in ihre Aktivität beeinflussen würden.

3. Material und Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Zellinie

Alle Versuche wurden an HEK 293 Zellen durchgeführt, die nach Transformation mit dem Adenovirus Typ 5 als permanente Zellinie kultiviert werden. Durch Transfektion mit entsprechenden cDNAs (pCMV6b-DOR und pcDNA3.1/Hygro (+)) und anschließender Selektion wurden die Zellen stabil mit δ-Opioidrezeptoren ausgestattet. Ein am Institut gezogener Zellklon (HEK-DOR), mit einer stabilen Expression von 1.4 pmol δ-Opioidrezeptor /mg Membranprotein (Eisinger et al., 2002), stand für die Versuche zur Verfügung.

3.1.2 Kulturbedingungen

Die HEK-DOR Zellen wurden in Zellkulturflaschen (Peske, Aindling-Arnhofen) mit 75 cm^2 bzw. 150 cm^2 Grundfläche bei 37˚C, gesättigtem Wasserdampfdruck und 5% CO_2 im Brutschrank (Heraeus, Hanau) kultiviert.

3.1.3 Zellkulturmedium

Die Zellen wurden in Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; PAN Biotech GmbH, Aidenbach) kultiviert, welches mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS; PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich), 29.3 mg/ml L-Glutamin (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) und Penicillin (10.000 U)/Streptomycin (10 mg/ml) (PAA Laboratories GmbH, Pasching) ergänzt wurde.

3.1.4 Passagieren der Zellen

Jegliche Arbeiten an geöffneten Gewebekulturgefäßen wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank durchgeführt. Um die Zellen unter optimalen Wachstumsbedingungen zu halten, wurden sie zwei- bis dreimal die Woche subkultiviert.

Dazu wurden die Zellen durch Abklopfen vom Gefäßboden gelöst, die Zellsuspension in ein steriles 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 300 x g 10 Minuten sedimentiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau). Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:3 bis 1:10 auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

3.1.5 Zellzählung

Um nur intakte Zellen bei der Zellzählung zu erfassen, wurden sie einer lebend-tot Färbung unterzogen. Dazu wurde die zu bestimmende Zellsuspension in physiologischer Natriumchloridlösung verdünnt und mit Trypanblau (0.25%) versetzt. Da der Farbstoff nur in tote Zellen mit geschädigter Plasmamembran eindringt, können diese durch ihre Blaufärbung deutlich von vitalen Zellen differenziert werden. Ein Tropfen dieser Zellsuspension wurde in eine Zählkammer nach Neubauer überführt. Vier große Quadrate mit einem jeweiligen Volumen von 4 nl (0.04 mm^2 Fläche x 0.1 mm Höhe) wurden ausgezählt und zur Berechnung der Zellzahl verwendet.

3.1.6 Behandlung der Zellen mit Pharmaka

Vor Versuchsbeginn wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 geteilt und für zwei Tage kultiviert. Das Wachstumsmedium wurde erneuert oder durch serumfreies Medium ersetzt und die in Frage kommenden Substanzen aus einer 100-fachen Stammlösung zugesetzt.

<u>Verwendete Substanzen:</u>

D-Ala^2, D-Leu^5-Enkephalin, (DADLE) (Bachem, Heidelberg)

D-Pen^2, D-Pen^5-Enkephalin, (DPDPE) (Bachem, Heidelberg)

Etorphin-HCl (National Institute of Drug Abuse, Bethesda, ML, USA)

Morphin-HCl (Merck, Mannheim)

Naloxon (Merck, Mannheim)

Pertussis Toxin (PTX) (Calbiochem, Schwalbach)

Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) (Bachem, Heidelberg)

Forskolin (Calbiochem, Schwalbach)

Adenosindiphosphat (ADP) (Boehringer GmbH, Mannheim)

Prostaglandin E1 (PGE1) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
2-(2‘-amino-3‘-methoxyphenyl)-oxanaphtalen (PD098059) (Sigma-Aldrich, Steinheim)
Tyrphostin AG1478 (Calbiochem, Schwalbach)
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) (Calbiochem, Schwalbach)
Deltorphin II (Bachem , Heidelberg)
1-Butanol (Merck, Darmstadt)
Neomycin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
N-[2-p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolin-sulfonamid (H-89) (Calbiochem, Schwalbach)

3.1.7 MTT-Test

MTT [3-(4,5-Dimethyl-3-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide] ist ein membrangängiger gelber Farbstoff, der in lebenden, aktiven Zellen von mitochondrialen Reduktasen zu MTT-Formazan-Kristallen reduziert wird. Diese Formazan-Kristalle weisen eine dunkelblaue Farbe auf, welche Licht einer Wellenlänge von 550-570 nm absorbiert. So kann über die Menge der gebildeten Kristalle durch spektralphotometrische Messung jeweils der Umsatz von MTT zu Formazan und somit die Vitalität und Stoffwechselaktivität der Zellen bestimmt werden.

Puffer und Lösungen:

Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (PBS):
137 mM NaCl
2.7 mM KCl
4.3 mM Na_2HPO_4 x $2H_2O$
1.4 mM KH_2PO_4
pH 7.4

MTT (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen) in PBS, 5 mg/ml

Lösungsmittel:
1/1 (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO)/ Ethanol

Durchführung:

HEK-DOR Zellen wurden auf einer 12-Lochplatte ausgesät und für 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurde das Wachstumsmedium durch frisches Medium ersetzt und die Zellen mit PTX (100 ng/ml) über Nacht inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Nach der entsprechenden Vorbehandlung wurden alle Zellen mit 0.5 mg/ml MTT für eine Stunde bei 37˚C inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch Zugabe von 1 ml Lösungsmittel die in den Zellen gebildeten Formazan-Kristalle gelöst. Anschließend wurden die Zellüberstände entnommen und die Absorption bei 560 nm gemessen. Der Anteil der vitalen Zellen wurde nach folgender Formel in Prozent ermittelt:

$$\frac{\text{Absorption behandelter Zellen}}{\text{Absorption Kontrollzellen}} \times 100 = \text{Prozent vitaler Zellen}$$

3.1.8 Kryokonservierung der Zellen

Um spontanen Mutationen und anderen selektiven Prozessen entgegenzuwirken, wurden die Zellen nach ca. 25 Passagen verworfen und neue Ausgangszellen aufgetaut. Dazu wurde ein ausreichender Vorrat an Zellen zu Beginn der Studien angelegt und in flüssigem Stickstoff bis zur Verwendung gelagert. Um der Kristallbildung von Wasser während des Gefriervorganges und somit einer Zellschädigung entgegenzuwirken, enthielt das Einfriermedium 10% DMSO (Merck-Schuchardt, Hohenbrunn). Die Zellen wurden vom Flaschenboden abgeklopft, bei 300 x g (4˚C) pelletiert und in 1 ml eisgekühltem Einfriermedium resuspendiert. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Kryoröhrchen (Nunc, Wiesbaden) überführt und in einer Styroporbox langsam auf -70˚C (GFL Gefrierschrank) heruntergekühlt. Die Umlagerung in flüssigen Stickstoff erfolgte nach 24 Stunden.

3.1.9 Auftauen der Zellen

Nach Entnahme der Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wurden diese schnell im Wasserbad bei 37˚ C aufgetaut und anschließend in 10 ml Nährmedium überführt. Nach Abzentrifugieren (300 x g, 10 min, 4˚C) und anschließender Resuspension wurden die Zellen mit 10 ml Nährmedium in eine Gewebekulturflasche umgesetzt und bei 37˚C kultiviert.

3.2 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterien

3.2.1 Transformation und Anzucht von Bakterien

Durch den Vorgang der Transformation wird fremde DNA (Plasmide) in Bakterien eingebracht, die dort schließlich in großen Mengen repliziert wird. Um anschließend nur transformierte Bakterien isolieren zu können, beinhaltet das eingebrachte Plasmid ein Resistenzgen für bestimmte Antibiotika, was die Selektion der plasmidhaltigen Bakterien auf entsprechenden antibiotikahaltigen Agarplatten ermöglicht.

Materialien:

Kompetente Bakterien:

Escherichia coli TOP 10F` (Invitrogen BV, Leek, Niederlande)

Luria-Bertani (LB)-Medium:

LB Broth Base 20g/1l H_2O (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen)

LB-Agarplatten:

Ampicillin 50 µg/ml; (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen)

LB Agar 32g/1l H_2O (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen

Verwendete Plasmide:

Adenylatzyklase Typ II (Feinstein et al., 1991)	pcDNA3.1-ACII
Hämagglutinin-Ezrin-Radixin-Moesin-bindendes Phosphoprotein 50 (Rochdi und Parent, 2003)	pcDNA 3.0-HA-EBP50
Phosduzin (Wehmeyer und Schulz, 1997)	pBC-Phd-dhfr

Durchführung:

Kompetente Bakterien (100 µl, OD_{600nm}: 0.5) wurden auf Eis langsam aufgetaut und anschließend mit jeweils 0.1 µg Plasmid-DNA versetzt. Dieser Transformationansatz wurde für 30 Minuten auf Eis inkubiert und danach für 30 Sekunden bei 42˚C erhitzt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für eine Stunde bei 37˚C (Thermomixer compact, Eppendorf) inkubiert. Anschließend wurde der Transfektionsansatz 1:10 und 1:100 mit LB-

Medium verdünnt und auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agarplatte ausplattiert. Nach einer Übernacht-Inkubation bei 37˚C konnten einzelne Bakterienkolonien isoliert werden, die anschließend in jeweils 3 ml Ampicillin-haltigem (50 µg/ml) LB-Medium bei 37˚C kultiviert wurden. Diese Übernachtkultur wurde zum Nachweis der Plasmidreplikation in isolierten Klonen verwendet.

3.2.2 Charakterisierung von Plasmid-DNA

Da durch Auftreten von Spontanmutationen die Antibiotikaresistenz alleine nicht eindeutig zur Charakterisierung transformierter Bakterien herangezogen werden kann wird aus den isolierten Bakterienklonen zunächst Plasmid-DNA gewonnen und ihre Identität über Restriktionsverdau und anschließende Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel bestimmt.

3.2.2.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmid-DNA kann aus Bakterien über die "Alkalische Lyse" nach Birnboim und Doly (1979) gewonnen werden. Die Bakterien werden dabei durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) lysiert und die enthaltene DNA anschließend durch Natronlauge denaturiert. Nach Neutralisation wird der Überstand von denaturierten Proteinen, chromosomaler DNA und bakteriellen Zelltrümmern durch Zentrifugation befreit. Im Überstand bleiben die kleineren Plasmidmoleküle in Lösung und können schließlich durch Zusatz von Isopropanol ausgefällt werden.

S1-Puffer:
50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
100 µg RNAse A/ml
pH 8.0

S2-Puffer:
200 mM NaOH
1 % SDS

S3-Puffer:
2.80 M KA c
pH 5.1

Tris/EDTA-(TE) Puffer:
10 mM Tris
1 mM EDTA
pH 8.0

Durchführung:
Von einer 3 ml-Übernacht-Kultur wurden 1.5 ml in ein 2 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und bei 4˚C für 1 Minute bei 2.000 x g zentrifugiert (Laborzentrifuge 1K15, SIGMA). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 200 µl S1-Puffer resuspendiert. Nach einer Zugabe von 200 µl S2-Puffer wurde der Ansatz für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Isolationsansatz mit 200 µl S3-Puffer neutralisiert und für 10 Minuten bei 4˚C inkubiert. Der entstandene Bakteriendetritus wurde abzentrifugiert (2.000 x g, 10 min, 4˚C) und 500 µl des verbleibenden Überstandes in 350 µl Isopropanol (Merck, Darmstadt) überführt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (2.000 x g, 10 min) wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das DNA-Pellet durch Zugabe von 500 µl 70 %-igem (v/v) Ethanol (Merck, Darmstadt) gewaschen. Nach weiterer Zentrifugation (2.000 x g, 5 min, 4˚C) wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet bei Raumtemperatur für fünf Minuten getrocknet und anschließend in 20 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.2.2 Restriktionsverdau der isolierten Plasmid-DNA

Beim Restriktionsverdau wird unter definierten Puffer- und Reaktionsbedingungen Plasmid-DNA in einzelne Fragmente enzymatisch gespalten. Da Restriktionsenzyme nur an spezifischen Erkennungsstellen das Plasmid spalten, erhält man nach Auftrennung der enzymgespaltenen DNA ein Plasmid-spezifisches Fragmentmuster und somit einen eindeutigen Hinweis auf das transformierte Plasmid.

Restriktionsenzym:
EcoR I (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Konzentration: 10 Einheiten/µl
Reaktionspuffer:
Puffer Y^+/Tango™ (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth)

Durchführung:
Für einen Restriktionsansatz wurden jeweils 1 µg isolierter oder ursprünglicher Plasmid-DNA, eine Einheit EcoR I und 1 µl Puffer auf ein Gesamtvolumen von 10 µl Aqua bidest. pipettiert. Nach einer Inkubation für vier Stunden bei 37˚C wurde der Verdau durch Erhitzen auf 65˚C gestoppt. Daran schloß sich die Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel.

3.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese von DNA

Aufgrund der polyanionischen Eigenschaft können DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau im elektrischen Feld der Größe nach aufgetrennt werden. Dabei wandern die kleineren Fragmente schneller zur Anode als die größeren. Parallel zu den Proben wird ein Größenstandard aus DNA-Fragmenten definierter Länge aufgetragen. Durch Einlagerung des Fluoreszensfarbstoffs Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente anschließend markiert und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Puffer und Lösungen:
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE):
40 mM Tris-HCl
2 mM $Na_2EDTA \times 2\ H_2O$
mit Essigsäure auf pH 8.5 eingestellt

1 %-iges (m/v) Agarosegel:
0.3 mg Agarose
30 ml TAE-Puffer

Größenstandard:
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (0.5 mg DNA/ml; MBI Fermentas, St. Leon-Rot)
Ladepuffer 6 x:
60 mM EDTA

0.2 % (m/v) Bromphenolblau
0.2 % (m/v) Xylencyanol
60 % (v/v) Glycerol

Ethidiumbromid-Lösung:
0.5 µg/ml Ethidiumbromid (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen) in Aqua bidest.

Durchführung:
Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und mit Ethidiumbromid versetzt. Das noch flüssige Agarosegel wurde anschließend in eine Gelkassette (Model: B1A ,OwI Separations Systems) gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Dieser wurde nach Erstarren des Gels entfernt und das Gel in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer (Model B1A; OwI Separations Systems, Portsmouth, USA) gelegt. Jeweils 6 µl des DNA-Verdau-Ansatzes wurden mit 4 µl Ladepuffer gemischt und in die Geltaschen des Agarosegels pipettiert. Parallel dazu wurden einmalig 0.5 µg des Größenstandards aufgetragen. Die Kammer wurde nun an einen Stromgeber angeschlossen und die DNA-Fragmente bei 75 V aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurden die einzelnen DNA-Fragmente im Videodensitometer (E.A.S.Y. RH-3; Herolab, Wiesloch) unter UV-Licht bestimmt.

3.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA zur Transfektion

Da die Transfektion von Zellen größere Mengen hochreiner DNA erfordert, wurde die DNA-Isolierung aus Bakterien unter Verwendung des "Nukleobond® AX Kit" (Macherey-Nagel GmbH, Düren) durchgeführt. Wie unter 3.2.2.1 bereits beschrieben, beruht auch dieses System auf dem Prinzip der "Alkalischen Lyse". Allerdings wird nach der Bakterienlyse die polyanionische Plasmid-DNA über eine äquilibrierte Anionenaustauschersäule gebunden und durch mehrmaliges Waschen von Proteinresten und RNA befreit. Anschließend wird die so gereingte Plasmid-DNA eluiert und durch Zugabe von Isopropanol gefällt.

Durchführung:
Plasmidhaltige Bakterien wurden für 12 Stunden bei 37˚C in 200 ml LB-Medium kultiviert, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 2.500 x g für 10 Minuten pelletiert (Sorvall® RC-5B Zentrifuge, GSA-Rotor, DuPont, Köln). Nach Verwerfen des Überstandes, wurde das

Bakterienpellet in 12 ml S1-Puffer vorsichtig resuspendiert und die Bakterien durch Zugabe von 12 ml S2-Puffer für 5 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Das Lysat wurde anschließend mit 12 ml S3-Puffer neutralisiert und für 5 Minuten bei 4˚C inkubiert. Danach wurden die denaturierten Bakterienproteine bei 23.000 x g (20 Minuten, 4˚C, Sorvall®-Zentrifuge SS-34 Rotor) sedimentiert und durch erneutes Zentrifugieren (23.000 x g, 20 Minuten, 4˚C) der Überstand vollständig geklärt. Dieser wurde über eine mit 5 ml N2-Puffer äquilibrierte Austauschersäule (Nukleobond® AX 500) geführt. Anschließend wurde die Säule zweimal mit jeweils 12 ml N3-Puffer gewaschen. Die an die Säule gebundene Plasmid-DNA wurde schließlich mit 12 ml N5-Puffer eluiert. Durch Zugabe von 0.75 Volumenanteilen Isopropanol wurde die eluierte DNA gefällt und für 30 Minuten bei 15.000 x g pelletiert. Nachdem das DNA-Pellet mit 10 ml 70% igem Ethanol gewaschen wurde, wurde die DNA in 250 µl TE-Puffer gelöst.

3.2.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die aromatischen Ringe der Nukleinsäuren können Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm absorbieren, was zur photometrischen Konzentrationsbestimmung der DNA genutzt werden kann. Die Messung erfolgt in Quarzküvetten, die kein UV-Licht absorbieren. Bei einer Küvettenschichtdicke von 1 cm ergibt eine 50 µg/ml DNA-Lösung eine optische Dichte (OD) von 1. Im Gegensatz dazu weisen Proteine ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf. So kann durch die Bestimmung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} eine Aussage über die Reinheit bzw. Verunreinigungen durch Proteine der DNA-Präparation gemacht werden. Eine reine DNA-Präparation besitzt einen Quotienten von 1.8 bis 2.0. Je größer die Kontamination mit Proteinen ist, desto kleiner wird dieser Wert. Die photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit einem Hitachi U-3200 Photometer. Alle für die Transfektion von HEK-DOR Zellen isolierten Plasmide wiesen eine Reinheit von 1.96 bzw. 1.97 auf.

3.2.5 Transfektion von HEK-DOR Zellen

Bei einer Transfektion wird wirtsfremde DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Die häufigste Transfektionsmethode stellt die Kalziumphosphat-Kopräzipitation dar, bei der Plasmid-DNA mit Kalziumchlorid und einem phosphathaltigem Puffer gemischt wird. Dabei bilden sich DNA-Kalziumphosphat-Kopräzipitate, die über Endozytose in die Zelle

aufgenommen werden können. Nach der Transfektion gelangt die Plasmid-DNA in den Zellkern und wird dort für einige Tage exprimiert (transiente Expression).

Verwendete Plasmide:
pcDNA 3.1-ACII
pcDNA 3.0-HA-EBP50
pBC-Phd-dhfr

2.5 M $CaCl_2$

2 x N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminoethansulfon Säure (BES):
50 mM BES
280 mM NaCl
1.5 mM Na_2HPO_4
pH 6.95

Durchführung:
HEK-DOR Zellen wurden vor der Transfektion im Verhältnis 1:3 in Zellkulturflaschen umgesetzt und bis zu einer Wachstumsdichte von etwa 70 % kultiviert. In ein Polypropylen-Röhrchen (A) wurden 100 µl $CaCl_2$, 10 µg Plasmid-DNA und Aqua bidest auf ein Endvolumen von 1 ml pipettiert und vorsichtig gemischt. In einem zweiten Röhrchen (B) wurden 1 ml einer 2 x BES-Lösung vorgelegt und langsam mit dem Inhalt aus Röhrchen A gemischt. Der Transfektionsansatz wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in das Wachstumsmedium der Zellen gegeben. Nach 24 Stunden wurde das Medium erneuert und die transfizierten Zellen auf 12- bzw. 24-Lochplatten umgesetzt. Nach einer weiteren Inkubation für 24 Stunden wurden die Zellen schließlich für die Versuche zur ERK-Stimulation bzw. cAMP-Akkumulationen verwendet.

3.3 Rezeptoraffinitätsbestimmung verschiedener Opioide durch heterologe Verdrängung

Die Bindungsaffinität verschiedener Liganden zu einem Rezeptor kann über heterologe Verdrängungsexperimente untersucht werden, welche auf einer Konkurrenz von einem markierten und einem nicht markierten Liganden um eine spezifische Bindungsstelle basieren. Um die Affinität verschiedener Opioide zum δ-Opioidrezeptor zu bestimmen, wurde das Bindungsexperiment mit einer konstanten Menge des Antagonisten ^{3}H-Diprenorphin und aufsteigenden Konzentrationen der unterschiedlichen Agonisten (DADLE, DPDPE, Etorphin, Morphin) durchgeführt. Da die einzelnen Agonisten entsprechend ihrer Bindungsaffinität den Radioliganden vom Rezeptor verdrängen, kann über die Verdrängungskurve die Konzentration des unmarkierten Liganden, bei der die Hälfte des Radioliganden aus seiner Bindung verdrängt wurde (EC_{50}), ermittelt werden. Über die eingesetzte Konzentration des Radioliganden R* und der Radio-Ligandenkonzentration, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind (K_{d*}), kann die inhibitorische Konstante (K_i) des Kompetitors nach Cheng und Prusoff (1973) errechnet werden. Die K_d von ^{3}H-Diprenorphin in HEK-DOR Zellen beträgt 0.9 nM.

$$K_i = \frac{EC_{50}}{1 + \frac{[R^*]}{K_{d^*}}}$$

3.3.1 Membranpräparation

Die Bindungsstudien wurden jeweils an einer partikulären Membranpräparation von HEK-DOR Zellen durchgeführt, die nach Vachon et al. (1987) gewonnen wurden.

Pufferlösungen:

Phosphat-gepufferte Natriumchloridlösung (PBS)

Tris/$MgCl_2$-Puffer-Lösung:

Tris 50 mM

$MgCl_2$ 5 mM

pH 7.4

Durchführung:

HEK-DOR Zellen wurden vom Flaschenboden abgeklopft, in Zentrifugenröhrchen überführt und für 10 min bei 300 x g und 4˚C (Minifuge RF, Hanau) sedimentiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 10 ml kaltem PBS-Puffer resuspendiert und erneut bei 300 x g für 10 min sedimentiert. Nach Verwerfen dieses Überstandes wurde das Zellpellet resuspendiert, nochmals in 10 ml PBS aufgenommen und sedimentiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Tris/$MgCl_2$-Puffer resuspendiert und im Polytron-Homogenisator (PCU, Bachhofer, Ratingen) für 10 Sekunden bei Stufe 6 homogenisiert. Intakte Zellen und Zellkerne wurden anschließend bei 600 x g (10 Minuten) abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Plasmamembranfraktion durch Zentrifugation bei 40.000 x g für 30 min (Rotor SS-34, Sorvall® RC-5B, DuPont, Köln) gewonnen. Dieses Membranpellet wurde nach Abkippen des Überstandes in Tris/$MgCl_2$-Puffer resuspendiert und der Proteingehalt bestimmt.

3.3.2 Proteinbestimmung nach Lowry

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) basiert auf der Ausbildung eines Kupfer-Protein-Komplexes, der anschließend über eine Farbreaktion bestimmt werden kann. Zweiwertiges Kupfer (Cu^{2+}) wird von den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan komplexiert und reduziert. Das reduzierte Cu^{+} wiederum bildet zusammen mit Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz einen Farbkomplex, der sich in einer blauen Färbung zeigt. Die Intensität dieser Blaufärbung wird im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen. Über die Verwendung von bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard kann schließlich eine Bestimmung der Proteinmengen unter linearen Regressionsbedingungen erfolgen.

<u>Reagenzien:</u>

Kupfersulfat-Tartrat-Natriumkarbonat (CTC-Lösung):

0.1% (m/v) $CuSO_4*5H_2O$

0.2% (m/v) Na/K-Tartrat

10% (m/v) Na_2CO_3

in Aqua bidest.

Lowry A-Lösung:

10 ml CTC-Lösung

10 ml 0.8 M NaOH
20 ml 5% (m/v) Natriumdodecylsulfat (SDS; Carl Roth GmbH, Karlsruhe)

Lowry B-Lösung:
20% (v/v) Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen) in Aqua bidest.
Für die Standardkurve wurden jeweils im Doppelansatz eingesetzt:
A: 100 µl H_2O (= Nullwert der Standardgerade)
B: 100 µl 2.5% (m/v) BSA (Fluka, BioChemika, Switzerland) in H_2O
C: 100 µl 5% (m/v) BSA
D: 100 µl 7.5% (m/v) BSA
E: 100 µl 10% (m/v) BSA

Durchführung:
Jeweils 3 µl der Membranpräparation wurden in 97 µl Wasser verdünnt und für die Proteinbestimmung im Doppelansatz eingesetzt. Nach Zugabe von jeweils 200 µl Lowry A-Reagenz zu den Standards und den Proben wurden die Reaktionsansätze gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden jeweils 100 µl Lowry B-Reagenz zugegeben und die Ansätze nochmals für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 750 nm im Spektralphotometer (Modell U-3200; Hitachi, Düsseldorf) gemessen.

3.3.3 Radioligandenbindung

Verwendeter Puffer:
Tris/$MgCl_2$-Puffer
pH 7.4

Blocklösung für GF/B-Filter:
0.1% (m/v) Polyethylenglycol 6.000 (PEG, Merck, Hohenbrunn) in Aqua bidest.

Durchführung:
Der Bindungsansatz beinhaltete jeweils 160 µl einer frisch präparierten Membransuspension von HEK-DOR Zellen, 20 µl ^{3}H-Diprenorphin (10 nM) und 20 µl der Opioide DADLE,

DPDPE, Etorphin (0.1 nM-100 µM) und Morphin (1 nM-1 mM) in aufsteigender Konzentration. Die Bindungsreaktion wurde bei 25˚C für 60 Minuten im Wasserbad durchgeführt und anschließend mit 1 ml eiskaltem Tris/$MgCl_2$ Puffer gestoppt. Die Abtrennung nicht-gebundener Radioliganden erfolgte über eine Vakuumfiltration durch PEG-geblockte Whatman GF/C Filter (Ø 25 cm). Nach dreimaligem Waschen der Filter mit 3 ml Tris/$MgCl_2$-Puffer wurden diese in Zählröhrchen überführt und die gebundene Radioaktivität nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Carl Roth, Karlsruhe) im Szintillationszähler (Beckmann Coulter, LS 6500) gemessen.

3.4 Bestimmung von cAMP in intakten HEK-DOR Zellen

Die Stimulation von Opioidrezeptoren bedingt über inhibitorische G-Proteine eine Hemmung von Adenylatzyklasen und somit eine Abnahme von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in der exponierten Zelle. Die anschließende Bestimmung des zellulären cAMP ermöglicht somit eine Aussage über die Regulation der Adenylatzyklasen. Eine äußerst selektive Methode zur Ermittlung von cAMP stellt der auf immunologischem Verfahren beruhende Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA) dar.

3.4.1 cAMP-Akkumulation in HEK-DOR Zellen

Die Durchführung der cAMP –Akkumulation in HEK-DOR Zellen erfolgte in Anlehnung an Ammer und Schulz (1997). Dabei wird die Basalaktivität der Zyklasen zunächst durch den direkten Stimulator Forskolin (10 µM) gesteigert, um anschließend den hemmenden Einfluß von Opioiden und anderen Substanzen ermitteln zu können. Um dem Abbau des gebildeten cAMP durch endogene Phosphodiesterasen entgegenzuwirken, wurden die Zellen zusätzlich in Anwesenheit von 10 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX, Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen), einem Phosphodiesterase-Blocker, behandelt.

Lösungen:

DMEH/IBMX-Lösung:

5 g/0.5 l Wasser DMEM (SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen)

25 mM HEPES (N-[2-Hydroxyethyl]-piperazin-N‘-[2-ethansulfonsäure]; SIGMA Chemie GmbH, Deisenhofen)
pH 7.4
10 µM IBMX

HCl zum Stoppen:
10 mM HCl

Durchführung:
Die Zellen wurden einen Tag vor dem Versuch auf eine 24-Lochplatte umgesetzt und über Nacht bei 37˚C kultiviert. Nach unterschiedlichen Vorbehandlungen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch jeweils 250 µl der folgenden Lösungen ersetzt: DMEH/IBMX, DMEH/IBMX + Forskolin, DMEH/IBMX + Forskolin + Opioide in unterschiedlichen Konzentrationen. Anschließend wurde die Platte auf einem Wasserbad bei 37˚C für 15 Minuten inkubiert. Durch Zugabe von 750 µl 10 mM HCl/well wurde die Reaktion gestoppt und die Platte für 30 min auf ein Eisbad gestellt. Anschließend wurden die Zellen durch das Zentrifugieren der Platte für 10 Minuten bei 300 x g sedimentiert und der Zellüberstand durch Zugabe von 37 µl NaOH neutralisiert. Bis zur cAMP-Bestimmung wurden die Platten bei –20˚C gelagert.

3.4.2 ELISA-Technik

Das Prinzip des ELISAs (Abb. 5) zur Bestimmung von cAMP beruht auf einer Konkurrenz von zellulärem und einem Markerenzym-konjugierten cAMP um die Bindung an einen selektiven cAMP-Antikörper (AK), der über einen anti-Kaninchen Antikörper am Boden einer 96-Lochplatte gebunden ist. Durch Zugabe eines chromogenen Substrats kann der Anteil der Immunkomplex-gebundenen Markerenzyme durch eine Farbreaktion ermittelt werden. Je intensiver die Farbreaktion, desto geringer der Anteil zellulären cAMPs, welches um die Antikörper-Bindung konkurriert.

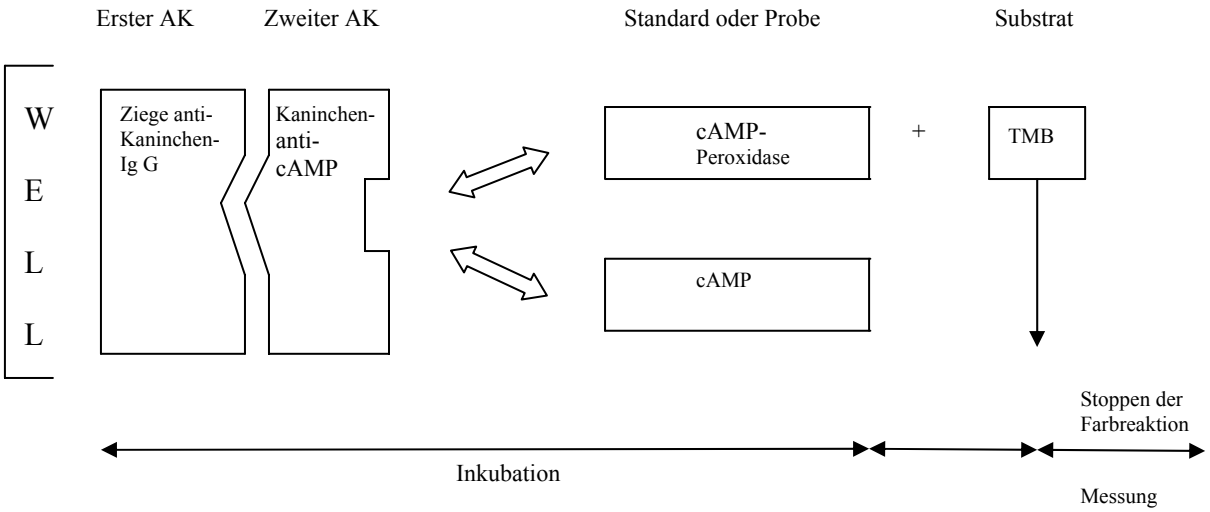


Abb. 5. Prinzip des ELISAs
TMB = Tetramethylbenzidin

Der ELISA zur cAMP-Bestimmung wurde am Institut unter Verwendung eigens hergestellter Antikörper und Konjugat etabliert.

3.4.2.1 Affinitätsreinigung eines Ziege-anti-Kaninchen Antiserums

Zur Gewinnung reiner anti-Kaninchen IgG-Antikörper wurde das Serum einer Kaninchen IgG-immunisierten Ziege über eine entsprechend gekoppelte Kaninchen IgG-Agarosesäule affinitätsgereinigt. Die an eine Vakuumpumpe (Minipuls 2, Gilson) angeschlossene Säule (7 cm x 1.5 cm, mit 2 ml Kaninchen-IgG-Agarose) wurde vor und nach Aufbringen des Ziegenserums mit 10 mM Tris-Puffer (pH 7.5) gewaschen. Anschließend wurde die Agarosesäule mit 5 ml 0.5 M NaSCN (pH 8.0) und 5 ml 0.1 M Glycin-HCl (pH 3.5) gewaschen. Der an die Säule gebundene anti-Kaninchen IgG-Antikörper wurde dann über die Zugabe von 10 ml 0.1 M Glycin-HCl (pH 2.0) und 2 ml 10 mM Tris-HCL (pH 8.0) eluiert.

3.4.2.2 cAMP-ELISA

Puffer und Lösungen:

Beschichtungspuffer (Coatingbuffer):

0.2 M Carbonatpuffer

pH 9.4

Blockpuffer:

0.1 % BSA in PBS

pH 7.4

Probenpuffer:

50 mM Na-Acetat

pH 6.0

0.1% BSA

Waschpuffer (Phosphatpuffer):

1 M Na_2HPO_4

1 M NaH_2PO_4

pH 7.4

0.01% Tween 20

Substratlösung:

Lösung A: 1 g/l Wasserstoffperoxid

18 g/l Na_2HPO_4 x 2 H_2O

10.3 g/l Zitronensäure x 1 H_2O

Lösung B: 500 mg Tetramethylbenzidin (TMB)

40 ml Dimethylsulfoxid (DMSO)

960 ml H_2O

10.3 g/l Zitronensäure x 1 H_2O

cAMP-Standardkurve:

Standard I: 10 µM cAMP-Standardlösung in Probenpuffer

A: Substrat Kontrolle (B_0= Probenpuffer)

B: 1:10 aus Std.I (100 pmol cAMP/100 µl)	1 µM cAMP
C: 1:5 aus B (20 pmol cAMP/100 µl)	200 nM cAMP
D: 1:5 aus C (4 pmol cAMP/100 µl)	40 nM cAMP
E: 1:5 aus D (0.8 pmol cAMP/100 µl)	8 nM cAMP
F: 1:5 aus E (0.16 pmol cAMP /100 µl)	1.6 nM cAMP
G: 1:5 aus F (0.032 pmol cAMP/100 µl)	0.32 nM cAMP
H: 1:5 aus G (0.0064 pmol cAMP/100 µl)	0.064 nM cAMP

Durchführung:

Eine 96-Loch-Mikrotitierplatte wurde mit dem affinitätsgereinigten Ziege-anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (10 µg/ml) beschichtet und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Zugabe einer 0.1 %-igen BSA-Lösung für 30 Minuten geblockt. Anschließend wurde die beschichtete Platte ausgeklopft und dreimal mit Waschpuffer (400 µl/well) gewaschen. Danach wurde die Mikrotiterplatte mit jeweils 50 µl Kaninchen-anti-cAMP-Antikörper (1/70 verdünnt in Probenpuffer) bestückt. In der Zwischenzeit wurde die 24-Lochplatte aus dem Akkumulationversuch aufgetaut und der Zellüberstand im Verhältnis 1:4 mit Probenpuffer verdünnt. Im Dreifachansatz wurden jeweils 100 µl des verdünnten Zellüberstandes in die beschichtete Platte pipettiert. Zur Bestimmung der Standardkurve wurden in Dreifachbestimmung analog jeweils 100 µl der unterschiedlich konzentrierten Standardlösungen verwendet. Anschließend wurde die Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe des cAMP-Konjugates (hergestellt nach Horton et al., 1992) in einer Verdünnung von 1:750,wurde die Platte über Nacht bei 4˚C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platte ausgeklopft und nach dreimaligem Waschen die Substratlösung (150 µl/well) aufgetragen. Die Platte wurde für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 1 N HCl wurde die Farbreaktion gestoppt und die Färbung photometrisch bei 450 nM (SLT Spectra) gemessen.

3.5 Bestimmung der ERK-Phosphorylierung in HEK-DOR Zellen

Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren führt über eine komplexe Signalkaskade zur Aktivierung der Extrazellulär Signalregulierten Proteinkinasen (ERK). Die Aktivierung erfolgt über eine Phosphorylierung der ERKs an bestimmten Threonin- und Tyrosin-Resten, die schließlich über phosphospezifische Antikörper im Westernblot-Verfahren detektiert werden kann.

3.5.1 Stimulierung der ERKs in HEK-DOR Zellen

Zur Bestimmung der ERK-Phosphorylierung wurden HEK-DOR Zellen auf eine 12-Lochplatte umgesetzt und bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Um die basale ERK-Phosphorylierung auf ein Minimum zu reduzieren, wurden die Zellen für 120 Minuten

serumfrei inkubiert. Im Anschluß daran wurde das serumfreie Medium mit verschiedenen Substanzen zur Stimulation oder Hemmung der ERKs versetzt. Die Basalaktivität der ERKs in unbehandelten Zellen diente jeweils zur Kontrolle. Es folgte eine Inkubation der Zellen für 5 min auf einem beheizten Wasserbad bei 37˚C. Zum Stoppen der Inkubation wurde die Platte anschließend sofort auf ein Eisbad gestellt, das Medium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von jeweils 150 µl Probenpuffer lysiert.

Probenpuffer:
6.25 mM Tris-HCl; pH 6,8
2% (m/v) SDS (Carl Roth, Karlsruhe)
50 mM DTT (GERBU, Biotechnik, Gaiberg)
10% (v/v) Glycerol
0.6% (v/v) Phenolrot

3.5.2 Vorbereitung der Proben für die Elektrophorese

Von der 12-Lochplatte wurden die Zellysate jeweils in 1.5 ml Schraubgefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und die zellulären Proteine durch Erhitzen (Thermomixer compact, Eppendorf, Hamburg) der Proben auf 95˚C für 5 Minuten denaturiert. Nach dem Abkühlen wurden die Zellysate einer SDS-Gelelektrophorese unterzogen.

3.5.3 Auftrennung der Proteine durch SDS-Gelelektrophorese

Durch die großen Mengen an anionischem Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer und im Gel, wird die Eigenladung der Proteine so effektiv überdeckt, daß die Auftrennung der nun einheitlich negativ geladenen Proteine im Gel ausschließlich nach der Molekülgröße erfolgt. Ein Linearisieren der Proteine durch zusätzliche Aufhebung der Sekundär- und Tertiärstruktur unterstützt darüber hinaus die größenorientierte Proteinauftrennung. Die Auftrennung erfolgte über ein Polyacrylamid (PAA)- Gel, das durch Variationen des PAA-Anteils unterschiedliche Porengrößen aufweisen kann.

Materialien

Trenngel:

5 ml 30% (m/v) Polyacrylamid (PAA)/ Bisacrylamid-Stammlösung (Carl Roth, Karlsruhe)

3.75 ml 1.5 M Tris-HCl; pH 8.8
150 µl 10% (m/v) SDS
6.1 ml H_2O

Die Polymerisierung des Gels wurde durch die Zugabe von 15 µl N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED, Carl Roth, Karlsruhe) und 7.5 µl 10 %-igem Ammoniumpersulfat (APS, Sigma, Taufkirchen) gestartet.

Sammelgel:
1.7 ml PAA-Lösung
1 ml Tris-HCl; pH 6.8
100 µl 10% (m/v) SDS
7 ml H_2O
Zur Auspolymerisierung:
20 µl TEMED
100 µl APS

Elektrophoresepuffer:
3 g Tris
14.4 g Glycin (Carl Roth, Karlsruhe)
1 g SDS
auf 1 l H_2O

Durchführung:
Nach gründlicher Reinigung der Glasplatten und der Gelapparatur wurde diese entsprechend der Herstelleranweisung zusammengebaut (Mini Protean 3, Bio Rad Laboratories, Segrate, Italien). Zwischen die im Abstand von 1 mm horizontal aufgestellten Glasplatten wurden zunächst 4 ml der Trenngel-Lösung gegossen. Diese wurde anschließend mit 1 ml Wasser überschichtet, um die oben gelegene Gelseite während der Polymerisierung vor dem

Eintrocknen zu schützen. Nach 25 min wurde das Wasser abgekippt, die Sammelgel-Lösung auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm eingesetzt. Nachdem die Gele vollständig polymerisiert waren, wurde der Kamm gezogen und die Gele in eine mit Elektrophorese-Puffer gefüllte Gelkassette gestellt. Die durch den Kamm gebildeten Geltaschen wurden jeweils mit 10 µl des Zellysates befüllt. Die Gelkassette wurde schließlich in die mit Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt und diese an einen Stromgeber angeschlossen. Das Sammeln der Proteine im Sammelgel erfolgte bei 100 V (ca. 20 min), und ihre Auftrennung im anschließenden Trenngel bei 200 V (35 min).

3.5.4 Proteinblotting und Detektion der Proteinbanden

Während des Blotvorgangs werden die im Gel aufgetrennten Proteine auf die Oberfläche einer Membran übertragen und dort somit immobilisiert. Diese Membran wird mit einem für das Protein spezifischen Antikörper anschließend inkubiert und die entstandenen Immunkomplexe nach einer zweiten Inkubation der Membran mit einem enzymmarkierten Antikörper sichtbar gemacht.

3.5.4.1 Proteintransfer

Blotting-Puffer:
3 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe)
6.9 g Glycin (Carl Roth, Karlsruhe)
auf 1 l H_2O

Durchführung:
Der Größe des Trenngels entsprechend wurde eine PVDF-Membran (Hybond-P, Amersham, Biosciences) zurechtgeschnitten und für 10 Minuten in Methanol eingelegt. Anschließend wurde die Membran auf das Gel gelegt und beides zwischen puffergetränktes Filterpapier (Novablot, Amersham, Biosciences, Schweden) und zwei Glasfaserschwämme in einer Gitterkassette eingeklemmt. Die Kassette wurde in einen mit Puffer gefüllten Blottank (No Mini Protean 3 Cell, Bio Rad, Italien) gestellt und an einen Stromgeber bei 80 V für eine Stunde angeschlossen.

3.5.4.2 Blocken unspezifischer Bindungsstellen

Nach dem Proteintransfer wurde die Membran für eine Stunde in Blocklösung bei Raumtemperatur und leichtem Schwenken inkubiert.

Blocklösung:

1 ml Roti-Block-Lösung (Carl Roth, Karlsruhe)

9 ml H_2O

3.5.4.3 Inkubation der Membranen mit spezifischen Antiseren

Die Detektion der ERKs erfolgte durch einen polyklonalen Anti-ERK- und einen Anti-phosphospezifischen-ERK-Antikörper (Cell Signaling, Frankfurt). Während der Anti-ERK-AK (Verdünnung 1:1000) unabhängig vom Phosphorylierungsstatus beide Isoformen der ERKs bindet, erkennt der Anti-phosphospezifische-ERK-AK (Verdünnung 1:1000) nur die phosphorylierte und somit aktive Form der ERKs. Die Expression von HA-gekoppeltem EBP50 in transfizierten HEK-DOR Zellen wurde über einen HA- (Hämagglutinin) Antikörper (von Herrn Prof. Dr.H. Ammer zur Verfügung gestellt) kontrolliert (Verdünnung 1:600). Zum Nachweis von Phosduzin in entsprechend transfizierten Zellen wurde ein Kaninchen-anti-Phosduzin Antikörper (von Herrn Prof. Dr. R. Schulz zur Verfügung gestellt) verwendet (Verdünnung 1:20.000). Der sekundäre Antikörper war jeweils ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper (Verdünnung 1:20.000). Sowohl die primären als auch der sekundäre Antikörper wurden in TBS-T-Puffer aufgenommen.

TBS/T-Puffer:

3 g Tris (Carl Roth, Karlsruhe)

11.1 g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe)

1 ml Tween 20 (Carl Roth, Karlsruhe)

auf 1 l H_2O

pH 7.7

Durchführung:

Nach Entfernen der Blocklösung wurden die Membranen mit den verschiedenen primären Antikörpern in der angegebenen Verdünnung über Nacht bei 4˚ C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die AK-Lösungen abgekippt und die Membranen fünfmal mit 15 ml TBS/T Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit dem sekundären AK (Verdünnung

1:20.000) bei Raumtemperatur für eine Stunde unter leichtem Schütteln inkubiert. Daran schloß sich wieder ein fünfmaliges Waschen mit TBS/T Puffer.

3.5.4.4 Optische Detektion der Proteinbanden

Das an den sekundären Antikörper gekoppelte Enzym Meerrettich-Peroxidase bindet das Chemilumineszenzsubstrat Luminol, welches in Anwesenheit von H_2O_2 oxidiert wird und unter Emission von Licht(-blitzen) wieder reduziert wird. Über diese Lichtemissionen können entsprechende Immunkomplexe als Schwärzung auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm-ECL®; Amersham Life Science, Buckinghamshire, England) sichtbar gemacht werden.

Enhanced-Chemilumineszenzlösung (ECL-Lösung):
18 ml H_2O
2 ml 1 M Tris/HCl; pH 8.5
89 µl p-Cumarsäure (Fluka Feinchemiekalien, Deisenhofen)
200 µl Luminol (Fluka Feinchemiekalien, Deisenhofen)
6.1 µl H_2O_2 (Merck, Darmstadt)

Durchführung:
Die Blotmembranen wurden für 30 Sekunden in der ECL-Lösung inkubiert und anschließend in eine Röntgenkassette gelegt. Nach dem Auflegen der Membranen auf einen Röntgenfilm für eine Minute wurde der so exponierte Film entwickelt und fixiert.

3.5.4.5 Densitometrische Bestimmung

Die Ermittlung der EC_{50}-Werte für die Phosphorylierung der ERKs durch die verschiedenen Opioide erfolgte über die densitometrische Bestimmung der jeweils detektierten Immunobanden.. Die stärkste Schwärzung und somit die maximale Phosphorylierung der ERKs wurde 100 % gesetzt und die folgenden Werte dazu prozentual bestimmt.

3.6 Statistische Auswertung

Innerhalb einer Zwei- oder Dreifachbestimmung wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Die Berechnung von Standardardabweichung und Standardfehler erfolgte unter Zuhilfenahme des Statistikprogramms "InStat" in der Version 2.03 für Apple Macintosh.
Signifikante Unterschiede zwischen zwei (Student Test) oder mehreren Proben (ANOVA) wurden ebenfalls unter Verwendung des Statistikprogramms "InStat" ermittelt.

4. Ergebnisse

4.1 Einfluß verschiedener Opioide auf die Adenylatzyklase-Aktivität in HEK-DOR Zellen

Opioide können eine Hemmung von Adenylatzyklasen induzieren. Zunächst wurde daher untersucht, wie dieses Effektorsystem in HEK-DOR Zellen infolge einer δ-Opioidrezeptorstimulation durch peptiderge Opioide und Alkaloide reguliert wird. Dazu wurden HEK-DOR Zellen zunächst mit 10 µM Forskolin inkubiert, welches die Adenylatzyklasen direkt aktiviert und somit zu einer Akkumulation von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in den Zellen führt (Abb. 6). Die gleichzeitige Exposition der Zellen mit Forskolin und einem Opioid (1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin) führt zu einer verminderten Bildung von cAMP. Dabei ist zu beobachten, daß die Hemmung der cAMP-Bildung durch die Enkephalinderivate DADLE und DPDPE, sowie durch das Alkaloid Etorphin stärker ist als durch Morphin. Demzufolge führt die Aktivierung der DORs durch diese Opioide in HEK Zellen zu einer Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.

4.2 Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen

4.2.1 Opioide bewirken eine Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen

Die Stimulation von GPCRs kann in unterschiedlichen Zellsystemen eine Aktivierung der ERKs bedingen. Um im weiteren die Auswirkungen einer δ-Rezeptor-Stimulation auf die ERK-Aktivität zu ermitteln, wurden HEK-DOR Zellen mit den gewählten Opioiden DADLE (1 µM), DPDPE (1µM), Etorphin (0.1 µM) oder Morphin (1 µM) behandelt und anschließend mittels Westernblot-Technik der Phosphorylierungstatus der ERKs bestimmt. Im Zuge ihrer Aktivierung werden die ERKs über komplexe Vorgänge an den Aminosäuren Tyrosin und Threonin phosphoryliert und so kann durch die Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers, der die ERKs nur im phosphorylierten und somit aktivierten Zustand erkennt, die Aktivierung dieser Kinasen ermittelt werden. Wie in Abb. 7 zu sehen ist, war in unbehandelten, serum-frei gehaltenen Kontrollzellen keine Phosphorylierung der ERKs zu erkennen. Nach einer Behandlung der Zellen mit den Opioiden DADLE, DPDPE, Etorphin

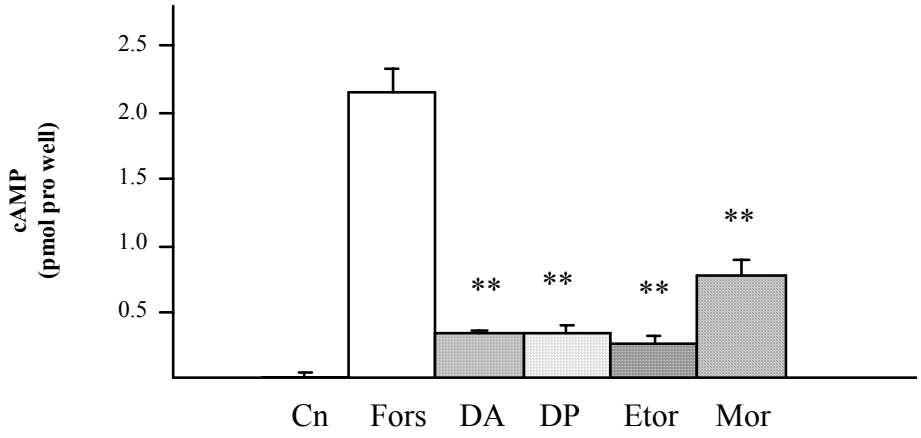


Abb. 6. Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität durch Opioide in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden in einer 24-Lochplatte ausgesät und mit 10 µM Forskolin (Fors) alleine und zusammen mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Kontrollen blieben unbehandelt (Cn). Die Menge an gebildeten cAMP wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-behandelten Zellen sind signifikant (***, $p<0.001$).

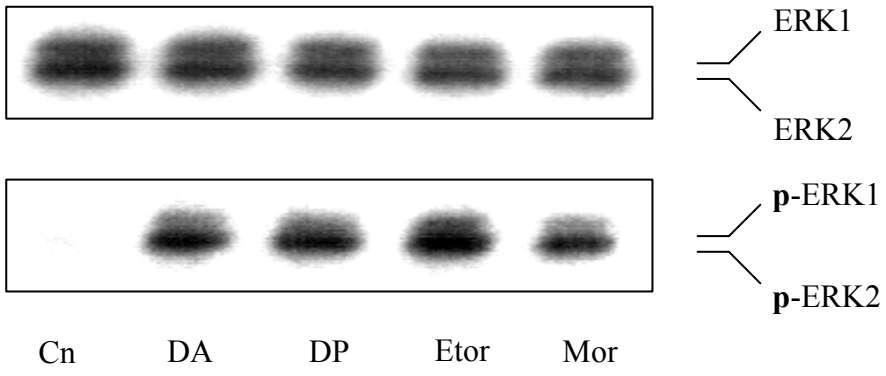


Abb. 7. Opioide führen zu einer Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Die Kontrolle (Cn) erhielt kein Opioid. Anschließend wurden mittels Westernblot-Technik und unter Verwendung spezifischer Antikörper die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

oder Morphin werden zwei Immunobanden durch den phosphospezifischen anti-pERK1/2 Antikörper erkannt, die der aktivierten Form der ERK1 (44 kDa) und der ERK2 (42 kDa) entsprechen. Die Gesamtexpression der ERKs (Abb. 7) wird durch die Opioidbehandlung der HEK-DOR Zellen nicht beeinträchtigt. Demzufolge bedingt eine Behandlung von HEK-DOR Zellen mit diesen unterschiedlichen Opioiden eine Phosphorylierung und somit eine Aktivierung der ERKs in diesem Zellsystem.

4.2.2 Zeitabhängige Stimulation der ERKs durch DADLE

Die ERKs reagieren rasch auf extrazelluläre Reize. Um den Zeitpunkt einer maximalen ERK-Phosphorylierung infolge einer DOR-Stimulation zu ermitteln, wurden HEK-DOR Zellen stellvertretend für die verwendeten Opioide mit DADLE für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert. Bereits nach einer 5 minütigen Zellbehandlung mit 1 µM DADLE ist eine starke Phosphorylierung der ERKs zu erkennen (Abb. 8), die allerdings bei anhaltender DADLE-Exposition für 10 bis 15 Minuten wieder schwächer wird. Somit scheint innerhalb von 5 Minuten eine maximale Phosphorylierung und Aktivierung der ERKs in Anwesenheit eines Opioids zu erfolgen, ohne dabei einen meßbaren Einfluß auf die Gesamtexpression der Kinasen zu nehmen (Abb. 8). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden alle weiteren Bestimmungen zur ERK-Aktivierung nach einer 5-minütigen Opioidexposition durchgeführt.

4.2.3 Auswirkung verschiedener Lösungsmittel auf die ERK-Phosphorylierung

Viele verschiedene exogene Reize können zu einer Aktivierung der ERKs führen. So kann bereits eine Verdünnung des Inkubationmediums durch Zugabe unterschiedlicher Lösungsmittel zu einer Stimulation dieser Kinasen führen (Aroor und Shukla, 2004). Um den Einfluß der in dieser Studie verwendeten Lösungsmittel auf die ERKs zu untersuchen, wurde serum-freies Medium mit entmineralisiertem, entmineralisiertem und sterilisiertem, sowie pyrogenfreiem Wasser zu jeweils 10 und 20 Volumenprozent versetzt und HEK-DOR Zellen mit diesen so verdünnten Medien für 5 Minuten bei 37˚C inkubiert. Außerdem wurden die Zellen in serum-freiem Medium mit jeweils einem Anteil von 1 und 10 % DMSO (dies entspricht 14 mM und 140 mM) und Ethanol (2 M und 0.20 M) für 5 Minuten auf eine Aktivierung der ERKs durch diese Lösungsmittel untersucht. Während die Gesamtexpression der ERKs wiederum unverändert bleibt, kann bei einem Anteil von jeweils 20 % Wasser unterschiedlicher Qualität eine geringe Phosphorylierung der ERKs beobachtet werden. Im

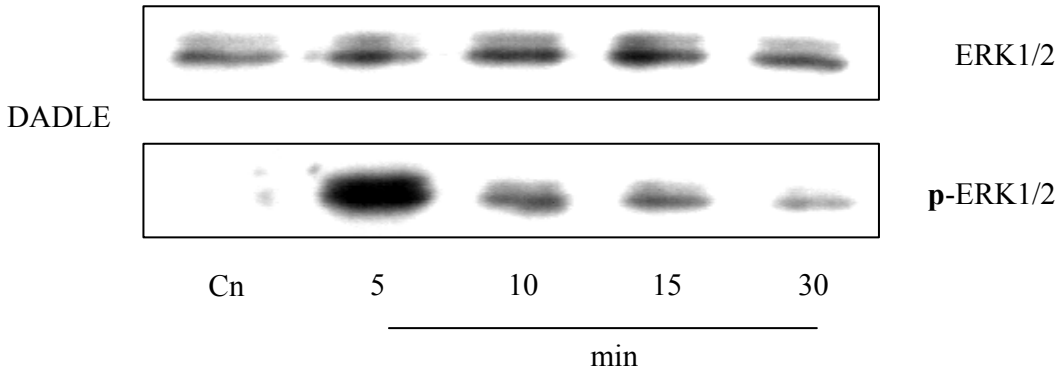


Abb. 8. Zeitabhängige Stimulation der ERKs durch DADLE.
HEK-DOR Zellen wurden jeweils mit DADLE (1 µM) für 30, 15, 10 und 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Cn). Mittels Westernblot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper wurden anschließend sowohl die phosphorylierten (p) als auch die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

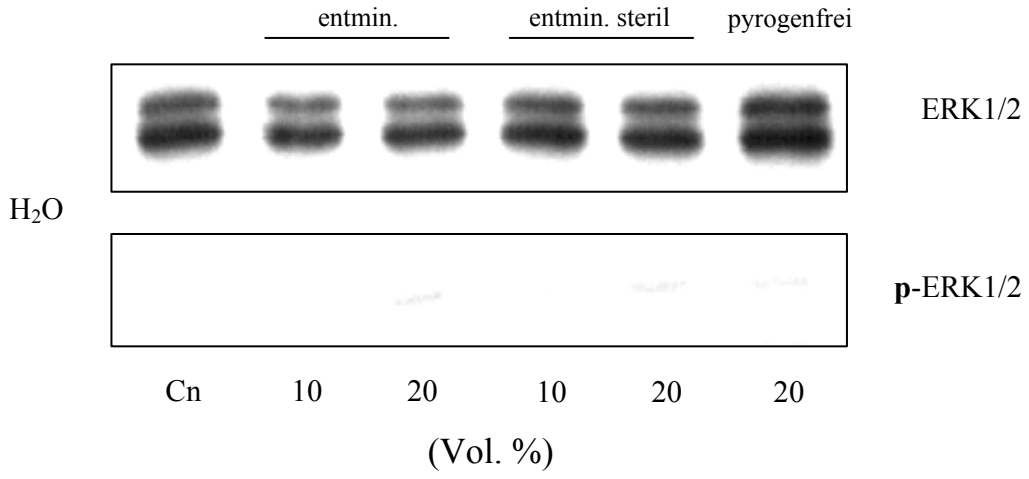


Abb. 9. Auswirkung von Wasser unterschiedlicher Qualität auf die Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen.
Serum-freies Medium wurde mit entmineralisiertem (entmin.), entmineralisiertem und sterilem (entmin. steril) sowie pyrogenfreiem Wasser zu jeweils 10 und 20 Volumenprozent (%) versetzt und HEK-DOR Zellen mit diesem verdünnten Medium für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Cn). Durch Westernblot-Technik wurden mit entsprechenden Antikörpern die phosphorylierte (p) und die Gesamtmengen der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

Gegensatz dazu war weder durch einen 10 %-igen Anteil von Wasser (Abb. 9) noch durch 1 und 10 % DMSO oder Ethanol (Abb. 10) im Inkubationsmedium eine Aktivierung der Kinasen auszulösen. Somit wurden für alle weiteren Versuche die Konzentrationen der Stocklösungen so gewählt, daß der Anteil des entsprechenden Lösungsmittels im Inkubationsmedium sich auf maximal 10 % beläuft, um damit eine Lösungmittel-induzierte Aktivierung der ERKs zu vermeiden.

4.2.4 Exposition von HEK-wt Zellen mit Opioiden

Peptide besitzen durch ihren Ampholytcharakter Puffereigenschaften, die den pH-Wert einer Lösung verändern können. Auch die basisch reagierenden Alkaloide können Einfluß auf die Wasserstoffionenkonzentration haben. Da die ERKs allerdings auch durch geringgradige Veränderungen des extrazellulären pH-Wertes aktiviert werden können (Xue und Lucocq, 1997), wurde die Auswirkung einer Enkephalin- und Alkaloid-Exposition auf die ERK-Aktivierung an HEK293-Wildtyp (HEK-wt) Zellen untersucht. Da diese Zellen keine Opioidrezeptoren exprimieren (Bot et al., 1997), kann an diesem Zellsystem ausschließlich die ERK-Phosphorylierung durch eventuelle pH-Wertsänderungen in Anwesenheit der verschiedenen Opioide bestimmt werden. In unbehandelten HEK293-Wildtyp Zellen ist keine Phosphorylierung der ERKs zu beobachten. Auch eine Inkubation dieser Zellen mit 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin für 5 Minuten bewirkt keine Phosphorylierung der ERKs (Abb. 11). Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation der in HEK293 Zellen endogen exprimierenden Rezeptor-Tyrosinkinasen für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF; Voß et al., 1999) durch den entsprechenden Liganden EGF (100 ng/ml) zu einer ausgeprägten Aktivierung der ERKs. Somit ist in HEK293-Wildtyp Zellen generell eine Aktivierung der ERKs zu induzieren, allerdings scheint die Stimulation der ERKs durch Peptid- oder Alkaloid-Opioide die Anwesenheit eines Opioidrezeptors zu erfordern.

4.3 Effekt von Naloxon auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklasen und Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen

Rezeptor-vermittelte Effekte können durch die Anwesenheit eines dem Rezeptor zugeordneten Antagonisten gehemmt werden. Da Opioide aber auch unabhängig von einer

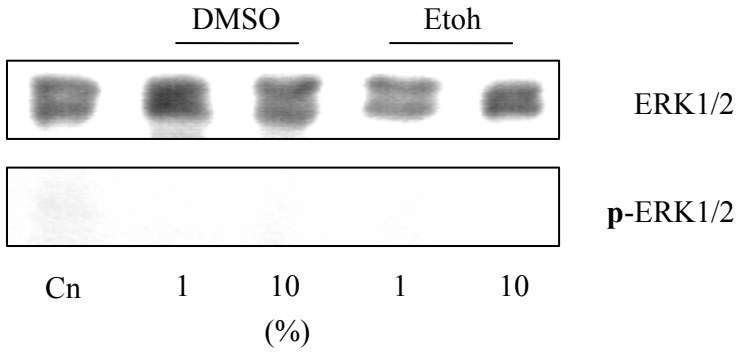


Abb. 10. Auswirkung von DMSO und Ethanol auf die Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden mit jeweils 1 und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, 14 mM und 140 mM)) und Ethanol (Etoh, 0.20 M und 2 M) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (Cn). Die phosphorylierten (p) wie auch die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) wurde mittels Westernblot-Technik unter Verwendung jeweils spezifischer Antikörper ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

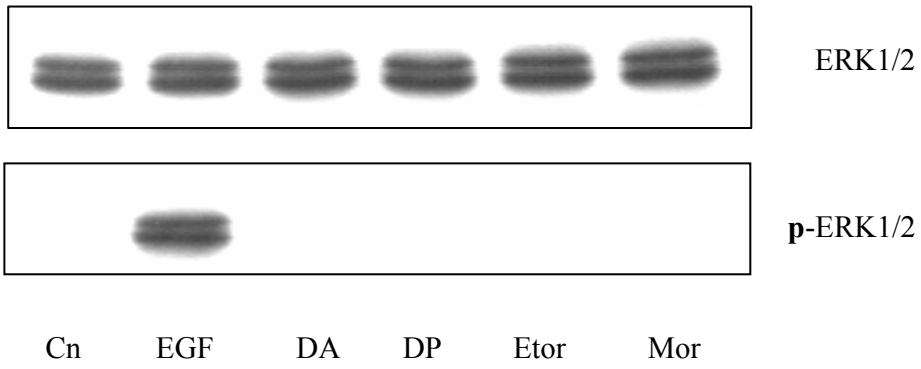


Abb. 11. Auswirkung der Opioide auf die ERKs in HEK-Wildtyp Zellen.
HEK-Wildtyp (HEK-wt) Zellen wurden mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor), Morphin (1 µM; Mor) oder EGF (100 ng/ml) für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Die Kontrolle blieb unbehandelt (Cn). Anschließend wurden mittels Westernblot-Technik die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs durch entsprechende Antikörper bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

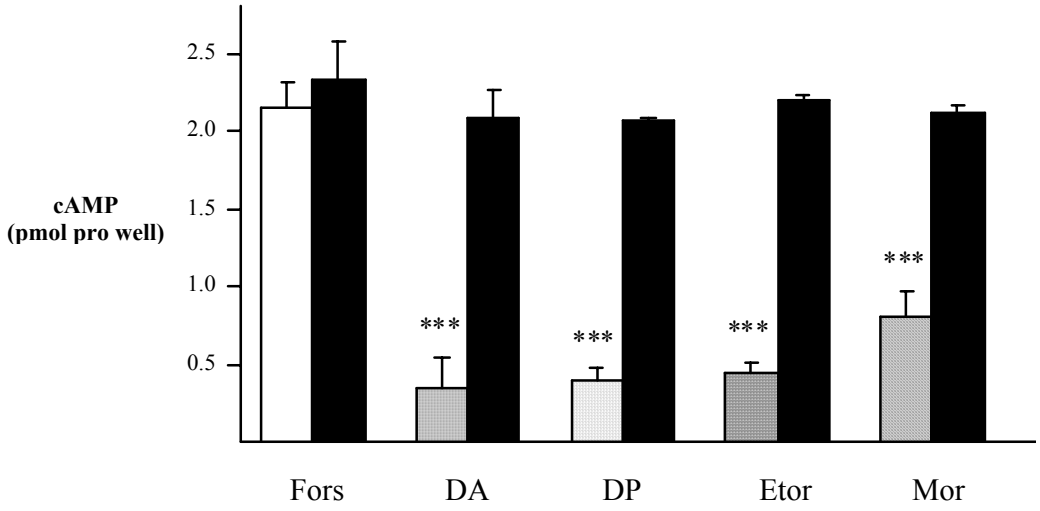


Abb. 12. Naloxon blockt die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase in HEK-DOR Zellen.
Die Zellen wurden auf einer 24-Lochplatte ausgesät und für 5 Minuten mit 10 µM Naloxon vorbehandelt ( ). Anschließend wurden die Zellen für jeweils für 15 Minuten bei 37°C mit Forskolin (10 µM; Fors) allein und zusammen mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) exponiert. Die Kontrollgruppe erhielt kein Naloxon ( ). Durch ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zu unbehandelten Zellen sind signifikant (***; $p<0.001$).

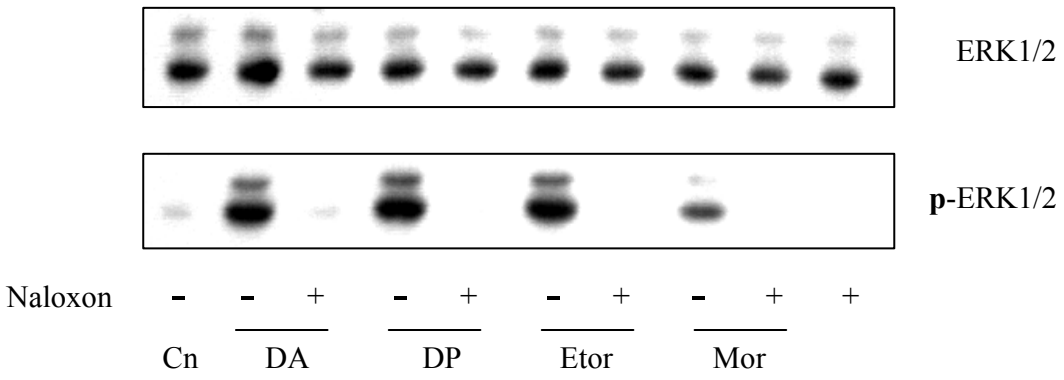


Abb. 13. Die opioidvermittelte Stimulation der ERKs wird durch Naloxon gehemmt.
HEK-DOR Zellen wurden für 5 Minuten mit 10 µM Naloxon vorbehandelt und anschließend mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Cn). Mittels Westernblot-Technik wurden die phosphorylierten ERKs (p-ERK1/2) durch einen phosphospezifischen Antikörper ermittelt. Auch zum Nachweis der Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) wurde ein spezifischer Antikörper verwendet. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

Rezeptoraktivierung verschiedene zelluläre Effektoren wie Na^+- (Remy et al., 2004), K^+- (Xiao et al., 2003) und Ca^{2+}-Kanäle (Carpenter et al., 1996) regulieren, wurde in Anwesenheit des Opioid-Antagonisten Naloxon untersucht, ob für die Hemmung der Andenylatzyklasen und die Stimulation der ERKs nicht nur die Anwesenheit, sondern auch eine Aktivierung des DORs erforderlich ist. Die Vorbehandlung der HEK-DOR Zellen mit Naloxon (10 µM; 5 min) hatte dabei keinen Einfluß auf die anschließende Forskolin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität. In Anwesenheit des Antagonisten ist die Hemmung der Adenylatzyklasen durch die verschiedenen Opioide blockiert (Abb. 12).
Ebenso ist in Anwesenheit von Naloxon keine Phosphorylierung der ERKs durch eine nachfolgende Exposition der HEK-DOR Zellen mit DADLE (1 µM), DPDPE (1 µM), Etorphin (0.1 µM) oder Morphin (1 µM) zu induzieren (Abb. 13). Demzufolge werden beide Effektorsysteme über die Stimulation des DORs durch die verschiedenen Opioide reguliert.

4.4 Konzentrationsabhängige Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch verschiedenen Opioide in HEK-DOR Zellen

Um weiterhin die Empfindlichkeit dieser beiden Effektorsysteme gegenüber einer DOR-Stimulation durch die verschiedenen Opioide beurteilen zu können, wurden über Dosis-Wirkungsstudien die jeweils erforderlichen Opioidkonzentrationen (EC_{50}) ermittelt, die zur Erlangung einer halbmaximalen Zyklase-Hemmung bzw. Stimulation der ERKs notwendig sind.
Zunächst wurde die Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP Akkumulation in Anwesenheit unterschiedlicher Opioidkonzentrationen (10 µM-0.1 pM) in HEK-DOR Zellen bestimmt. Die sich hieraus abgeleiteten Dosis-Wirkungs-Kurven (Abb. 14) ergaben für alle verwendeten Opioide eine zunehmende Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität bei steigenden Konzentrationen. Für DADLE, DPDPE und Etorphin konnte eine halbmaximale Hemmung der Adenylatzyklasen bei einer Konzentration von 0.24, 0.57 und 0.20 nM bestimmt werden. Allerdings war hierbei zu bemerken, daß die durch Etorphin hervorgerufene maximale Hemmung der cAMP Akkumulation geringer war als bei den Peptiden DADLE und DPDPE. Im Gegensatz dazu war eine 1000-fach höhere Konzentration von Morphin notwendig, um in HEK-DOR Zellen eine halbmaximale Hemmung der Adenylatzyklasen zu induzieren.

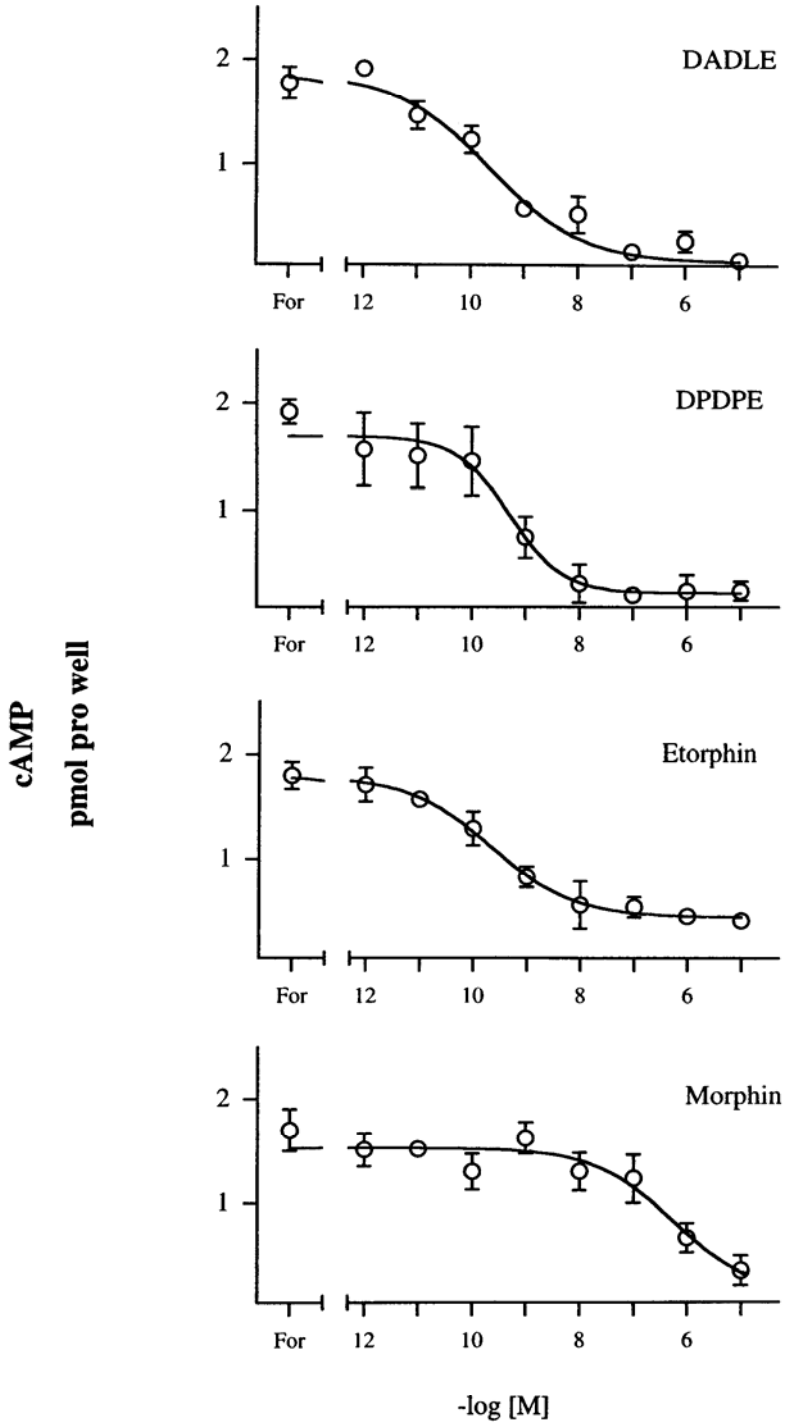


Abb. 14. Konzentrationsabhängige Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität durch Opioide.
HEK-DOR Zellen wurden in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit aufsteigenden Konzentrationen der angegebenen Opioide für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Mittels ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP bestimmt. Die dargestellten Daten sind Mittelwerte (±SD) von jeweils drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung.

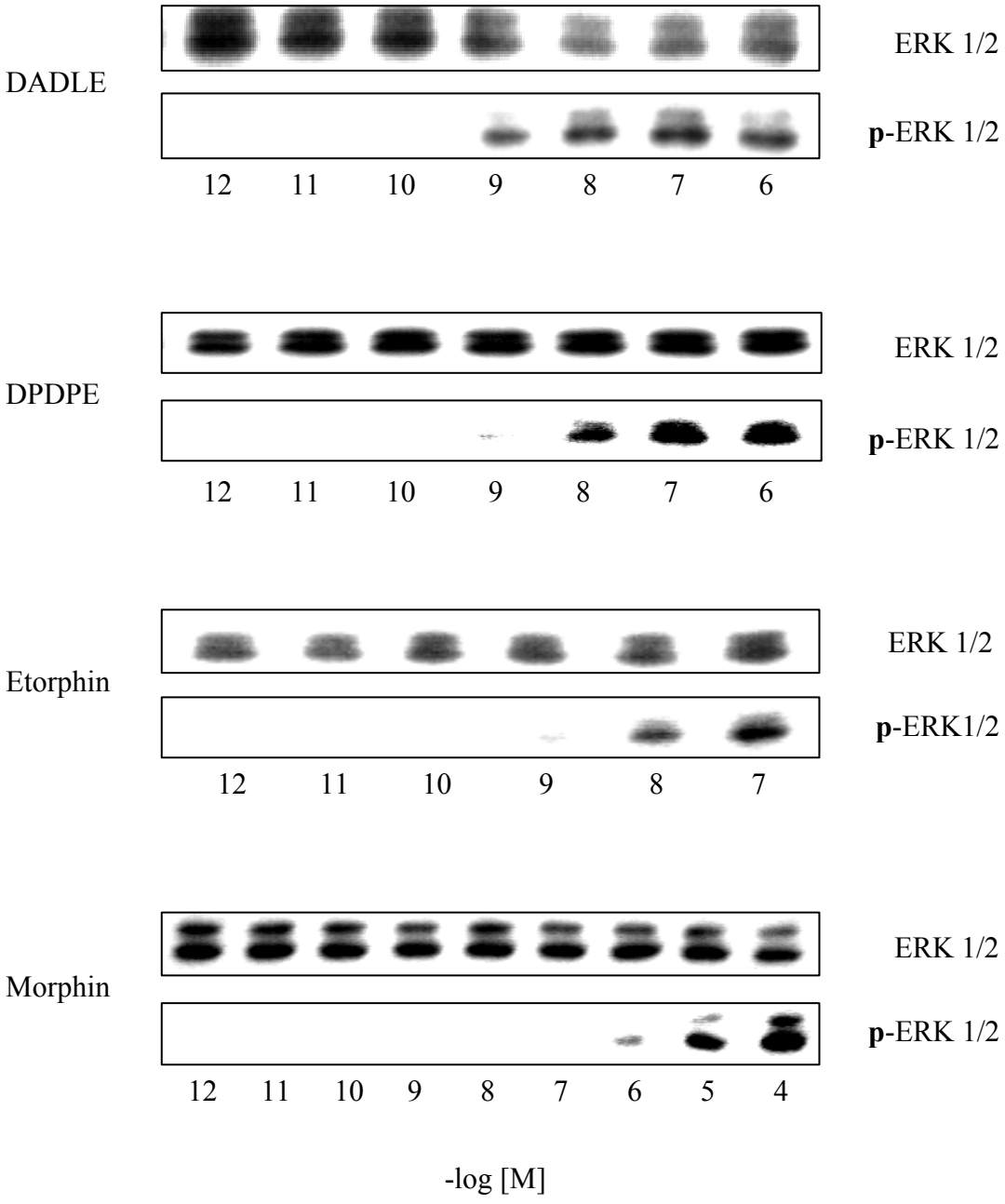


Abb. 15. Konzentrationsabhängige Stimulation der ERKs durch verschiedene Opioide in HEK-DOR Zellen.
Die Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der angegebenen Opioide für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Westernblot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper wurden anschließend sowohl die phosphorylierten (p) als auch die Gesamtexpression der ERKs ermittelt. Die Abbildungen zeigen jeweils einen von drei repräsentativen Blots.

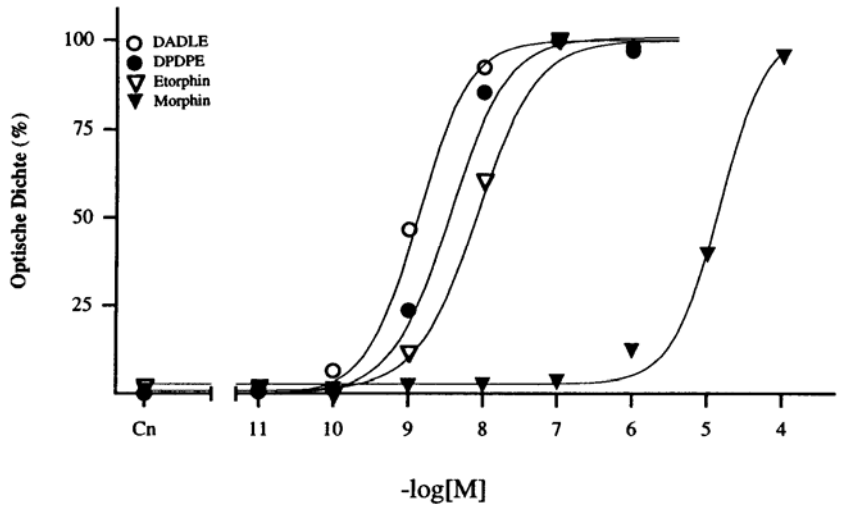


Abb. 16. Dosis-Wirkungs-Kurve der ERK-Stimulation in HEK-DOR Zellen.
Die Schwärzung der Immunobanden aus den Konzentrationsstudien zur ERK-Stimulation wurden densitometrisch bestimmt und die maximale ERK-Phosphorylierung auf jeweils 100 % gesetzt. Aus den sich daraus ergebenden Dosis-Wirkungskurven wurden jeweils die EC_{50}-Werte der einzelnen Opioide errechnet.

	EC_{50}		
	AC	ERK1/2	ERK/AC
DADLE	0.24 nM	1.3 nM	5.4
DPDPE	0.57 nM	3.43 nM	6.0
Etorphin	0.20 nM	7.93 nM	39.6
Morphin	0.44 µM	14.1 µM	31.68

Tabelle 2. Empfindlichkeit der Adenylatzyklasen und der ERKs in HEK-DOR Zellen gegenüber einer Aktivierung des δ-Opioidrezeptors durch verschiedene Opioide.

Unter den bisher gewählten Bedingungen ergab auch die Bestimmung der ERK-Phosphorylierung nach Inkubation von HEK-DOR Zellen mit unterschiedlichen Opioidkonzentrationen (100 nM – 1 pM) eine Dosis-abhängige Regulation dieses Effektorsystems durch DADLE, DPDPE, Etorphin oder Morphin (Abb. 15). Hierbei lassen sich für DADLE und DPDPE bereits bei einer Konzentration von 1 nM eine schwache Aktivierung der ERKs beobachten, während für Etorphin erst bei einer Konzentration von 10 nM eine Phosphorylierung dieser Kinasen zu detektieren war. Ähnlich wie für das Zyklasesystem erfordert auch die Stimulation der ERKs durch Morphin eine 1000-fach höhere Konzentration dieses Liganden, so daß erst bei einer Dosis von 10 µM eine beginnende Phosphorylierung dieser Kinasen deutlich zu erkennen ist. Nach densitometrischer Erfassung der einzelnen Immunosignale wurde eine Dosis-Wirkung-Kurve erstellt und die EC_{50} mathematisch bestimmt (Abb. 16). Dabei ergaben sich für DADLE, DPDPE und Etorphin ähnliche EC_{50} Werte von 1.3, 3.4 und 7.9 nM. Für Morphin konnte auch mathematisch eine 1000-fach höhere EC_{50} ermittelt werden, was in einer deutlichen Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve dieses Liganden resultiert. Eine Gegenüberstellung der einzelnen EC_{50}-Werte (Tab.2) ergibt, daß für DADLE und DPDPE eine 6- und für Etorphin und Morphin eine bis zu 39-fach höhere Opioidkonzentration erforderlich ist, um eine halbmaximale Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen auszulösen, als eine halbmaximale Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität zu induzieren.

4.5 Stimulation der ERKs durch Deltorphin II in HEK293 Zellen

Obwohl die ERK/MAP-Kinasen als sehr empfindliche Effektorsysteme beschrieben werden (Burt et al., 1996), sind verhältnismäßig hohe Agonistenkonzentrationen zur Stimulation dieser Kinasen über den DOR in HEK-DOR Zellen notwendig. Da zwei Subtypen (δ1, δ2) des DORs existieren, wurde im weiteren untersucht, ob sich die ERK-Aktivierung in HEK-DOR Zellen durch den δ2-spezifischen Agonisten Deltorphin II wesentlich von der Effizienz der δ1-selektiven Agonisten DADLE und DPDPE (Portoghese et al., 1992) dieses Effektorsystem zu regulieren, unterscheidet. Dazu wurden HEK-DOR Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen von Deltorphin II inkubiert und das Ausmaß der ERK-Phosphorylierung anschließend mittels Westernblot-Technik bestimmt. Wie in Abb. 18 dargestellt, bewirkt auch eine Exposition von HEK-DOR Zellen mit Deltorphin II eine Dosis-

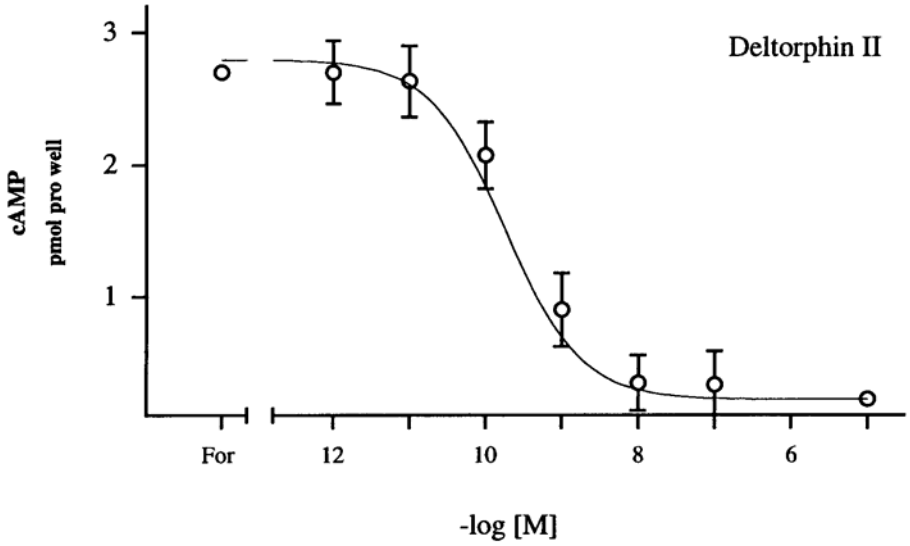


Abb. 17. Konzentrationsabhängige Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität durch Deltorphin II.
In Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) wurden HEK-DOR Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen vo Deltorphin II für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Über ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP bestimmt. Di Daten stellen Mittelwerte (±SD) von jeweils drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar.

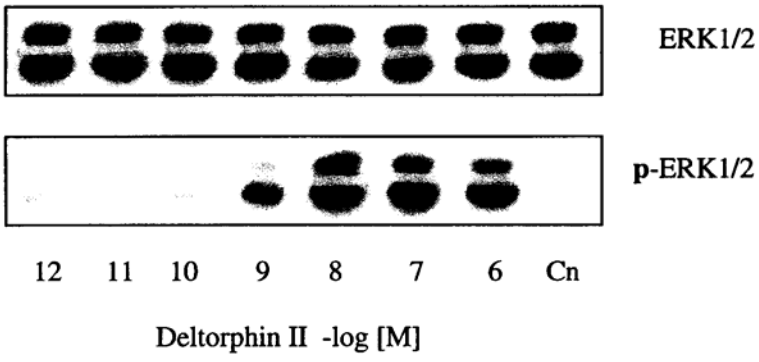


Abb. 18. Konzentrationsabhängige Stimulation der ERKs durch Deltorphin II.
HEK-DOR Zellen wurden mit aufsteigender Konzentration von Deltorphin für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Al Kontrolle (Cn) dienten naive Zellen. Mit Westernblot-Technik und unter Verwendung spezifischer Antikörpe konnten die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) in den Zellen bestimmt werden Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

abhängige Zunahme der ERK-Phosphorylierung. Allerdings ist auch für dieses Opioid erst bei einer Konzentration von 1 nM eine eindeutige Phosphorylierung der Kinasen zu beobachten, wobei eine maximale Phosphorylierung der ERKs bereits in Anwesenheit von 10 nM Deltorphin II erreicht wird. Die anschließende densitometrischen Auswertung der einzelnen Immunobanden und die computergestützte Berechnung ergaben für die Deltorphin II-vermittelte ERK-Aktivierung einen EC_{50}-Wert von 1.03 nM. Die Empfindlichkeit der Adenylatzyklasen gegenüber einer DOR-Aktivierung durch Deltorphin II wurde ebenso über eine Dosis-Wirkungsstudie bestimmt (Abb. 17). Dabei war auch für diesen Agonisten eine konzentrationsabhängige Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklase-Aktivität zu beobachten. Bei einer Konzentration von 0.18 nM war eine halbmaximale Hemmung der Zyklasen durch Deltorphin II zu erzielen. Somit reagieren die Adenylatzyklasen auch gegenüber eines δ2-selektiven Agonisten empfindlicher als die ERKs in HEK-DOR Zellen.

4.6 Bestimmung der Bindungsaffinität der verschiedenen Opioide am δ-Opioidrezeptor

Die Effizienz verschiedener Agonisten zelluläre Effektoren zu regulieren ist stark mit ihrer Bindungsaffinität an den jeweils zu aktivierenden Rezeptor verbunden. Da im Vergleich zu den Enkephalin-Derivaten und Etorphin sehr hohe Morphinkonzentrationen für die Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs in HEK-DOR Zellen notwendig sind, wurde die Affinität der verwendeten Opioide für den δ-Rezeptor mittels heterologem Verdrängungsexperiment bestimmt. Hierzu wurde an isolierten HEK-DOR Zellmembranen die Bindung des radioaktivmarkierten Antagonisten [^{3}H]Diprenorphin in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von DADLE, DPDPE, Etorphin oder Morphin ermittelt. Die Bindung des Radioliganden wurde hierbei zunehmend durch steigende Konzentrationen der einzelnen Opioide verdrängt (Abb. 19). Während DADLE, DPDPE und Etorphin mit einem jeweiligen K_i-Wert von 4.14, 12.72 und 6.81 nM eine hohe Affinität zum δ-Rezeptor aufweisen (Tab. 3), bindet Morphin mit einer weitaus geringeren Affinität (K_i: 335.8 nM) an diesen Rezeptor. Dies äußert sich auch in einer deutlichen Rechtsverschiebung der [^{3}H]Diprenorphin-Bindungskurve in Anwesenheit von Morphin (Abb. 19).

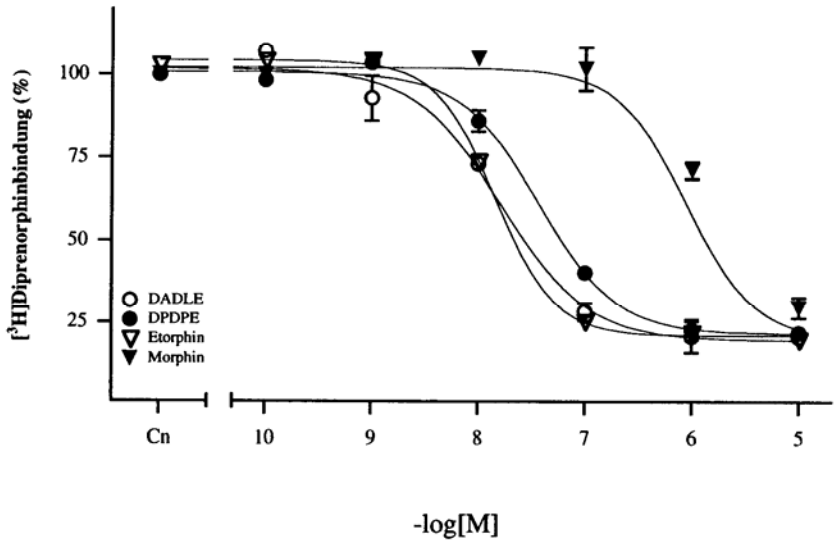


Abb. 19. Heterologe Verdrängung des radioaktiv-markierten Antagonisten ^{3}H-Diprenorphin durch verschiedene Opioide an Membranen von HEK-DOR Zellen.
Membranen von HEK-DOR Zellen (50 µg/Ansatz) wurden mit 1 nM ^{3}H-Diprenorphin alleine (Cn) und in Anwesenheit unterschiedlicher Opioidkonzentrationen (DADLE, DPDPE, Etorphin oder Morphin) für 60 Minuten bei 25°C inkubiert. Unspezifische Bindung des Radioliganden wurde in Anwesenheit von 10 µM Naloxon bestimmt. Die Daten sind Mittelwerte (±SD) aus drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

	K_i
DADLE	4.14 nM
DPDPE	12.72 nM
Etorphin	6.81 nM
Morphin	335.8 nM

Tabelle 3. K_i-Werte, ermittelt durch heterologe Verdrängungsstudien von ^{3}H-Diprenorphin durch verschiedene Opioide.

4.7 Einfluss von Pertussistoxin auf die opioidvermittelte Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs

Opioidrezeptoren bewirken vornehmlich über die Aktivierung inhibitorisch agierender $G\alpha_i$-Untereinheiten eine Hemmung von Adenylatzyklasen (Quock et al., 1999). Eine Beteiligung dieser G-Proteine an der Regulation der Adenylatzyklasen und ERKs in opioidexponierten HEK-DOR Zellen wurde unter Verwendung von Pertussistoxin (PTX) untersucht, welches über eine ADP-Ribosylierung der $G\alpha_i$-Untereinheiten die Rezeptor-vermittelte Aktivierung dieser G-Proteine und somit auch die anschließende Signalweiterleitung hemmt. Während die basale Aktivität der Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen nicht beeinträchtigt wird, bewirkt eine PTX-Behandlung (100 ng/ml; 18 h) eine verminderte Bildung von cAMP nach einer direkten Aktivierung der Zyklasen mit Forskolin (Abb. 20). Darüberhinaus konnte nach einer PTX-Behandlung eine verminderte Hemmung der Forskolin-stimulierten Adenylatzyklasen durch DADLE (1 μM), DPDPE (1 μM) oder Etorphin (0.1 μM) beobachtet werden. Während in Anwesenheit der Enkephalin-Derivate nur noch eine Hemmung der Adenylatzyklase Aktivität von etwa 50 % erreicht wird, wird die Forskolin-vermittelte cAMP Produktion durch Etorphin nur noch um etwa 20 % reduziert. Im Gegensatz dazu war nach einer PTX-Behandlung Morphin (1 μM) nicht mehr in der Lage, eine Hemmung Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen zu induzieren.

In serum-frei inkubierten HEK-DOR Zellen hatte die gleiche PTX-Behandlung (100 ng/ml, 18 h) weder einen Einfluß auf die Gesamtexpression noch auf die reduzierte Basalaktivität der ERKs (Abb. 21). Allerdings konnte durch eine anschließende Exposition der PTX-behandelten Zellen mit DADLE (1 μM), DPDPE (1 μM), Etorphin (0.1 μM) oder Morphin (1 μM) durch keines der jeweiligen Opioide eine Aktivierung der ERKs mehr ausgelöst werden.

4.8 Abklärung der PTX-vermittelten Hemmung der ERK-Phosphorylierung

4.8.1 Die Stimulation der ERKs durch $G\alpha_{\square}$-unabhängige Mechanismen wird durch PTX gehemmt

Um die Selektivität von PTX auf $G\alpha_i$-Untereinheiten zu überprüfen, wurde im weiteren der Einfluß einer PTX-Behandlung auf die ERK Stimulation durch Aktivierung von EGF-Rezeptoren, $G\alpha_q$-gekoppelten $P2Y_1$-Rezeptoren (Schachter et al., 1997) und der Proteinkinase

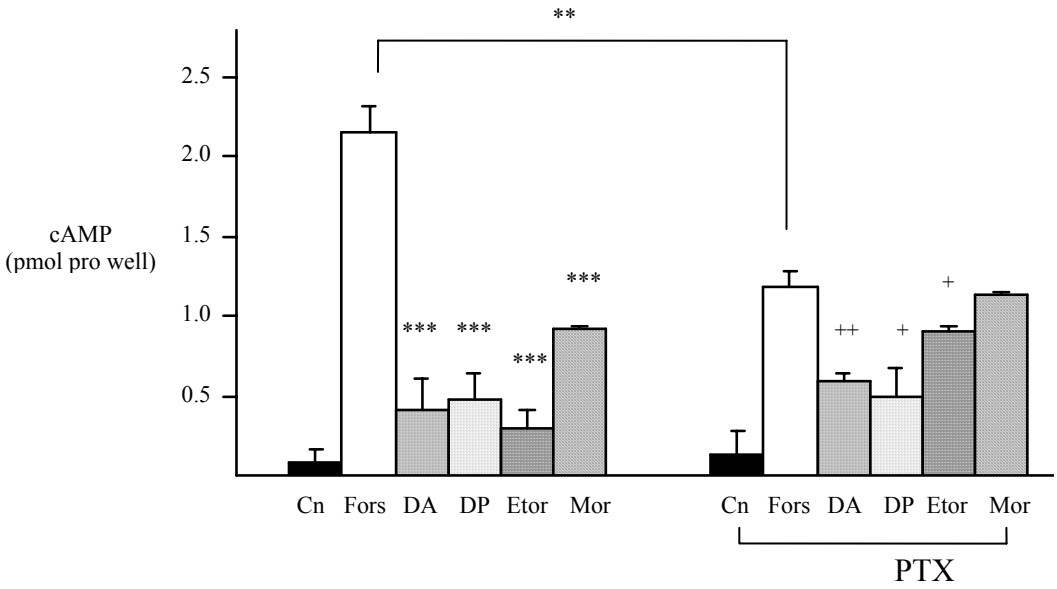


Abb. 20. Auswirkung von PTX auf die Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität durch Opioide.
HEK-DOR Zellen wurden entweder mit Pertussis Toxin (100 ng/ml; 18 h, PTX) vorbehandelt oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die jeweiligen Zellpopulationen mit Forskolin (10 µM, Fors) alleine und zusammen mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten keine Opioide. Durch ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP ermittelt. Die dargestellten Ergebnisse stellen Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zur jeweiligen Forskolin-Stimulation sind signifikant (***, $p<0.001$; $^{++}$, $p<0.01$; $^{+}$, $p<0.05$). Der Unterschied von Forskolin zwischen naiven und PTX-vorbehandelten Zellen ist signifikant (**, $p<0.01$).

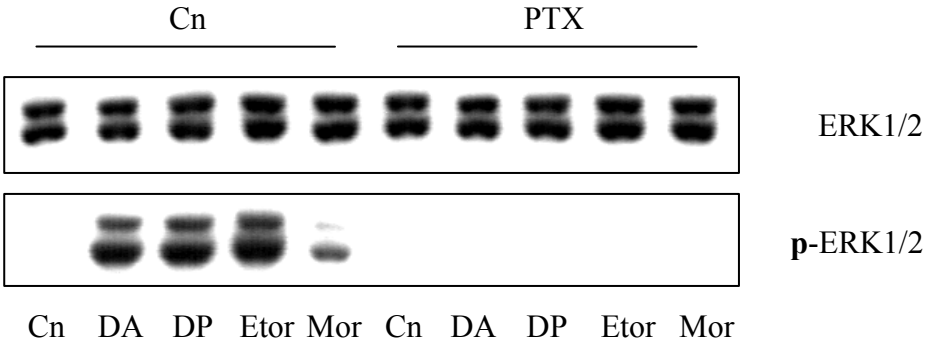


Abb. 21. Effekt von PTX auf die opioidinduzierte Stimulation der ERKs.
HEK-DOR Zellen wurden über Nacht mit Pertussis Toxin (100 ng/ml; 18 h, PTX) vorbehandelt und anschließend für 5 Minuten mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) bei 37°C exponiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten jeweils keine Opioide. Die phosphorylierten (p) wie auch die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) wurde mittels Westernblot-Technik unter Verwendung jeweils spezifischer Antikörper ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

C (PKC) in HEK-DOR Zellen ermittelt, die jeweils unabhängig von einer $G\alpha_i$-Aktivierung zu einer Stimulation der ERKs führen (Campos-Gonzalez und Glenney, 1991; Luttrell et al., 1995; van Biesen et al., 1996). Die Inkubation von HEK-DOR Zellen mit dem epidermalen Wachstumsfaktor EGF (1 und 0.1 ng/ml) bewirkt über die Stimulation von endogenen EGF Rezeptoren (Voß et al., 1999) innerhalb von 5 Minuten eine konzentrationsabhängige Phosphorylierung der ERKs. Nach einer Vorbehandlung der Zellen mit PTX (100 ng/ml, 18 h) ist allerdings durch EGF nur noch eine partielle Aktivierung der ERKs zu beobachten (Abb. 22). Im Gegensatz dazu war nach einer PTX-Behandlung die Phosphorylierung der ERKs durch eine anschließende Stimulation des endogenen $P2Y_1$-Rezeptors (Mundell und Benovic, 2000) mit Adenosindiphosphat (ADP, 100 µM) total gehemmt. Ebenso war auch eine ERK Aktivierung durch den direkten PKC Aktivator PMA (100 nM) in PTX-behandelten HEK-DOR Zellen gehemmt. Auf die Gesamtexpression der ERKs hatten die jeweiligen Behandlungen keinen Einfluß.

4.8.2. Auswirkung von PTX auf die Zellzahl und Zellaktivität

Viele Substanzen können aufgrund zytotoxischer Eigenschaften die Zell-Reagibilität gegenüber exogenen Reizen beeinflussen. Da eine PTX-Behandlung von HEK-DOR Zellen auch die Stimulation der ERKs durch $G\alpha_i$-unabhängige Mechanismen beeinträchtigt, wurde untersucht, ob die zu beobachtende Hemmung auf eine zytotoxischen Wirkung des PTX zurückzuführen ist. Die Vitalität von Zellen wird häufig über die Integrität der Zellmembranen definiert, die durch Anfärben der Zellen mit Trypanblau zu ermitteln ist. Dazu wurden HEK-DOR Zellen wiederholt mit PTX (100 ng/ml; 18h) behandelt und mit Trypanblau gefärbt. Die anschließende Auszählung intakter Zellen ergab keinen wesentlichen Unterschied zwischen den PTX-behandelten und den unbehandelten Kontrollgruppen (Abb. 23). Auch der MTT-Test, bei welchem die Vitalität von Zellen über die Bestimmung ihrer mitochondrialen Aktivität definiert wird, erbrachte keinen Hinweis von zytotoxischen Auswirkungen einer PTX-Behandlung von HEK-DOR Zellen (Abb. 23).

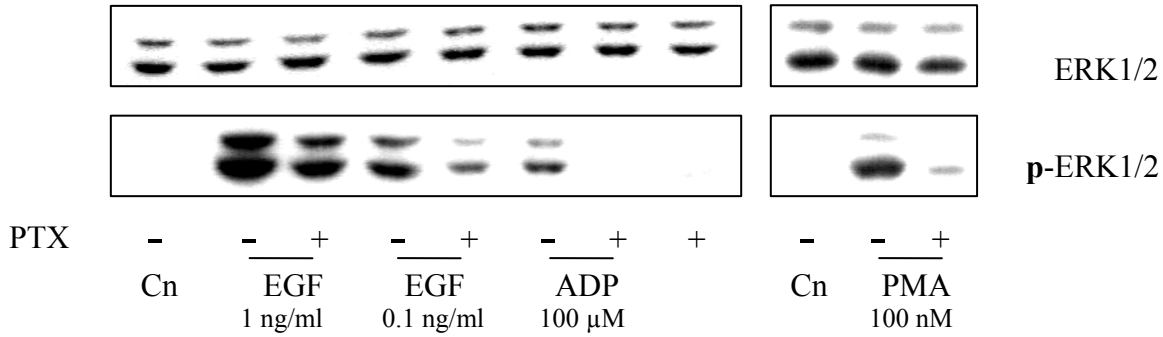


Abb. 22. Effekt von PTX auf die Stimulation der ERKs durch ADP , EGF und PMA.
HEK-DOR Zellen wurden mit Pertussis Toxin (100 ng/ml; 18 h, PTX) vorbehandelt und anschließend mit EGF, ADP und PMA für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle (Cn) dienten unbehandelte Zellen. Die Phosphorylierung (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) wurden mittels Westernblot-Technik bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

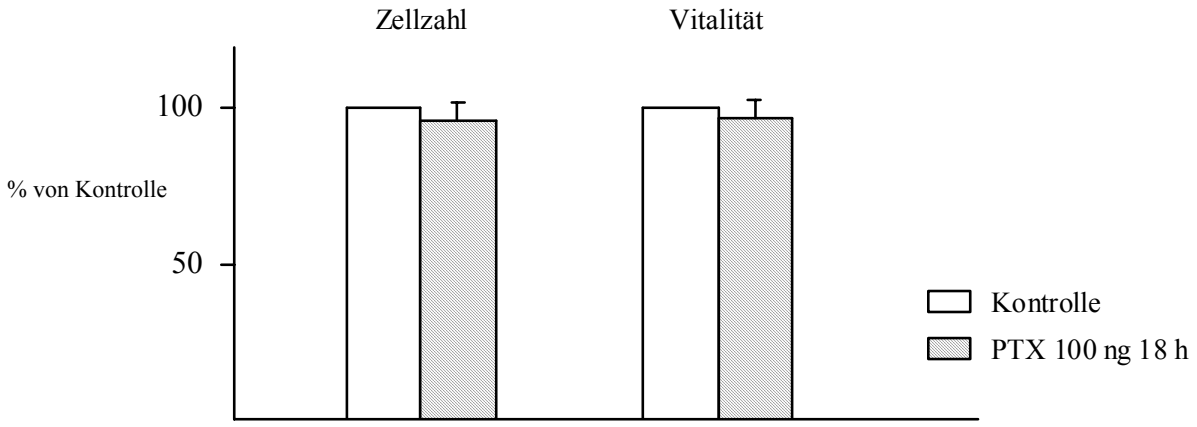


Abb. 23. Einfluß von PTX auf Zellzahl und Vitalität von HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden in einer 12-Lochplatte ausplattiert und für 18 h mit PTX vorbehandelt. Die Kontrollen blieben während dieser Zeit unbehandelt. Anschließend wurde das Medium angesaugt, die jeweils adhärent verbliebenen Zellen gezählt und hinsichtlich ihrer Vitalität unter Zuhilfenahme des MTT-Test untersucht. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen dar.

4.9 Einfluß von EBP50 auf die opioidvermittelte Effektorregulation in HEK-DOR Zellen

Studien haben gezeigt, daß δ-Rezeptoren ebenso über die Aktivierung von $G\alpha_{q/11}$ Proteinen zelluläre Effektoren regulieren können (Joshi et al., 1999). Um die Funktion dieser G-Proteine bei der Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch Opioide zu untersuchen, wurden HEK-DOR Zellen transfiziert und transient mit dem $G\alpha_q$-bindenden Protein EBP50 (Rochdi et al., 2003) ausgestattet. Diese Zellpopulation wurde als HEK-DOR/EBP50 bezeichnet und vor einer experimentellen Verwendung mittels Immunoblot-Verfahren auf die Expressionsmengen von EBP50 im Zellysat hin untersucht. Wie in Abb. 24 und Abb. 26 zu sehen ist, war in pcDNA3.0-HA-EBP50 transfizierten Zellen trotz unterschiedlicher Expressionsraten jeweils ein starkes Immunosignal bei einer Größe von 50 kDa zu detektieren gewesen, welches dem EBP50 entspricht (Reczek et al., 1997).
Die anschließende cAMP-Akkumulationsbestimmung ergab, dass die Expression von EBP50 in HEK-DOR Zellen unabhängig von der Expressionmenge weder einen Einfluß auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Synthese noch auf die durch 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin vermittelte Hemmung der Zyklaseaktivität hat (Abb. 25). Ähnliches war auch für die ERK-Regulation in opioidexponierten HEK-DOR/EBP50 Zellen zu beobachten. In Anwesenheit des $G\alpha_q$-bindenden Proteins war wie in HEK-DOR Zellen eine ausgeprägte Phosphorylierung der ERKs durch die verschiedenen Opioide zu beobachten (Abb. 27).

4.10 Einfluß von Neomycin auf die Adenylatzyklase- und ERK-Regulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen

Ebenso können $G\alpha_{11}$-Untereinheiten über die Aktivierung verschiedener Phospholipase C-Isoformen die Aktivität von Adenylatzyklasen (Tang und Hurley, 1998) wie auch der ERKs (Rochdi und Parent et al., 2003) regulieren. Um die Funktion dieser G-Protein-Untereinheit untersuchen zu können, wurden HEK-DOR Zellen mit Neomycin vorbehandelt, welches renale Phospholipase C Isoformen hemmt (Lipsky und Lietman, 1982). Eine Vorbehandlung von HEK-DOR Zellen mit Neomycin (1 mM, 30 min), was zu einer Inhibition von Phospholipasen C in diesen Zellen führt (Sandmann et al., 1991), hatte keinen Einfluß auf die Forskolin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität. Die Hemmung der Zyklasen durch 1 µM

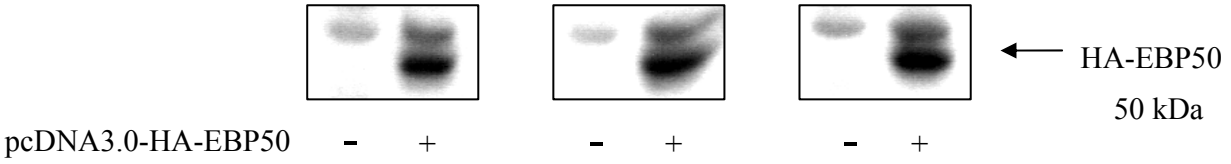


Abb. 24. Transiente Expression von HA-EBP50 in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden transient mit 10 µg pcDNA3.0-HA-EBP50 transfiziert. Anschließend wurde ein Aliquot von ca. 10.000 Zellen lysiert und EBP50 in diesem Lysat durch Westernblot-Technik ermittelt. Die Abbildung zeigt die Expression der ausgewählten Zellpopulationen, die für die Bestimmung des Effekts von EBP50 auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität verwendet wurden.

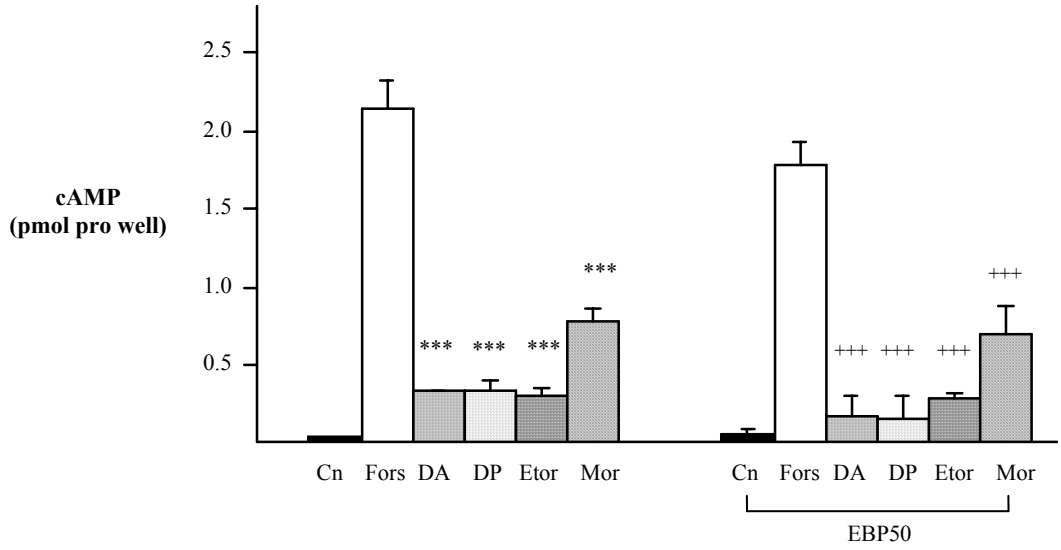


Abb. 25. Opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität in HEK-DOR/EBP50 Zellen.
HEK-DOR und HEK-DOR/EBP50 Zellen wurden in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Die Kontrollen (Cn) erhielten jeweils keine Opioide. Das gebildete cAMP wurde mit ELISA-Technik bestimmt. Die Daten zeigen Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-behandelten Zellen sind signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$).

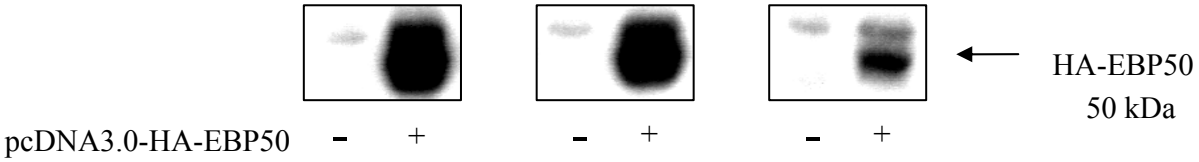


Abb. 26. Transiente Expression von HA- EBP50 in HEK-DOR Zellen.
Die Expression von HA-EBP50 wurde in Zellysaten von transfizierten und nicht-transfizierten HEK-DOR Zellen im Westernblot durch einen HA-Antikörper bestimmt. Die Abbildung zeigt die Expression der ausgewählten Zellpopulation, die für die ERK-Stimulation verwendet wurden.

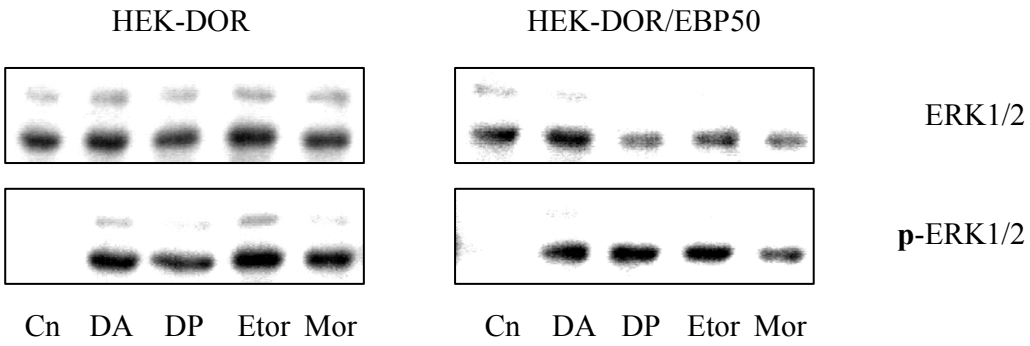


Abb. 27. Stimulation der ERKs durch Opioide in HEK-DOR/EBP50 Zellen.
HEK-DOR und HEK-DOR/EBP50 Zellen wurden mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM;DP), Etorphin (0.1 µM;Etor), Morphin (1 µM;Mor) oder EGF (100 ng/ml) bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Der Kontrolle (Cn) dienten HEK-DOR Zellen. Mittels Westernblot-Technik und spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

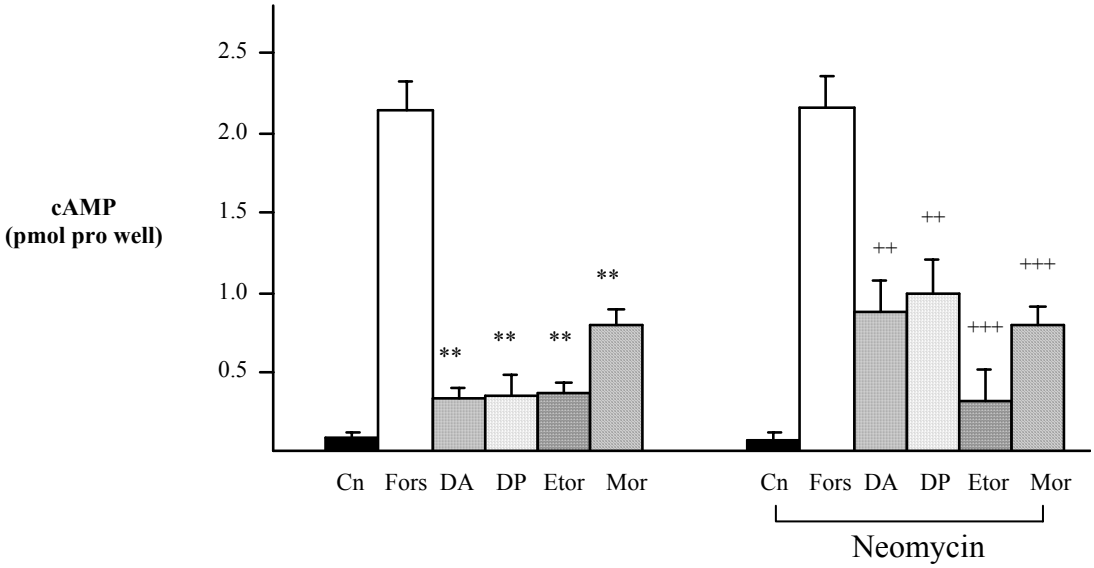


Abb. 28. Effekt von Neomycin auf die opioidinduzierte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
Mit Neomycin (1 mM) für 30 Minuten vorinkubierte und unbehandelte HEK-DOR Zellen wurden in Anwesenheit von Forskolin (10 µM) mit DADLE (1 µM, DA), DPDPE (1 µM, DP), Etorphin (0.1 µM, Etor) oder Morphin (1 µM, Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen (Cn) wurden nicht mit Opioiden behandelt. Mit ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-stimulierten Zellen sind jeweils signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$; $^{++}$, $p<0.01$).

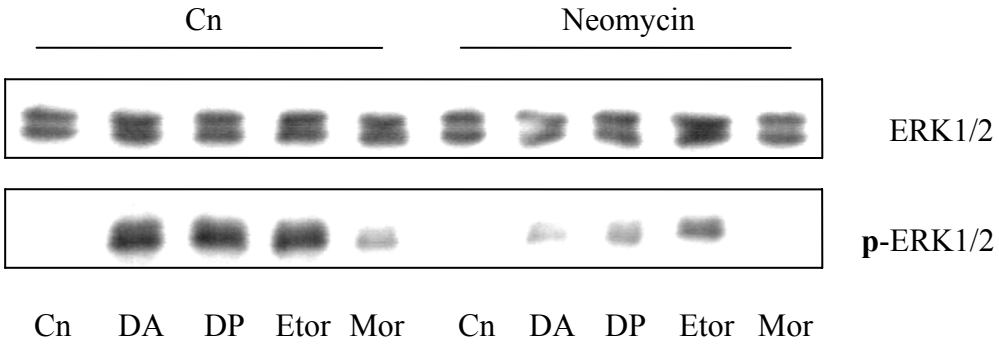


Abb. 29. Auswirkung von Neomycin auf die opioidinduzierte Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen.
Nach einer 30 minütigen Vorbehandlung mit 1 mM Neomycin wurden die Zellen mit DADLE (1 µM, DA), DPDPE (1 µM, DP), Etorphin (0.1 µM, Etor) oder Morphin (1 µM, Mor) für 5 Minuten bei 37°C exponiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten keine Opioide. Mittels Westernblot-Technik und spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

DADLE wie auch durch 1 µM DPDPE war nach dieser Neomycin-Vorbehandlung nur noch halb so stark ausgeprägt als in nicht-vorbehandelten Kontrollzellen (Abb. 28). Im Gegensatz dazu war die Hemmung der Forskolin-induzierten Zyklaseaktivität durch die Alkaloide Etorphin (0.1 µM) und Morphin (1 µM) nicht beeinträchtigt. Interessanterweise fiel nach einer gleichartigen Neomycin-Behandlung die Phosphorylierung der ERKs in Anwesenheit aller verwendeter Opioide schwächer aus. Die geringe Aktivierung der ERKs durch Morphin war sogar völlig unterdrückt (Abb. 29).

4.11 Auswirkung von 1-Butanol auf die Hemmung der Adenylatzyklasen und der ERK-Stimulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen

Im Gegensatz zu den $G\alpha_{11}$-regulierten Phospholipasen C, nehmen $G\alpha_{12/13}$-Proteine über die Stimulation der Phospholipase D (PLD) Einfluß auf zelluläre Effektoren. Über die Hemmung der Phospholipase D durch 1-Butanol (0.3 %, entspricht 33 mM, für 30 min; Ballou et al., 2003) kann die Beteiligung dieser G-Proteine somit indirekt ermittelt werden. Die Blockade der $G\alpha_{12/13}$/PLD-vermittelten Signalgebung durch eine Vorbehandlung der HEK-DOR Zellen mit 1-Butanol hatte weder einen Effekt auf die Forskolin-stimulierte Bildung von cAMP noch war die Hemmung der Adenylatzyklasen durch DADLE (1 µM), DPDPE (1 µM), Etorphin (0.1 µM) oder Morphin (1 µM) unter diesen Bedingungen beeinträchtigt (Abb. 30). Im Gegensatz dazu war allerdings wieder eine geringere ERK-Phosphorylierung durch 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE und 0.1 µM Etorphin in 1-Butanol-vorbehandelten HEK-DOR Zellen zu beobachten (Abb. 31). Auch dieses Mal war unter diesen Bedingungen die schwache Aktivierung der ERKs durch Morphin völlig gehemmt.

4.12 Auswirkungen einer gleichzeitigen Neomycin und 1-Butanol Behandlung auf die Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs in HEK-DOR Zellen

Da die Hemmung der Phospholipasen unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen jeweils zu partiellen Blockaden der Adenylatzyklas-Hemmung und ERK-Phosphorylierung durch bestimmte Opioide führten, war von Interesse, welchen Einfluß eine simultane Hemmung der Lipasen auf die Effektorregulation hat. So wurden HEK-DOR Zellen

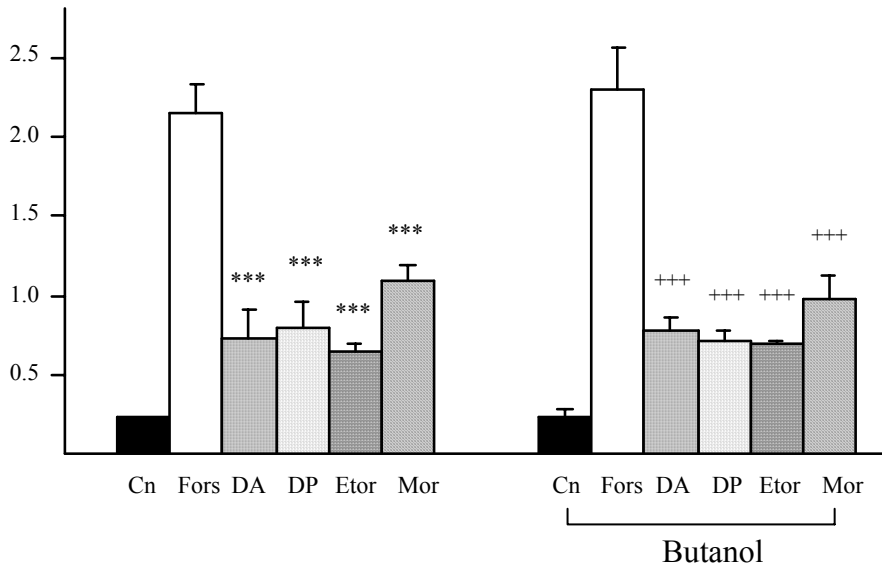


Abb. 30. Effekt von Butanol auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
In einer 24-Lochplatte ausgesäte HEK-DOR Zellen wurden mit 0.3 % Butanol für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Die Kontrollen (Cn) erhielten keine Opioide. Mit ELISA-Technik wurde anschließend das gebildete cAMP bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-stimulierten Zellen sind jeweils signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$).

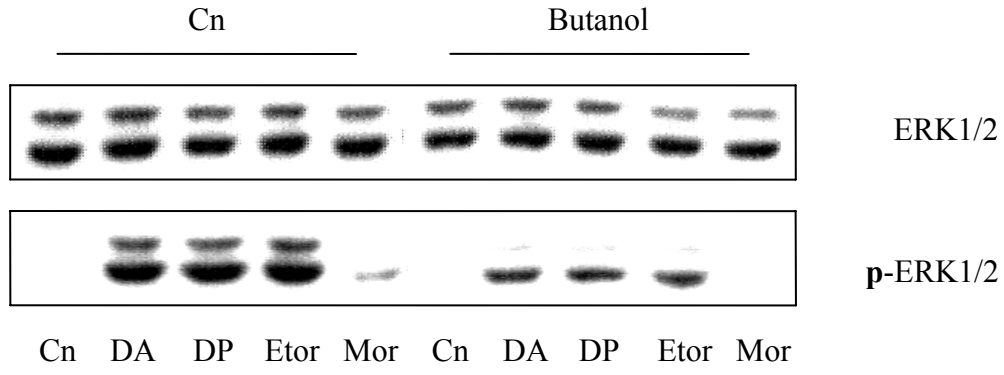


Abb. 31. Einfluss von Butanol auf die opioidvermittelte Stimulation der ERKs.
HEK-DOR Zellen wurden für 30 Minuten mit 0.3 % Butanol vorbehandelt und daraufhin mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Die Kontrollen (Cn) erhielten jeweils keine Opioide. Mit Westernblot-Technik und unter Verwendung spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

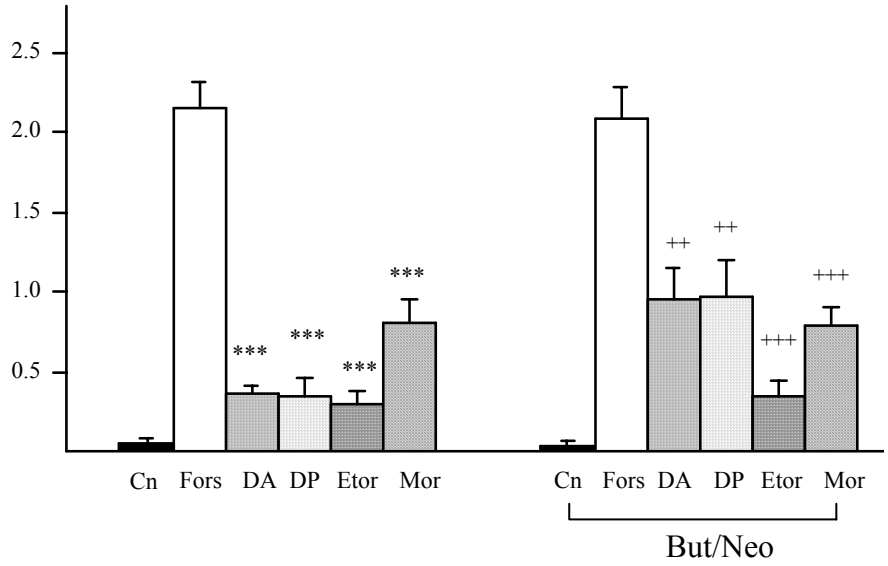


Abb. 32. Effekt von Butanol und Neomycin auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
HEK-DOR Zellen wurden auf einer 24-Lochplatte ausgesät und für 30 Minuten mit Butanol (10 mM, But) und Neomycin (10 mM, Neo) vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen für jeweils 15 Minuten bei 37°C mit Forskolin (10 µM, Fors) allein und zusammen mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) exponiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten keine Opioide. Durch ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP bestimmt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zu Forskolin-stimulierten Zellen sind signifikant (***; $p<0.001$,$^{+++}$; $p<0.001$, $^{++}$; $p<0.01$).

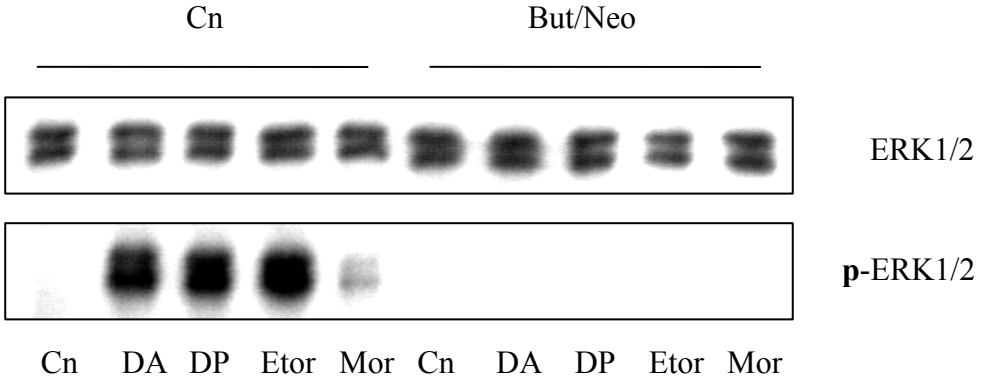


Abb. 33. Gleichzeitige Behandlung von HEK-DOR Zellen mit Butanol und Neomycin hemmen die opioidvermittelte Phosphorylierung der ERKs.
Die Zellen wurden für 30 Minuten mit Butanol (10 mM; But) und Neomycin (10 mM; Neo) vorbehandelt und daraufhin DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C exponiert. Die Kontrollen (Cn) wurden nicht mit Opioiden behandelt. Anschließend wurden mittels Westernblot-Technik die phosphorylierten (p) und die Geasmtexpression der ERKs durch entsprechende Antikörper bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

zusammen mit 1-Butanol (30 mM) und Neomycin (1 mM) für 30 Minuten vorbehandelt und anschließend das Ausmaß der Adenylatzyklase-Hemmung und der ERK-Phosphorylierung durch DADLE, DPDPE, Etorphin oder Morphin in diesen Zellen bestimmt. Während wiederum die Forskolin-stimulierte Zyklaseaktivität durch die peptidergen Opioide DADLE und DPDPE nur noch halb so stark ausgeprägt war, war die Hemmung der Adenylatzyklasen durch Etorphin und Morphin nach einer Butanol/Neomycin-Behandlung nicht beeinträchtigt (Abb. 32). Im Gegensatz dazu allerdings konnte nach selbiger Vorbehandlung keine Phosphorylierung der ERKs durch die verschiedenen Opioide mehr induziert werden (Abb. 33).

4.13 Effekt von Phosduzin auf die Effektorregulation in opioidexponierten HEK-DOR Zellen

Neben den Gα-Untereinheiten sind zelluläre Effektoren auch über die Gβγ-Untereinheit zu regulieren (Ford et al., 1998). Phosduzin ist ein zytosolisches Phosphoprotein (Lee et al. 1992), das an freie Gβγ-Untereinheiten bindet (Lee et al. 1987, Gaudet et al. 1996) und somit eine weitere Signalweiterleitung durch diese Untereinheit hemmt. Um die Funktion der Gβγ-Untereinheiten bei der Regulation von Adenylatzyklasen und den ERKs durch den DOR zu untersuchen, wurden HEK-DOR Zellen transient mit Phosduzin ausgestattet (HEK-DOR/Phd). Eine Untersuchung der für die Versuchsreihen verwendeten HEK-DOR/Phd Zellpopulationen ergab ausschließlich in transfizierten Zellen eine hohe Expression des 33 kDa schweren Phosduzins (Wehmeyer und Schulz, 1998; Abb. 34, 36). Eine Überexpression von Phosduzin ist mit einer deutlich gesteigerten cAMP-Bildung nach Aktivierung der Adenylatzyklasen durch Forskolin verbunden (Abb. 35). Die Eigenschaft der einzelnen Opioide, die Akkumulation von cAMP zu hemmen, bleibt allerdings erhalten. Durch die gesteigerte Adenylatzyklase-Aktivität in Anwesenheit von Forskolin erscheint die Hemmung sogar verstärkt. Im Vergleich dazu hat die Ausstattung der Zellen mit Phosduzin keinen Einfluß auf die Gesamtexpression der ERKs (Abb. 37). Ebenso ist im Vergleich zu HEK-DOR Zellen die Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR/Phd Zellen nach einer Exposition mit 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin identisch (Abb. 37).

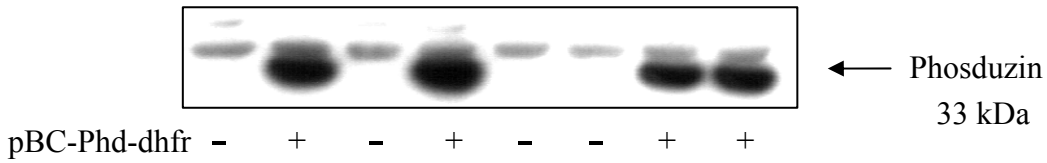


Abb. 34. Transiente Expression von Phosduzin in HEK-DOR Zellen.
Nach der Transfektion von HEK-DOR Zellen mit dem Plasmid pBC-Phd-dhfr wurde ein Aliquot von ca. 10.000 Zellen lysiert und in diesem Lysat Phosduzin durch Westernblot-Technik ermittelt. Die Abbildung belegt die Phosduzin-Expression der Zellpopulationen, die für die nachfolgenden cAMP Akkumulationen verwendet wurden.

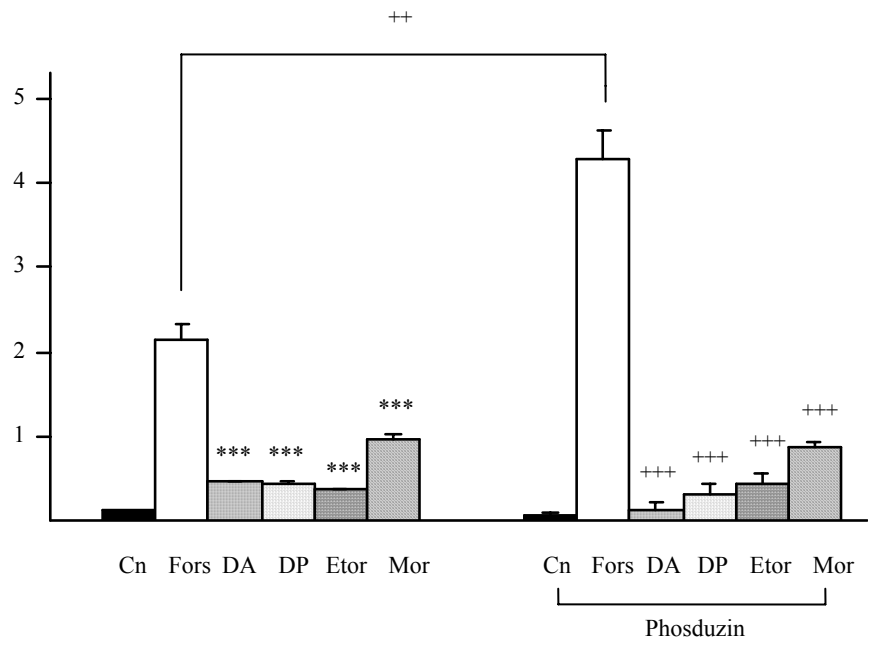


Abb. 35. Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität durch Opioide in HEK-DOR/Phd Zellen.
HEK-DOR und HEK-DOR/Phd Zellen wurden jeweils in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Als Kontrolle (Cn) dienten jeweils unbehandelte Zellen. Das gebildete cAMP wurde mit ELISA-Technik bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (± SD) von vier unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-behandelten Zellen sind signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$). Auch ist der Unterschied von Forskolin-stimulierten HEK-DOR/Phd zu HEK-DOR Zellen signifikant ($^{++}$, $p<0.001$).

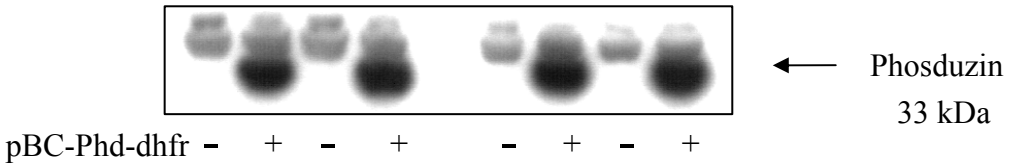


Abb. 36. Transiente Expression von Phosduzin in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden mit Phosduzin (Plasmid: pBC-Phd-dhfr) transfiziert. Anschließend wurde ein Aliquot von ca. 10.000 Zellen entnommen. Diese wurden lysiert und mittels Westernblot-Technik auf Expression von Phosduzin (Phd) überprüft.

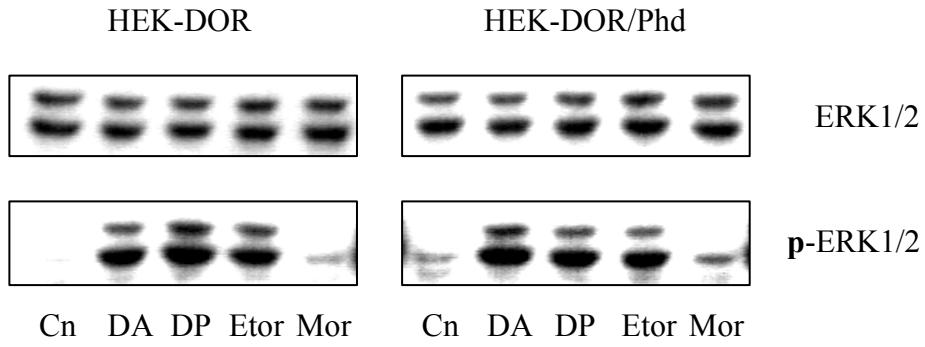


Abb. 37. Opioidvermittelte Stimulation der ERKs in HEK-DOR/Phd Zellen.
HEK-DOR Zellen und HEK-DOR/Phd Zellen wurden mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) jeweils für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Als Kontrolle (Cn) dienten HEK-DOR Zellen. Die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) wurde durch Westernblot-Technik mit jeweils spezifischen Antikörpern ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von vier repräsentativen Blots.

4.14 Einfluss einer ERK Aktivierung auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität

Studien konnten zeigen, daß zwischen Adenylatzyklasen und ERKs ein „Cross-Talk“ besteht (Stork und Schmitt, 2002). Da über die Stimulation des DORs in HEK Zellen gleichzeitig eine Hemmung von Adenylatzyklasen und eine Aktivierung der ERKs ausgelöst wird, war weiterhin von Interesse, wie sich diese beiden Effektoren gegenseitig in ihrer Aktivität beeinflussen können. Zunächst wurde daher der Einfluß der ERK-Aktivierung auf die Hemmung der Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen untersucht.

4.14.1 Effekt von Tyrphostin AG 1478 auf die Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität

Die Aktivierung der ERKs durch manche G-Protein gekoppelte Rezeptoren läßt sich durch Tyrphostin AG 1478, einem spezifischen Inhibitor des EGF Rezeptors (Bartsch et al., 2001) hemmen. Eine Behandlung von HEK-DOR Zellen mit Tyrphostin AG 1478 (35 µM, 15 min) alleine bedingte eine schwache Phosphorylierung der ERKs, die allerdings in Anwesenheit von 1 µM DADLE und 1 µM DPDPE nicht weiter zunahm (Abb. 38.). Eine Exposition der Zellen mit Etorphin (0.1 nM) ergab unter diesen Bedingungen eine schwache Aktivierung der ERKs, wohingegen eine vollständige Hemmung der ERK-Phosphorylierung durch Morphin (1 µM) wie auch durch EGF (100 ng/ml) nach dieser Tyrphostin-Behandlung zu beobachten war (Abb. 38.) Im Hinblick auf die Adenylatzyklase-Regulation führte die Tyrphostin-Behandlung (35 µM, 15 min) zu einer um 50 % verminderten cAMP-Synthese nach direkter Aktivierung der Adenylatzyklasen durch Forskolin. Die Hemmung der Adenylatzyklasen durch 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin war trotz der verminderten Zyklase-Aktivität durch Tyrphostin nicht beeinträchtigt (Abb. 39).

4.14.2 Effekt des MEK Inhibitors PD 098059 auf die opioidinduzierte Hemmung der Adenylatzyklasen

Eine Hemmung der ERK-Aktivierung ist ebenso durch [2-(2’-Amino-3’-Methoxyphenyl)-Oxanaphthalen-4-one] (PD 098059) zu erzielen, welches durch selektive Hemmung der MAP-Kinase Kinase MEK (Dudley et al. 1995) die Phosphorylierung der ERKs unterbindet. Wie in Abb. 40 zu sehen ist, war nach einer Vorbehandlung von HEK-DOR Zellen mit PD 098059 (10 µM, 5 min) eine Phosphorylierung der ERKs durch 1 µM DADLE, 1 µM

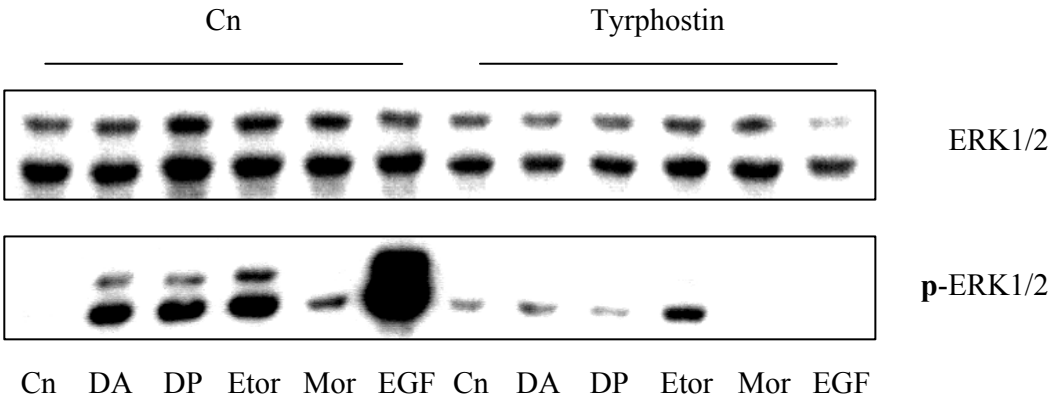


Abb. 38. Hemmung der opioidvermittelten Stimulation der ERKs durch Tyrphostin AG1478.
HEK-DOR Zellen wurden mit 35 µM Tyrphostin für 15 Minuten vorbehandelt und anschließend mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor), Morphin (1 µM; Mor) oder EGF (100 ng/ml) für 5 Minuten bei 37ºC inkubiert. Die Kontrollen (Cn) wurden nicht mit Tyrphostin vorbehandelt. Durch Westernblot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten ERKs (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

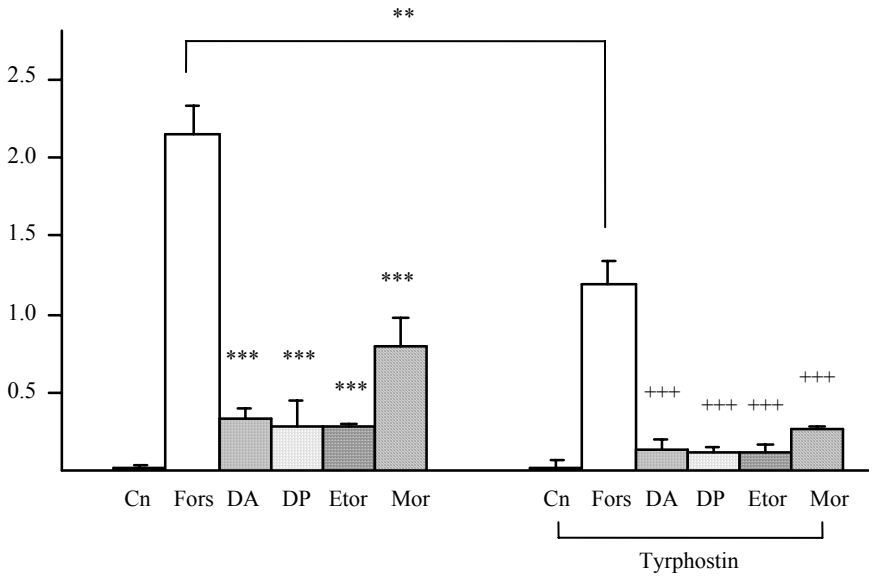


Abb. 39. Einfluß von Tyrphostin AG 1478 auf die opioidvermittelte Hemmung Adenylatzyklase-Aktivität.
HEK-DOR Zellen wurde in einer 24-Lochplatte ausgesät und nach einer 15 minütigen Vorinkubation mit Tyrphostin (35 µM) in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C behandelt. Kontrollen (Cn) erhielten jeweils keine Opioide. Anschließend wurde mit ELISA-Technik das gebildete cAMP ermittelt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zu Forskolin-behandelten Zellen sind jeweils signifikant (***, $p<0.001$; $^{++}$,$p<0.01$). Auch der Unterschied von unbehandelten zu vorbehandelten Forskolin-stimulierten Zellen ist signifikant (**, $p<0.01$).

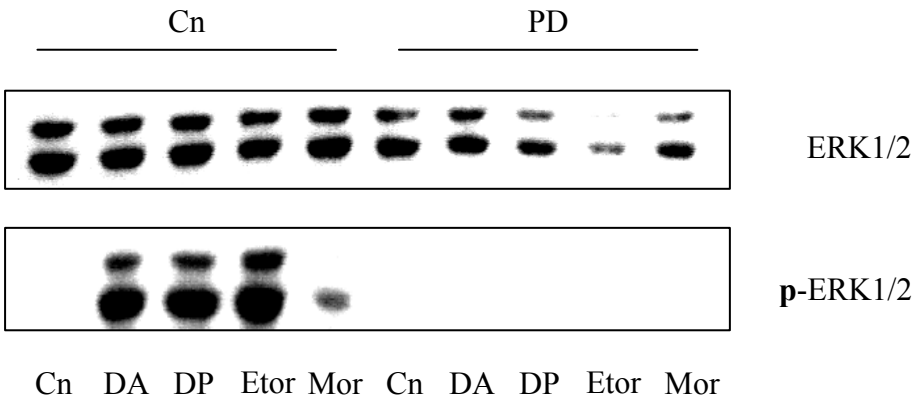


Abb. 40. Hemmung der opioidvermittelten Stimulation der ERKs durch PD in HEK-DOR Zellen.
In Anwesenheit von 10 µM PD wurden die Zellen mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C exponiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten jeweils kein PD. Durch Westernblot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

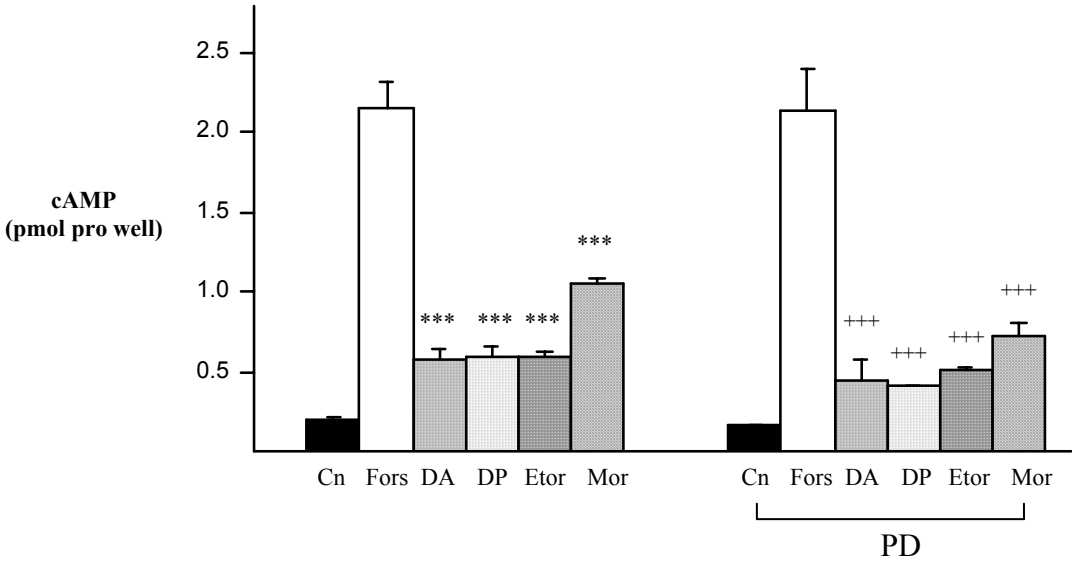


Abb. 41. PD hat keinen Effekt auf die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
In einer 24-Lochplatte ausgesäte HEK-DOR Zellen wurden in Anwesenheit von 10 µM PD und 10 µM Forskolin (Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) bei 37°C für 15 Minuten behandelt. Kontrollen (Cn) wurden nicht mit Opioiden behandelt. Gebildetes cAMP wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind Mittelwerte (± SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung. Die Unterschiede zu Forskolin-behandelten Zellen sind jeweils signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$).

DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin nicht mehr zu beobachten. Somit konnte durch PD 098059 eine Aktivierung der ERKs nach einer Stimulation des DORs vollkommen gehemmt werden. Im Gegensatz zu Tyrphostin AG 1478 hatte allerdings die Hemmung der ERK-Aktivierung durch PD 098059 keinen Einfluß auf die Forskolin-stimulierten Adenylatzyklasen. Auch war die Hemmung der Zyklaseaktivität durch die verschiedenen Opioide unter diesen Bedingungen genauso stark ausgeprägt wie in den nicht-vorbehandelten Kontrollzellen (Abb. 41).

4.15 Einfluß der Adenylatzyklase-Hemmung auf die Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen

Um andererseits die Bedeutung der opioidvermittelten Hemmung der Adenylatzyklasen für die gleichzeitige ERK-Aktivierung zu charakterisieren, wurde durch unterschiedliche Verfahren eine Stimulation der Zyklasen bewirkt und die damit verbundenen Folgen für die ERK -Phosphorylierung durch die Opioide bestimmt.

Eine direkte Aktivierung der Adenylatzyklasen wird durch Forskolin hervorgerufen (Seamon und Daly et al., 1983). So wurden HEK-DOR Zellen mit Forskolin (50 µM, 30 min) vorbehandelt und zunächst die Auswirkungen dieser Behandlung auf die Adenylatzyklase-Aktivität charakterisiert. Nach einer derartigen Vorbehandlung waren in HEK-DOR Zellen die gleichen Mengen an cAMP zu bestimmen wie in nicht-behandelten Kontrollzellen (Abb. 42). Allerdings war nach einer wiederholten Exposition der Zellen mit Forskolin (10 µM) eine weitaus geringere Akkumulation von cAMP zu bestimmen wie in nicht-vorbehandelten Zellen (Abb. 42). Eine Hemmung der Adenylatzyklase durch 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE und 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin war nach der Forskolin-Vorbehandlung nach wie vor zu beobachten.

Eine Behandlung der HEK-DOR Zellen mit Forskolin (50 µM, 30 min) alleine führte nicht zu einer Phosphorylierung der ERKs (Abb. 43). Nach dieser Vorbehandlung war aber keine Aktivierung der ERKs durch Stimulation des DORs mit 1 µM DPDPE oder 0.1 µM Etorphin zu detektieren. Auch die Phosphorylierung der ERKs durch EGF (100 ng/ml) war nach der Forskolin-Behandlung vermindert (Abb. 43). Im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen war die Gesamtmenge der ERKs unverändert. Eine Vorbehandlung von HEK-DOR Zellen mit Prostaglandin E1 (PGE1) (10 µM, 15 min), welches durch die Aktivierung des

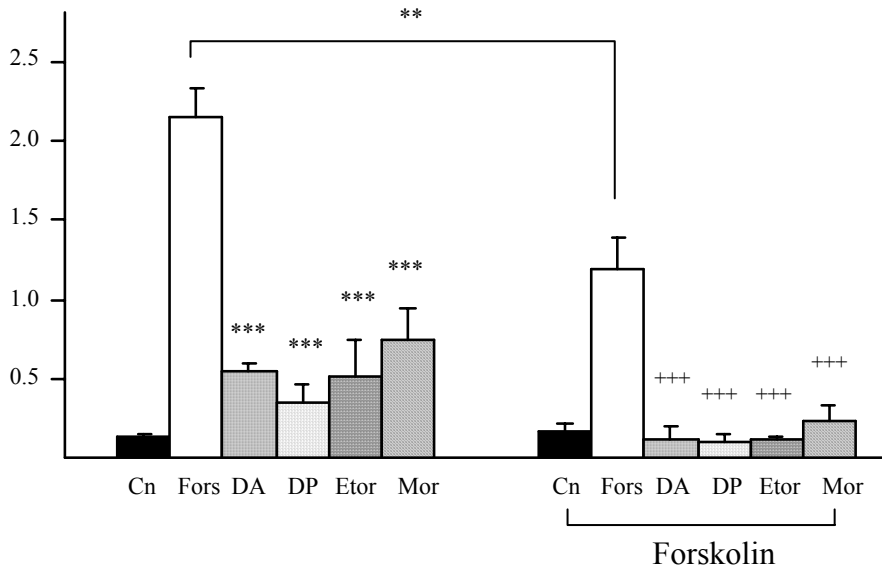


Abb. 42. Auswirkung von Forskolin auf die durch Opioide induzierte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
Mit Forskolin (50 µM) für 30 Minuten vorinkubierte und unbehandelte HEK-DOR Zellen wurden in Anwesenheit von Forskolin (10 µM; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Kontrollzellen (Cn) erhielten keine Opioide. Mit ELISA-Technik wurde das gebildete cAMP bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$; $^{++}$, $p<0.01$; $^{+}$, $p<0.05$). Der Unterschied von unbehandelten zu vorbehandelten Forskolin-stimulierten Zellen ist signifikant (**, $p<0.01$).

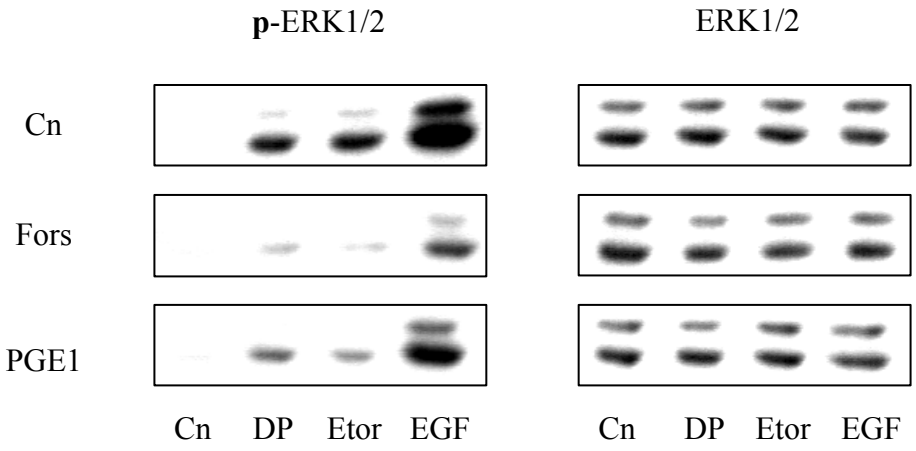


Abb. 43. Stimulierung der ERKs durch Opioide und EGF in Anwesenheit von Forskolin und PGE1.
nach einer 30 minütigen Vorinkubation mit 50 µM Forskolin (Fors) und einer 15 minütigen Vorinkubation mit 10 µM PGE1 wurden HEK-DOR Zellen mit DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder EGF (100 ng/ml) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen (Cn) wurden nicht mit Forskolin oder PGE1 vorbehandelt. Mittels Westernblot-Technik wurden mit spezifischen Antikörpern die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

$G\alpha_s$-gekoppelten PGE-Rezeptors ebenso zu einer Stimulation der Adenylatzyklasen in HEK Zellen führt, bewirkt selbst keine Phosphorylierung der ERKs, beeinträchtigt aber ebenso wesentlich die Aktivierung der ERKs durch 1 μM DPDPE, 0,1 μM Etorphin oder 100 ng/ml EGF, ohne dabei wiederum einen Effekt auf die Gesamtexpression der Kinasen zu haben (Abb. 43).

4.16 Einfluß der Adenylatzyklase Typ II auf die Stimulation der ERKs durch Opioide in HEK-DOR Zellen

Während die meisten Adenylatzyklase-Isoformen durch Stimulation von DORs gehemmt werden, kann die katalytische Aktivität der Isoform II unter bestimmten Bedingungen stimuliert werden (Tsu et al., 1995). Nach einer Überexpression der Adenylatzyklase II in HEK-DOR Zellen (HEK-DOR/ACII) war allerdings ähnlich wie in HEK-DOR Zellen keine gesteigerte Synthese von cAMP durch die Opioide DPDPE (1 μM) oder Etorphin (0.1 μM) zu verzeichnen. Es konnte aber in Adenylatzyklase II-transfizierten HEK-DOR Zellen ein höhere Akkumulation an cAMP durch PGE1 hervorgerufen werden als in den HEK-DOR Zellen. Da Adenylatzyklasen II durch α_s-gekoppelte PGE1-Rezeptoren stimuliert werden, läßt die erhöhte Synthese von cAMP in Anwesenheit von PGE1 eine zusätzlichen Adenylatzyklase vermuten. Im Vergleich zu HEK-DOR Zellen fiel die Hemmung der PGE1-stimulierten Adenylatzyklasen in Typ II exprimierenden Zellen durch DPDPE oder Etorphin annähernd gleich aus. Wie in Abb. 44 allerdings zu sehen ist, hatte die zusätzliche Ausstattung der HEK-DOR Zellen mit der Adenylatzyklase II keinerlei Einfluß auf die Phosphorylierung der ERKs durch DADLE (1 μM), DPDPE (1 μM), Etorphin (0,1 μM) oder Morphin (1 μM).

4.17 Auswirkung des PKA Inhibitors H-89 auf die Hemmung der Adenylatzyklasen und die ERK-Stimulation durch Opioide in HEK-DOR Zellen

Eine erhöhte Adenylatzyklase-Aktivität bewirkt die Aktivierung der cAMP-regulierten Proteinkinase A (PKA), welche durch Phosphorylierung zahlreiche zelluläre Effektoren in ihrer Aktivität beeinflussen kann. Da sowohl Forskolin als auch PGE1 durch eine Erhöhung von zellulärem cAMP zu einer Stimulation der PKA führen (Walsh et al., 1978; Roper et al.,

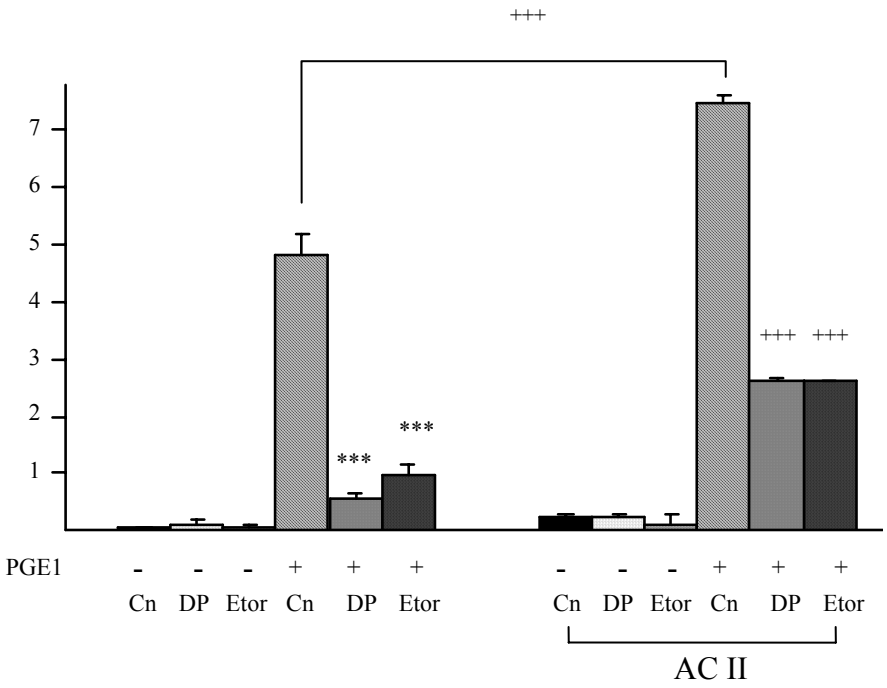


Abb. 44. Regulation der ACII in HEK-DOR Zellen.
Nach Transfektion von HEK-DOR Zellen mit der AC II (Plasmid: pcDNA3.1-AC II) wurden HEK-DOR und HEK-DOR/AC II Zellen mit DPDPE (1 µM; DP) oder Etorphin (0.1 µM; Etor) jeweils allein und in Anwesenheit von PGE1 (10 µM) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten kein Opioid. Die Bestimmung des gebildeten cAMP erfolgte im ELISA. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zu PGE1-behandelten Zellen sind signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$). Der Unterschied von HEK-DOR/AC II zu HEK-DOR Zellen ist signifikant ($^{+++}$, $p<0.001$).

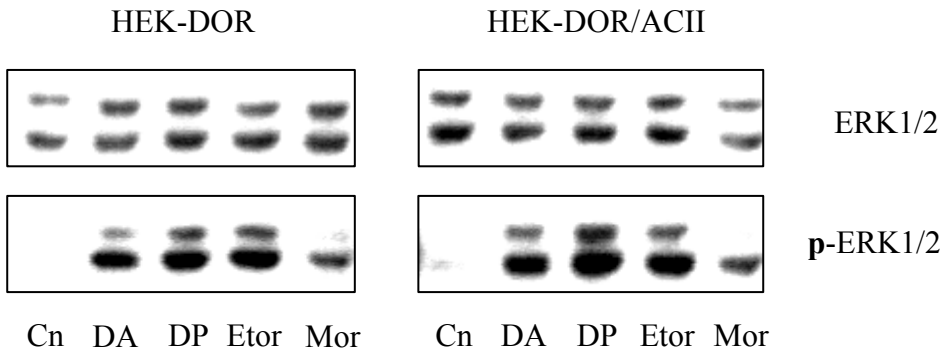


Abb. 45. Opioidvermittelte Stimulation der ERKs in HEK-DOR/AC II Zellen.
HEK-DOR/AC II und HEK-DOR Zellen wurden jeweils mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrolle (Cn) blieb jeweils unbehandelt. Durch Westernblot-Technik wurden mit spezifischen Antikörpern die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) bestimmt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

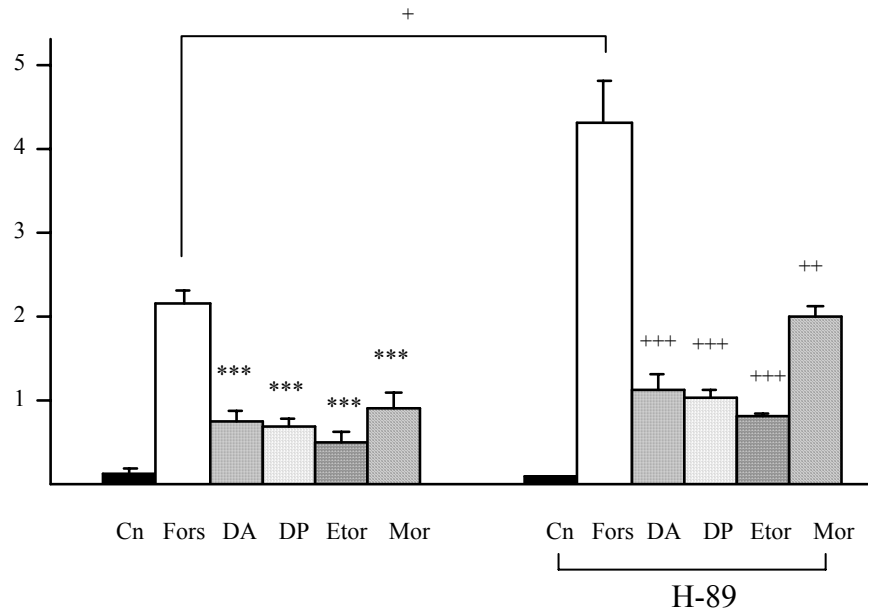


Abb. 46. Einfluß von H-89 auf die opioidinduzierte Hemmung der Adenylatzyklase-Aktivität.
HEK-DOR Zellen wurden auf einer 24-Lochplatte ausgesät und nach 40 minütiger Inkubation mit H-89 (10 µM) in Anwesenheit von Forskolin (10 µm; Fors) mit DADLE (1 µM; DA), DPDPE (1 µM; DP), Etorphin (0.1 µM; Etor) oder Morphin (1 µM; Mor) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Kontrollen (Cn) erhielten keine Opioide. Das gebildete cAMP wurde mit ELISA-Technik ermittelt. Die Ergebnisse stellen Mittelwerte (±SD) von drei unabhängigen Versuchen in Doppelbestimmung dar. Die Unterschiede zu Forskolin-stimulierten Zellen sind jeweils signifikant (***, $p<0.001$; $^{+++}$, $p<0.001$; $^{++}$, $p<0.01$). Der Unterschied von Forskolin zwischen naiven und H89-vorbehandelten Zellen ist signifikant ($^{+}$, $p<0.05$).

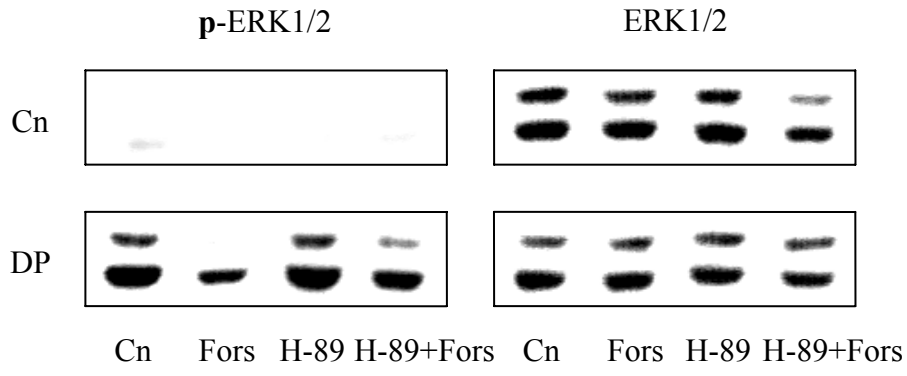


Abb. 47. Effekt von H-89 auf die opioidvermittelte Stimulation der ERKs in HEK-DOR Zellen.
HEK-DOR Zellen wurden mit 10 µM H-89 für 40 Minuten und mit 10 µM Forskolin (Fors) für 30 Minuten vorinkubiert. Danach wurden die Zellen jeweils mit DPDPE (1 µM; DP) für 5 Minuten bei 37°C behandelt. Als Kontrolle (Cn) dienten naive Zellen. Durch Westernblot-Technik und Verwendung spezifischer Antikörper wurden die phosphorylierten (p) und die Gesamtexpression der ERKs (ERK1/2) ermittelt. Die Abbildung zeigt einen von drei repräsentativen Blots.

1994), wurde die Bedeutung dieser Kinase für die Hemmung der opioidinduzierten ERK-Aktivierung in Anwesenheit dieser Substanzen untersucht. Eine Vorbehandlung der HEK-DOR Zellen mit dem PKA-Blocker H-89 (10 µM, 30 min; Chijiwa et al., 1990) führte zu einer gesteigerten cAMP-Produktion durch Forskolin (10 µM). Die Aktivierung des DORs durch 1 µM DADLE, 1 µM DPDPE, 0.1 µM Etorphin oder 1 µM Morphin resultierte nach wie vor in einer unveränderten Hemmung der cAMP-Synthese (Abb. 46). Im Gegensatz dazu hatte die Vorbehandlung von HEK-DOR Zellen mit H-89 alleine (10 µM, 30 min) keinen Einfluß auf eine DPDPE-induzierte Phosphorylierung der ERKs (Abb. 47). Allerdings konnte unter diesen Bedingungen eine durch Forskolin (10 µM) hervorgerufene Hemmung der DPDPE-vermittelten ERK1/2-Aktivierung fast vollständig aufgehoben werden.

5. Diskussion:

Die Aktivierung von δ-Opioidrezeptoren bedingt sowohl eine Hemmung der Adenylatzyklasen als auch eine Stimulation von ERK/MAP-Kinasen. Da δ-Rezeptoren über die Interaktion und Aktivierung sehr unterschiedlicher G-Proteine Einfluß auf zelluläre Effektoren nehmen können (Standifer und Pasternak, 1997), wurde hier untersucht, ob diese gegensätzliche Effektorregulation infolge einer Opioidexposition auf die Aktivierung verschiedener G-Proteine zurückzuführen ist.

Um die zellulären Mechanismen zur Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs gezielt untersuchen zu können, wurden die Versuche an δ-Rezeptor-tragenden HEK293 Zellen durchgeführt. Diese Zellen werden aufgrund ihrer umfangreichen und definierten Ausstattung mit G-Proteinen (G_i, G_q und G_{12}; Neptune et al., 1999) und Effektoren, wie z.B. Adenylatzyklasen vom Typ V, VI und VII (Sunahara et al., 1996) oder ERKs (Eisinger und Schulz, 2004), am häufigsten für rezeptorvermittelte Signalstudien verwendet (Schmitt und Stork, 2000). Da allerdings HEK293 Zellen keine Opioidrezeptoren endogen exprimieren (Bot et al., 1997), mußte der durch Transfektion um den murinen δ-Opioidrezeptor ergänzte Zellklon HEK-DOR zunächst auf die Funktion und Signalverarbeitung des Rezeptors hin charakterisiert werden. Dabei konnte wie in NG108-15 Zellen oder neuronalen Primärzellen, die endogen mit δ-Opioidrezeptoren ausgestattet sind, auch für HEK-DOR Zellen eine Hemmung der Adenylatzyklasen und eine Stimulation der ERKs durch die Enkephalin-Derivate DADLE und DPDPE, sowie durch die Alkaloide Etorphin und Morphin nachgewiesen werden. Da weder in HEK293 Zellen noch in Anwesenheit des Antagonisten Naloxon eine Aktivierung der ERKs durch die verschiedenen Opioide induziert werden konnte, werden die ERKs in HEK-DOR Zellen über die Aktivierung des δ-Rezeptors reguliert. Wie bereits durch Bot et al. (1997) gezeigt, war auch die opioidvermittelte Hemmung der Adenylatzyklasen in diesen Zellen durch Naloxon zu antagonisieren und beruht somit ebenso auf einer Stimulation des δ-Rezeptors.

Obwohl beide Effektoren über die Aktivierung des δ-Opioidrezeptors in HEK-DOR Zellen in ihrer Aktivität reguliert werden, reagieren sie gegenüber einer Zellexposition mit den verschiedenen Opioiden unterschiedlich empfindlich. Die Dosis-Wirkungsbeziehungen

ergaben dabei sowohl Unterschiede zwischen den einzelnen Opioiden einen Effektor zu regulieren, als auch unterschiedliche Sensitivitäten der beiden Effektoren gegenüber einem Opioid. So war für die Hemmung der Adenylatzyklasen oder eine Stimulation der ERKs durch Morphin eine jeweils 1000-fach höhere Konzentration erforderlich als für die Peptide und Etorphin. Außerdem konnte für die Stimulation der ERKs durch die ausgewählten Enkephalin-Derivate eine 6-fach höhere EC50 als für die Hemmung der Adenylatzyklasen bestimmt werden. Für die Alkaloide Etorphin und Morphin war sogar eine bis zu 40-fach höhere Konzentration für die Aktiverung der ERKs erforderlich als für eine Inhibition der Zyklasen. Diese Befunde waren erstaunlich, da das ERK/MAP-Kinase System bereits auf geringste extrazelluläre Veränderungen reagieren kann und somit bislang als sehr reaktionsfreudig galt (Burt et al., 1996). Daher wurde im weiteren untersucht, wodurch diese Unterschiede bedingt sein könnten. Generell ist die Fähigkeit eines Opioids, zelluläre Effektoren über die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu regulieren, von seiner Bindungsaffinität zum Rezeptor abhängig (Quock et al., 1999). So konnte durch Verdrängungsexperimente bestätigt werden, daß Morphin, welches vornehmlich als μ-Agonist (Standifer und Pasternak; 1997) mit geringer Affinität für den δ-Rezeptor bekannt ist (Chaturvedi et al., 2000), ebenso für den δ-Rezeptor in HEK-DOR Zellen einen niederaffinen Agonisten darstellt. Somit könnte die geringe Empfindlichkeit der untersuchten Effektoren gegenüber Morphin durch die geringe Affinität des Liganden zum δ-Rezeptor bedingt sein. Auch könnten die für DADLE, DPDPE und Etorphin ermittelten EC50-Werte zur Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs mit der höheren Affinität dieser Liganden (Bot et al., 1997) verbunden sein, die für den δ-Rezeptor in HEK-DOR Zellen bestätigt werden konnte.

δ-Opioidrezeptoren existieren in zwei Suptypen, die sich durch ihre Affinität zu verschiedenen Opioiden und auch in der Effektoregulation (Wild et al., 1991) unterscheiden. Die bisherigen Studien wurden unter Verwendung der Agonisten DADLE und DPDPE, die mit einer höheren Affinität an δ1-Rezeptoren binden (Portoghese et al., 1992), sowie der δ/μ-Opioidrezeptor-bindenen Liganden Etorphin und Morphin (Zhang et al., 1999) durchgeführt. Um auszuschließen, daß die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der Adenylatzyklasen und der ERKs darauf beruhen, daß diese Opioide keine optimalen Agonisten für eine effiziente Effektorregulation in HEK-DOR Zellen darstellen könnten, wurde der δ2-Agonist Deltorphin II, der sich durch eine höhere Affinität für δ2-Rezeptoren ausweist, auf seine regulatorischen

Eigenschaften in diesem Zellmodell untersucht. Die Dosis-Wirkungskurven ergaben hierbei, daß Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen durch Deltorphin II mit einer EC50 von 0.18 nM ähnlich effizient reguliert werden wie in δ-Rezeptor exprimierenden CHO Zellen (EC50: 0.39 ± 0.05 nM; Law und Loh, 1999). Allerdings war auch für Deltorphin II mit einer EC50 von 1.03 nM für die Stimulation der ERKs eine etwa 6-fach höhere Dosis erforderlich als für die Hemmung der Adenylatzyklasen. Somit reagiert scheinbar unabhängig von der jeweiligen Affinität und Rezeptorspezifität der hier untersuchten Opioide das System der Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen empfindlicher auf eine Stimulation des δ-Opioidrezeptors als die ERKs.

Im weiteren wurde untersucht, ob die unterschiedlich empfindlich reagierenden Adenylatzyklasen und ERKs in HEK-DOR Zellen nach Exposition mit den hier verwendeten Opioiden durch verschiedene G-Proteine kontrolliert werden. Obwohl δ-Opioidrezeptoren mit unterschiedlichen G-Proteinen interagieren können (Sanchez-Blazquez und Garzon, 1998), wurde die Hemmung der Adenylatzyklasen vornehmlich einer Aktivierung von $G\alpha_{i2}$-Untereinheiten zugeordnet (McKenzie und Milligan, 1990). So konnte nach einer Übernacht-Behandlung mit 100 ng/ml PTX, was unter diesen Bedingungen über 90 % der in HEK293 Zellen exprimierenden $G\alpha_i$-Untereinheiten über ADP-Ribosylierung hemmt (Friedman et al., 2002), durch Etorphin und Morphin keine Hemmung der Adenylatzyklasen mehr beobachtet werden. Somit scheinen Morphin und Etorphin überwiegend über die Aktivierung von $G\alpha_i$-Untereinheiten die Zyklasen in HEK-DOR Zellen zu hemmen. Wie bereits schon früher für HEK-DOR Zellen gezeigt werden konnte (Bot et al.; 1997), waren im Gegensatz dazu nach einer derartigen PTX-Behandlung die Inhibition der Adenylatzyklasen durch DADLE und DPDPE nur partiell gehemmt. So könnte vermutet werden, daß die Peptide DADLE und DPDPE nicht nur über die Aktivierung von $G\alpha_i$-Untereinheiten, sondern auch über PTX-insensitive G_q-Proteine, die in HEK293 Zellen exprimiert (Neptune et al., 1999) und durch DORs aktiviert werden können (Standifer und Pasternak, 1997), eine Hemmung der Adenylatzyklasen (Tsu et al., 1995) auslösen. Da auch für den $G_{i/o}$-gekoppelten μ-Opioidrezeptor eine zusätzliche Aktivierung von $G\alpha_q$ durch das Enkephalin-Derivat DAMGO bekannt ist (Sanchez-Blazquez et al., 2001), könnte dies auch für den DOR und die untersuchten Peptide DADLE und DPDPE vermutet werden.

Interessanterweise führt eine PTX-Behandlung zu einer vermindertern Adenylatzyklase-Aktivität in Anwesenheit von Forskolin in HEK-DOR Zellen. Da Forskolin direkt mit den Zyklasen interagiert und diese aktiviert, lässt die verminderte Zyklaseaktivität direkte Veränderungen am Enzym vermuten. Die Sensitivität der Adenylatzyklasen gegenüber Forskolin kann beispielsweise über eine Phosphorylierung der Zyklasen durch die Serin-Threonin Kinase c-Raf-1 (Hagemann et al., 1999) erhöht werden (Ding et al., 2004). Da allerdings PTX neben den $G\alpha_i$-Untereinheiten auch die in proliferierenden Zellen permanent aktive c-Raf-1 hemmt (Piiper et al., 2000), und eine Inhibition von c-Raf-1 in HEK293 Zellen eine Forskolin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität hemmt (Tan et al. 2001), könnte dies die verminderte Akkumulation von cAMP durch Forskolin in PTX-behandelten HEK-DOR Zellen erklären. Die absolute Hemmung der ERK-Aktivierung durch die verschiedenen Opioide in Anwesenheit von PTX läßt ebenso eine Kontrolle dieses Effektors durch $G\alpha_i$-Untereinheiten vermuten. Allerdings zeigten weitere Experimente, daß PTX auch die Aktivierung der ERKs durch Rezeptoren beeinflußt, die unabhängig von $G\alpha_i$-Untereinheiten zelluläre Effektoren regulieren. Wie bereits durch Melien et al. (1998) beobachtet, war beispielsweise die Stimulation der ERKs nach einer Aktivierung von Rezeptor-Tyrosinkinasen für EGF durch PTX partiell gehemmt. Die Stimulation von ERKs durch EGF-Rezeptoren beinhaltet die Aktivierung von c-Raf-1 und B-Raf (Treisman et al., 1996; Piiper et al., 2000). Da beide Isoformen in HEK Zellen exprimiert werden (Schmitt und Stork, 2000), und PTX nur die c-Raf-1-Variante nicht aber B-Raf hemmt (Piiper et al., 2000), bleibt eine verminderte PTX-insensitive ERK Aktivierung durch B-Raf (Schmitt und Stork, 2000) erhalten. So konnte auch gezeigt werden, daß infolge einer direkten Aktivierung beider Raf Isoformen durch PKC (Williams et al., 2002) die anschließende Phosphorylierung der ERKs in HEK-DOR Zellen durch PTX wiederum nur partiell gehemmt wird. Im Gegensatz dazu erfolgt die Aktivierung der ERKs durch den G_q-gekoppelten $P2Y_1$-Rezeptor in HEK293 Zellen (Schachter et al., 1997) ausschließlich über die Aktivierung von c-Raf-1 (Kolch et al., 1993; Marais et al., 1998). So bewirkt PTX in HEK-DOR Zellen auch nach einer Stimulation dieses Rezeptors durch ADP eine totaleHemmung der ERK-Phosphorylierung. Da die ERK-Aktivierung auch durch andere G_q-gekoppelte Rezeptoren in Anwesenheit von PTX gehemmt werden kann (Smith et al., 1999), scheint diese Beobachtung kein dem $P2Y_1$-Rezeptor-spezifisches Phänomen zu sein. Auch DOR führen über c-Raf-1 zu einer Stimulation der ERKs (Varga et al., 2002) und somit könnte die Hemmung der opioidvermittelten ERK-

Aktivierung durch PTX nicht nur auf einer Inhibition der $G\alpha_i$ Untereinheit (Piiper et al., 2000), sondern auch auf einer Blockade der c-Raf-Kinaseaktivität beruhen.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse war es im weiterem Verlauf dieser Studie daher von Interesse, welche Rolle die Gruppe der PTX-insensitiven G_q- und G_{12}-Proteine bei der opioidinduzierten Hemmung der Adenylatzyklasen und der Stimulation der ERKs nach δ-Rezeptor Aktivierung übernehmen. Die Funktion der in HEK-DOR Zellen exprimierenden $G\alpha_q$-Untereinheiten (Neptune et al., 1999) wurde durch die Überexpression von EBP50 untersucht, welches durch Bindung an die aktivierte $G\alpha_q$-Untereinheit (Rochdi et al., 2002) und nicht durch eine Interaktion mit dem δ-Rezeptor (Huang et al., 2004) jegliche $G\alpha_q$-regulierten Signalkaskaden hemmt. Obwohl in transfizierten HEK-DOR Zellen eine sehr hohe Expression dieses Phosphoproteins in seiner konstitutiv aktiven Form (Hall et al., 1999) nachgewiesen werden konnte und δ-Opioidrezeptoren über G_q-Proteine verschiedene Effektoren regulieren können (Joshi et al., 1999), hatte die Hemmung dieser G-Protein-Untereinheit durch EBP50 keinen erkennbaren Einfluß auf die Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs. Somit scheint die $G\alpha_q$-Untereinheit nicht an der Regulation dieser Effektoren durch δ-Opioidrezeptoren beteiligt zu sein. Dieses Ergebnis war allerdings überraschend, da bereits in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß eine Hemmung einer G_q-vermittelten Signalkaskade zu einer Blockade der ERK-Aktivierung durch Morphin in HEK-DOR Zellen beiträgt (Eisinger und Schulz, 2004). Da EBP50 aber ausschließlich die $G\alpha_q$-Untereinheit hemmt (Rochdi et al., 2002), könnten somit andere Gα-Untereinheiten der G_q-Familie in diesem Prozeß involviert sein. In der Tat konnten Blaukat et al. (2000) zeigen, daß die Stimulation der ERKs in HEK Zellen überwiegend durch PTX-insensitive $G\alpha_{11}$- (Fields und Casey, 1997) und nicht über $G\alpha_q$-Untereinheiten kontrolliert wird. Daher wurde die Bedeutung einer möglichen $G\alpha_{11}$-Aktivierung durch δ-Opioidrezeptoren (Wu et al., 1992; Jiang et al., 1996) für die Effektorregulation in HEK-DOR Zellen weiterhin untersucht.

Da die Aktivierung von Phospholipasen C durch δ□□□□□d□□□□□□□□□□ (Tsu et al., 1995) ausschließlich über $G\alpha_{11}$-Untereinheiten bewerkstelligt wird (Wu et al., 1992; Jiang et al., 1996), wurde in Anwesenheit des Phospholipase-Inhibitors Neomycin die Rolle dieser G-Protein-Untereinheit für die Hemmung der Adenylatzyklasen und Stimulation der ERKs untersucht. Während Neomycin dabei keinen Einfluß auf die Regulation der Adenylatzyklase-

Aktivität durch die verschiedenen Alkaloide hatte, war unter diesen Bedingungen nur noch eine partielle Hemmung der Zyklasen durch die Peptidopioide zu induzieren. Da Opioide auch über die Stimulation von PLC die Aktivität von Zyklasen regulieren können (Chan et al., 1998; Yung et al., 1999), läßt dieses Ergebnis somit vermuten, dass DADLE und DPDPE auch über eine Aktivierung von $G\alpha_{11}$-Untereinheiten zu einer Hemmung von Adenylatzyklasen beitragen. Im Gegensatz dazu bestätigt dieses Ergebniss eine bereits vermutete, alleinige $G\alpha_i$-vermittelte Hemmung der Adenylatzyklasen durch die Alkaloide Etorphin und Morphin. Die partielle Blockade der opioidvermittelten ERK Aktivierung durch Neomycin läßt vermuten, daß, wie bereits für andere G_i- und G_q-gekoppelte Rezeptoren in HEK293 Zellen (Della Rocca et al., 1997) postuliert wurde, eine G_{11}/Phospholipase C-vermittelte Aktivierung der ERKs auch für den δ-Opioidrezeptor einen Signalweg in HEK-DOR Zellen darstellen könnte.

Neben den Phospholipasen C, stellt die Aktivierung der Phospholipase D durch PTX-insensitive $G\alpha_{12}$-Proteine (Plonk et al., 1998) ebenfalls einen Signalweg zur Aktivierung von ERKs dar (Denys et al., 2004). Da die Stimulation von Opioidrezeptoren auch eine Aktivierung von PLD bewirken kann (Mangoura und Dawson, 1993), kann über eine Hemmung dieser in HEK293 Zellen exprimierten Phospholipasen (Everett und Senogles, 2004) eine Beteiligung von $G\alpha_{12}$-Untereinheiten bei der Effektorregulation untersucht werden. Da die Hemmung einer G_{12}/PLD-vermittelen Signalkaskade durch 1-Butanol (Ballou et al., 2003; Le et al., 2003) keinen Einfluß auf die δ–rezeptorvermittelte Hemmung der Adenylatzyklasen aufwies, scheint diese G-Protein-Untereinheit nicht an einer Regulation der Zyklasen durch Opioide beteiligt zu sein. Da allerdings unter diesen Bedingungen die Stimulation der ERKs durch die verschiedenen Opioide wiederum zur Hälfte gehemmt wird, scheint eine Aktivierung von G_{12}-Proteinen durch δ-Opioidrezeptoren ebenso zu einer ERK-Aktivierung in HEK-DOR Zellen beizutragen. Da eine simultane Hemmung der Phospholipase C und D zu einer totalen Hemmung der ERK-Phosphorylierung durch Opioide führt, könnte dieses Ergebnis, ähnlich wie für μ-Opioidrezeptoren (Belcheva et al., 2000), eine kombinierte G_{11}-und G_{12}-vermittelte Regulation der ERKs durch den δ-Opioidrezeptor vermuten lassen.

Neben den Gα-Untereinheiten können auch βγ-Dimere der aktivierten G-Proteine zu einer Effektorregulation beitragen (Ford et al., 1998). In HEK293 Zellen können Gβγ-

Untereinheiten über Kalziumkanäle (Shekter et al., 1997) eine Hemmung verschiedener Adenylatzyklasen hervorrufen (Cooper et al., 1995). In naiven Zellen findet eine spontane, rezeptorunabhängige Aktivierung von G-Proteinen (Eisinger et al., 2002) statt, die durch verschiedene Mechanismen die Basalaktivität der Adenylatzyklasen permanent hemmen (Chen-Goodspeed et al., 2005). Die Anwesenheit des Gβγ-bindenden Proteins Phosduzin (Lee et al., 1987) könnte somit eine Elimination dieser basalen, eventuell Gβγ-vermittelten Hemmung der Adenylatzyklasen zur Folge haben und, wie schon in NG108-15 Zellen zu beobachten war (Wehmeyer und Schulz, 1998), eine gesteigerte Aktivität der Zyklasen durch Forskolin in HEK-DOR Zellen zur Folge haben. Da aber die Regulation der Adenylatzyklase-Aktivität durch aktivierte Opioidrezeptoren den Gα-Untereinheiten zugeschrieben wird (McKenzie und Milligan, 1990; Beck et al., 1997), war die opioidvermittelte Zyklasehemmung in Anwesenheit von Phosduzin nicht beeinträchtigt. Gerade für G_i-gekoppelte Rezeptoren wird die Stimulation der ERKs der jeweiligen Gβγ–Untereinheit zugeordnet (Koch et al., 1994; Crespo et al., 1994). Obwohl Phosduzin keine Spezifität für bestimmte Gβγ-Kombinationen aufweißt und somit jegliche βγ-vermittelte Signalgebung hemmt (Müller et al., 1996), war in Anwesenheit dieses Proteins die Stimulation der ERKs durch die verschiedenen Opioide nicht beeinträchtigt. Da eine $G_{q/11}$-vermittelte Aktivierung der ERKs unempfindlich auf verschiedene Gβγ–bindende Proteine reagiert (van Biesen et al., 1996), könnte somit nicht nur ein Gβγ-unabhängiger Signalweg für die Aktivierung der ERKs durch den δ-Opioidrezeptor (Hedin et al., 1999) in HEK-DOR Zellen vermutet werden.

Da in verschiedenen Zellmodellen zwischen Adenylatzyklasen und ERKs ein „Cross-Talk“ zu beobachten ist (Stork und Schmitt, 2002), war weiterhin von Interesse, ob die Signalkaskaden, die zur Regulation der jeweiligen Effektoren führen, sich in HEK-DOR Zellen gegenseitig beeinflussen. Zunächst wurde daher der Einfluß der ERK-Aktivierung auf die opioidvermittele Adenylatzyklase-Aktivität untersucht. G_i- (Daub et al., 1997) als auch G_q-gekoppelte Rezeptoren (Seta und Sadoshima, 2003) können eine Stimulation der ERKs über die Aktivierung von EGF-Rezeptoren vermitteln. Da in HEK-DOR Zellen durch Tyrphostin AG 1478, einem spezifischen EGF-Rezeptor Inhibitor (Fry et al., 1994), nicht nur die Aktivierung der ERKs durch EGF, sondern auch durch die verschiedenen Opioide hemmt, könnte auch dieser Signalweg für δ-Opioidrezeptoren in HEK-DOR Zellen zutreffen. Während eine Hemmung der ERK-Aktivierung durch Tyrphostin AG 1478 keinen Effekt auf

die Inhibition der Adenylatzyklasen durch die verschiedenen Opioide hatte, konnte allerdings nach einer Vorbehandlung der Zellen mit 35 µM Tyrphostin AG 1478 ähnlich wie nach einer PTX-Behandlung, eine verminderte Zyklaseaktivität nach einer direkten Stimulation der Enzyme durch Forskolin beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, kann die Sensitivität von Adenylatzyklasen gegenüber Forskolin durch eine c-Raf-1-vermittelte Phosphorylierung erhöht werden (Ding et al., 2004). Da in proliferierenden HEK293 Zellen die Anwesenheit eines EGF-Rezeptor Inhibitors (Gazit et al., 1991) allerdings eine verminderte Phosphorylierung von Adenylatzyklasen durch c-Raf-1 (Tan et al., 2001) bewirkt, könnte die verminderte Sensitivität der Zyklasen gegenüber Forskolin nach einer Tyrphostin AG 1478-Behandlung ebenso auf einem solchen Mechanismus beruhen. Im Gegensatz dazu bewirkt die Hemmung der ERK-Aktivierung durch Opioide in Anwesenheit des selektiven MAP-Kinase Kinase Inhibitors PD 098059 (Dudley et al., 1995) keine veränderte Sensitivität der Adenylatzyklasen gegenüber Forskolin. Auch die Hemmkapazität der einzelnen Opioide war unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt. Da Tyrphostin AG 1478 die Raf-MEK-ERK-Signalkaskade unmittelbar vor der Aktivierung von c-Raf-1 hemmt, PD 098059 allerdings durch die Hemmung von MEK die Aktivierung der vorgeschaltenen Raf-1 Kinase nicht beeinträchtigt, scheint die Signalkaskade zur ERK-Aktivierung über c-Raf-1, und nicht über MEK oder die ERKs, Einfluß auf die Aktivität der Adenylatzyklasen nehmen zu können (Houslay und Baillie, 2003).

Ebenso wurde die Bedeutung der δ-Opioidrezeptor-vermittelten Hemmung der Adenylatzyklasen für die Stimulation der ERKs durch die verschiedenen Opioide untersucht. Dazu wurde die Regulation der ERKs durch den δ-Rezeptor während einer permanenten Stimulation der Zyklasen sowohl durch Forskolin wie auch durch die Aktivierung $G\alpha_s$-gekoppelter Rezeptoren in HEK-DOR Zellen untersucht. Eine permanente Aktivierung von Adenylatzyklasen kann allerdings zu umfangreichen zellulären Veränderungen führen (Howlett et al., 2000). So bewirkt eine anhaltende Zyklaseaktivität durch Forskolin eine Stimulation der cAMP-regulierten Proteinkinase A (PKA; Taylor et al., 1992). Diese Kinase wiederum stimuliert verschiedene Phosphodiesterasen (Sette et al., 1994), die zu einem beschleunigtem Abbau von gebildetem cAMP in den Zellen führt (Beavo et al., 1994). Somit konnte trotz anhaltender Aktivierung der Zyklasen durch Forskolin keine erhöhte Akkumulation von cAMP in HEK-DOR Zellen beobachtet werden. Allerdings konnte eine

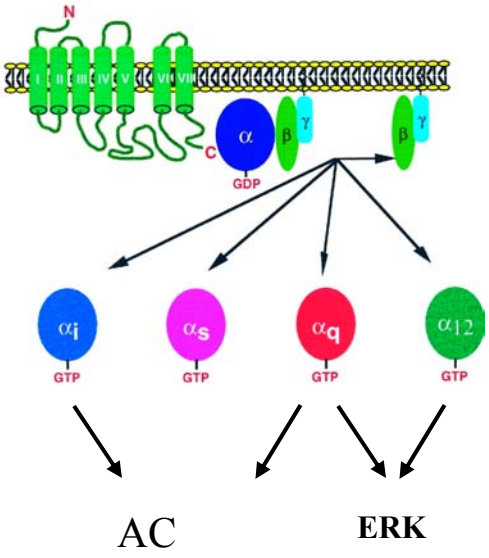
verminderte Adenylatzyklase-Aktivität nach einer wiederholten Forskolinstimulation unter diesen Bedingungen beobachtet werden. Auch dieser Befund läßt sich einer gesteigerten PKA-Aktivität zuordnen. In anderen Studien konnte gezeigt werden, daß PKA verschiedene Adenylatzyklasen phosphoryliert und dadurch zu einer verminderten Adenylatzyklase-Aktivität gegenüber eines direkten Aktivators beiträgt (Premont et al., 1992; Chen et al., 1997). Eine erhöhte Forskolin-vermittelte Adenylatzyklase-Aktivität nach einer H-89 vermittelten Hemmung der PKA unterstützt diese Annahme für HEK-DOR Zellen. Die Hemmung der Adenylatzyklasen durch stimulierte δ-Opioidrezeptoren war allerdings unter diesen Bedingungen nicht beeinträchtigt, so daß PKA anscheinend die Basalaktivität der Zyklasen, nicht aber ihre Regulation durch δ-Rezeptoren beeinflußt. Im Gegensatz dazu konnte nach einer anhaltenden Zyklaseaktivierung durch Forskolin nicht nur eine Hemmung der ERK-Stimulation durch δ-Opioidrezeptoren (Davis et al., 2003), sondern auch durch EGF-Rezeptoren (Erhardt et al., 1995) bestätigt werden. Ebenso war die Phosphorylierung der ERKs durch DPDPE, Etorphin oder EGF nach einer Aktivierung der Adenylatzyklasen durch $G\alpha_s$-gekoppelte Prostaglandinrezeptoren gehemmt. Somit scheint die Stimulation von Adenylatzyklasen über die Hemmung der EGF-Rezeptor-nachgeschaltete Raf-MEK-ERK-Signalkaskade die Phosphorylierung der ERKs zu hemmen. Da allerdings eine Stimulation der ERKs durch Opioide in Anwesenheit des PKA-Blockers H-89 wiederhergestellt werden konnte, scheint die Hemmung der ERKs durch Forskolin und aktivierte PGE-Rezeptoren durch eine Stimulation von PKA bedingt zu sein. Studien haben gezeigt, daß die c-Raf-1 Kinase, die durch δ-Opioidrezeptoren (Varga et al., 2002) und EGF-Rezeptoren (Treisman et al., 1995) im Laufe der ERK-Aktivierung stimuliert wird, ein Substrat der PKA darstellt (Cook und McCormick, 1993). Allerdings führt eine Phosphorylierung von c-Raf-1 durch cAMP-aktivierte PKA zu einer Hemmung der Raf-Kinaseaktivität (Stork und Schmitt, 2002), und somit auch zu einer Hemmung der fortlaufenden Raf-MEK-ERK-Signalkaskade zur Stimulation der ERKs (McKenzie et al., 1996). Somit könnte die Forskolin- und PGE1-vermittelte Hemmung der ERK-Aktivierung durch Opioide und EGFs auf einer PKA-vermittelten Inhibition der c-Raf-1 Kinase in HEK-DOR Zellen beruhen. Da δ-Opioidrezeptoren durch eine Hemmung von Adenylatzyklasen auch nicht PKA aktivieren (Lou und Pei, 1997), könnte vermutet werden, daß die Stimulation der ERKs durch δ-Opioidrezeptoren durch eine gleichzeitige Hemmung der Zyklasen in HEK-DOR Zellen unterstützt wird.

Im Gegensatz zu den in HEK293 endogenen Adenylatzyklasen Typen V, VI und VII, kann die Typ II Zyklase durch δ-Opioidrezeptoren stimuliert werden (Tsu et al., 1995). Um weiterhin den Einfluß von cAMP auf die Aktivierung der ERKs durch Opioide zu untersuchen, sollte in HEK-DOR Zellen nach einer Transfektion mit der Typ II Zyklase die Regulation der ERKs unter diesen Bedingungen untersucht werden. Allerdings konnte durch eine alleinige Aktivierung des δ-Opioidrezeptors in Typ II-transfizierten HEK Zellen keine Stimulation dieser Zyklase-Isoform nachgewiesen werden. Auch die zusätzliche Anwesenheit von aktivierten $G\alpha_s$-Untereinheiten, die eine Stimulation dieser Zyklase durch G_i-gekoppelte Rezeptoren unterstützen soll (Tang und Gilman, 1992), konnte keine Aktivierung der Typ II Zyklase durch die verschiedenen Opioide in HEK-DOR Zellen bewirken. Dies könnte darin begründet sein, daß die Gβγ-Untereinheiten, die zur Aktivierung dieser Zyklase durch δ-Rezeptoren erforderlich sind (Beck et al., 1997), nicht in ausreichenden Mengen nach einer DOR-Aktivierung in HEK Zellen zur Verfügung stehen. Andererseits könnte aber auch die Typ II Zyklase nicht in genügenden Mengen exprimiert worden sein, so daß eine Stimulation dieser Zyklasen durch die Regulation der endogenen Adenylatzyklasen vielleicht überdeckt wird.

Diese Beobachtungen könnten zusammen vermuten lassen, daß unterschiedliche G-Proteine zu einer gegensätzlichen Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch δ-Opioidrezeptoren in HEK293 Zellen beitragen. Dabei scheinen Peptidliganden wie DADLE und DPDPE über die Aktivierung von $G\alpha_i$- und $G\alpha_{11}$-Untereinheiten eine Inhibition der Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen hervorzurufen. Die Stimulation der ERKs durch diese Liganden scheint dabei über $G\alpha_{11}$- und $G\alpha_{12}$- aktivierte Phospholipasen vermittelt zu werden. Im Gegensatz dazu scheinen die Alkaloide Etorphin und Morphin eine Hemmung der Zyklasen über die Aktivierung von $G\alpha_i$-Untereinheiten zu bewirken, wohingegen die ERKs wiederum möglicherweise durch $G\alpha_{11}$- und $G\alpha_{12}$-aktivierte Phospholipasen reguliert werden (Abb. 48). Da Opioide überwiegend $G\alpha_i$-Untereinheiten über die Besetzung des δ-Rezeptors aktivieren (Law und Reisine, 1997), und mit geringerer Effizienz die Gruppe der $G_{q/12}$ Proteine, könnte dies die unterschiedlichen EC50-Werte der Opioide erklären, die für die Regulation der einzelnen Effektoren in HEK-DOR Zellen ermittelt werden konnte. Diese Studie könnte somit den ersten Hinweis auf eine Beteiligung unterschiedlicher G-Proteine zur Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs durch δ-Opioidrezeptoren geben, und somit als Arbeitshypothese für weitere Untersuchungen dienen.

DADLE, DPDPE

δ-Opioidrezeptor



Etorphin, Morphin

δ-Opioidrezeptor

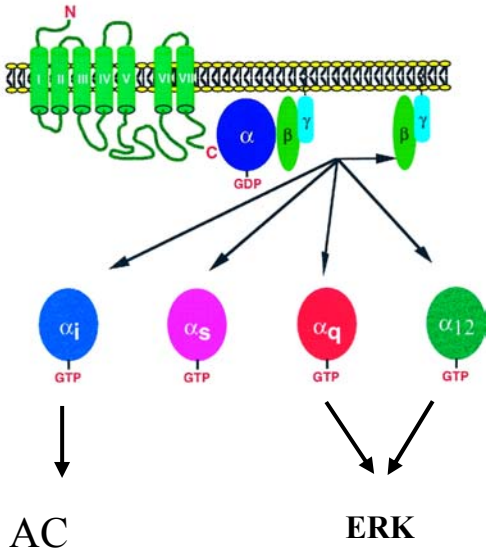


Abb. 48. Vermutete Regulation der Adenylatzyklase und der ERKs in HEK-DOR Zellen.

6. Zusammenfassung

Die Stimulation von G-Protein-gekoppelten Opioidrezeptoren bewirkt auf zellulärer Ebene sowohl eine Hemmung von Adenylatzyklasen als auch eine Stimulation der extrazellulär-signalregulierten Proteinkinasen ERK1/2. Da nicht nur sehr unterschiedliche G-Proteine, sondern auch die jeweils verschiedenen Untereinheiten (Gα, Gβγ) eines G-Proteins an der Regulation von zellulären Effektoren beteiligt sein können, sollte für den δ-Opioidrezeptor daher untersucht werden, ob die Aktivierung verschiedener G-Proteine zu diesen gegensätzlichen Effekten führen.

In transfizierten, humanen embryonalen Nieren (HEK293) Zellen bewirkt die Aktivierung von δ-Opioidrezeptoren durch peptiderge Opioide (DADLE, DPDPE) und Alkaloide (Etorphin, Morphin) jeweils eine konzentrationsabhängige Hemmung der Adenylatzyklasen und Stimulation der ERKs. Während für die hochaffinen Opioide DADLE, DPDPE und Etorphin bereits bei nanomolaren Konzentrationen eine Regulation der jeweiligen Effektoren zu bestimmen war, mußte das für den δ-Opioidrezeptor niederaffine Morphin mit einer 1000-fach höheren Konzentration eingesetzt werden. Für alle getesteten Opioide konnte allerdings einheitlich für die Stimulation der ERKs eine höhere EC_{50} ermittelt werden als für die Hemmung der Adenylatzyklasen, womit das System der Adenylatzyklasen in HEK-DOR Zellen empfindlicher auf eine Aktivierung von δ-Opioidrezeptoren reagiert als die ERKs.

Wie bereits durch andere Gruppen gezeigt, resultiert eine Behandlung von HEK-DOR Zellen mit Pertussis Toxin (PTX) in einer partiellen Blockade der Adenylatzyklase-Regulation durch DADLE und DPDPE. Im Gegensatz dazu war die Hemmung der Zyklasen durch Etorphin und Morphin unter diesen Bedingungen vollständig aufgehoben. Die Stimulation der ERKs war in Anwesenheit von PTX durch alle Opioide gehemmt. Allerdings hemmte PTX auch die Aktivierung der ERKs durch G_q-gekoppelte Rezeptoren und durch G-Protein-unabhängige Rezeptor-Tyrosinkinasen. PTX scheint daher G-Protein-unabhängige Effekte auf die ERK-Stimulation zu haben. Während die Blockade der $G\alpha_q$-Untereinheiten durch das $G\alpha_q$-bindende Protein EBP50 keinen Einfluß auf die Effektorregulation ausübte, konnte nach einer Inhibition der $G\alpha_{11}$- und $G\alpha_{12}$-vermittelten Signalwege durch Neomycin und 1-Butanol jeweils eine partielle Hemmung der ERKs für alle Opioide beobachtet werden. Eine gleichzeitige Behandlung von HEK-DOR Zellen mit 1-Butanol und Neomycin führte

darüberhinaus zu einer totalen Blockade der ERK-Stimulation durch die jeweiligen Opioide. Im Gegensatz dazu war nach einer Inhibition der $G\alpha_{11}$-Untereinheit die Hemmung der Adenylatzyklasen nur durch die peptidergen Opioide vermindert. Etorphin und Morphin vermittelten unter diesen Bedingungen nach wie vor eine Hemmung der Zyklasen. Da die Hemmung der Gβγ-Untereinheiten durch Phosduzin keine Wirkung auf die opioid-vermittelte Regulation der Adenylatzyklasen und der ERKs zeigte, scheinen δ-Opioidrezeptoren diese Effektoren über Gα-Untereinheiten zu regulieren.

Obwohl diese Effektoren gegensätzlich in ihrer Aktivität kontrolliert werden, scheint die Hemmung der Adenylatzyklasen den Vorgang der ERK-Aktivierung durch Opioide zu unterstützen, da eine gleichzeitige Stimulation der Zyklasen durch Forskolin die Phosphorylierung der ERKs durch DPDPE und Etorphin hemmt. Im Gegensatz dazu hatte die Aktivierung der ERKs allerdings keinen Einfluß auf die Regulation der Adenylatzyklasen durch δ-Opioidrezeptoren.

Die Ergebnisse dieser Studie lassen somit vermuten, daß unterschiedliche Gα-Untereinheiten an der Regulation der ERKs und Adenylatzyklase durch δ-Opioidrezeptoren beteiligt sind. Während die Stimulation des δ-Opioidrezeptors durch peptiderge Opioide zu einer Hemmung der Zyklasen über $G\alpha_i$- und $G\alpha_{11}$-Untereinheiten führt, wird dieser Effektor durch Alkaloide scheinbar durch die $G\alpha_i$-Untereinheit reguliert. Unabhängig von der Ligandenstruktur scheint dabei die Stimulation der ERKs durch aktivierte $G\alpha_{11}$- und $G\alpha_{12}$-Untereinheiten zu erfolgen.

7. Summary

Regulation of adenylate cyclases and extracellular signal-regulated protein kinases by δ-opioid receptors in HEK293 cells

Stimulation of G protein coupled opioid receptors result in both inhibition of adenylate cyclases and stimulation of extracellular signal-regulated protein kinases ERK1/2. As regulation of cellular effectors may be accomplished by various G proteins as well as by the different G protein subunits (Gα, Gβγ), δ-opioid receptors were thus examined for activating different G proteins underlying different regulation of these cellular effectors.

In transfected HEK293 cells, activation of δ-opioid receptors by peptidergic opioids (DADLE, DPDPE) and alkaloids (etorphine, morphine) brought about concentration-dependent inhibition of adenylate cyclases and stimulation of the ERKs, respectively. Since the high-affinity opioids DADLE, DPDPE and etorphine accomplished regulation of respective effector molecules already at nanomolar ligand concentrations, a 1000-fold higher dose of low-affinity agonist morphine was required for both inhibition of adenylate cyclases and ERK activation. However, for all tested opioids, a higher EC50 could have been determined for inhibition of adenylate cyclases than for stimulation of the ERKs. Thus, adenylate cyclases expressed in HEK cells seems to be more sensitive to δ-opioid receptor activation than the ERKs.

As previously shown, exposure of HEK-DOR cells to pertussis toxin (PTX) resulted in incomplete inhibition of adenylate cyclases by DADLE and DPDPE, whereas etorphine and morphine totally lost their ability to inhibit the cyclases under these conditions. In contrast, activation of ERKs by all tested opioids was abolished by PTX treatment. However, PTX also blocked ERK activation by G_q-coupled receptors and receptor tyrosine kinases, both regulating ERKs independent from PTX-sensitive G_i proteins. Thus, PTX is suggested to inhibit ERK activation also independent from affecting G protein activation. Since inhibition of $G\alpha_q$ subunits by the $G\alpha_q$-binding protein EBP50 did not affect effector regulation, inhibition of $G\alpha_q$ and $G\alpha_{12}$ mediated signaling by neomycin and 1-butanol brought about partial blockade of ERK activation by all tested opioids. Exposure of HEK-DOR cells with neomycin and 1-butanol together even totally blocked ERK activation by respective opioids.

In contrast, inhibition of $G\alpha_{11}$ signaling partially blocked inhibition of adenylate cyclases by DADLE and DPDPE, whereas regulation of the cyclases by the alkaloids was not affected under this condition. Since inhibition of $G\beta\gamma$ signaling by phosducin did not affect regulation of adenylate cyclases and ERKs by opioids, δ-opoioid receptors are supposed to regulate these cellular effectors by $G\alpha$ subunits.

Although the tested cellular effectors are regulated differently, inhibition of adenylate cyclases seems to support activation of ERKs, since simultaneous stimulation of the cyclases by forskolin impairs ERK activation by DPDPE and etorphin. In contrast, activation of ERKs did not affect regulation of the cyclases by δ-opioid receptors.

Together the findings let suppose that different $G\alpha$ subunits might be involved in regulation of adenylate cyclases and ERKs by δ-opioid receptors. Since stimulation of δ-receptors might be supposed to bring about inhibition of adenylate cyclases by $G\alpha_i$ and $G\alpha_{11}$ subunits, alkaloids seems to regulate cyclases by $G\alpha_i$ subunits. In contrast, both peptide and alkaloid opioids seem to stimulate ERKs by $G\alpha_{11}$- and $G\alpha_{12}$-mediated signaling.

8. Literaturverzeichnis

Ammer H, Schulz R. (1997)
Chronic morphine treatment increases stimulatory beta-2 adrenoceptor signaling in A431 cells stably expressing the mu opioid receptor.
J Pharmacol Exp Ther. 280(1):512-520.

Aroor AR, Shukla SD. (2004)
MAP kinase signaling in diverse effects of ethanol.
Life Sci. 74(19):2339-2364.

Avidor-Reiss T, Nevo I, Levy R, Pfeuffer T, Vogel Z. (1996)
Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma.
J Biol Chem. 271(35):21309-21315.

Ballou LM, Jiang YP, Du G, Frohman MA, Lin RZ. (2003)
Ca(2+)- and phospholipase D-dependent and -independent pathways activate mTOR signaling.
FEBS Lett. 550(1-3):51-56.

Bartsch O, Bartlick B, Ivell R. (2001)
Relaxin signalling links tyrosine phosphorylation to phosphodiesterase and adenylyl cyclase activity.
Mol Hum Reprod. 7(9):799-809.

Beavo JA, Conti M, Heaslip RJ. (1994)
Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases.
Mol Pharmacol. 46(3):399-405.

Beck HI, Chan JS, Wong YH. (1997)

Receptor-induced beta gamma release from fatty acylation-deficient mutants of G alpha z.
Neuroreport. 8(4):937-940.

Belcheva MM, Wong YH, Coscia CJ. (2000)
Evidence for transduction of mu but not kappa opioid modulation of extracellular signal-regulated kinase activity by G(z) and G(12) proteins.
Cell Signal. 12(7):481-489.

Belcheva MM, Coscia CJ. (2002)
Diversity of G protein-coupled receptor signaling pathways to ERK/MAP kinase.
Neurosignals. 11(1):34-44.

Berhow MT, Hiroi N, Nestler EJ. (1996)
Regulation of ERK (extracellular signal regulated kinase), part of the neurotrophin signal transduction cascade, in the rat mesolimbic dopamine system by chronic exposure to morphine or cocaine.
J Neurosci. 16(15):4707-4715.

Birnboim HC, Doly J. (1979)
A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.
Nucleic Acids Res. 7(6):1513-1523.

Blaukat A, Barac A, Cross MJ, Offermanns S, Dikic I. (2000)
G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals.
Mol Cell Biol. 20(18):6837-6848.

Blenis J. (1993)
Signal transduction via the MAP kinases: proceed at your own RSK.
Proc Natl Acad Sci U S A. 90(13):5889-5892.

Bot G, Blake AD, Li S, Reisine T. (1997)
Opioid regulation of the mouse delta-opioid receptor expressed in human embryonic kidney 293 cells.
Mol Pharmacol. 52(2):272-281.

Burt AR, Carr IC, Mullaney I, Anderson NG, Milligan G. (1996)
Agonist activation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases following expression of the mouse delta opioid receptor in Rat-1 fibroblasts: effects of receptor expression levels and comparisons with G-protein activation.
Biochem J. 320 (Pt 1):227-235.

Buzas B, Izenwasser S, Portoghese PS, Cox BM. (1994)
Evidence for delta opioid receptor subtypes regulating adenylyl cyclase activity in rat brain.
Life Sci. 54(7):PL101-106.

Campos-Gonzalez R, Glenney JR Jr. (1991)

Temperature-dependent tyrosine phosphorylation of microtubule-associated protein kinase in epidermal growth factor-stimulated human fibroblasts.
Cell Regul. 2(8):663-673.

Carpenter E, Gent JP, Peers C. (1996)

Opioid receptor independent inhibition of Ca2+ and K+ currents in NG108-15 cells by the kappa opioid receptor agonist U50488H.
Neuroreport. 7(11):1809-1812.

Chabre O, Conklin BR, Brandon S, Bourne HR, Limbird LE. (1994)
Coupling of the alpha 2A-adrenergic receptor to multiple G-proteins. A simple approach for estimating receptor-G-protein coupling efficiency in a transient expression system.
J Biol Chem. 269(8):5730-5734.

Chaturvedi K, Christoffers KH, Singh K, Howells RD. (2000)
Structure and regulation of opioid receptors.
Biopolymers. 55(4):334-346.

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

Adenylyl cyclase 6 is selectively regulated by protein kinase A phosphorylation in a region involved in Galphas stimulation.
Proc Natl Acad Sci U S A. 94(25):14100-14104.

Chen-Goodspeed M, Lukan AN, Dessauer CW. (2005)

Modeling of Galpha(s) and Galpha(i) regulation of human type V and VI adenylyl cyclase.
J Biol Chem. 280(3):1808-1816.

Chijiwa T, Mishima A, Hagiwara M, Sano M, Hayashi K, Inoue T, Naito K, Toshioka T, Hidaka H. (1990)
Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells.
J Biol Chem. 265(9):5267-5272.

Cobb MH, Goldsmith EJ. (1995)

How MAP kinases are regulated.
J Biol Chem. 270(25):14843-14846.

Coleman DE, Berghuis AM, Lee E, Linder ME, Gilman AG, Sprang SR. (1994)

Structures of active conformations of Gi alpha 1 and the mechanism of GTP hydrolysis.
Science. 265(5177):1405-1412.

Cook SJ, McCormick F. (1993)

Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf.
Science. 262(5136):1069-1072.

Cooper DM, Mons N, Karpen JW. (1995)

Adenylyl cyclases and the interaction between calcium and cAMP signalling.
Nature. 374(6521):421-424.

Crespo P, Xu N, Daniotti JL, Troppmair J, Rapp UR, Gutkind JS. (1994)

Signaling through transforming G protein-coupled receptors in NIH 3T3 cells involves c-Raf activation. Evidence for a protein kinase C-independent pathway.
J Biol Chem. 269(33):21103-21109.

Daub H, Wallasch C, Lankenau A, Herrlich A, Ullrich A. (1997)

Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor.
EMBO J. 16(23):7032-7044.

Davis MI, Ronesi J, Lovinger DM. (2003)

A predominant role for inhibition of the adenylate cyclase/protein kinase A pathway in ERK activation by cannabinoid receptor 1 in N1E-115 neuroblastoma cells.
J Biol Chem. 278(49):48973-48980.

Della Rocca GJ, van Biesen T, Daaka Y, Luttrell DK, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. (1997)

Ras-dependent mitogen-activated protein kinase activation by G protein-coupled receptors. Convergence of Gi- and Gq-mediated pathways on calcium/calmodulin, Pyk2, and Src kinase.
J Biol Chem. 272(31):19125-19132.

Denys A, Aires V, Hichami A, Khan NA. (2004)

Thapsigargin-stimulated MAP kinase phosphorylation via CRAC channels and PLD activation: inhibitory action of docosahexaenoic acid.
FEBS Lett. 564(1-2):177-182.

Dhanasekaran N, Prasad MV, Wadsworth SJ, Dermott JM, van Rossum G. (1994)

Protein kinase C-dependent and -independent activation of Na+/H+ exchanger by G alpha 12 class of G proteins.
J Biol Chem. 269(16):11802-11806.

Ding Q, Gros R, Gray ID, Taussig R, Ferguson SS, Feldman RD. (2004)

Raf kinase activation of adenylyl cyclases: isoform-selective regulation.
Mol Pharmacol. 66(4):921-928.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. (1995)

A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade.
Proc Natl Acad Sci U S A. 92(17):7686-7689.

Eckstein F, Romaniuk PJ, Heideman W, Storm DR. (1981)

Stereochemistry of the mammalian adenylate cyclase reaction.
J Biol Chem. 256(17):9118-9120.

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

Chronic morphine treatment inhibits opioid receptor desensitization and internalization.
J Neurosci. 22(23):10192-10200.

Eisinger DA, Schulz R.(2004)
Extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinases block internalization of delta-opioid receptors.
J Pharmacol Exp Ther. 309(2):776-785.

Erhardt P, Troppmair J, Rapp UR, Cooper GM. (1995)

Differential regulation of Raf-1 and B-Raf and Ras-dependent activation of mitogen-activated protein kinase by cyclic AMP in PC12 cells.
Mol Cell Biol. 15(10):5524-5530.

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

Cloning of a delta opioid receptor by functional expression.
Science. 258(5090):1952-1955.

Everett PB, Senogles SE. (2004)

D3 dopamine receptor activates phospholipase D through a pertussis toxin-insensitive pathway.
Neurosci Lett. 371(1):34-39.

Federman AD, Conklin BR, Schrader KA, Reed RR, Bourne HR. (1992)

Hormonal stimulation of adenylyl cyclase through Gi-protein beta gamma subunits.
Nature. 356(6365):159-161.

Feinstein PG, Schrader KA, Bakalyar HA, Tang WJ, Krupinski J, Gilman AG, Reed RR. (1991)
Molecular cloning and characterization of a Ca2+/calmodulin-insensitive adenylyl cyclase from rat brain.
Proc Natl Acad Sci U S A. 88(22):10173-10177.

Fields TA, Casey PJ. (1997)

Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins.
Biochem J. 321 (Pt 3):561-571.

Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang CS, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE. (1998)

Molecular basis for interactions of G protein betagamma subunits with effectors.
Science. 280(5367):1271-1274.

Friedman J, Babu B, Clark RB. (2002)

Beta(2)-adrenergic receptor lacking the cyclic AMP-dependent protein kinase consensus sites fully activates extracellular signal-regulated kinase 1/2 in human embryonic kidney 293 cells: lack of evidence for G(s)/G(i) switching.
Mol Pharmacol. 62(5):1094-10102.

Fry DW, Kraker AJ, McMichael A, Ambroso LA, Nelson JM, Leopold WR, Connors RW, Bridges AJ. (1994)

A specific inhibitor of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase.
Science. 265(5175):1093-1095.

Gaudet R, Bohm A, Sigler PB. (1996)

Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin betagamma and its regulator, phosducin.
Cell. 87(3):577-588.

Gazit A, Osherov N, Posner I, Yaish P, Poradosu E, Gilon C, Levitzki A. (1991)

Tyrphostins. 2. Heterocyclic and alpha-substituted benzylidenemalononitrile tyrphostins as potent inhibitors of EGF receptor and ErbB2/neu tyrosine kinases.
J Med Chem. 34(6):1896-1907.

Gilman AG. (1987)

G proteins: transducers of receptor-generated signals.
Annu Rev Biochem. 56:615-649.

Giros B, Pohl M, Rochelle JM, Seldin MF. (1995)
Chromosomal localization of opioid peptide and receptor genes in the mouse.
Life Sci. 56(18):PL369-375.

Gottesman MM, Fleischmann R, Abraham I. (1986)

Molecular genetic analysis of cAMP-dependent protein kinase.
Ann N Y Acad Sci. 478:162-174.

Gutkind JS. (1998)

The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades.
J Biol Chem. 273(4):1839-1842.

Hagemann C, Rapp UR. (1999)

Isotype-specific functions of Raf kinases.
Exp Cell Res. 253(1):34-46.

Hall RA, Spurney RF, Premont RT, Rahman N, Blitzer JT, Pitcher JA, Lefkowitz RJ. (1999)

G protein-coupled receptor kinase 6A phosphorylates the Na(+)/H(+) exchanger regulatory factor via a PDZ domain-mediated interaction.
J Biol Chem. 274(34):24328-24334.

Harrison C, Smart D, Lambert DG. (1998)

Stimulatory effects of opioids.
Br J Anaesth. 81(1):20-28.

Hedin KE, Duerson K, Clapham DE. (1993)

Specificity of receptor-G protein interactions: searching for the structure behind the signal.
Cell Signal. 5(5):505-518.

Hedin KE, Bell MP, Huntoon CJ, Karnitz LM, McKean DJ. (1999)

Gi proteins use a novel beta gamma- and Ras-independent pathway to activate extracellular signal-regulated kinase and mobilize AP-1 transcription factors in Jurkat T lymphocytes.
J Biol Chem. 274(28):19992-20001

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

Enzyme immunoassays for the estimation of adenosine 3',5' cyclic monophosphate and guanosine 3',5' cyclic monophosphate in biological fluids.
J Immunol Methods. 155(1):31-40.

Houslay MD, Baillie GS. (2003)

The role of ERK2 docking and phosphorylation of PDE4 cAMP phosphodiesterase isoforms in mediating cross-talk between the cAMP and ERK signalling pathways.
Biochem Soc Trans. 31(Pt 6):1186-190.

Howlett AC, Mukhopadhyay S. (2000)

Cellular signal transduction by anandamide and 2-arachidonoylglycerol.
Chem Phys Lipids. 108(1-2):53-70.

Hu GF. (1998)

Neomycin inhibits angiogenin-induced angiogenesis.
Proc Natl Acad Sci U S A. 95(17):9791-9795.
Huang C, Hujer KM, Wu Z, Miller RT. (2004)

The Ca2+-sensing receptor couples to Galpha12/13 to activate phospholipase D in Madin-Darby canine kidney cells.
Am J Physiol Cell Physiol. 286(1):C22-30.

Jaffe JH, Martin WR. (1990)
Opioid analgesics and antagonists. In:The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th edn., pp. 485-521, Gilman, A.G., Rall, T. W., Nies, A.S. and Taylor, P. (eds) Pergamon Press.

Jiang H, Kuang Y, Wu Y, Smrcka A, Simon MI, Wu D. (1996)

Pertussis toxin-sensitive activation of phospholipase C by the C5a and fMet-Leu-Phe receptors.
J Biol Chem. 271(23):13430-13434.

Joshi S, Lee JW, Wong YH. (1999)

Stimulation of phospholipase C by the cloned mu, delta and kappa opioid receptors via chimeric G alpha(q) mutants.
Eur J Neurosci. 11(2):383-388.

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

Direct evidence that Gi-coupled receptor stimulation of mitogen-activated protein kinase is mediated by G beta gamma activation of p21ras.
Proc Natl Acad Sci U S A. 91(26):12706-12710.

Kolch W, Heidecker G, Kochs G, Hummel R, Vahidi H, Mischak H, Finkenzeller G, Marme D, Rapp UR. (1993)

Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation.
Nature. 364(6434):249-252.

LaMorte VJ, Harootunian AT, Spiegel AM, Tsien RY, Feramisco JR. (1993)

Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2.
J Cell Biol. 121(1):91-99.

Law PY, Wu J, Koehler JE, Loh HH. (1981)

Demonstration and characterization of opiate inhibition of the striatal adenylate cyclase.
J Neurochem. 36(5):1834-1846.

Law PY, Hom DS, Loh HH. (1983)

Opiate receptor down-regulation and desensitization in neuroblastoma X glioma NG108-15 hybrid cells are two separate cellular adaptation processes.
Mol Pharmacol. 24(3):413-424.

Law PY, Wong YH, Loh HH. (2000)

Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 40:389-430.

Law PY, Loh HH. (1999)

Regulation of opioid receptor activities.
J Pharmacol Exp Ther. 289(2):607-624.

Law SF, Reisine T. (1997)

Changes in the association of G protein subunits with the cloned mouse delta opioid receptor on agonist stimulation.

J Pharmacol Exp Ther. 281(3):1476-1486.

Lee RH, Lieberman BS, Lolley RN. (1987)

A novel complex from bovine visual cells of a 33,000-dalton phosphoprotein with beta- and gamma-transducin: purification and subunit structure.
Biochemistry. 26(13):3983-3990.

Lee RH, Ting TD, Lieberman BS, Tobias DE, Lolley RN, Ho YK. (1992)
Regulation of retinal cGMP cascade by phosducin in bovine rod photoreceptor cells. Interaction of phosducin and transducin.
J Bill Chem. 267(35): 25104-25112.

Lee SC, Han JS, Seo JK, Cha YN. (2003)

Modulation of cyclooxygenase-2 expression by phosphatidylcholine specific phospholipase C and D in macrophages stimulated with lipopolysaccharide.
Mol Cells. 15(3):320-326.

Li LY, Chang KJ. (1996)

The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors.

Mol Pharmacol. 50(3):599-602.

Liebmann C. (2001)
Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity.
Cell Signal. 13(11):777-785.

Lipsky JJ, Lietman PS. (1982)

Aminoglycoside inhibition of a renal phosphatidylinositol phospholipase C.
J Pharmacol Exp Ther. 220(2):287-292.

Lopez-Ilasaca M. (1998)

Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades.
Biochem Pharmacol. 56(3):269-277.

Lou LG, Pei G. (1997)

Modulation of protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase by delta-opioid.
Biochem Biophys Res Commun. 236(3):626-629.

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

Protein measurement with the Folin phenol reagent.
J Biol Chem. 193(1):265-275.

Luttrell LM, van Biesen T, Hawes BE, Koch WJ, Touhara K, Lefkowitz RJ. (1995)

G beta gamma subunits mediate mitogen-activated protein kinase activation by the tyrosine kinase insulin-like growth factor 1 receptor.
J Biol Chem. 270(28):16495-16498.

Mangoura D, Dawson G. (1993)

Opioid peptides activate phospholipase D and protein kinase C-epsilon in chicken embryo neuron cultures.
Proc Natl Acad Sci U S A. 90(7):2915-2919.

McKenzie FR, Pouyssegur J. (1996)

cAMP-mediated growth inhibition in fibroblasts is not mediated via mitogen-activated protein (MAP) kinase (ERK) inhibition. cAMP-dependent protein kinase induces a temporal shift in growth factor-stimulated MAP kinases.
J Biol Chem. 271(23):13476-13483.

McKenzie FR, Milligan G. (1990)

Delta-opioid-receptor-mediated inhibition of adenylate cyclase is transduced specifically by the guanine-nucleotide-binding protein Gi2.
Biochem J. 267(2):391-398.

Melien O, Thoresen GH, Sandnes D, Ostby E, Christoffersen T. (1998)

Activation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase by angiotensin II, vasopressin, norepinephrine, and prostaglandin F2alpha in hepatocytes is sustained, and like the effect of epidermal growth factor, mediated through pertussis toxin-sensitive mechanisms.
J Cell Physiol. 175(3):348-358.

Muller S, Straub A, Schroder S, Bauer PH, Lohse MJ. (1996)

Interactions of phosducin with defined G protein beta gamma-subunits.
J Biol Chem. 271(20):11781-11786.

Mundell SJ, Benovic JL. (2000)

Selective regulation of endogenous G protein-coupled receptors by arrestins in HEK293 cells.
J Biol Chem. 275(17):12900-12908.

Murakawa K, Hirose N, Takada K, Suzuki T, Nagase H, Cools AR, Koshikawa N. (2004)

Deltorphin II enhances extracellular levels of dopamine in the nucleus accumbens via opioid receptor-independent mechanisms.
Eur J Pharmacol. 491(1):31-36.

Neer EJ. (1994)

G proteins: critical control points for transmembrane signals.
Protein Sci. 3(1):3-14.

Neptune ER, Iiri T, Bourne HR. (1999)

Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors.
J Biol Chem. 274(5):2824-2828.

Ortiz J, Harris HW, Guitart X, Terwilliger RZ, Haycock JW, Nestler EJ. (1995)

Extracellular signal-regulated protein kinases (ERKs) and ERK kinase (MEK) in brain: regional distribution and regulation by chronic morphine.
J Neurosci. 15(2):1285-1297.

Pawson T. (1994)
Signal transduction. Look at a tyrosine kinase.
Nature. 372(6508):726-727.

Piiper A, Gebhardt R, Kronenberger B, Giannini CD, Elez R, Zeuzem S. (2000)

Pertussis toxin inhibits cholecystokinin- and epidermal growth factor-induced mitogen-activated protein kinase activation by disinhibition of the cAMP signaling pathway and inhibition of c-Raf-1.
Mol Pharmacol. 58(3):608-613.

Plonk SG, Park SK, Exton JH. (1998)

The alpha-subunit of the heterotrimeric G protein G13 activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases.
J Biol Chem. 273(9):4823-4826.

Portoghese PS, Sultana M, Nagase H, Takemori AE. (1992)

A highly selective delta 1-opioid receptor antagonist: 7-benzylidenenaltrexone.
Eur J Pharmacol. 218(1):195-196.

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

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

Quock RM, Burkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeske WR, Yamamura HI. (1999)

The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and the determination of drug efficacy.
Pharmacol Rev. 51(3):503-532.

Reczek D, Berryman M, Bretscher A. (1997)

Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family.
J Cell Biol. 139(1):169-179.

Remy C, Remy S, Beck H, Swandulla D, Hans M. (2004)

Modulation of voltage-dependent sodium channels by the delta-agonist SNC80 in acutely isolated rat hippocampal neurons.
Neuropharmacology. 47(7):1102-1112.

Rochdi MD, Watier V, La Madeleine C, Nakata H, Kozasa T, Parent JL. (2002)

Regulation of GTP-binding protein alpha q (Galpha q) signaling by the ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein-50 (EBP50).
J Biol Chem. 277(43):40751-40759.

Rochdi MD, Parent JL. (2003)

Galphaq-coupled receptor internalization specifically induced by Galphaq signaling. Regulation by EBP50.
J Biol Chem. 278(20):17827-17837.

Roper RL, Ludlow JW, Phipps RP. (1994)

Prostaglandin E2 inhibits B lymphocyte activation by a cAMP-dependent mechanism: PGE-inducible regulatory proteins.
Cell Immunol. 154(1):296-308.

Sanchez-Blazquez P, Gomez-Serranillos P, Garzon J. (2001)

Agonists determine the pattern of G-protein activation in mu-opioid receptor-mediated supraspinal analgesia.
Brain Res Bull. 54(2):229-235.

Sanchez-Blazquez P, Garzon J. (1998)

delta Opioid receptor subtypes activate inositol-signaling pathways in the production of antinociception.
J Pharmacol Exp Ther. 285(2):820-827.

Sandmann J, Peralta EG, Wurtman RJ.(1991)

Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to phospholipase D.
J Biol Chem. 266(10):6031-6034.

Satoh M, Minami M. (1995)

Molecular pharmacology of the opioid receptors.
Pharmacol Ther. 68(3):343-364.

Schachter JB, Boyer JL, Li Q, Nicholas RA, Harden TK. (1997)
Fidelity in functional coupling of the rat P2Y1 receptor to phospholipase C.
Br J Pharmacol. 122(6):1021-1024.

Schmitt JM, Stork PJ. (2000)

beta 2-adrenergic receptor activates extracellular signal-regulated kinases (ERKs) via the small G protein rap1 and the serine/threonine kinase B-Raf.
J Biol Chem. 275(33):25342-25350.

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

Opioid control of MAP kinase cascade.
Eur J Pharmacol. 500(1-3):487-497.

Seamon KB, Daly JW, Metzger H, de Souza NJ, Reden J. (1983)

Structure-activity relationships for activation of adenylate cyclase by the diterpene forskolin and its derivatives.
J Med Chem. 26(3):436-439.

Seta K, Sadoshima J. (2003)

Phosphorylation of tyrosine 319 of the angiotensin II type 1 receptor mediates angiotensin II-induced trans-activation of the epidermal growth factor receptor.
J Biol Chem. 278(11):9019-9026.

Sette C, Vicini E, Conti M. (1994)
The ratPDE3/IVd phosphodiesterase gene codes for multiple proteins differentially activated by cAMP-dependent protein kinase.
J Biol Chem. 269(28):18271-18274.

Sharma SK, Nirenberg M, Klee WA. (1975)
Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity.
Proc Natl Acad Sci U S A. 72(2):590-594.

Shekter LR, Taussig R, Gillard SE, Miller RJ. (1997)

Regulation of human neuronal calcium channels by G protein betagamma subunits expressed in human embryonic kidney 293 cells.
Mol Pharmacol. 52(2):282-291.

Smith JA, Poteet-Smith CE, Malarkey K, Sturgill TW. (1999)

Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo.
J Biol Chem. 274(5):2893-2898.

Standifer KM, Pasternak GW. (1997)

G proteins and opioid receptor-mediated signalling.
Cell Signal. 9(3-4):237-248.

Stork PJ, Schmitt JM. (2002)

Crosstalk between cAMP and MAP kinase signaling in the regulation of cell proliferation.
Trends Cell Biol. 12(6):258-266.

Sunahara RK, Dessauer CW, Gilman AG. (1996)

Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 36:461-480.

Tan CM, Kelvin DJ, Litchfield DW, Ferguson SS, Feldman RD. (2001)

Tyrosine kinase-mediated serine phosphorylation of adenylyl cyclase.
Biochemistry. 40(6):1702-1709.

Tang WJ, Gilman AG. (1991)
Type-specific regulation of adenylyl cyclase by G protein beta gamma subunits.
Science. 254(5037):1500-1503.

Tang WJ, Hurley JH. (1998)

Catalytic mechanism and regulation of mammalian adenylyl cyclases.
Mol Pharmacol. 54(2):231-240.

Taussig R, Tang WJ, Hepler JR, Gilman AG. (1994)

Distinct patterns of bidirectional regulation of mammalian adenylyl cyclases.
J Biol Chem. 269(8):6093-60100.

Taussig R, Gilman AG. (1995)

Mammalian membrane-bound adenylyl cyclases.
J Biol Chem. 270(1):1-4.

Taylor SS, Knighton DR, Zheng J, Ten Eyck LF, Sowadski JM. (1992)
cAMP-dependent protein kinase and the protein kinase family.
Faraday Discuss. (93):143-152.

Treisman R. (1996)

Regulation of transcription by MAP kinase cascades.

Curr Opin Cell Biol. 8(2):205-215.

Tsu RC, Chan JS, Wong YH. (1995)
Regulation of multiple effectors by the cloned delta-opioid receptor: stimulation of phospholipase C and type II adenylyl cyclase.
J Neurochem. 64(6):2700-2707.

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

GTPase and adenylate cyclase desensitize at different rates in NG108-15 cells.
Mol Pharmacol. 31(2):159-568.

van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ. (1996)
G(o)-protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism.
J Biol Chem. 271(3):1266-1269.

Varga EV, Rubenzik M, Grife V, Sugiyama M, Stropova D, Roeske WR, Yamamura HI. (2002)

Involvement of Raf-1 in chronic delta-opioid receptor agonist-mediated adenylyl cyclase superactivation.
Eur J Pharmacol. 451(1):101-102.

Voss M, Weernink PA, Haupenthal S, Moller U, Cool RH, Bauer B, Camonis JH, Jakobs KH, Schmidt M. (1999)

Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a Ras/Ral signaling cascade.
J Biol Chem. 274(49):34691-34698.

Walsh DA. (1978)

Role of the cAMP-dependent protein kinase as the transducer of cAMP action.
Biochem Pharmacol. 27(14):1801-1804.

Wehmeyer A, Schulz R. (1998)

Phosducin expression in NG 108-15 hybrid cells enhances prostaglandin E1 stimulated adenylate cyclase activity.
Life Sci. 62(9):PL127-134.

Wild KD, Vanderah T, Mosberg HI, Porreca F. (1991)

Opioid delta receptor subtypes are associated with different potassium channels.
Eur J Pharmacol. 193(1):135-136.

Williams JA, Sans MD, Tashiro M, Schafer C, Bragado MJ, Dabrowski A. (2002)

Cholecystokinin activates a variety of intracellular signal transduction mechanisms in rodent pancreatic acinar cells.
Pharmacol Toxicol. 91(6):297-303.

Wu DQ, Lee CH, Rhee SG, Simon MI. (1992)
Activation of phospholipase C by the alpha subunits of the Gq and G11 proteins in transfected Cos-7 cells.
J Biol Chem. 267(3):1811-1817.

Xiao GS, Zhou JJ, Cheung YF, Li GR, Wong TM. (2003)

Effects of U50,488H on transient outward and ultra-rapid delayed rectifier K+ currents in young human atrial myocytes.
Eur J Pharmacol. 473(2-3):97-103.

Xue L, Lucocq JM. (1997)

Low extracellular pH induces activation of ERK 2, JNK, and p38 in A431 and Swiss 3T3 cells.
Biochem Biophys Res Commun. 241(2):236-242.

Yuen JW, So IY, Kam AY, Wong YH. (2004)
Regulation of STAT3 by mu-opioid receptors in human neuroblastoma SH-SY5Y cells.
Neuroreport. 15(9):1431-1435.

Yung LY, Joshi SA, Chan RY, Chan JS, Pei G, Wong YH. (1999)

GalphaL1 (Galpha14) couples the opioid receptor-like1 receptor to stimulation of phospholipase C.
J Pharmacol Exp Ther. 288(1):232-238.

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

Agonist-specific regulation of delta-opioid receptor trafficking by G protein-coupled receptor kinase and beta-arrestin.
J Recept Signal Transduct Res. 19(1-4):301-313.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut sowie wertvolle Hinweise, Diskussionsbeiträge und hilfreiche Unterstützung bei der Abfassung der Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Daniela A. Eisinger für die sehr gute Einarbeitung in die Laborarbeit, die vielen hilfreichen Gespräche und Anregungen sowie die stets gewährte Betreuung.

Herrn Prof. Dr. Hermann Ammer danke ich für anregende Dikussionsbeiträge sowie für die Unterstützung der vorliegenden Arbeit durch die Bereitstellung des HA-Antikörpers und der pcDNA3.1-ACII.

Bei allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät möchte ich mich für die freundliche Aufnahme und bereitwillig gewährte Hilfe bedanken.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Jean-Luc Parent (Kanada) für die Überlassung der pcDNA3.0-HA-EBP50.

Lebenslauf

Name	Stephanie Janowski
geboren	14. November 1975 in Dortmund
Eltern	Marek Janowski, Dirigent
	Marina Janowski, geb. v.Othegraven
Schulbildung	1982-1995: Rudolf-Steiner-Schule, München
	Juni 1995: Abitur
Ausbildung zur Tierarzthelferin	1995-1996: Ludwig-Maximilians-Universität, München
	Abteilung für Kleintierchirurgie
Studium der Tiermedizin	1996-2003: Ludwig-Maximilians-Universität, München
	Mai 2003: Approbation als Tierärztin

Seit 15. Juni 2003 Anfertigung der Doktorarbeit am Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie der Tierärztlichen Fakultät der LMU, München.