

**Einfluss des Hitzeschockproteins Hsc70 und des Raf
Kinase Inhibitor Proteins RKIP auf den zellulären
Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

von Dipl.-Humanbiologin Andrea Goschke (geb. Beyer)
geb. am 07. 03.1979 in Burg (b. Magdeburg)

Gutachter: Prof. Dr. Volker Höllt
Prof. Dr. Andreas Zimmer

eingereicht am: 25.08.2008

verteidigt am: 04.12.2008

1. Einleitung	1
Ziel dieser Arbeit	12
2. Methoden	13
2.1. Amplifizieren und Subklonieren des AS-Hsc 70 und der RKIP-S153A-Mutante	13
2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion	13
2.1.2. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA	14
2.1.3. Gelelektrophorese	15
2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten	16
2.1.5. Sequenzanalyse	16
2.1.6. Herstellung kompetenter Zellen und Übertragung rekombinanter DNA auf Bakterien (Transformation)	17
2.1.7. Amplifikation und Isolierung der Plasmid-DNA	18
2.2. Kultivierung von HEK293-Zellen	19
2.2.1. Methoden zur allgemeinen Handhabung der Zellen	19
2.2.2. Transfektion und transiente Expression von Fremd-DNA in HEK293-Zellen	19
2.2.2.1. Transfektion der Hsc 70-siRNA in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen	19
2.2.2.2. Transfektion der Plasmid-DNA in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen	21
2.3. Western Blot Analysen	21
2.3.1. Aufarbeitung der Hsc 70-siRNA- und AS-Hsc70-transfizierten MOPr-HEK293-Zellen	21
2.3.2. Isolierung der Glykoproteine mittels Weizenkeim-Agglutinin (WGA)	22
2.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	22
2.3.4. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen	23
2.3.5. Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe	24
2.4. Immunocytochemie	24
2.4.1. Konfokale Laserscan-Mikroskopie	24
2.4.2. Quantitative Messung der Endozytose mittels ELISA	25
2.5. Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation	26
2.6. Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK 1/2)	27
2.7. Datenanalyse	27

3. Material	28
3.1. Chemikalien, Enzyme, Reagenzansätze	28
3.2. Vektoren, rekombinante Expressionsplasmide und Antikörper	29
3.3. Bakterien und Zelllinien	29
3.4. Lösungen und Kulturmedium	30
3.5. Geräte	31
3.6. Verbrauchsmaterialien	32
4. Ergebnisse	33
4.1. Der Einfluss des <i>Heat Shock Cognate 70</i> -Proteins (Hsc70) auf den zellulären Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors (MOPr)	33
4.1.1. Verminderung der Hsc70-Expression	33
4.1.2. Einfluss der Verringerung der Hsc70-Expression auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOPr	35
4.1.3. Beeinflussung der agonisten-vermittelten Desensibilisierung des MOPr durch AS-Hsc70	37
4.2. Der Einfluss des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf den zellulären Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors	39
4.2.1. Beeinflussung der agonisten-vermittelten Desensibilisierung des MOPr durch RKIP	39
4.2.2. Beeinflussung der Agonisten-induzierten Phosphorylierung des MOPr	40
4.2.3. Einfluss der RKIP-vermittelten GRK2-Inhibition auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOPr	42
4.2.4. Beeinflussung der Aktivierung der mitogen-aktivierten Kinase ERK 1/2 durch RKIP	46
5. Diskussion	48
6. Zusammenfassung	55
7. Literaturverzeichnis	57
8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen	67

9. Abkürzungen und Dimensionen	69
10. Anhang	72
10.1. Lebenslauf	72
10.2. Wissenschaftliche Vorleistungen	73
10.3. Danksagung	75

1. Einleitung

Opium ist der durch Anritzen unreifer Kapseln gewonnene getrocknete Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), dessen ursprüngliche Heimat der östliche Mittelmeerraum ist. Seit Jahrtausenden ist Opium bekannt für seine schmerzlindernden Effekte. Die ersten belegbaren Verwender von Opium waren die alten Sumerer in Südbabylonien im frühen vierten Jahrtausend vor Christus. Sie bezeichneten das Opium als "Braune Droge", "Tochter des Mohns" sowie als "Pflanze der Freuden" und verwendeten es bereits als Heilmittel und auch als Genussmittel. Auch die Minoer kannten die Opiumwirkungen, wie der Fund einer Mohn Göttin auf Kreta aus dem zweiten Jahrtausend vor Christus zeigt. Im alten Griechenland war der Schlafmohn dem Gott des Todes (Thanatos), dem Gott des Schlafes (Hypnos) und dem Gott der Träume (Morpheus) geweiht.

Opium enthält etwa 40 verschiedene Alkaloide. Die Isolierung des Hauptalkaloids Morphin erfolgte erst 1804 durch den Apotheker Friedrich Sertürner. Im Verlauf des 19. Jahrhunderts wurden weitere für die Medizin relevante Opiumalkaloide identifiziert, so zum Beispiel Noscapin (Robiquet 1817), Codein (Robiquet 1832) oder Papaverin (Merck 1848).

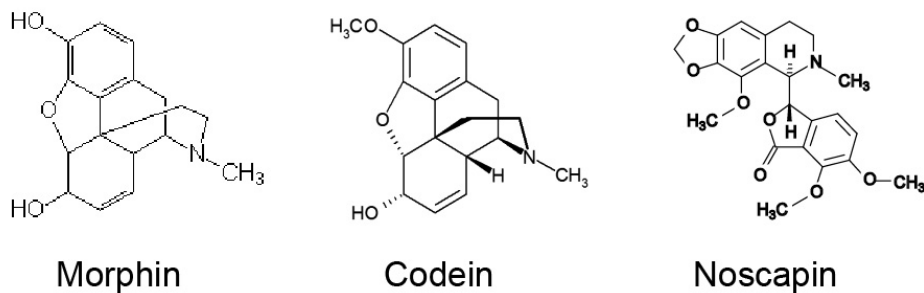


Abbildung 1: Strukturformeln des Morphins, des Codeins und des Noscapins.

Das reine, aus der Pflanze isolierte Morphin wurde zunächst medizinisch zur Stillung extremer Schmerzen eingesetzt, so erhielten zum Beispiel viele Kriegsverwundete des deutsch-französischen Krieges (1871/72) zur Schmerzstillung in großem Maßstab Morphin. Anschließend konnten jedoch Suchtsymptome, hervorgerufen durch das zu oft angewendete Morphin, beobachtet werden. Die Anwendung der Opiate wie Morphin oder Diacetylmorphin (Heroin) ist also durch die Ausbildung einer psychischen und physischen Abhängigkeit sowie einer Toleranzentwicklung eingeschränkt. Die physische Abhängigkeit äußert sich in

Entzugssymptomen wie starker Unruhe, Durchfällen und Erbrechen. Die psychische Abhängigkeit dagegen, manifestiert sich im extremen Verlangen nach der Droge. Sie kann noch vorhanden sein, obwohl keine physische Abhängigkeit mehr besteht.

Seit dieser Zeit gab es viele Versuche ein starkes Analgetikum ohne Suchtpotential zu finden, jedoch bisher ohne großen Erfolg (Übersicht: Brownstein, 1993). Außer der Analgesie werden folgende Effekte durch die Opiate ausgelöst: Sedation, Stimmungsveränderungen (Euphorie/Dysphorie), Atemdepression, Miosis, Antidiurese, Übelkeit, Erbrechen, Hemmung der gastrointestinalen Funktionen sowie Veränderungen des endokrinen Systems (Übersicht: Pasternak, 1993). Die Wirkungen der Opiate werden auf zellulärer Ebene durch Bindung an spezifische Opioidrezeptoren (μ , δ , κ) vermittelt (Tabelle 1).

Rezeptor-Subtyp Effekt	μ MOP	δ DOP	κ KOP
Analgesie	+++	+	++
Euphorie	+++	-	--
Dysphorie	-	-	+++
Sedation	++	-	++
Atemdepression	+++	++	-
Miosis	++	-	+

Tabelle 1: Übersicht der Opioidrezeptor-Subtypen-vermittelten Effekte.

Die spezifischen Opioidrezeptoren μ (MOP), δ (DOP) und κ (KOP) lösen auf zellulärer Ebene die typischen Opiatwirkungen aus.

Das Vorhandensein mehrerer Opioidrezeptoren wurde zuerst in Radioligandenbindungsstudien gezeigt (Chang und Cuatrecasas, 1979; Chang et al., 1979). Die pharmakologisch in μ -, κ - und δ - unterteilten Opioidrezeptoren sind in ihrer Aminosäuresequenz zu etwa 60% homolog, wobei die größte Homologie in den Transmembrandomänen und den intrazellulären Schleifen vorliegt. Die Rezeptoren sind spezifisch im Gehirn verteilt und binden Opioide mit unterschiedlicher Affinität (Tabelle 2). Die physiologische Aktivierung erfolgt durch endogene Neuropeptide, wie β -Endorphin, Enkephalin und Dynorphin. β -Endorphin bindet dabei bevorzugt an μ - und δ -, Enkephalin an δ - und Dynorphin an κ -Opioidrezeptoren.

Rezeptor-Subtyp	μ MOP	δ DOP	κ KOP
endogener Ligand	Endomorphin	Enkephalin	Dynorphin
selektiver Agonist	DAMGO	DPDPE	Enadolin
selektiver Antagonist	Naloxon	Naltrindol	Norbinaltorphimin

Tabelle 2: Übersicht der Opioidrezeptor-Subtypen und ihren spezifischen Liganden.

Die Untersuchungen dieser Arbeit beziehen sich auf den μ -Opioidrezeptor, der im Jahre 1993 kloniert wurde (Chen et al., 1993; Fukuda et al., 1993). In den nachfolgenden Jahren wurden verschiedene Isotypen des μ -Opioidrezeptors identifiziert, die durch alternatives Spleißen entstanden sind und sich nur in ihrem C-Terminus unterscheiden. So konnte die Existenz verschiedener Spleißvarianten des μ -Opioidrezeptors des Menschen (MOP_{1A}: Bare et al., 1994; MOP_{1O}, MOP_{1X}: Cadet, 2004), der Ratte (MOP_{1B}: Zimprich et al., 1995) sowie der Maus (MOP_{1C}, MOP_{1D}, MOP_{1E}: Pan et al., 1999; MOP_{1F}: Pan et al., 2000) gezeigt werden. Obwohl der μ -Opioidrezeptor und seine Spleißvarianten vom selben Gen abgeleitet sind und ähnliche Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Opioiden zeigen, sind Unterschiede in der Funktionalität vorhanden. So zeigt die Spleißvariante MOP_{1B} eine verzögerte Desensibilisierung im Vergleich zum MOP (Zimprich et al., 1995), was auf eine erleichterte Internalisierung und Reaktivierung des Rezeptors zurückzuführen ist (Koch et al., 1998). In einer weiteren Studie konnte festgestellt werden, dass die Spleißvarianten MOP_{1D} und MOP_{1E}, im Gegensatz zum MOP-Wildtyp, nach Morphingabe internalisieren und beschleunigt reaktiviert werden, was zu einer verzögerten morphin-induzierten Desensibilisierung dieser Rezeptoren führt (Koch et al., 2001).

Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, welche etwa 1000 bekannte Mitglieder umfasst. Charakteristisch für diese Gruppe sind sieben helikale Transmembrandomänen, die jeweils aus 20 bis 25 hydrophoben Aminosäuren bestehen. Die sieben Helices sind bündelförmig in die Plasmamembran eingebettet, wobei die Transmembrandomänen 1 und 7 in unmittelbarer Nähe liegen (Palczewski et al., 2000). Wie in Abbildung 2 dargestellt besitzen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren einen extrazellulären N-Terminus sowie einen intrazellulären C-Terminus. Die sieben Transmembranregionen sind durch drei unterschiedlich große intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen (*loops*) miteinander verbunden.

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind häufig Glykoproteine mit extrazellulären Glykosylierungsstellen. In der ersten und zweiten extrazellulären Schleife befinden sich vielfach konservierte Cystein-Reste, durch welche über Disulfidbrücken die Konformation der extrazellulären Domäne stabilisiert wird. Ferner weisen einige Rezeptoren Palmitoylierungen an Cystein-Resten im C-Terminus auf, die für die Verankerung in der Membran von Nutzen sind (Iismaa et al., 1995). Die extrazellulären Domänen und der N-Terminus bilden funktionelle Domänen für die Ligandenbindung. Für die G-Protein-Kopplung sind die intrazellulären Schleifen und die direkt benachbarten Transmembrandomänen von großer Bedeutung.

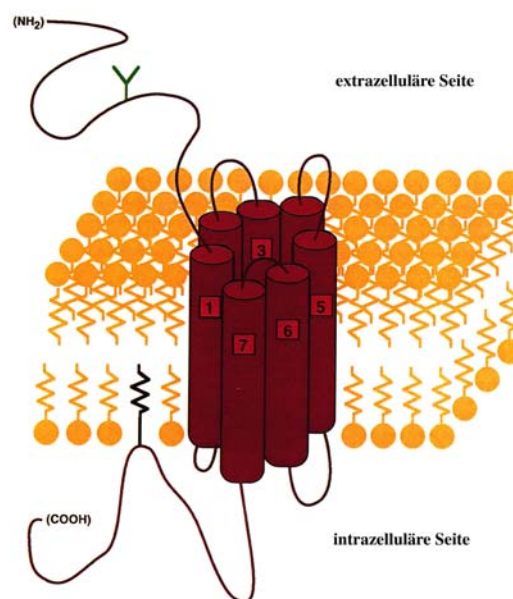


Abbildung 2: Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors.

Die 7 Transmembrandomänen sind als Zylinder gezeichnet. Die N-terminale extrazelluläre Domäne der meisten Rezeptoren enthält potentielle Glykosylierungsstellen (Y) und trägt zur Ligandenbindung bei. Die intrazellulären Schleifen und die benachbarten Transmembrandomänen sind für die G-Protein-Kopplung von Bedeutung. Schema nach Iismaa et al., 1995.

In Abwesenheit des Liganden liegt der Rezeptor in einer für G-Proteine bindungsinaktiven Form vor. Die Bindung des spezifischen Liganden (*first messenger*) an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, so dass die Assoziation mit dem heterotrimeren G-Protein-Komplex ermöglicht wird. Dieser G-Protein-Komplex besteht aus α -, β - und γ -Untereinheiten, diese können Effektorsysteme stimulieren oder inhibieren. Die α -Untereinheit des G-Proteins weist eine Bindungsstelle für Guanin-Nukleotide (Guanosindiphosphat [GDP] beziehungsweise Guanosintriphosphat [GTP]) auf und beinhaltet die GTPase-Aktivität. β - und γ -Untereinheit bilden einen hydrophoben

Komplex und verankern das G-Protein in der Membran. Im inaktiven Zustand bilden die drei Untereinheiten ein gemeinsames Protein, das nicht an den Rezeptor gebunden ist. Durch Bindung des G-Proteins an den aktivierten Rezeptor wird das G-Protein selbst aktiviert, so dass GTP gegen GDP an der α -Untereinheit ausgetauscht wird und der entstandene Komplex von der $\beta\gamma$ -Untereinheit abdissoziiert. Infolge der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion werden so genannte *second messenger*-Moleküle gebildet, die weitere Signaltransduktionskaskaden auslösen. Beide G-Protein-Untereinheiten können dann spezifisch Effektorsysteme regulieren. Die Opioidrezeptoren sind an G-Proteine der $G_{i/o}$ - und G_q -Familie gekoppelt. So inhibiert zum Beispiel die α -Untereinheit des G-Proteins nach Aktivierung des μ -Opioidrezeptors die Aktivität der Adenylatzyklase (Mork, 1993). $\beta\gamma$ -Untereinheiten regulieren beispielsweise die Aktivität von spannungsabhängigen Kaliumkanälen (Ivanova-Nikolova et al., 1998). Des Weiteren werden MAP-Kinasen aktiviert (Adachi et al., 2000; Fukuda et al., 1996) und die Phospholipase C stimuliert (Spencer et al., 1997).

Nach Aktivierung des G-Proteins wird das gebundene GTP aufgrund der konstitutiven enzymatischen Aktivität der α -Untereinheit hydrolysiert. Der Komplex aus G-Protein und Rezeptor löst sich auf und die heterotrimeren Untereinheiten bilden den inaktiven G-Protein-Komplex (Kaziro et al., 1991). Der Rezeptor aktiviert entweder weitere G-Proteine oder kehrt in seinen inaktiven Ruhezustand zurück.

Die Rezeptoraktivität kann durch verschiedene Mechanismen, wie zum Beispiel die Desensibilisierung, die Internalisierung und die Veränderung der Expressionsrate, reguliert werden. Durch den Mechanismus der Desensibilisierung ist die Zelle in der Lage, die Empfindlichkeit auf einen Reiz reversibel zu verändern. Nach andauernder Stimulation durch einen Liganden kommt es zu einer Abnahme der Rezeptoraktivität (Desensibilisierung), so dass die Dosis erhöht werden muss um die gleiche Wirkung zu erzielen (Toleranzphänomen). Die Signalweiterleitung ins Zellinnere erfolgt nicht mehr oder nur noch abgeschwächt. Folglich bleibt die Rezeptorantwort auf den Liganden aus oder ist vermindert. Die agonisten-induzierte Desensibilisierung erfolgt maßgeblich durch Phosphorylierung bestimmter Aminosäuren (vor allem Serine und Threonine) am C-Terminus des Rezeptors vor allem durch G-Protein-gekoppelte Proteinkinasen (GRKs), aber auch durch *second messenger* Kinasen, wie der Proteinkinase C (PKC), der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) oder der MAP-Kinase. Durch diesen Vorgang wird die Bindung von β -Arrestin-Molekülen und eine damit verbundene Entkopplung der Rezeptoren von den G-Proteinen (Desensibilisierung) ermöglicht. Die Internalisierung (Endozytose) des Agonist-Rezeptor-Komplexes wird durch membranäre Translokation von Adapterprotein 2 (AP2) und Clathrin ausgelöst (Conner und Schmid, 2003).

Der Komplex wird in clathrin-bedeckte Vesikel eingeschlossen und von der Zellmembran in das Zellzytosol transportiert. Ein Fehlen der agonist-induzierten Phosphorylierung, zum Beispiel durch Mutation der mutmaßlichen Phosphorylierungsstelle der G-Proteingekoppelten Proteinkinase (GRK), äußert sich in einer Blockade beziehungsweise Verminderung der μ -Opioidrezeptor-Internalisierung (El Kouhen et al., 2001; Schulz et al., 2004). Die GRK-vermittelte Rezeptorphosphorylierung spielt demnach eine wichtige Schlüsselrolle bei der Internalisierung der μ -Opioidrezeptoren. Durch Internalisierung befindet sich der Rezeptor nicht mehr in der Membran und ist nicht für eine weitere Aktivierung durch Agonisten verfügbar. Die Abspaltung des Liganden erfolgt im sauren Milieu der Endosomen, das durch aktiven Transport von Wasserstoffprotonen aus dem Zytosol der Zelle entsteht. Durch Phosphatasen kommt es zur Dephosphorylierung des Rezeptors. In Lysosomen wird später der Ligand abgebaut. Die Reaktivierung der meisten Rezeptoren erfolgt anschließend durch Rücktransport (*Recycling*) des Rezeptors in die Membran. Einige Rezeptoren werden jedoch in den Lysosomen degradiert, was zu einer Herunterregulierung (*Downregulation*) der Rezeptormoleküle führen kann. Dieser Verlust an Rezeptoren kann erst durch Neusynthese von Rezeptoren ausgeglichen werden. Desensibilisierung, Internalisierung und Downregulation führen also zu einer reduzierten Rezeptoraktivität (Abbildung 3). Durch Modulation der Expressionsrate wie zum Beispiel durch Wachstumsfaktoren, Hormone oder Zytokine, kann sowohl eine Erhöhung als auch eine Verminderung der Rezeptoraktivität erfolgen.

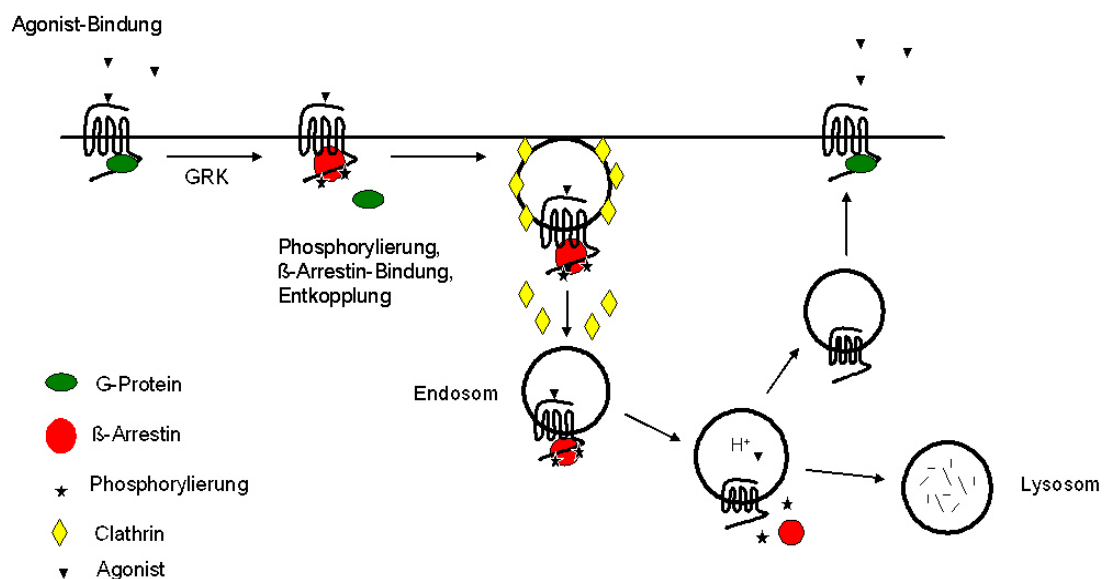


Abbildung 3: Modell der agonist-induzierten Internalisierung des μ -Opioidrezeptors.

Erläuterung im Text.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde nach neuen intrazellulären Interaktionspartnern des μ -Opioidrezeptors gesucht, die einen Einfluss auf die Aktivität des Rezeptors aufweisen könnten. Dazu wurde das so genannte „Hefe-2-Hybrid“-System (*yeast two hybrid*) verwendet (Fields et al., 1989). Diese Methode beruht auf der Induktion von Reporter genen, welche durch Wechselwirkung zweier getrennter Domänen eines Transkriptionsfaktors ausgelöst werden. Der dazu verwendete Hefetranskriptionsfaktor GAL4 besteht aus einer Aktivierungs- und einer Bindungsdomäne, wobei die cDNAs der Domänen in zwei getrennten Vektoren kodiert werden. Es wurden der C-terminale Bereich des μ -Opioidrezeptors (Aminosäuren 340 bis 398) sowie eine cDNA-Bibliothek aus der Ratte als Vektoren verwendet. Wenn die Proteine interagieren, führt die räumliche Annäherung der Aktivierungs- und Bindungsdomäne von GAL4 zur Expression des Reportergens. Die Interaktion mit den identifizierten positiven Klonen wurde mittels nachfolgender Kontrollversuche des *yeast two hybrid*-Systems bestätigt. Bei einem der gefundenen Klone handelt es sich um eine cDNA, welche für das *Heat shock cognate 70*-Protein (Hsc70) kodiert (Aminosäuren 421 bis 646). Das *Heat shock cognate 70*-Protein gehört zur Familie der 70-kDa-Hitzeschockproteine und ist das am häufigsten konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein in normalen Zellen (Übersicht: Welch, 1993).

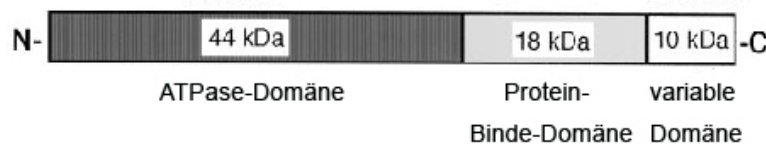


Abbildung 4: Struktur der 70-kDa-Hitzeschockproteine.

ATPase- und Protein-Binde-Domäne sind bei allen 70-kDa-Hitzeschockproteine annähernd homolog. Sequenzunterschiede treten vor allem in der C-terminalen variablen 10-kDa-Domäne auf.

Verschiedene Studien zeigen, dass die N-terminale 44-kDa-Domäne des *Heat shock cognate 70* eine ATPase ist (Chappell et al., 1987; Huang et al., 1993) und die C-terminale 30-kDa-Domäne die Proteinbindung ermöglicht (Hu und Wang, 1996). Diese 30-kDa-Domäne kann weiter unterteilt werden in eine 18-kDa-Domäne und in eine 10-kDa-Domäne (Wang et al., 1993; Tsai und Wang, 1994). Unter Stressbedingungen, wie zum Beispiel hohen Temperaturen, Alkohol, Inhibitoren des Energie-Stoffwechsels, Schwermetallen, oxidativem Stress, Fieber oder Entzündungen, erhöhen sich die Expressionsraten (Übersicht: Jolly und Morimoto, 2000). *Heat shock cognate 70* (Hsc70) und *Heat shock protein 70* (Hsp70) sind

sowohl zytosolische als auch nukleäre Proteine und fungieren als molekulare Chaperone bei biologischen Prozessen wie der Faltung und Entfaltung von Proteinen, der Formation und Dissoziation von Proteinkomplexen, sowie der Translokation von Proteinen durch Membranen (Hendrick und Hartl, 1993). Für die Proteinfaltung ist die ATPase-Aktivität von großer Bedeutung. Der ADP-gebundene Status des Hitzeschockproteins Hsc70 weist eine hohe Affinität für Proteinsubstrate auf, durch Bindung von ATP wird diese Affinität vermindert (Schmid et al., 1994; Theyssen et al., 1996). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Hsc70 an Transport- und Sortierungs-Ereignissen zwischen endosomalen Kompartimenten beteiligt ist. Ein relevanter Prozess ist zum Beispiel die Rezeptorendozytose, die durch clathrin-bedeckte Vesikel vermittelt wird. Das Hitzeschockprotein Hsc70 entlässt Clathrin ATP-abhängig aus den Mantelvesikeln (Schlossman et al., 1984; Rothmann und Schmid, 1986). Weiterhin ist Hsc70 notwendig für die Freigabe des Adaptorproteins AP2 aus diesen Vesikeln (Hannan et al., 1998), welches die Bindung sowohl an Clathrin als auch an Membranlipide ermöglicht. Ferner wurde angenommen, dass Hsc70 vielfältig in den clathrin-vermittelten Endozytose-Zyklus und das Recycling involviert ist (Newmyer und Schmid, 2001). So wird vermutet, dass das Hitzeschockprotein Hsc70 Clathrin aus neu gebildeten Vesikeln entlässt, an der Formation zytosolischer Clathrin-Gerüste beteiligt ist, um eine Rekrutierung zu den sich bildenden Membraneinstülpungen zu ermöglichen und das Rezeptorrecycling im endosomalen Kompartiment fördert (Abbildung 5).

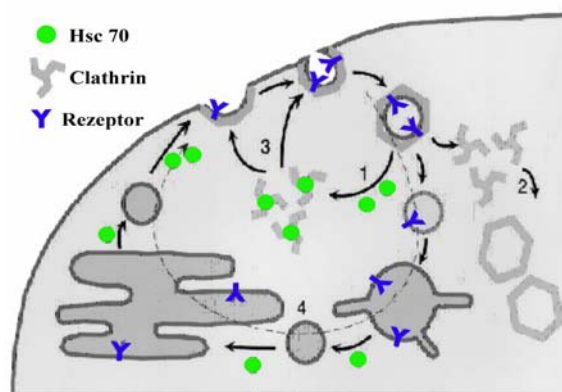


Abbildung 5: Rolle des *Heat shock cognate 70* bei der clathrin-vermittelten Endozytose.

(1) Entlassen des Clathrins aus neu-entstandenen clathrin-bedeckten Vesikeln, (2) Beteiligung an der Bildung zytosolischer Clathrin-Gerüste, (3) Rekrutieren des Clathrins zum clathrin-bedeckten Vesikel an der Membraneinstülpung, (4) Förderung des Rezeptor-Recyclings. Schema nach Newmyer und Schmid, 2001.

Es ist daher vorstellbar, dass das Hitzeschockprotein *Heat shock cognate 70* durch Beeinflussung der Rezeptorendozytose Effekte auf den zellulären Transport und somit auch auf die Aktivität des μ -Opioidrezeptors hervorruft.

Ein anderes Protein, das einen Einfluss auf den Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors haben könnte, ist das *Raf Kinase Inhibitor Protein* (RKIP).

Das Raf Kinase Inhibitor Protein gehört zur Familie der Phosphatidylethanolamin-bindenden Proteine (PBP, PEBP) und ist ein konserviertes, 23 kDa großes, überwiegend zytosolisches Protein. Es wurde erstmals 1984 durch Aufreinigung boviner Hirne entdeckt (Bernier und Jolles, 1984). RKIP wird in vielen Geweben verschiedener Spezies, wie zum Beispiel Affe, Ratte, Huhn oder Mensch, exprimiert (Perry et al., 1994; Grandy et al., 1990; Bollengier und Mahler, 1988; Hori et al., 1994). Die Expression der RKIP-mRNA konnte in verschiedenen Organen, wie Niere, Leber, Lunge, Hoden, Milz, Magen, Herz-, Skelettmuskel und Gehirn, gezeigt werden (Bollengier und Mahler, 1988; Seddiqi et al., 1994; Übersicht: Schoentgen und Jolles, 1995). Immunocytochemische Studien demonstrierten das Vorkommen von Raf Kinase Inhibitor Protein im gesamten Zytoplasma, entlang der Plasmamembran und der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums in Hirn-Oligodendrozyten (Roussel et al., 1988) und in Schwann-Zellen (Moore et al., 1996). Des Weiteren wurden homologe Proteine im Malaria-Erreger *Plasmodium falciparum* (Trottein und Cowman, 1955), in Nematoden (Gems et al., 1995; Ertman und Gallin, 1996), in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Pikielny et al., 1994) sowie in dem Hefepilz *Saccharomyces cerevisiae* (Robinson und Tatchell, 1991) entdeckt, deren detaillierte Funktionen jedoch unklar sind.

RKIP beeinflusst verschiedene Zell-Signalkaskaden, so inhibiert es zum Beispiel die extrazellulär-regulierte Kinase 1/2 (ERK1/2)-Signalwege (Yeung et al., 2000). RKIP kann sowohl Raf-1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase) als auch MEK-1 (Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase) binden und somit die Raf-vermittelte Aktivierung von MEK und ERK hemmen.

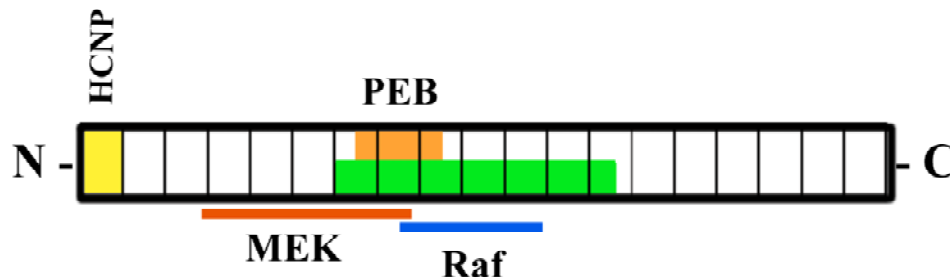


Abbildung 6: Struktur der Raf Kinase Inhibitor Proteine.

Die ersten 12 Aminosäuren des RKIP stellen das hippokampale neurostimulatorische Peptid (HCNP) dar, welches in die neuronale Entwicklung involviert ist. Der grün gefärbte Bereich stellt die zentrale Region der Liganden- und Nukleotidbindung dar. Die Bindung der Phosphatidylethanolamine erfolgt zwischen der 64. und 86. Aminosäure (orange). Die Bindedomänen von MEK (braun) und Raf (blau) überlappen sich teilweise.

Ferner greift RKIP in das Zellwachstum ein indem es mit der Proteinkinase C interagiert, welche Proteine phosphoryliert, die das Wachstum, die Differenzierung und die Transkription regulieren. Die Proteinkinase C phosphoryliert RKIP und vermindert dadurch die RKIP-vermittelte Hemmung von Raf-1 (Corbit et al., 2003). Des Weiteren inhibiert RKIP die durch TNF α - induzierte NF κ B - Signaltransduktion und inaktiviert verschiedene Kinasen der NF κ B-Familie (Yeung et al., 2001). Außerdem scheint Raf Kinase Inhibitor Protein eine Rolle in der Apoptose (Chatterjee et al., 2003; Fu et al., 2003) und in der Suppression von Metastasen zu spielen (Jazireh et al., 2004). Neuere Studien zeigen, dass Raf Kinase Inhibitor Protein an der Entstehung der Alzheimer-Krankheit beteiligt ist (Klysik et al., 2008). Das hippokampale neurostimulatorische Peptid (HCNP) und der Nervenwachstumsfaktor NGF spielen eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Cholinacetyltransferase-Spiegel im Gehirn. Die ersten 12 Aminosäuren des Raf Kinase Inhibitor Proteins formen einen Teil des Vorläuferproteins des HCNP und bilden somit einen wichtigen Bestandteil im regulierten Prozess der Cholinacetyltransferase. Es ist bekannt, dass Störungen des cholinergen Systems verbunden sind mit altersbedingtem Gedächtnisverlust, eines der charakteristischen Symptome der Alzheimer-Krankheit (Bartus et al., 1982).

Der Einfluss von RKIP auf die Signaltransduktion von G-Proteinen und G-Proteingekoppelten-Rezeptoren wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe gezeigt (Kroslak et al., 2001). Demnach wurde vermutet, dass RKIP die heterotrimeren G-Proteinkopplung aktiviert, indem es zu einem vermehrten Austausch von GDP zu GTP führt.

Eine weitere Funktion von RKIP ist die Hemmung der G-Protein-gekoppelten Proteinkinase 2 (GRK2) (Lorenz et al., 2003). Da RKIP nach seiner Phosphorylierung durch die Proteinkinase C von Raf-1 abdissoziiert (Corbit et al., 2003; Lorenz et al., 2003; Yeung et al., 1999), wird vermutet, dass Raf Kinase Inhibitor Protein als Vermittler zwischen Raf-1 und der GRK2 wirkt (Slupsky et al., 1999). Die GRK2 ist der hauptsächliche Rückkopplungs-Inhibitor der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, da sie die aktivierten Rezeptoren phosphoryliert, diese von den G-Proteinen entkoppelt und somit deren Internalisierung auslöst (Krupnick and Benovic, 1998; Lefkowitz et al., 1998). Wahrscheinlich dissoziiert RKIP nach Aktivierung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren von Raf-1 ab um mit der GRK2 zu assoziieren und dadurch deren Aktivität zu blockieren. Dieses Umschalten der Affinität des Raf Kinase Inhibitor Proteins wird durch die Proteinkinase C vermittelt, die RKIP spezifisch an einem Serin-Rest (Serin153) phosphoryliert. Rezeptoren, die die Proteinkinase C aktivieren, können demzufolge die Aktivierung verschiedener Signalwege durch RKIP fördern. RKIP moduliert folglich die Signaltransduktion, indem es einerseits die G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Signalgebung durch die GRK2-Hemmung und andererseits die Raf-1-abhängigen Signalwege durch Verringerung der Raf-1-Aktivität beeinflusst. Da diese Mechanismen die Aktivität und Signaltransduktion des μ -Opioidrezeptors beeinflussen, soll in der vorliegenden Arbeit der Effekt des Raf Kinase Inhibitor Proteins auf die Rezeptoraktivität des MOP näher untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es den Einfluss des Hitzeschockproteins *Heat shock cognate 70* (Hsc70) und des *Raf Kinase Inhibitor Proteins* (RKIP) auf die Aktivität und den zellulären Transport des μ -Opioidrezeptors zu untersuchen. Die verwendeten μ -opiodrezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen zeigen bereits endogen eine hohe Expression von *Heat shock cognate 70*. Hsc70 als wichtiger Regulator der clathrin-vermittelten Endozytose sollte einen großen Einfluss auf den Transport des μ -Opioidrezeptors haben. In den nachfolgenden Versuchen sollte daher zunächst der Einfluss einer Verringerung der *Hsc70*-Expression auf die agonist-induzierte Endozytose und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors analysiert werden.

In einem weiteren Ansatz wurden die μ -opiodrezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen transient mit dem *Raf Kinase Inhibitor Protein* transfiziert, um den Effekt dieses Proteins auf die Aktivität näher zu charakterisieren. RKIP moduliert wichtige Kinasen, die den μ -Opioidrezeptor in seiner Aktivität beeinflussen, daher sollte geprüft werden, wie sich eine Koexpression von RKIP auf die agonisten-vermittelte Desensitisierung und Internalisierung auswirkt.

2. Methoden

2.1. Amplifizieren und Subklonieren des AS-Hsc70 und der RKIP-S153A-Mutante

Ausgehend von einer Ratten-Hirn-cDNA wurde das *Heat Shock Cognate 70*-Protein amplifiziert und in „*Antisense*“-Orientierung in das Expressionsplasmid pcDNA3 subkloniert. Für den zweiten Teil dieser Arbeit standen das RKIP-pT7/T3-Expressionsplasmid (von Prof. Rommelspacher, Benjamin Franklin Universität Berlin) sowie das RKIP-pcDNA3.1-Plasmid (Kroslak et al., 2001) zur Verfügung. Für weitere Untersuchungen wurde eine Mutation des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP-S153A-Mutante) konstruiert und in das Expressionsplasmid pcDNA3.1 subkloniert. Mittels der Polymerase-Kettenreaktion wurden die notwendigen Restriktionsstellen sowie die Mutation des RKIP in das Gen eingeführt.

2.1.1. Polymerase-Kettenreaktion (PCR - „polymerase chain reaction“)

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können DNA-Sequenzen spezifisch amplifiziert werden. Durch den Einsatz von 2 Oligonukleotiden (Primer) unterschiedlicher Orientierung kann die gewünschte DNA-Sequenz zwischen den anhand der Oligonukleotide definierten Sequenzen amplifiziert werden. Dieser Sachverhalt führt dazu, dass durch die Primer gezielt Mutationen in die Sequenz eingeführt werden können. Um das Antisense-Hsc70-Plasmid zu konstruieren wurden ein *BamHI*- und ein *XbaI*-Schnitt in die amplifizierte Sequenz des Hsc70 eingefügt. Bei der Konstruktion der RKIP-S153A-Mutante des Raf Kinase Inhibitor Proteins enthielt der reverse Primer neben einer *SacI*-Restriktionsstelle eine Mutation in Aminosäureposition 153, sodass die Aminosäure Alanin anstatt Serin eingebaut wird. Der jeweilige Reaktionsansatz (50 µl) enthielt folgende Komponenten:

- 37,5 µl Aqua bidest,
- 5 µl PCR-Puffer (10x),
- 3 µl MgCl₂ (25 mM),
- 1 µl dNTP (20 mM),
- 1 µl *forward*-Primer,
- 1 µl *revers*-Primer,
- 0,5 µl Taq-Polymerase,
- 1 µl cDNA bzw. RKIP-pT7/T3 (< 1 µg).

Die PCR wird in 3 Reaktionsschritte unterteilt: Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Zunächst wurden die Einzelstränge der doppelsträngigen DNA bei 96°C für 1 min voneinander getrennt, damit sich im nächsten Schritt die beiden Oligonukleotide anlagern. Diese sind in einem kurzen Abschnitt der DNA homolog und hybridisieren in gegenläufiger Orientierung an die komplementäre Sequenz des erforderlichen DNA-Stückes. Die optimale Temperatur für die Primeranlagerung ist vom Verhältnis der Primerbasen abhängig (für jedes A:T 2°C, für jedes G:C 4°C). Die DNA-Synthese, auch Extension oder Elongation, erfolgte bei 72°C für 3 min durch die Taq-Polymerase. Abschließend wurde die neu synthetisierte DNA bei 96°C denaturiert und die Abfolge wiederholte sich (30 Zyklen). Die Reaktionsprodukte wurden dann bei 4°C aufbewahrt. Die Reaktion wurde in einem DNA Engine PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) in dünnwandigen 500 µl-PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe und nach Anleitung des „PCR Purification Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) aufgereinigt.

2.1.2. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Sowohl das pcDNA3-Plasmid als auch das amplifizierte Hsc70-Gen wurden mit den Restriktionsendonukleasen *BamH* I (5'-G↓GA-TCC -3') und *Xba* I (5'-T↓CT-AGA-3') bei 37°C für 1 – 2 Stunden gespalten. Die Reaktionsansätze sahen folgendermaßen aus:

Vektor:	Insert-DNA:
2 µl pcDNA3,	44 µl Hsc70 (aufgereinigtes PCR-Produkt),
2 µl <i>BamH</i> I,	2 µl <i>BamH</i> I,
2 µl <i>Xba</i> I,	2 µl <i>Xba</i> I,
2 µl Restriktionspuffer 2,	6 µl Restriktionspuffer 2,
2 µl BSA,	<u>6 µl BSA</u>
<u>10 µl Aqua bidest</u>	60 µl Gesamtvolumen
20 µl Gesamtvolumen	

Die Restriktion wurde durch Zugabe von DNA-Stopp-Puffer (1/4 des Volumens) abgestoppt.

Um die RKIP-S153A-Mutante des Raf Kinase Inhibitor Proteins in das pcDNA3.1-Plasmid subklonieren zu können, wurde sie zunächst über einen Zwischenschritt in das pT7/T3-Plasmid überführt. Die erste Spaltung erfolgte daher mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR* I (5'-G↓AA-TTC -3') und *Sac* I (5'-GAG-CT↓C-3') bei 37°C für 1 – 2 Stunden. Die

zweite Spaltung wurde mit den Restriktionsendonukleasen *EcoR* I und *Hind* III (5'-A↓AG-CTT-3') durchgeführt. Die Reaktionsansätze sahen folgendermaßen aus:

1.) Vektor:	Insert-DNA:
2 µl RKIP-pT7/T3,	30 µl RKIP-S153A (aufgereinigtes PCR-Produkt),
2 µl <i>Sac</i> I,	2 µl <i>Sac</i> I,
2 µl <i>EcoR</i> I,	2 µl <i>EcoR</i> I,
2 µl Restriktionspuffer 1,	5 µl Restriktionspuffer 1,
2 µl BSA,	5 µl BSA,
<u>10 µl Aqua bidest</u>	<u>6 µl Aqua bidest</u>
20 µl Gesamtvolumen	50 µl Gesamtvolumen

2.) Vektor:	Insert-DNA:
2 µl RKIP-pcDNA3.1,	3 µl RKIP-S153A-pT7/T3,
1 µl <i>Hind</i> III,	1 µl <i>Hind</i> III,
1 µl <i>EcoR</i> I,	1 µl <i>EcoR</i> I,
2 µl <i>EcoR</i> I-Restriktionspuffer,	2 µl <i>EcoR</i> I-Restriktionspuffer,
<u>14 µl Aqua bidest</u>	<u>13 µl Aqua bidest</u>
20 µl Gesamtvolumen	20 µl Gesamtvolumen

Die Restriktionen wurden durch Zugabe von DNA-Stopp-Puffer (1/4 des Volumens) abgestoppt.

2.1.3. Gelelektrophorese

Die DNA-Fragmente wurden gelelektrophoretisch unter Verwendung eines 1%igen Agarosegels (2 g Agarose in 200 ml 1x TAE gelöst) aufgetrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Standard (1 kb DNA Standard) mit auf das Gel aufgetragen. Das Gel wurde in Ethidiumbromid-haltigem TAE-Puffer gefärbt, mit bidestilliertem Wasser entfärbt und die DNA-Banden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht.

Die Isolation der DNA-Fragmente aus dem Gel erfolgte mit Hilfe und nach Anleitung des "Gel *Extraction Kit*" der Firma Qiagen (Hilden).

2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Der Einbau der DNA-Fragmente in das Plasmid erfolgte mittels Ligation bei 15°C über Nacht.

Ligationsansatz:

20 µl Insert-DNA (mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten),

10 µl Plasmid (mit den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten),

8 µl 5x Ligase-Puffer

2 µl T4-Ligase

40 µl Gesamtvolumen

Nach dieser Reaktion liegt das Protein in das Plasmid eingebaut als rekombinante DNA vor und wird mit dem Plasmid vermehrt.

2.1.5. Sequenzanalyse

Mit Hilfe eines LI-COR DNA-Sequencer (Modell 4000) wurde die Sequenzierung des pcDNA3-AS-Hsc70 halbautomatisch durchgeführt. Die Detektion der Fragmente erfolgte mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierter Primer im Infrarot-Bereich. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynucleotid-Methode durch Cycle-Sequenzierung wie im „Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP“ - Protokoll beschrieben. In vier Reaktionsgefäße wurden je 1 µl des Terminationsmixes (A-, C-, G-, T-Reagenz) vorgelegt. 4 µl Template-DNA (200 fmol) und 1,5 µl IRD 800 - markierter Primer wurden auf 14 µl Gesamtvolumen mit Aqua bidest aufgefüllt und gut gemischt. Je 3 µl der Mischung wurden in die Reaktionsgefäße verteilt. Die PCR-Reaktion wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt: 3 min Vorinkubation (Pre-Denaturierung) bei 95°C, dann 30 Zyklen jeweils 25 sec bei 95°C (Denaturierung), 20 sec bei 63°C (Primer-Anlagerung), 40 sec bei 70°C (Reaktion). Abschließend wurden die Proben bis zur Nutzung bei 4°C aufbewahrt.

Vor dem Auftragen der Proben auf das Sequenziergel wurden diese mit 3 µl Auftragslösung (enthält Bromphenolblau) versetzt. Die verwendeten Gele wurden wie in der Gebrauchsanleitung des Sequenziergerätes beschrieben hergestellt. Es wurde 4,8 % Rapid Gel XL von Amersham mit 7 M Harnstoff verwendet.

Die Sequenzierung des pT7/T3-S153A- sowie des pcDNA3.1-RKIP-S153A-Plasmids erfolgte durch die Firma Sequence Laboratories Göttingen.

2.1.6. Herstellung kompetenter Zellen und Übertragung rekombinanter DNA auf Bakterien (Transformation)

Bei der Transformation der Bakterien werden Teilstücke des Bakteriengenoms oder Plasmide in Form von isolierter DNA von einem Donor auf einen Rezipienten übertragen (Günther, 1991). Für die Transformationen wurden kompetente Zellen nach einem modifizierten Protokoll der Calciumchlorid-Methode nach Mandel und Higa (1970) hergestellt. Als weitere Methode der Transformation wurde die Elektroporation verwendet.

Für die Calciumchlorid-Methode wurden 20 ml LB-Medium 1%ig mit einer „Übernacht“-Kultur von *E. coli* XL1 - Bakterien angeimpft und bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Nach etwa 2 Stunden, wenn die logarithmische Wachstumsphase erreicht ist, wurden für einen Transformationsansatz 2 ml der Bakterienkultur bei 14000 Upm 30 sec in einer Mikrozentrifuge sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen, das so erhaltene Pellet in 1 ml eiskaltem 70 mM CaCl₂ resuspendiert und 30 min im Eisbad inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (30 sec, 14000 Upm) wurde das entstandene Ringpellet in 200 µl 70 mM CaCl₂ resuspendiert. Anschließend wurden die nun „kompetenten“ Zellen mit der jeweiligen DNA versetzt und weitere 30 min im Eisbad inkubiert. Nach einem 90-sekündigen Hitzeschock in einem 42°C-Wasserbad und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium erfolgte schließlich die Inkubation auf einem 37°C-Zellschüttler für 30 min. Auf ampicillinhaltigen Agar-Platten wurden je 100 - 200 µl der Ansätze ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Eine weitere Transformationsmethode ist die Elektroporation, bei der die Zellmembran der Bakterien für kurze Zeit durch einen elektrischen Impuls instabilisiert wird, so dass die extrazelluläre Plasmid-DNA in das Zellinnere diffundieren kann. Für diese Methode wurden zunächst 300 ml LB-Medium mit 5 ml einer „Übernacht“-Kultur von *E. coli* XL1 - Bakterien angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{590nm}) von 0,6 kultiviert. Die Bakterien wurden im Eisbad 15 min vorgekühlt, auf 50-ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und 5 min bei 6000 Upm pelletiert. Bei allen nachfolgenden Schritten befanden sich die Proben auf Eis um eine stetige Kühlung zu gewährleisten. Der Überstand wurde jeweils verworfen, 15 ml 5%iges eiskaltes Glycerol auf das Pellet pipettiert und der Ansatz gut vermischt. Nach einer weiteren Zentrifugation (5 min, 6000 Upm, 2°C) wurde der Überstand dekantiert und 15 ml

5%iges eiskaltes Glycerol hinzugegeben. Es folgten eine Vermischung des Ansatzes und ein erneuter Zentrifugationsschritt (5 min, 6000 Upm, 2°C). Das so entstandene Pellet wurde in 1 ml 5%igem eiskaltem Glycerol resuspendiert und mit 100 µl 87%igem Glycerol vermischt, so dass die Endkonzentration des Glycerols 10% beträgt. Jeweils 80 µl wurden in einem Reaktionsgefäß aliquotiert und bei -70°C bis zur Verwendung gelagert.

Auf Eis wurden die Bakterien aufgetaut und mit der jeweiligen DNA (1 µl) kurz vermischt. Diese Lösung wurde sogleich in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und einem kurzen Elektroimpuls mit Hilfe des Genpulsers ausgesetzt. Anschließend wurde 1 ml vorgewärmtes LB-Medium in die Küvette gegeben, 100 µl dieses Ansatzes auf ampicillinhaltigen Agar-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.1.7. Amplifikation und Isolierung der Plasmid-DNA

Einige der Bakterienwirtszellen nehmen die Plasmid-DNA auf und replizieren sie bei ihrer Vermehrung zusammen mit ihrem eigenen Genom. Die verwendeten Plasmide beinhalten eine Ampicillinresistenz, demzufolge können sich nur diese Bakterienzellen auf den ampicillinhaltigen Agar-Platten vermehren, die zusätzlich die transformierte Plasmid-DNA replizieren. Durch Zugabe des Ampicillins wird eine Selektion der transformierten Bakterien erreicht. Die über Nacht gewachsenen einzelnen Kolonien auf den Selektiv-Agar-Platten ließen sich dann mit einem autoklavierten Zahnstocher in 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium überführen, in dem sie für einige Stunden bei 37°C wachsen konnten. Anschließend wurden die Bakterien in 50 ml frisches ampicillinhaltiges LB-Medium gegeben und über Nacht bei 37°C unter Schütteln vermehrt. Lediglich die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, konnten während dieser Zeit wachsen (Chung et al., 1989). Die Plasmide wurden aus diesen Bakterienkulturen durch Anionenaustausch-Chromatografie mit einem kommerziell erhältlichen „Plasmid-Isolierungs-Kit“ (Qiagen, Hilden) nach Angabe der mitgelieferten Protokolle gewonnen. Die gereinigte DNA wurde in 100 µl Aqua bidest gelöst und die optische Dichte (OD_{260}) am Spektralphotometer bestimmt.

2.2. Kultivierung der HEK293-Zellen

2.2.1. Methoden zur allgemeinen Handhabung der Zellen

Humane embryonale Nierenzellen, die stabil den μ -Opioidrezeptor exprimieren, wurden bei 37°C und 10% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Zur dauerhaften Kultivierung wurden dem DMEM („*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“) 10% fötales Kälberserum (FKS) und 1 μ g Puromycin pro ml Medium zugesetzt. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt (alle 2-3 Tage), oder vorzeitig, wenn das Medium seine Indikatorfarbe von rot-orange auf gelb-orange wechselte. Das verbrauchte Medium war mit der Pipette steril abzusaugen (Vakuumpumpe) ohne dabei die Monolayer-Kultur zu berühren oder zu beschädigen. Anschließend wurde das Kulturgefäß vorsichtig mit PBS ausgeschwenkt, die Spüllösung abgesaugt und durch frisches, auf 37°C vorgewärmtes Medium ersetzt. Danach erfolgte die Reinkubation bei 37°C und 10% Kohlenstoffdioxid im Brutschrank.

Sobald der Boden eines Kulturgefäßes dicht bewachsen war, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mit PBS gespült. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung und leichtes Klopfen auf den Boden des Kulturgefäßes. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf neue Kulturgefäße verteilt, die frisches Medium enthielten. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Einfriermedium (30% FKS, 50% DMEM, 20% DMSO) bei -140°C (flüssiger Stickstoff).

2.2.2. Transfektion und transiente Expression von Fremd-DNA in HEK293 – Zellen

2.2.2.1. Transfektion der Hsc70-siRNA in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen

In MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen kommen die Hitzeschockproteine in hoher Konzentration vor. Um einen Effekt auf die Aktivität des μ -Opioidrezeptors zeigen zu können, sollte die Expression des Hsc70 verringert werden.

RNA-Interferenz (RNAi, Fire et al., 1998) ist dabei ein wichtiges Hilfsmittel zum „*Knock down*“ von Genen in einer Vielzahl von Organismen sowie in menschlichen Zellen. Der Prozess der RNA-Interferenz wird durch *small-interfering-RNA* (siRNA) veranlasst (Elbashir et al., 2001; Caplen et al., 2001). siRNA ist eine aus 21 bis 23 Nukleotiden bestehende doppelsträngige RNA, welche hochspezifisch für eine mRNA-Nukleotidsequenz ist. Sie bildet zusammen mit einer Helikase (entwindet die siRNA) und einer Nuklease (degradiert die Ziel-

mRNA) den *RNA-induced silencing complex* (RISC). Die mRNA-Degradation führt dann zu einem „*Gene silencing*“ auf posttranskriptioneller Ebene (**Abbildung 6**).

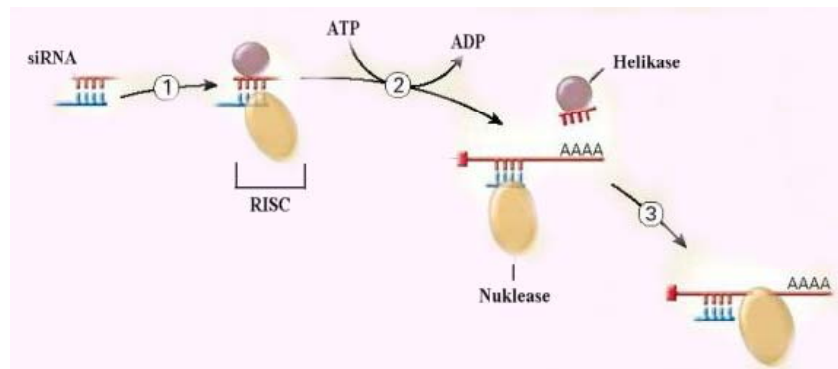


Abbildung 7: Prinzip der RNA-Interferenz durch siRNA.

1) Durch Interaktion der siRNA mit der zellulären Helikase und Nuklease bildet sich der *RNA-induced silencing complex* (RISC). 2) Die Helikase entwindet die siRNA in einem ATP-abhängigen Schritt, sodass eine Interaktion mit der Ziel-mRNA ermöglicht wird. 3) Die Nuklease kann im nächsten Schritt an die mRNA binden und sie degradieren. Schema nach Kitabwalla & Ruprecht, 2002.

Die transiente Transfektion der Zellen mit Hsc70-siRNA wurde mit Hilfe eines Transfektionssystems („Oligofectamine“) der Firma Invitrogen durchgeführt.

MOPr-exprimierende HEK293-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Vertiefung ausgesät und in DMEM, das mit 10% fötalem Kälberserum versetzt war, über Nacht bei 37°C und einem Kohlenstoffdioxidgehalt von 10% inkubiert. Am nächsten Tag wurden in einem Reaktionsgefäß 10 μl Hsc70-siRNA in 175 μl UltraMEM gelöst, in einem weiteren Reaktionsgefäß 3 μl „Oligofectamine“ in 15 μl UltraMEM. Nach einer 5-10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen zusammengegeben, durch vorsichtiges Umkehren des Reaktionsgefäßes gemischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Zellen wurden einmal vorsichtig mit UltraMEM gewaschen und pro Vertiefung wurden 800 μl UltraMEM vorgelegt. Mit einer Pipette wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig kreisförmig auf das frische Medium getropft. Die Kulturschalen wurden dann über Nacht bei 37°C und 10% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Vier Stunden nach Transfektion wurden jeweils 500 μl DMEM mit 30% FKS zugegeben. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Zellen dann abgelöst und für Western Blot-Analysen verwendet.

2.2.2.2. Transfektion der Plasmid-DNA in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen

Die transienten Transfektionen der MOPr-exprimierende HEK293-Zellen mit den Plasmiden (pcDNA3-AS-Hsc70, pcDNA3.1-RKIP, pcDNA3.1-RKIP-S153A, pcDNA3.1-Leervektor als Kontrolle) wurden mit Hilfe eines Transfektionsreagents („Lipofectamine 2000“) der Firma Invitrogen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen in 100 mm-Zellkulturschalen in einer Dichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen in DMEM/ 10% FKS ausgesät und über Nacht bei 37°C/ 10% CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion sollten die Zellkulturen eine mehr als 80%ige Konfluenz aufweisen. Pro Ansatz wurden in einem Reaktionsgefäß 24 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in 1,5 ml UltraMEM gelöst, in einem weiteren Reaktionsgefäß 30 µl „Lipofectamine“ in 1,5 ml UltraMEM. Nach einer 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Lösungen zusammenpipettiert, durch vorsichtiges Umkehren des Reaktionsgefäßes gemischt und weitere 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach einem vorsichtigen Waschschrift mit DMEM/ 10% FKS, wurden 7 ml frisches Kulturmedium vorgelegt. Mit einer Pipette wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig in das Medium gegeben. Die Kulturschalen wurden dann über Nacht bei 37°C und 10% Kohlenstoffdioxid kultiviert. Nach 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen abgelöst und für weitere Untersuchungen ausgesät.

2.3. Western Blot Analysen

2.3.1. Aufarbeitung der Hsc70-siRNA- und AS-Hsc70-transfizierten MOPr-HEK293-Zellen

Die Zellaufarbeitung erfolgte zunächst durch Absaugen des Mediums aus den Zellkulturschalen und eines zweimaligen vorsichtigen Waschens mit kaltem PBS. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer (enthält Proteinase-Inhibitoren) lysiert, sofort in Reaktionsgefäße überführt und 30 min bei 4°C geschüttelt. Nach einem einstündigen Zentrifugationsschritt bei 18.000 x g/ 4°C befanden sich die gelösten Proteine im Überstand. Um den Einsatz äquivalenter Proteinmengen zu gewährleisten, wurden die Proteinmengen der Überstände nach der von Lowry et al. (1951) beschriebenen Methode bestimmt. Danach wurden die Lysate 1:1 mit einem zweifach konzentrierten SDS-Probenpuffer versetzt, 2 min bei 96°C erhitzt und auf ein 8%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

2.3.2. Isolierung der Glykoproteine mittels Weizenkeim-Agglutinin (WGA)

Glykoproteine (wie z.B. der μ -Opioidrezeptor) können aus dem Lysat mittels Weizenkeim-Agglutinin, das an Agarosekügelchen gebunden ist, isoliert werden. Daher wurde für die Phosphorylierungsuntersuchungen des μ -Opioidrezeptors die Methode der Weizenkeim-Agglutinin-Agarose-Kügelchen verwendet. Die entsprechenden Zellen wurden dafür in Poly-L-Lysin-beschichtete Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 100 mm kultiviert. Bei einer Wachstumsdichte von 70 bis 80% wurden die Zellen einmal vorsichtig mit UltraMEM gewaschen und 30 min mit dem μ -Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO (10 μ M) stimuliert. Danach wurden die Zellkulturschalen einmal mit kaltem PBS gewaschen und mit 1 ml eiskaltem RIPA-Puffer (enthält sowohl Proteinase- als auch Phosphatase-Inhibitoren) lysiert. Die Zellen wurden auf Eis mit einem Zellschaber vom Boden der Schalen entfernt, in Reaktionsgefäße überführt und 30 min bei 4°C geschüttelt. Die Lysate wurden dann 60 min bei 18.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde mit 100 μ l WGA-Kügelchen 2 h bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Nach Sedimentation der Kügelchen mit den adsorbierten Glykoproteinen nach einer kurzen Zentrifugation, erfolgte ein fünfmaliges Waschen mit kaltem RIPA-Puffer. Die gereinigten Proteine wurden in 200 μ l SDS-Probenpuffer durch Erhitzen für 20 min bei 60°C von den Kügelchen gelöst. Danach wurden die abgekühlten, eluierten Proteine auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

2.3.3. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Für diese Arbeit wurde die Methode der diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Tris-HCl-Glycin-Puffersystem verwendet, die hohe Auflösungen und Bandenschärfen der Proteine ermöglicht. Die Proben wurden vor dem Auftragen wie beschrieben in einem SDS-haltigen Probenpuffer erhitzt. Das anionische Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) bildet einen Komplex mit den Proteinen, so dass die Quartärstruktur der Proteine unterbunden ist und die Komplexe im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Auftrennung erfolgt durch den Siebeffekt des porösen Polyacrylamid-Gels nach dem Molekulargewicht. Die elektrophoretische Trennung des Hsc70 bzw. des phosphorylierten μ -Opioidrezeptors wurde mit Trenngelen durchgeführt, die einen 8%igen Acrylamid-Gehalt aufwiesen. Für die Separation der ERK1/2-Kinase wurden Trenngele mit einem 12%igen Acrylamid-Gehalt verwendet. Die Konzentration der Sammelgele, die mit Probenaschen versehen waren, und sowie die 0,1%ige SDS-Konzentration waren für alle Anwendungen

gleich. Äquivalente Proteinmengen der Proben (bei den Phosphorylierungsuntersuchungen ca. 100 µl) in SDS-Probenpuffer wurden in die taschenartigen Vertiefungen des Sammelgels appliziert. Neben den Proben wurde auf jedes Gel stets ein geeigneter Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte nach Auftragen der Proben bei einer Stromstärke von 8 mA pro Gel über Nacht bzw. bei 200 V über einige Stunden, bis die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte (Laemmli, 1970).

2.3.4. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Nach der elektrischen Auftrennung der Proben wurden die Proteine aus der Trenngel-Matrix auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort immobilisiert. Im halbtrockenen Blotverfahren liegen Gel und immobilisierende Membran zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere, die direkten Kontakt zu zwei horizontalen Graphitplatten-Elektroden (unten Anode, oben Kathode) hatten (Towbin, 1979). Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurden luftblasenfrei 3 Lagen von Filterpapier, die Nitrozellulosemembran und das Gel geschichtet. Abschließend wurden 3 Lagen Filterpapier darauf gebracht. Die Filterpapiere, die Nitrozellulosemembran sowie das Gel wurden zuvor in Transferpuffer eingelegt bzw. äquilibriert. Die Blotapparatur wurde mit der Kathodenplatte verschlossen. Der Transfer erfolgte bei einer von der Gelgröße abhängigen angelegten Stromstärke (0,85 mA pro cm² Gelfläche) über einen Zeitraum von 1,5 bis 2 h. Um die freien und unspezifischen Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran zu blockieren, wurde diese für 1 bis 2 h in einer Lösung aus 5% fettfreiem Milchpulver in PBS-T (PBS, pH 7,4; 0,1% Tween 20) inkubiert, anschließend mehrmals mit PBS-T gewaschen und mit den entsprechenden Antikörperlösungen in PBS-T über Nacht bei 4°C leicht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde die Membran nach 30-minütigem Waschen in PBS-T für 2 h mit einer PBS-T-Lösung inkubiert, die den sekundären Antikörper enthielt. Dieser ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, was eine Detektion des Komplexes mit einem verstärkten Chemilumineszenz-System ermöglicht.

2.3.5. Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe

Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe mit dem verstärkten Chemilumineszenz-System im Immunoblot wurde mit Hilfe kommerziell erhältlicher Detektionslösungen der Firma Amersham durchgeführt. Eine Lösung enthält das Luminol, welches bei der Oxidation mit dem Wasserstoffperoxid aus der zweiten Lösung eine Chemilumineszenz entwickelt. Eine zweite Lösung enthält das Substrat für die Meerrettichperoxidase, das Wasserstoffperoxid, sowie eine Verstärkersubstanz, die eine stärkere und länger anhaltende Chemilumineszenz bewirkt. Die beiden Detektionslösungen wurden 1:1 vermischt und für 1 bis 2 min mit der Nitrozellulosemembran inkubiert. Die bei der ablaufenden Reaktion entstandene Lumineszenz wurde anschließend auf ECL-empfindlichen Filmen sichtbar gemacht.

2.4. Immunozytochemie

2.4.1. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Für die immunozytochemischen Untersuchungen an μ -Opioidrezeptoren wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung verwendet.

Am Vortag wurden dazu autoklavierte Deckgläschen (\varnothing 15 mm) in 12-Loch-Zellkulturplatten mit Poly-L-Lysin beschichtet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurde dreimal mit PBS gewaschen und Kompletmedium vorgelegt. Danach wurden 10^5 transfizierte Zellen, die in Medium resuspendiert wurden, ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit UltraMEM gespült und anschließend 2 Stunden mit dem Primär-Antikörper (affinitätsgereinigter Kaninchen-HA in UltraMEM, 1 μ g pro ml) bei 4°C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit UltraMEM wurden die Zellen für 30 min mit dem μ -Opioidrezeptoragonisten DAMGO (1 μ M in UltraMEM) bei 37°C stimuliert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 40 min auf dem Schüttler mit Zamboni-Lösung fixiert. Die auf den Deckgläschen fixierten Zellen wurden mehrmals mit TPBS gewaschen, um anschließend jeweils 3 min mit eiskaltem 50 %igem Methanol und eiskaltem 100 %igem Methanol permeabilisiert zu werden. Nach drei weiteren Waschschriffen mit TPBS und einem Schriff mit TPBS/ 1% Ziegen serum wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur mit TPBS/ 3% Ziegen serum geblockt. Anschließend wurden die Zellen mit dem Sekundär-Antikörper (Cy3-markierter Anti-

Kaninchen-Antikörper in TPBS/ 1% Ziegen Serum) über Nacht auf dem Schüttler bei Raumtemperatur inkubiert, um gebundene primäre Antikörper zu markieren.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen durch die aufsteigende Alkoholreihe (70, 80, 90, 100 % Ethanol) entwässert, mit Roti-Histol I und II entfettet und abschließend mittels *DPX*-Einschlussmittel auf Objektträger eingebettet. Nach mehrstündiger Trockenzeit konnten die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop, das mit einem Krypton/Argon-Laser ausgerüstet ist, betrachtet werden. Dieses Mikroskop blendet unscharfe Informationen, die sich nicht in der Brennebene befinden, aus und ermöglicht nichtinvasive optische Schnitte durch das Präparat. Anhand kompletter optischer Schnittserien kann man die dreidimensionale Verteilung des markierten Proteins in den Zellen untersuchen. Die mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cyanin 3 (Cy 3) markierten Strukturen wurden im Mikroskop durch eine Wellenlänge von 568 nm und einem Bandpass-Emissions-Filter von 570 bis 630 nm angeregt.

2.4.2. Quantitative Messung der Endozytose mittels ELISA

Die ELISA-Technik (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) ermöglicht eine immunologische, quantitative Messung der Endozytose über eine enzymatische Farbreaktion. Für diese Versuche wurde eine 24-Loch-Zellkulturplatte mit Poly-L-Lysin-beschichtet, jeweils 2×10^5 Zellen pro Vertiefung in Kompletmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit UltraMEM 2 h mit dem primären Antikörper (Kaninchen-HA in UltraMEM, 1 µg pro ml) bei 4°C inkubiert und je nach Experiment 30 bis 120 min mit dem µ-Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO (Ansätze in UltraMEM) bei 37°C behandelt. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 45 min mit Zamboni-Lösung unter leichtem Schütteln fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS/ CaCl₂ (1 mM CaCl₂) folgte für 1,5 h bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem Meerrettichperoxidase-konjugierten sekundären Antikörper (Anti-Kaninchen-POD, 1:1000). Nach erneuten Waschschriften mit PBS/ CaCl₂ wurden pro Vertiefung jeweils 250 µl ABTS-Entwicklungslösung (Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat), Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) auf die Zellen gegeben. Die Meerrettich-Peroxidase (POD) bildet einen Komplex mit Wasserstoffperoxid und ist daher in der Lage organische Substrate zu oxidieren. Für diese Versuche ist ABTS als Substrat besonders gut geeignet. Es bildet ein wasserlösliches, metastabiles, grünes Zwischenprodukt, das ein Absorptionsmaximum bei 410 und 650 nm besitzt und deshalb

photometrisch gemessen werden kann. Nach 10 bis 30 min Reaktionszeit wurden jeweils 200 µl der Entwicklungslösung von jeder Vertiefung in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Die Farbreaktion ließ sich dann photometrisch in einem Mikroplattenleser analysieren. Die quantitative Messung der Endozytose geht mit einer liganden-induzierten Abnahme der Antikörper (somit auch der Zahl der Rezeptoren) an der Zelloberfläche einher.

2.5. Bestimmung der intrazellulären cAMP-Akkumulation

Nach Ligandenbindung an die μ -Opioidrezeptoren kommt es zu einer Inhibition der Adenylatzyklase und somit zu einer Verringerung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Durch längere Agonistengabe wird diese Inhibition verringert, so dass der cAMP-Spiegel wieder ansteigt (Desensitisierung). Bei dieser Bestimmung wird die Adenylatzyklase zunächst durch die Substanz Forskolin direkt stimuliert, was zu einer Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle führt, um dann das Potential der Hemmung des Agonisten bestimmen zu können.

Für diese Versuche wurden 5×10^4 Zellen pro Vertiefung in eine Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Loch-Zellkulturplatte in Kulturmedium ausgesät und über Nacht bei 37°C und 10% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium entfernt und durch UltraMEM ersetzt. Für die Desensitierungsuntersuchungen wurden die Zellen für unterschiedliche Zeiträume (0, 0.5, 1, 2, 3 oder 4 h) mit 10 µM DAMGO bei 37°C präinkubiert. Danach wurden die Lösungen abgesaugt, die Vertiefungen mit serumfreien DMEM gespült und anschließend 15 min bei 37°C mit serumfreien DMEM, das 25 µM des adenylatzyklase-stimulierenden Forskolins oder eine Mischung aus 25 µM Forskolin und 10 µM DAMGO enthielt, stimuliert. Nach diesen 15 min wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen, die Zellkulturplatte auf Eis gestellt und die Zellen in 500 µl eiskalter Salzsäure/ Ethanol-Lösung, Mischungsverhältnis: 1/100 (1M HCl/100% Ethanol) lysiert. Die Ansätze wurden in Reaktionsgefäße überführt, mittels Vakuumzentrifuge eingedampft und die Rückstände in Tris-EDTA-Pufferlösung (Amersham) resuspendiert. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte nach Anleitung und mit Hilfe des „cAMP [³H] assay system“ der Firma Amersham (Braunschweig).

Das Prinzip des Assays basiert auf einer Kompetition zwischen unmarkiertem cAMP und einer stets konstanten Menge [³H]-markiertem cAMP um eine hochaffine und hochspezifische Bindungsstelle eines cAMP-bindenden Proteins. Die gebundene Radioaktivität des Proteins wird indirekt mittels Szintillatorflüssigkeit im β -Counter 1900TR, Packard, ausgewertet.

Je mehr [^3H]-markiertes cAMP am Protein gemessen wird, desto geringer ist der Anteil an unmarkiertem cAMP in der Probe.

2.6. Aktivierung der extrazellulär regulierten Kinase (ERK 1/2)

Durch Stimulation des μ -Opioidrezeptors werden die extrazellulär regulierten Kinasen (ERK 1 und 2) aktiviert, die weitere Reaktionskaskaden auslösen. Diese Proteinkinase, auch MAP-Kinase 1 und 2 genannt (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen), gehören zu den Serin/Threonin-Kinasen. Für viele G-Protein-gekoppelte Rezeptoren ist beschrieben, dass nach einer Ligandenbindung die MAP-Kinasen 1/2 innerhalb weniger Minuten an diesen beiden Aminosäuren phosphoryliert werden (Yang et al.; 1997, Polakiewicz et al.; 1998, Luttrell et al., 1999). Um die phosphorylierten ERK 1/2 nach einer Stimulation der μ -Opioidrezeptoren zu erfassen, wurden $1,5 \times 10^5$ Zellen pro Vertiefung in Poly-L-Lysin-beschichtete 12-Loch-Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht in DMEM/ 0,5% FKS bei 37°C/ 10% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst 2 h in UltraMEM inkubiert und anschließend 5 min mit 1 μM DAMGO bei 37°C behandelt. Danach wurde die Lösung abgesaugt, einmal mit PBS gewaschen und 250 μl heißer SDS-Probenpuffer auf die Zellen gegeben. Die lysierten Zellen wurden 5 min bei 95°C erhitzt und kurz zentrifugiert. Dann erfolgte die Auftrennung der Proteine aus dem Überstand über eine 12%ige SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese und der Transfer auf eine Nitrozellulosemembran. Die liganden-induzierte Phosphorylierung von ERK wurde schließlich im Immunoblot mit dem monoklonalen phosphospezifischen Antikörper (Anti-ERK 1/2) detektiert. Des Weiteren wurde der Gesamtgehalt von nicht-aktivierten ERK 2 in den Proben mit nicht-phosphospezifischen Antikörpern quantifiziert.

2.7. Datenanalyse

Die immunozytochemischen Bilder wurden mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogramms *Adobe Photoshop 5.5* zusammengestellt. Die Daten der cAMP-, ELISA- und ERK1/2-Assays wurden mit dem Computerprogramm *GraphPad Prism 3.0 Software* ermittelt. Statistische Auswertungen erfolgten mit den darin integrierten Statistikprogrammen.

Die Proteinbanden auf den ECL-empfindlichen Filmen der Phosphorylierungs- und phospho-ERK1/2-Studien wurden densitometrisch mit Hilfe des Computerprogramms *NIH-Image 1.57* ausgewertet.

3. Material

3.1. Chemikalien, Enzyme und Reagenzansätze

Die verwendeten Enzyme wurden bezogen von:

Ligase, Ligationspuffer, Fa. Gibco, Eggenstein

PCR –Reagenzien, Fa. Promega, Mannheim

Restriktionsenzyme: Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.

Oligonukleotide: Fa. Metabion, Martinsried; Fa. Qiagen-Xeragon, USA

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von folgenden Firmen erhalten:

Bachem (Heidelberg), Biochrom (Berlin), Biozym (Hess. Oldendorf), Calbiochem (Schwalbach), Chemapol (Prag), Dianova (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Gibco (Eggenstein), Gramsch (Schwabhausen), ICN (USA), Invitrogen (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen).

Reinstwasser wurde durch Umkehrosmose mit dem Milli-Q[®] Plus 10 Water System (millipore Corporation, Eschborn) gewonnen.

Verwendete Oligonukleotide:

hHsc 70 AS forward (Sequenz 5′- GGC CTA CAC TCT AGA AAC ATG TCC AGG G -3′)

hHsc 70 AS revers (Sequenz 5′- GTG GAA CAA AGC TTC ATC TAC ACT TGG TTG -3′)

Hsc 70-siRNA (Sequenz 5′- UGA CAA GGG CCG UUU GAG C -3′),

RKIP EcoR I forward (Sequenz 5′- CTC CCG GCT GAA TTC TCT GCT TGG CCT CGC -3′)

RKIP-S153A revers (Sequenz 5′- GGC CCT GAG CTC ATA CTT TTT ACG GAA GGC CGC CAC -3′)

Reagenzansätze:

cAMP-radioimmunoassay-Kit, Fa. Amersham Biosciences, Braunschweig

Sequenzier-Kit, Fa. Licor, USA

DNA-Aufreinigungs-Kit, Fa. Qiagen, Hilden

ABTS-Lösung (Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)),
Fa. Roche, Mannheim

3.2. Vektoren, rekombinante Expressionsplasmide und Antikörper

Vektoren:

pEAK10 (Edge Bio System, USA)
pcDNA3, pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe)

verwendete rekombinante Expressionsplasmide:

MOPr-Expressionsplasmid

Die cDNA des μ -Opioidrezeptors aus der Ratte wurde von Dr. Thomas Koch am Amino-Terminus mit Hämagglutinin (HA) markiert und in ein pEAK10-Expressionsvektor subkloniert.

RKIP-Expressionsplasmid

Die cDNA des RKIP wurde von Dr. Thomas Kroslak in einen pcDNA3.1-Expressionsvektor subkloniert.

verwendete Antikörper:

Affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchen Anti-HA Antikörper (Fa. Gramsch, Schwabhausen)

Cyanin-3-Anti-Kaninchen, sekundärer Antikörper (Fa. Dianova, Hamburg)

Meerrettich-Peroxidase-Anti-Kaninchen (Fa. Amersham Biosciences, Braunschweig)

Anti-Hsc 70 (Fa. Stressgen Biotechnologies, Kanada)

Anti-phospho-MOP (Ser³⁷⁵) (Fa. Cell Signaling Technology, USA)

Anti-phospho-ERK (Fa. Cell Signaling Technology, USA)

Anti-ERK 2 (Fa. Santa Cruz Biotechnology, USA)

3.3. Bakterien und Zelllinien

E. coli XL1, Fa. Promega, Mannheim

Humane embryonale Nierenzellen HEK293 (ATCC CRL 1573)

3.4. Lösungen und Kulturmedium

Kulturmedium für HEK293-Zellen:

500 ml DMEM – Medium (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Fa. BioWhittaker Europe, Belgien)
10 % fötales Kälberserum (Fa. Biochrom)
220 µl Puromycin (2,5 mg/ ml, Endkonzentration: 1 µg/ ml)

LB-Agar:

32 g LB Agar mit 1 l Aqua bidest aufgefüllt.

LB-Medium:

20 g LB broth base mit 1 l Aqua bidest aufgefüllt.

1 x PBS:

137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 8,1 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,4.

Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA-Puffer):

50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40,
0,5% Na-Deoxycholat, 0,1% SDS,
folgende Proteinase-Inhibitoren: 10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A,
5 µg/ml Aprotinin, 1 µg/ml Bacitracin, 1 µg/ml Soybean Trypsin Inhibitor,
0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF),
folgende Phosphatase-Inhibitoren: 10 mM NaF, 10 mM Dinatrium-Pyrophosphat.
(Proteinase-/Phosphatase- Inhibitoren werden direkt vor Gebrauch zugegeben)

SDS-Probenpuffer:

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2% SDS, 20% Glycerol, 0,005% Bromphenolblau,
100 mM DL-Dithiotreitol. (Dithiotreitol wurde direkt vor Gebrauch zugegeben)

1 x TAE-Puffer (Agarosegelelektrophorese):

40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA (pH 8,0).

1 x TPBS (Tris/phosphate-buffered saline):

10 mM Tris, 10 mM Phosphatpuffer, 137 mM NaCl, 0,05% Thimerosal, pH 7,4.

Trypsin/EDTA:

0,5 mM EDTA, 0,05% Trypsin.

Zamboni-Fixierlösung:

4% Paraformaldehyd, 0,2% Pikrinsäure, in Phosphatpuffer gelöst, pH 6,9.

3.5. Geräte

Abzugstisch „Variolab Mobilen W90“, Fa. Waldner-Laboreinrichtungen, Wangen

Blotting-Apparatur „Pharmacia LKB Multiphor II“, Fa. Pharmacia, Karlsruhe

Brutschrank „BB 6220 CU“, Fa. Heraeus Instruments, Hanau

2-D-Elektrophoresekammer „Protean II XL-System“, Fa. Bio-Rad, München

DNA-Sequencer „Model 4000“, Fa. LI-COR, USA

Drucker „Hewlett Packard Laser Jet 2100 TN“, Fa. Hewlett Packard, USA

Durchlichtmikroskop „Telaval 31“, Fa. Zeiss, Jena

ELISA-Reader „Expert Plus Microplate Reader“, Fa. ASYS, Österreich

Gene Pulser II und Pulse Controller Plus, Fa. Bio-Rad, München

*Gilsonpipetten „Pipetman“, 0,1-2 µl, 0,5-10 µl, 10-100 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl,
Fa. Abimed, Langenfeld*

*Konfokales Laser Scan Mikroskop „Leica TCS NT“, Fa. Leica Instruments,
Heidelberg*

Kühlzentrifuge „Allegra™ 21R“, Fa. Beckman, USA

Millipor-Anlage „Milli-Q Plus“, Fa. Millipor, UK

pH-Meter „AR 15“, Fa. Fischer, USA

PCR-Gerät „DNA Engine PTC-200“ (Peltier Thermal Cycler), Fa. Biozym, Oldendorf

Präzisionswaage, Fa. Sartorius, USA

37°C-Schüttel-Inkubator „Certomat“, Fa. Saur, Reutlingen

Schüttler „Heidolph UNIMAX 2010“, Fa. Bachofer, Reutlingen

*Spannungsquelle „Elektrophoresis Power Supply Modell 3000 xi“, Fa. Bio-Rad,
München*

Spektralphotometer, Fa. Biochrom, UK

Sterilbank, Fa. BDK, Reutlingen

Tri-Carb 1900 TR Liquid Scintillation Analyser, Fa. Packard, USA

Trockenschrank, Fa. Memmert, Schwabach

Vakuumpumpe, Inotech AG, Pottikon, Schweiz

Vakuumpumpe, Inotech AG, Pottikon, Schweiz

Vortex, Fa. Bachofer, Reutlingen

Wasserbad, Fa. Julabo, Seelbach

Zentrifuge "Eppendorf 5415C", Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

3.6. Verbrauchsmaterialien

Chemilumineszenz-Filme, Fa. Amersham Biosciences, Braunschweig

Deckgläser, rund Ø 15 mm, Fa. Gaudig, Osterweddingen

Einmalpipetten, verschiedene Größen, Fa. Greiner, Frickenhausen

Gewebekulturflaschen/ Gewebekulturschalen, Fa. Greiner, Frickenhausen

Nitrozellulose-Membranen, Fa. Amersham Biosciences, Braunschweig

Objektträger, Glas, SuperFrost, Fa. Roth, Karlsruhe

Pipettenspitzen, verschiedene Größen, Fa. Greiner, Frickenhausen

Reaktionsgefäße, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

Szintillatorröhrchen, aus Polypropylen, 8 ml, Fa. Packard, USA

Zellkulturplatten, 6, 12 oder 24 Vertiefungen, Fa. Biochrom, Berlin

Zentrifugenröhrchen, aus Polypropylen, 15 ml und 50 ml, Fa. Greiner, Frickenhausen

96-Loch-Platten, Fa. Greiner, Frickenhausen

Ferner das übliche Laborzubehör und *Glasgebrauchsmaterial*.

4. Ergebnisse

4.1. Der Einfluss des *Heat Shock Cognate 70* - Proteins (Hsc70) auf den zellulären Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors (MOPr)

4.1.1. Verminderung der Hsc70-Expression

Um eine mögliche essentielle Funktion des Hsc70-Proteins auf den Transport des MOPr nachweisen zu können, sollte die Hsc70-Genexpression mittels siRNA-Technologie vermindert werden. Für diesen Versuch wurden kurze doppelsträngige siRNA-Oligonukleotide, die eine spezifische Sequenz der Hsc70-mRNA aufweisen, in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen transfiziert. Nach 24h, 48h oder 72h wurden die Zellen aufgearbeitet und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Äquivalente Proteinmengen wurden auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem Hsc70-spezifischen Antikörper inkubiert. **Abbildung 8 zeigt** die immunreaktiven Banden des Hsc70 bei ca. 70 KDa. Es wird deutlich, dass keine Verminderung der Proteinexpression stattgefunden hat.

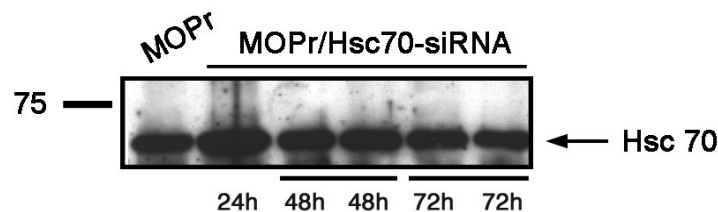


Abbildung 8: Western-Blot-Untersuchungen von Hsc70-siRNA-transfizierten MOPr/HEK293-Zellen. MOPr-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit Hsc70-siRNA transfiziert und nach 24h, 48h oder 72h aufgearbeitet. Untransfizierte MOPr/HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Äquivalente Proteinmengen wurden dann einer 8%igen SDS-PAGE unterworfen. An der linken Seite des Blots befinden sich die Positionen des Molekulargewichts-Standards (in KDa). Zwei weitere voneinander unabhängige Experimente ergaben ähnliche Resultate.

Da die Transfektion der Hsc70-siRNA nicht den gewünschten Effekt zeigte, wurde ein Plasmid konstruiert, in welches die DNA des Hsc70 entgegen der Transkriptionsrichtung ligiert wurde. Durch Transfektion dieses Konstruktes in MOPr-exprimierende HEK293-Zellen wird ein Anti-Hsc70-Transkript (AS-Hsc70) permanent exprimiert. Somit sollte eine Inhibition der Hsc70-Expression erreicht werden. Es war jedoch nicht möglich stabil exprimierende AS-Hsc70/MOPr-HEK293-Zellen zu erhalten, da die Zellen während der Selektionsphase starben. Das Ausschalten des Hsc70 scheint also für die HEK293-Zellen letal zu sein. Um eine hohe Transfektionseffizienz sicherzustellen, entschieden wir uns daher für eine mehrmalige transiente Transfektion. Die MOPr/HEK293-Zellen wurden einmal wöchentlich mit dem AS-Hsc70-Konstrukt transfiziert. 48h nach der 3. Transfektion wurden die Zellen aufgearbeitet, lysiert und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Äquivalente Proteinmengen wurden auf ein 8%iges SDS-Gel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit dem Hsc70-spezifischen Antikörper inkubiert. Die Banden wurden densitometrisch vermessen und in Relation zueinander gesetzt. Wie in **Abbildung 9** ersichtlich, konnte die Expression von Hsc70 durch dreimalige Transfektion des Anti-Hsc70-Transkripts deutlich verringert, jedoch nicht vollständig unterdrückt werden. Der Quotient Hsc70 : Actin beträgt für die MOPr/HEK293-Zellen 1,43 (entspricht 100%), während er für die AS-Hsc70-transfizierten MOPr/HEK293-Zellen 0,87 (entspricht 60,7%) ergibt. Die Hsc70-Proteinmenge konnte also um etwa 40% reduziert werden.

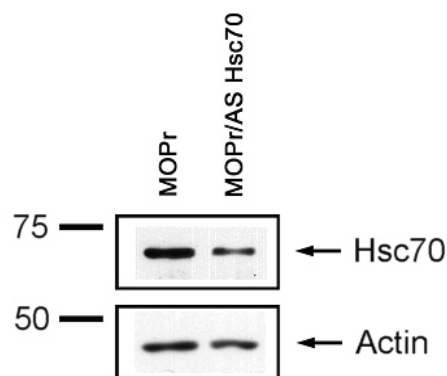


Abbildung 9: Western Blot-Untersuchungen von AS-Hsc70-transfizierten MOPr/HEK293-Zellen. MOPr-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit AS-Hsc70 transfiziert und nach 48h aufgearbeitet. Mit einem Leer-Vektor transfizierte MOPr/HEK293-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Das nicht-regulierte Protein Actin diente als Kontrollprotein. An der linken Seite des Blots befinden sich die Positionen des Molekulargewichts-Standards (in kDa). Zwei weitere voneinander unabhängige Experimente ergaben ähnliche Resultate.

4.1.2. Einfluss der Verringerung der Hsc70-Expression auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOPr

Es ist bekannt, dass Hsc70 mit endozytotischen Vesikelmembranen interagiert, am ATP-abhängigen Abbau des Clathringerüsts beteiligt und somit in die clathrin-vermittelte Endozytose involviert ist. Da der MOPr ebenfalls clathrin-vermittelt internalisiert, ist eine regulatorische Funktion des Hsc70 denkbar.

Stabil exprimierende MOPr/HEK293-Zellen wurden dreimal mit einem Leervektor oder mit AS-Hsc70 transfiziert und mit dem μ -Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO inkubiert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Mittels eines spezifischen Primär-Antikörpers (Kaninchen-HA) und eines Cy3-markierten Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen-HA) konnte die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren durch konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie untersucht werden.

Wie **Abbildung 10** zeigt, ist der MOPr in den unbehandelten Zellen in der Plasmamembran lokalisiert (Kontrolle). Nach einer 30-minütigen Behandlung mit DAMGO werden die MOPr in vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas detektiert. Die Rezeptoren sind in den MOPr/HEK293-Zellen deutlich internalisiert. In den MOPr/HEK293-Zellen, die mehrfach mit AS-Hsc70 transfiziert wurden, ist die Endozytose vermindert. Dadurch sichtbar, dass ein Teil der MOPr weiterhin in der Plasmamembran lokalisiert ist.

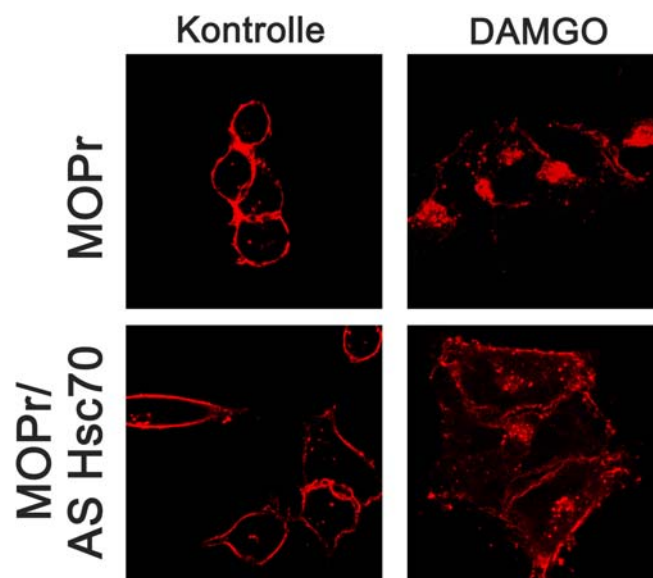


Abbildung 10: Vergleich der Endozytose des MOPr nach Transfektion von AS-Hsc70.

HEK293-Zellen, die den MOPr stabil exprimieren, wurden nach Vorinkubation mit dem Anti-HA-MOPr (Primär-Antikörper) bei 4°C mit 1 µM DAMGO für 30 min bei 37°C behandelt. Nach Fixierung der Zellen und Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper wurde die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren mit Hilfe der konfokalen Laserscannmikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von mindestens drei voneinander unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen.

Durch Verwendung der ELISA-Technik kann eine quantitative Aussage über das Ausmaß der Internalisierung des MOPr getroffen werden. Dazu wurden MOPr-exprimierende HEK293-Zellen, die entweder mit dem Leervektor oder mit AS-Hsc70 transfiziert wurden, mit Anti-HA-MOPr aus dem Kaninchen bei 4°C präinkubiert, um sicherzugehen, dass nur die membranständigen MOPr markiert werden. Nach einer 2-stündigen Behandlung mit den Agonisten DAMGO bei 37°C wurden die Zellen fixiert und mit dem Meerrettich-Peroxidase konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörper (sekundärer Antikörper) inkubiert. Die Quantifizierung der Rezeptor-Internalisierung erfolgt dann durch photometrische Bestimmung der Umsetzung eines Substrates der Peroxidase. Anhand der prozentualen Verringerung der Oberflächenrezeptoren in den agonisten-behandelten Zellen konnte auf die Internalisierung des MOPr geschlossen werden.

Abbildung 11 zeigt die quantitativen Resultate der Untersuchungen. Durch Verringerung der Hsc70-Expression vermindert sich die DAMGO-stimulierte Endozytose des MOPr signifikant. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate der konfokalen Immunfluoreszenz-Mikroskopie. Hsc70 scheint also eine Schlüsselrolle bei der agonist-induzierten Endozytose des MOPr zu spielen.

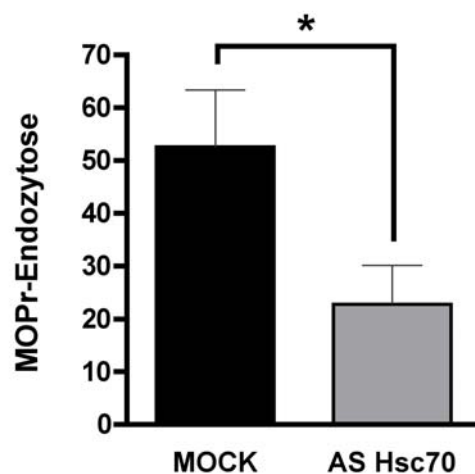


Abbildung 11: Quantitative Analyse der DAMGO-induzierten Endozytose des MOPr nach Transfektion mit AS-Hsc70.

MOPr-exprimierende HEK293-Zellen, die entweder mit einem Leervektor oder mit AS-Hsc70 transfiziert wurden, wurden mit Anti-HA-MOPr bei 4°C inkubiert und anschließend mit 1 µM DAMGO für 2 h bei 37°C behandelt. Nach der Fixierung erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörper. Die Rezeptor-Internalisierung wurde durch den prozentualen Verlust an Oberflächenrezeptoren der DAMGO-behandelten Zellen bestimmt. Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte ± SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten. Die signifikanten Unterschiede (* p < 0,05) wurden mittels t-Test berechnet.

4.1.3. Beeinflussung der agonisten-vermittelten Desensibilisierung des MOPr durch AS-Hsc70

Beim MOPr wird nach Stimulation durch einen Agonisten die Adenylatzyklase über ein inhibitorisches G-Protein gehemmt, wodurch der cAMP-Gehalt in der Zelle abfällt. Die Desensibilisierung des MOPr führt durch eine anhaltende Inkubation mit dem Agonisten zu einer verminderten Fähigkeit des MOPr den cAMP-Spiegel zu hemmen. Mittels Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration konnte der Einfluss der verringerten Hsc70-Expression auf die Desensibilisierung der MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen untersucht werden.

Für die Messungen der agonisten-vermittelten Desensibilisierung wurden die MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen dreimal mit dem Leervektor (MOCK) oder mit AS-Hsc70 transfiziert und anschließend 3 h mit dem µ-Opioidrezeptor-Agonisten DAMGO präinkubiert. Analysiert wurde die Inhibition der Forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation nach Gabe des MOPr-Agonisten DAMGO. Die maximale Reduktion des Forskolin-stimulierten cAMP-Gehalts durch DAMGO wurde dabei als 100% definiert.

Abbildung 12 zeigt, dass nach einer dreistündigen DAMGO-Vorbehandlung die AS-Hsc70/MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen eine maximale Desensibilisierung von ca. 70% und somit eine stärkere Desensibilisierung aufweisen als die MOCK/MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen, die nach 3 h DAMGO zu ca. 60% desensibilisiert sind. Aufgrund der hohen Streuung ist der Unterschied jedoch nicht signifikant.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Verringerung der Hsc70-Expression die DAMGO-vermittelte Desensibilisierung des µ-Opioidrezeptors zu diesem Zeitpunkt tendenziell verstärkt wird.

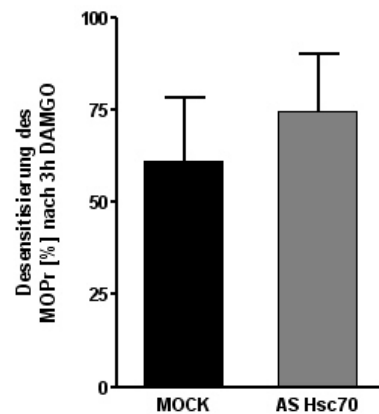


Abbildung 12: DAMGO-induzierte Desensitisierung des MOPr in MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen nach Transfektion mit AS-Hsc70.

Für die Analyse der Rezeptor-Desensitisierung wurden MOPr-exprimierende HEK293-Zellen dreimal mit einem Leervektor (MOCK) oder mit AS-Hsc70 transfiziert. Anschließend erfolgte eine dreistündige Präinkubation mit 10 μ M DAMGO bei 37°C. Nach dem Entfernen der Präinkubationslösung wurden die Zellen für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO (10 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus Doppelbestimmungen drei voneinander unabhängiger Experimente.

Abschließend kann man sagen, dass durch Verminderung der Hsc70-Expression die agonisten-induzierte Endozytose des MOPr reduziert wird. Die Ergebnisse der Desensitierungsuntersuchungen zeigen eine tendenzielle Verstärkung der agonisten-vermittelten Desensitisierung des MOPr durch eine verringerte Hsc70-Expression.

4.2. Der Einfluss des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf den zellulären Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors

4.2.1. Beeinflussung der agonisten-vermittelten Desensibilisierung des MOPr durch RKIP

Für die Messungen der agonisten-vermittelten Desensibilisierung wurden die MOPr- und MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen mit dem MOPr-Agonisten DAMGO für 0,5, 1, 2 und 4 h präinkubiert. Anschließend wurde die Inhibition der forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation nach Inkubation mit DAMGO analysiert. Die maximale Reduktion des forskolin-stimulierten cAMP-Gehalts durch DAMGO wurde dabei als 100% definiert. Die Ergebnisse zeigen, dass die zeitabhängige Abnahme der Hemmung der cAMP-Akkumulation nach Behandlung mit DAMGO in den MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zu den MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen geringer ist (**Abbildung 13**).

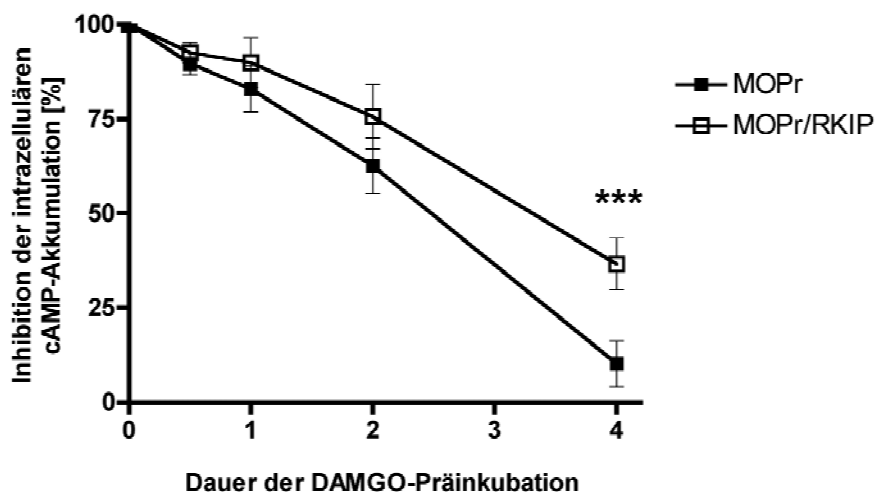


Abbildung 13: DAMGO-induzierte Desensibilisierung des MOPr in MOPr- und MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen.

Für die Analyse der Rezeptor-Desensibilisierung wurden MOPr- bzw. MOPr/RKIP-Zellen bei 37°C in dem angegebenen Zeitraum mit 10 μ M DAMGO präinkubiert. Nach dem Entfernen der Präinkubationslösung wurden die Zellen für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO (10 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus Doppelbestimmungen vier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (*** $p < 0,001$) zwischen den verschiedenen Zelllinien, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Nach einer zweistündigen DAMGO-Vorbehandlung zeigte der μ -Opioidrezeptor in den MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen eine maximale Desensibilisierung von ca. 40%, verglichen mit ca. 25% bei den MOPr/RKIP-Zellen.

Nach vier Stunden zeigt sich eine fast vollständige Desensibilisierung des MOPr in den MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen, während der MOPr in den MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen nur zu ca. 60% desensibilisiert war.

Diese Ergebnisse zeigen, dass durch Koexpression von RKIP die DAMGO-vermittelte Desensibilisierung des μ -Opioidrezeptors verringert werden kann.

4.2.2. Beeinflussung der agonisten-induzierten Phosphorylierung des MOPr durch RKIP

Der Mechanismus der Desensibilisierung beruht auf der agonisten-induzierten Phosphorylierung des MOPr durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und second messenger-regulierte Proteinkinasen (z.B. CaM Kinase II). Nach Bindung des Agonisten und Aktivierung des Rezeptors phosphorylieren diese Kinasen bestimmte Aminosäurenreste (Serine und Threonine) in den intrazellulären Schleifen des μ -Opioidrezeptors. Die Phosphorylierung der aktivierten Rezeptoren führt zu einer Bindung von β -Arrestinen und damit zur Entkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen (Desensibilisierung).

Es sollte daher mittels Western-Blot-Untersuchungen überprüft werden, ob die verzögerte Desensibilisierung nach Koexpression von RKIP in HEK293-Zellen, die den μ -Opioidrezeptor stabil exprimieren, durch eine verringerte Phosphorylierung hervorgerufen wird bzw. ob die Koexpression von RKIP die agonisten-induzierte Phosphorylierung beeinflusst. Da von RKIP gezeigt wurde, dass es die GRK2 hemmt, könnte es die agonisten-induzierte MOPr-Phosphorylierung hemmen. Für diese Untersuchungen wurde ein spezifischer Antikörper verwendet, der selektiv das phosphorylierte Serin375 (spezifische GRK2-Phosphorylierungsstelle) am C-Terminus des μ -Opioidrezeptors erkennt.

Nach Behandlung der MOPr- und MOPr/RKIP-exprimierende HEK293-Zellen mit dem MOPr-Agonisten DAMGO sind auf den Blots die immunreaktiven Banden der phosphorylierten Rezeptoren bei ca. 75 KDa zu sehen. Die Stimulation mit DAMGO führt zu einer starken Phosphorylierung des Rezeptors in den MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen, während die Koexpression von RKIP zu einer ca. 30% verringerten Phosphorylierung dieser spezifischen GRK2-Stelle führt (**Abbildung 14**).

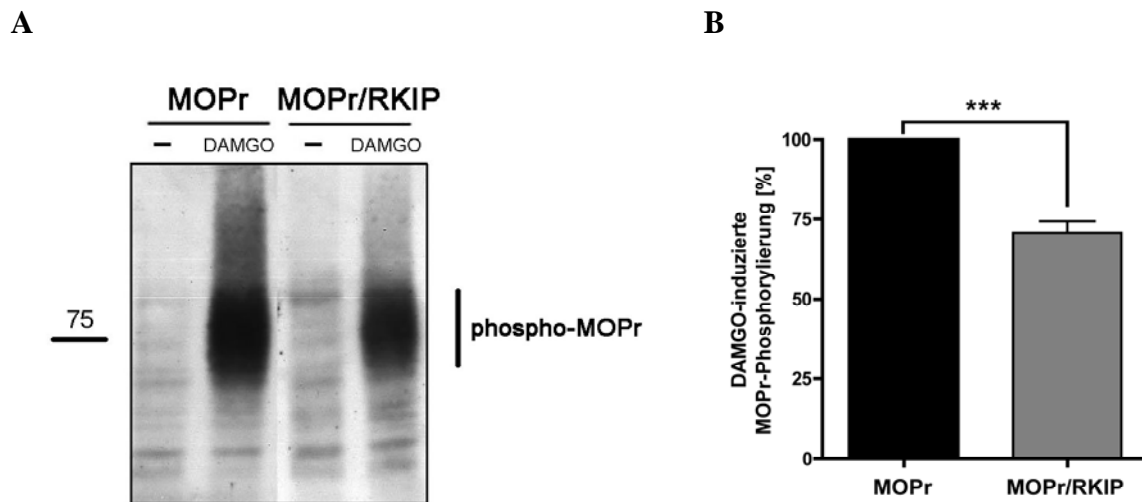


Abbildung 14: DAMGO-induzierte Phosphorylierung des MOPr nach Koexpression von RKIP.

(A) HEK293-Zellen, die den MOPr oder MOPr/RKIP exprimieren, wurden oder wurden nicht mit 10 μ M DAMGO für 30 min behandelt, lysiert und immungeblotet, wie unter „Methoden“ beschrieben. Die Detektion der phosphorylierten MOPr erfolgte mittels eines Antikörpers, der spezifisch für den Ser³⁷⁵-phosphorylierten MOPr ist. An der linken Seite des Blots befinden sich die Positionen des Molekulargewichts-Standards (in kDa). Zwei weitere voneinander unabhängige Experimente ergaben die gleichen Resultate. (B) Die immunreaktiven Banden wurden densitometrisch vermessen und die durchschnittliche Menge an phosphorylierten MOPr graphisch dargestellt. Die Werte repräsentieren Mittelwerte \pm SEM mindestens 5 voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (***) $p < 0,001$ zwischen den verschiedenen Zelllinien, berechnet mittels t-Test.

RKIP entfaltet seine regulatorische Funktion auf den MOPr durch Hemmung der GRK2. Um als GRK2-Inhibitor agieren zu können, muss RKIP an einer spezifischen Aminosäure (Serin153) durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden. RKIP löst sich von Raf, bindet anschließend an den C-Terminus der GRK2 und inhibiert durch Bildung dieses Komplexes die GRK2.

Für weitere Untersuchungen wurde eine spezifische RKIP-Mutante (RKIP-S153A-Mutante) konstruiert, die nicht mehr fähig ist die GRK2 zu inhibieren. Die Aminosäure Serin wurde gegen die Aminosäure Alanin ausgetauscht, dadurch kann die Proteinkinase C das RKIP an dieser Position nicht mehr phosphorylieren.

Zunächst wurde analysiert, welchen Effekt die Koexpression dieser S153A-Mutante auf die Phosphorylierung des MOPr hat. Nach einer 30minütigen DAMGO-Behandlung wurden Phosphorylierungslevel erreicht, die denen der MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen entsprechen (Abbildung 15). Dieses Ergebnis zeigt, dass die Aminosäure Serin153 eine

wichtige Rolle bei der Regulation der RKIP-Funktion spielt. Des Weiteren kann man daraus schlussfolgern, dass RKIP hauptsächlich über eine GRK2-Hemmung auf den MOPr wirkt.

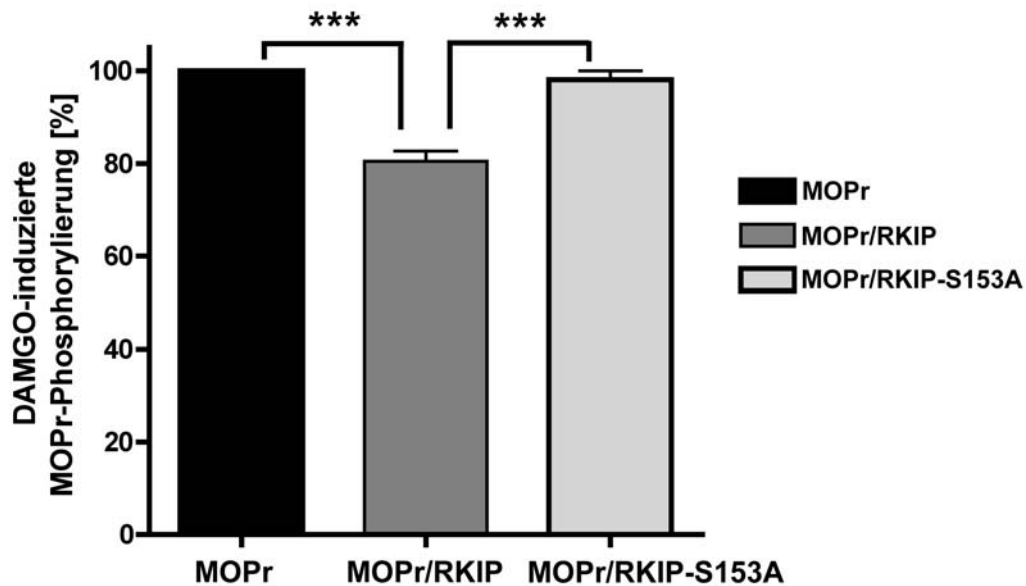


Abbildung 15: Vergleich der DAMGO-induzierten Phosphorylierung des MOPr nach Koexpression von RKIP oder RKIP-S153A.

HEK293-Zellen, die den MOPr, MOPr/RKIP oder MOPr/RKIP-S153A exprimieren, wurden nicht oder mit 10 μ M DAMGO für 30 min behandelt, lysiert und immunblottet. Die Detektion der phosphorylierten MOPr erfolgte mittels eines Antikörpers, der spezifisch für den Ser³⁷⁵-phosphorylierten MOPr ist. Die immunreaktiven Banden wurden densitometrisch vermessen und die durchschnittliche Menge an phosphorylierten MOPr graphisch dargestellt. Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte \pm SEM drei voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede (***) ($p < 0,001$) zwischen den verschiedenen Zelllinien, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.2.3. Einfluss der RKIP-vermittelten GRK2-Inhibition auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOPr

Im nächsten Schritt wurde die Internalisierung des MOPr zwischen MOPr- und MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen verglichen. Die Agonisten-Bindung an den Rezeptor führt zu einer Phosphorylierung des Rezeptors. Damit wird die Bindung von β -Arrestin ermöglicht, dass eine Schlüsselrolle bei der Desensibilisierung sowie auch in der clathrin-vermittelten Endozytose übernimmt. Die Aktivierung des Rezeptors durch den μ -Opioid-Agonisten

DAMGO hat eine Phosphorylierung des μ -Opioidrezeptors zur Folge, so dass die Internalisierung des Rezeptors ausgelöst werden kann.

Die DAMGO-vermittelte Endozytose wurde mittels konfokaler Immunfluoreszenz-Mikroskopie an HEK293-Zellen untersucht, die entweder den MOPr allein oder RKIP bzw. RKIP-S153A koexprimieren. Die Zellen wurden 30 Min mit 1 μ M DAMGO exponiert, anschließend fixiert und permeabilisiert. Mit Hilfe eines spezifischen Primär-Antikörpers (Kaninchen-HA) und eines Cy3-markierten Sekundär-Antikörper (anti-Kaninchen) konnten die Rezeptoren durch indirekte Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Dann wurde die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren mikroskopisch analysiert.

Abbildung 16 zeigt, dass der MOPr in unbehandelten Zellen in der Plasmamembran lokalisiert ist (Kontrolle). Eine 30-minütige Behandlung mit DAMGO induziert eine deutliche Endozytose, dadurch sichtbar, dass der MOPr in Vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas detektiert wird. Eine RKIP-Koexpression hat eine verminderte Internalisierung des MOPr zur Folge; ein Teil der MOPr ist weiterhin in der Plasmamembran lokalisiert. Die Koexpression der RKIP-S153A-Mutante zeigte keine Beeinflussung der Endozytose verglichen mit den MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen. Nach einer 30-minütigen Inkubation mit DAMGO sind die MOPr im gleichen Maße internalisiert.

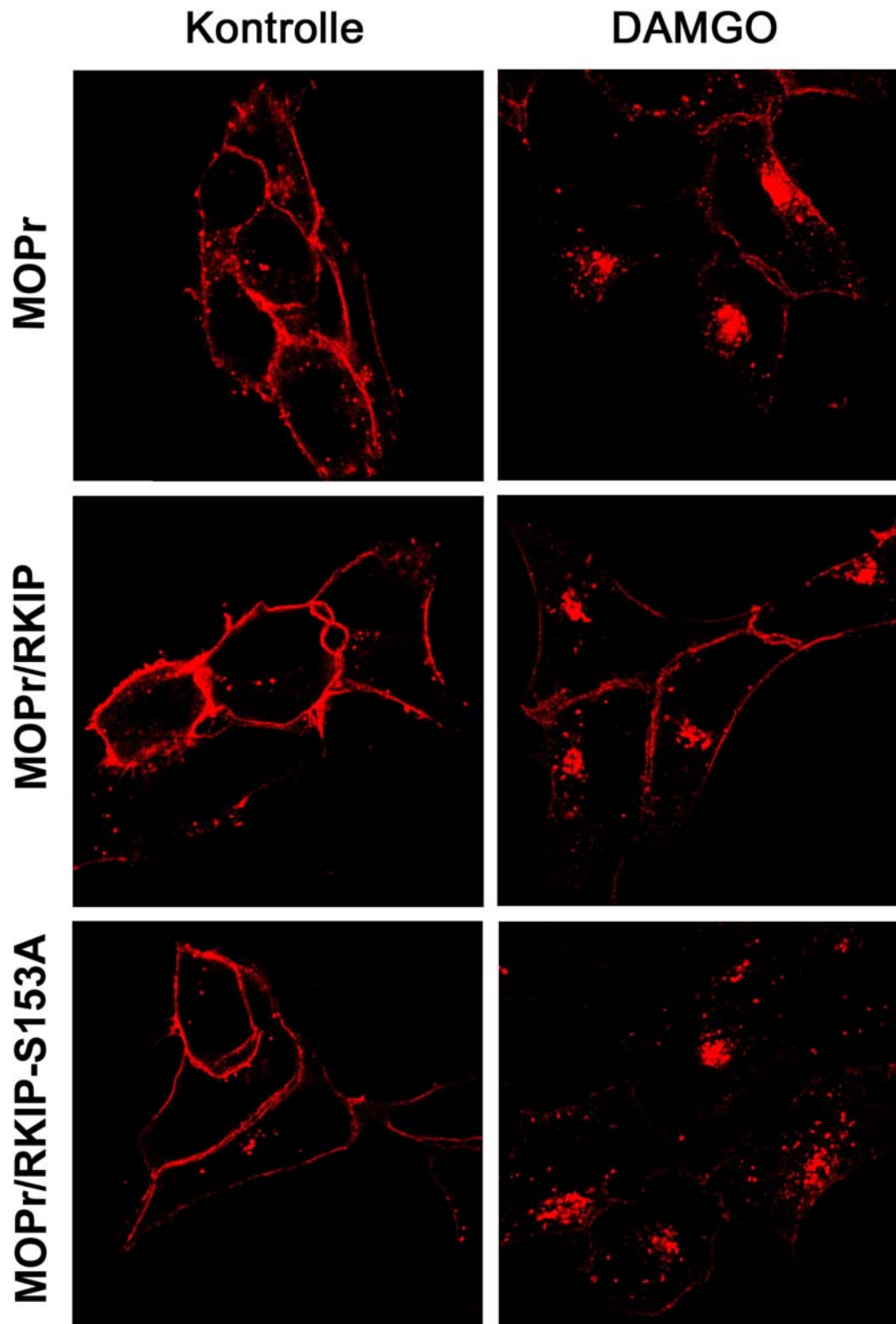


Abbildung 16: Vergleich der Endozytose des MOPr nach Koexpression von RKIP oder RKIP-S153A. HEK293-Zellen, die den MOPr, MOPr/RKIP und MOPr/RKIP-S153A exprimieren, wurden nach Vorinkubation mit dem Anti-HA-MOPr (Primär-Antikörper) bei 4°C mit 1 μ M DAMGO für 30 min bei 37°C behandelt. Nach Fixierung der Zellen und Inkubation mit dem Fluoreszenz-markierten Sekundär-Antikörper wurde die subzelluläre Verteilung der Rezeptoren mit Hilfe der konfokalen Laserscanmikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse mehrerer unabhängiger Experimente mit Doppelbestimmungen.

Um eine genauere Aussage über das Ausmaß der Internalisierung des MOPr treffen zu können, wurde auf eine Quantifizierung der Internalisierung mittels einer ELISA-Technik zurückgegriffen.

In **Abbildung 17** sind die quantitativen Resultate der Untersuchungen dargestellt. Es zeigt sich, dass die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigt werden. Durch Koexpression von RKIP vermindert sich die DAMGO-stimulierte Endozytose des MOPr signifikant. Eine Koexpression der RKIP-S153A-Mutante zeigt keinen Einfluss auf die Internalisierung.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass mittels Koexpression von RKIP die Endozytose des μ -Opioidrezeptors durch Inhibition der GRK2 verringert ist.

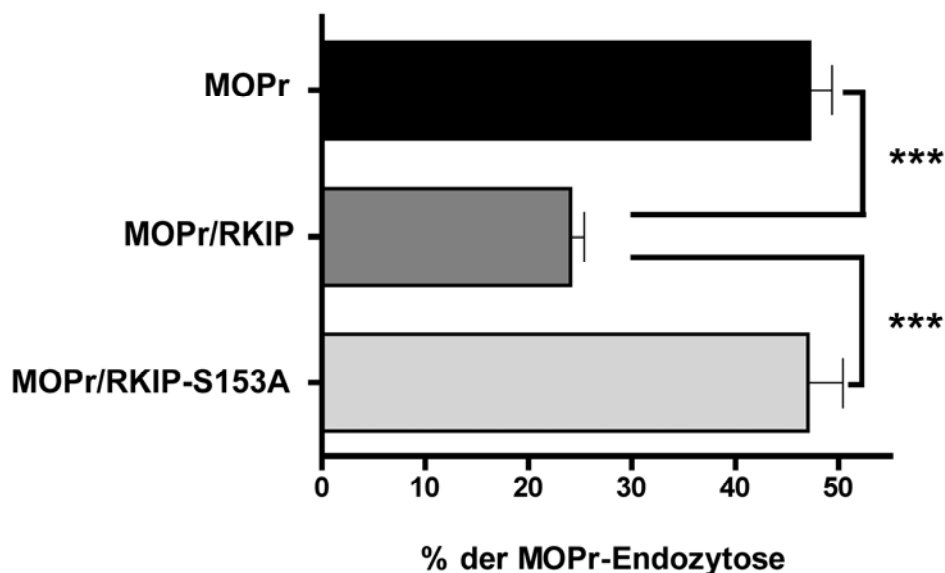


Abbildung 17: Quantitative Analyse der agonisten-induzierten Endozytose des MOPr.

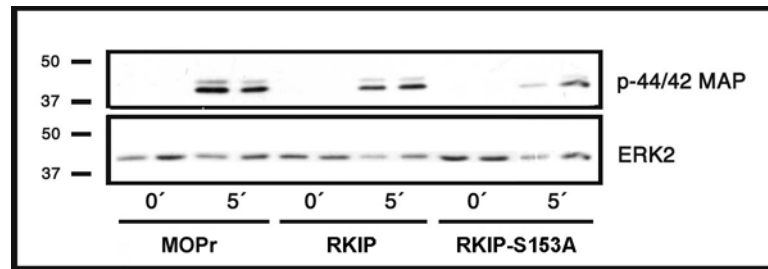
MOPr-, MOPr/RKIP- oder MOPr/RKIP-S153A-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit Anti-HA-MOPr bei 4°C inkubiert und anschließend mit 10 μ M DAMGO für 30 min bei 37°C behandelt. Nach der Fixierung erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen Antikörper. Die Rezeptor-Internalisierung wurde durch den prozentualen Verlust an Oberflächenrezeptoren der DAMGO-behandelten Zellen bestimmt. Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte \pm SEM vier voneinander unabhängiger Experimente. Die signifikanten Unterschiede (***) $p < 0,001$ wurden mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test, berechnet.

4.2.4. Beeinflussung der Aktivierung der MAP-Kinase ERK1/2 durch RKIP

Die Aktivierung des MOPr durch Agonisten wie z.B. DAMGO resultiert in einer schnellen, transienten Stimulation der ERK1/2-Phosphorylierung. HEK293-Zellen, die entweder den MOPr, MOPr/RKIP oder MOPr/RKIP-S153A exprimieren, wurden 5 min mit DAMGO behandelt um den Einfluss der MOPr-Aktivierung auf die Phosphorylierung der ERK1/2 untersuchen zu können. In **Abbildung 18A** ist erkennbar, dass eine 5-minütige Behandlung mit dem MOPr-Agonisten DAMGO zu einer deutlichen Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2 (p44/42 MAP) in MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen führt. Eine Koexpression von RKIP resultiert in einer Verminderung dieser Aktivierung. Durch RKIP wird die MAP-Kinase demzufolge inhibiert. Die Koexpression der RKIP-S153A-Mutante in MOPr/HEK293-Zellen führt zu einer stärkeren Hemmung der MAP-Kinase, da diese RKIP-Mutante dauerhaft an Raf gebunden ist und somit die MAP-Kinase-Signalgebung blockiert. Diese Ergebnisse stellen zugleich eine Kontrolle der RKIP-S153A-Mutante dar und zeigen, dass dieses RKIP-S153A-Protein funktionell ist.

Die immunreaktiven Banden der phosphorylierten ERK1/2 wurden densitometrisch vermessen und mit den immunreaktiven Banden der unphosphorylierten ERK2 normalisiert. Die daraus resultierende MAPK-Aktivität ist in **Abbildung 18B** dargestellt. Der signifikant inhibierende Effekt der RKIP-Koexpression und der RKIP-S153A-Koexpression ist klar erkennbar.

A



B

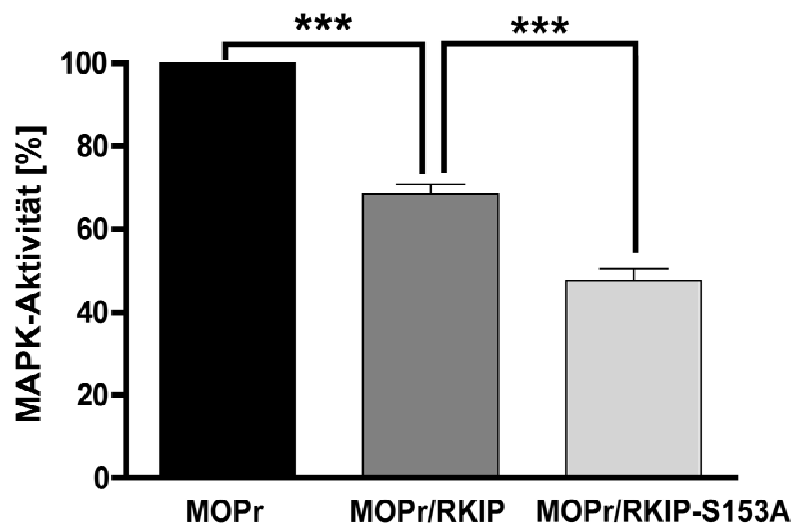


Abbildung 18: DAMGO-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2. (A) MOPr-, MOPr/RKIP- oder MOPr/RKIP-S153A-exprimierende HEK293-Zellen wurden 5 min mit 1 μ M DAMGO behandelt, unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Der Phosphorylierungsstatus der ERK1/2 (p44/42 MAP) wurde im Immunoblot analysiert. Die Gesamtmenge an unphosphorylierter ERK2 wurde zur Kontrolle dargestellt. An der linken Seite des Blots befinden sich die Positionen des Molekulargewichts-Standards (in kDa). Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte mehrerer voneinander unabhängiger Experimente. (B) Die immunreaktiven Banden wurden densitometrisch vermessen und die durchschnittliche Menge an phosphorylierten ERK1/2 als MAPK-Aktivität graphisch dargestellt. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM aus Doppelbestimmungen drei voneinander unabhängiger Experimente. Die signifikanten Unterschiede (***) $p < 0,001$ wurden mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test, berechnet.

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Hitzeschockproteins Hsc70 und des Raf Kinase Inhibitor Proteins RKIP auf den zellulären Transport und die Aktivität des μ -Opioidrezeptors untersucht.

Die Aktivität des MOPr kann durch unterschiedliche Mechanismen beeinflusst werden. Wichtige Aspekte in dieser Regulation sind die Endozytose und die Desensibilisierung des Rezeptors. Mehrere Studien zeigten, dass das konstitutiv exprimierte Hitzeschockprotein Hsc70 eine wichtige Rolle bei der clathrin-vermittelten Rezeptorendozytose spielt. So rekrutiert Hsc70 Clathrin-Gerüste für die Bildung neuer Membranvesikel. Seine ATPase-Aktivität kann durch Auxilin (Kofaktor zur Bindung clathrin-bedeckter Vesikel) stimuliert werden (Holstein et al., 1996; Jiang et al., 1996; Barouch et al., 1997), wodurch das Clathrin-*Uncoating* ermöglicht wird (Ungewickell et al., 1995). Durch Newmyer und Schmid (2001) konnte gezeigt werden, dass Hsc70 Clathrin aus neugebildeten Vesikeln entlässt, zytosolische Clathrin-Gerüste formiert, am Transport der Clathrin-Gerüste beteiligt ist und das Rezeptor-Recycling unterstützt. Diese Studien stützen daher die Theorie, dass das Hsc70 einen großen Einfluss auf die Endozytose und somit auch auf die Aktivität des MOPr haben könnte. Durch Ammon-Treiber et al. (2004) wurde bereits in tierexperimentellen Studien gezeigt, dass durch eine Opiatapplikation (Morphin) die Genexpression vor allem des nicht-konstitutiven Hitzeschockproteins Hsp70, aber auch in geringerem Maße von Hsp 27 und Hsc70, induziert wird. Des Weiteren wurde hypothetisiert, dass die erhöhte Hsp70-Expression nach der Morphingabe eine neuroprotektive Wirkung bei Ischämie, cerebraler Hypoxie und Epilepsien darstellen könnte (Ammon-Treiber et al., 2007).

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst untersucht, wie sich eine Verringerung der Hsc70-Expression auf die Regulation der μ -Opioidrezeptor-Endozytose auswirkt. Eine moderne Methode zur Ausschaltung von Genen ist die RNA-Interferenz. Kleine doppelsträngige RNA-Moleküle (siRNAs) hemmen dabei die Genexpression. Die von uns hierfür verwendete Hsc70-siRNA führte jedoch zu keiner Hemmung der Hsc70-Genexpression. Diese Hsc70-siRNA ist hochspezifisch für die Sequenz des Hsc70. Schon die Veränderung eines Basenpaares der siRNA kann allerdings deren Effizienz drastisch senken. Man benötigt im Allgemeinen mehrere verschiedene siRNA-Oligonukleotide um einen „*Knockdown*“ zu erreichen. Da die Hitzeschockproteine untereinander eine sehr hohe Sequenzhomologie aufweisen, sind die Möglichkeiten der einsetzbaren siRNAs begrenzt. Eine weitere Erklärung für das Nicht-Funktionieren der siRNA besteht in deren Stabilität. Zelleigene RNAsen

könnten die applizierte siRNAs abgebaut haben, wodurch diese nicht mehr wirken können. Ein anderer wichtiger Aspekt ist jedoch die hohe konstitutive Expressionsrate und Stabilität des Hsc70, sodass die siRNA aufgrund der kurzen Einwirkzeit nicht in der Lage war, den Anteil des exprimierten Hsc70-Proteins deutlich zu reduzieren. Daher wurde ein permanentes Anti-Hsc70-Transkript kloniert. Nachdem die MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen dreimal (einmal wöchentlich) mit diesem Antisense-Hsc70-Transkript transient transfiziert wurden, konnte die Expression von Hsc70 deutlich verringert, jedoch nicht vollkommen unterdrückt werden.

Die DAMGO-induzierte Endozytose des MOPr war nach Verringerung der Hsc70-Expression deutlich vermindert. Die MOPr wurden einerseits schlecht internalisiert, das heißt sie blieben in der Membran, andererseits schienen die Vesikel mit den internalisierten Rezeptoren eine veränderte Form aufzuweisen. Bedingt durch das Fehlen des Hsc70 werden die Clathrin-Moleküle falsch zusammgebaut und halten die internalisierten Rezeptoren in den Vesikeln fest. Quantitative Endozytoseversuche belegten die verminderte Internalisierung des μ -Opioidrezeptors nach Hemmung der Hsc70-Expression. Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine wichtige Rolle des Hsc70 in der Endozytose des μ -Opioidrezeptors.

Da durch die Internalisierung der Rezeptoren einer Desensibilisierung entgegengewirkt wird, sollte die Hemmung der Hsc70-Expression in einer stärkeren Desensibilisierung des μ -Opioidrezeptors resultieren. In der Tat konnte in unseren Untersuchungen eine Tendenz zu einer erhöhten Desensibilisierung beobachtet werden.

Nach Aktivierung des μ -Opioidrezeptors durch den Liganden kommt es zur Desensibilisierung des MOPr. Dies führt zu Phosphorylierungen des Rezeptors durch intrazelluläre Kinasen, wie zum Beispiel durch die G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Kinasen (GRKs) oder durch die Calcium/Calmodulin-abhängige (CaM)-Kinase II. Der phosphorylierte Rezeptor bindet nun β -Arrestin, was zur G-Protein-Entkopplung des Rezeptors führt (Ferguson, 2001). Infolge dessen wird der Rezeptor inaktiv bzw. desensibilisiert. In **Abbildung 19** (S. 50) wurde das Modell der möglichen Rolle des Hsc70 auf den Transport des μ -Opioidrezeptors dargestellt: Hsc70 liegt vermutlich gebunden am C-Terminus des MOPr vor, da im *yeast-2-hybrid*-System ein mit dem C-Terminus des MOPr interagierender Klon als Hsc70 identifiziert wurde. Hsc70 löst dann die Bindung von Clathrin an die Zellmembran und somit die clathrin-vermittelte Rezeptorendozytose aus.

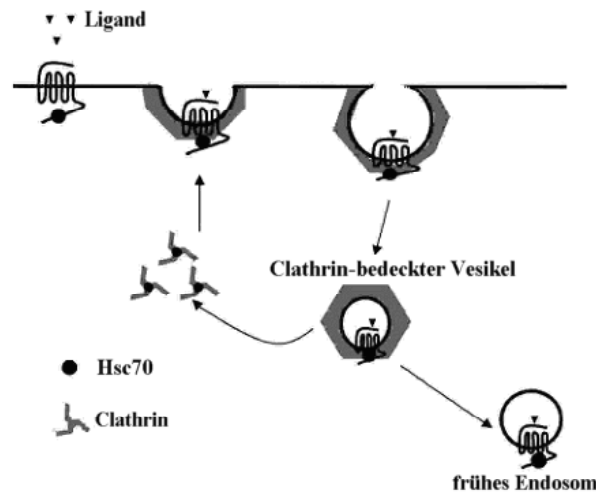


Abbildung 19: Hsc70 interagiert mit dem MOPr und beeinflusst die Endozytose des MOPr.

Hsc70 interagiert mit dem C-Terminus des MOPr und ist sowohl im Zusammenbau von clathrin-bedeckten Vesikeln als auch in der Entlassung neu gebildeter Clathrin-Gerüste involviert.

Durch Rezeptorrücktransport (Recycling) zur Zellmembran werden diese Rezeptoren reaktiviert und eine erneute Signalweiterleitung kann stattfinden. Dieser Prozess wirkt somit der Desensibilisierung entgegen. Wird jedoch die Hsc70-Expression vermindert, dann wird dementsprechend auch die clathrin-vermittelte Endozytose verringert. Geringere Rezeptorendozytose bedeutet ferner ein vermindertes Recycling und eine stärkere Desensibilisierung.

Zusammenfassend kann man sagen, dass unsere Untersuchungen die Bedeutung des Hsc70 in der MOPr-Endozytose belegen. Ebenso weisen sie auf eine Rolle des Hsc70 bei der Desensibilisierung des MOPr hin.

Ein weiteres Protein, das in die Regulationsmechanismen der Opioidtoleranz eingreift, ist das *Raf Kinase Inhibitor Protein* (RKIP). Es moduliert die für den MOPr wichtige Kinase GRK2 und beeinflusst somit die Aktivität des MOPr.

In vorherigen Studien konnte eine Assoziation des RKIP mit G-Proteinen gezeigt werden, es ist jedoch nicht selbst in der Lage GTP zu binden (Grandy et al., 1990; Bucquoy et al., 1994). Im Jahre 2001 zeigte unsere Arbeitsgruppe bereits eine Beeinflussung der heterotrimeren G-Protein-Kopplung und der G-Protein-gekoppelten-Rezeptor-Signaltransduktion durch RKIP (Kroslak et al., 2001). So führte in *Xenopus laevis*-Oozyten die Koexpression des RKIP mit dem MOPr zu einem agonist-induzierten erhöhten Kalium-Einstrom. Des Weiteren konnte eine Erhöhung der opioid-vermittelten Hemmung der Adenylatzyklase in HEK293-Zellen

festgestellt werden. Die Schlussfolgerungen dieser Studie sind, dass RKIP die Opioidrezeptor-G-Proteinkopplung, vermutlich durch einen vermehrten Austausch von GDP zu GTP, aktiviert. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass RKIP als ein physiologischer Inhibitor der GRK2 fungiert (Lorenz et al., 2003). Die agonist-induzierte Desensibilisierung des MOPr erfordert Phosphorylierungen an intrazellulären Rezeptordomänen (Lefkowitz et al., 1998). Diese Phosphorylierungen des G-Protein-gekoppelten Rezeptors erfolgen durch G-Protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRKs) oder durch *second-messenger*-abhängige Kinasen. Es konnte gezeigt werden, dass die GRK2-vermittelte Phosphorylierung wichtig ist für die Desensibilisierung des MOPr (Zhang et al., 1998, Law et al., 2000, Schulz et al., 2004). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss der Koexpression von RKIP auf die Aktivität des μ -Opioidrezeptors in HEK293-Zellen näher untersucht.

Die Desensibilisierungsuntersuchungen weisen daraufhin, dass durch eine RKIP-Koexpression nach chronischer DAMGO-Präinkubation die Desensibilisierung des μ -Opioidrezeptors verzögert ist, was durch eine verminderte GRK2-vermittelte Phosphorylierung des Rezeptors erklärt werden kann. Die durchgeführten Phosphorylierungsversuche untermauern diese Theorie. Durch Koexpression von RKIP nimmt die Phosphorylierung des MOPr an der spezifischen GRK2-Stelle Serin³⁷⁵ um etwa 30% ab. Die Hemmung der GRK2 durch RKIP erfolgt nach Phosphorylierung des RKIP am Serin¹⁵³ durch die Proteinkinase C. RKIP löst sich aus dem Komplex mit Raf und bindet somit die GRK2 am N-Terminus, welcher maßgeblich an der Aktivität der GRK2 beteiligt ist. Um zu überprüfen, ob diese verminderte Phosphorylierung durch die GRK2-Hemmung ausgelöst wurde, wurde eine RKIP-Negativmutante (RKIP-S153A) subkloniert, die nicht mehr am Serin¹⁵³ durch die Proteinkinase C phosphoryliert werden kann. Nach Koexpression dieser RKIP-S153A-Mutante wurde keine Hemmung der Phosphorylierung des MOPr beobachtet. Diese Ergebnisse beweisen einerseits, dass die GRK2 für die Phosphorylierung des μ -Opioidrezeptors am Serin³⁷⁵ verantwortlich ist und RKIP über eine GRK2-Hemmung die Aktivität des μ -Opioidrezeptors beeinflusst, und andererseits, dass RKIP seine GRK2-Hemmung durch Phosphorylierung seines Serin¹⁵³ auslöst.

Die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten am C-Terminus des MOPr ist eine wichtige Voraussetzung für die agonist-induzierte Endozytose dieses Rezeptors. In den folgenden Versuchen sollte deshalb der Einfluss der RKIP-Koexpression auf die DAMGO-induzierte Internalisierung des μ -Opioidrezeptors näher betrachtet werden. Zur Kontrolle wurde ebenfalls die RKIP-S153A-Mutante eingesetzt. Nach einer 30-minütigen DAMGO-Behandlung zeigten die MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen und die mit RKIP-S153A-

transfizierten MOPr/HEK293-Zellen eine deutliche Internalisierung des μ -Opioidrezeptors. Die mit RKIP-kotransfizierten MOPr/HEK293-Zellen zeigten dagegen eine Verminderung der Endozytose. Die Quantifizierung der Endozytose mittels ELISA bestätigte die signifikante Verringerung der Internalisierung nach RKIP-Koexpression. Diese Resultate sind auf die verminderte Phosphorylierung des μ -Opioidrezeptors zurückzuführen, da diese die unmittelbare Voraussetzung für eine Endozytose bildet. **Abbildung 20** (S. 52) zeigt schematisch den hemmenden Einfluss des RKIP auf die Phosphorylierung und demzufolge auch auf die Endozytose des MOPr.

Man kann daher schlussfolgern, dass eine RKIP-Koexpression die Signalgebung des MOPr erhöht und dabei jedoch seine Endozytose verringert. Da durch die Aktivierung des MOPr auch die Proteinkinase C aktiviert wird, die wiederum RKIP phosphoryliert, wird die Aktivität des MOPr weiter erhöht. Durch diese Phosphorylierung kann RKIP die GRK2 binden und somit deren Inhibition ermöglichen.

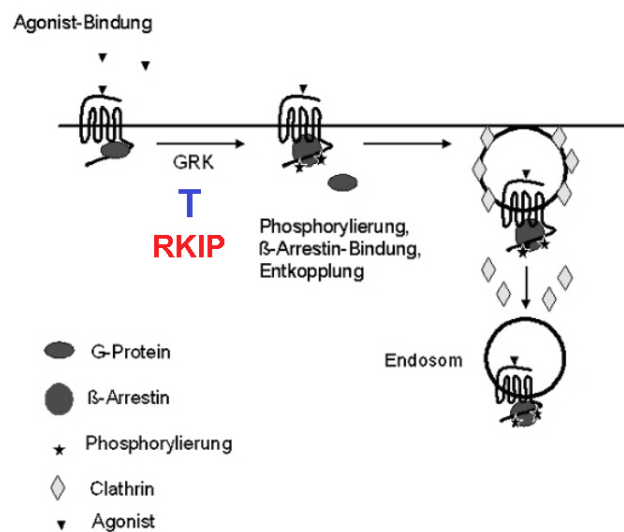


Abbildung 20: Modell der GRK2-Inhibition durch das Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP).

RKIP hemmt (T) durch Bindung an die GRK2 deren Fähigkeit den μ -Opioidrezeptor zu phosphorylieren. Die nachfolgenden Schritte wie β -Arrestinbindung, Entkopplung und Endozytose des Rezeptors sind demzufolge vermindert.

Wie bereits in mehreren Studien gezeigt wurde, stimuliert der MOPr den MAPK-Signalweg (Fukuda et al., 1996, Belcheva et al., 1998). Nach Aktivierung des μ -Opioidrezeptors führt die Freisetzung der $\beta\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins zur Aktivierung von Ras, das wiederum zu einer Aktivierung von Raf und somit von MEK (MAPK-Kinase) führt. Diese MAPK-Kinase phosphoryliert dann die ERK (MAPK). Da der MOPr wie zuvor beschrieben den MAPK

(Mitogen-aktivierte Kinase ERK 1/2) -Weg ansteuert und auch das RKIP in diesen Ablauf eingreifen kann, wurde in einem letzten Teil der Arbeit eine Koexpression von RKIP auf die durch den μ -opioidrezeptor-stimulierte MAPK-Aktivität weiter untersucht.

In unstimuliertem Zustand liegt RKIP sowohl an Raf als auch an MEK gebunden vor, so dass eine Raf-induzierte Aktivierung von MEK und ERK nicht stattfinden kann. Die G-Protein-gekoppelte-Rezeptorkinase (GRK) kann den G-Protein-gekoppelten Rezeptor phosphorylieren und somit die Entkopplung von den G-Proteinen und die Internalisierung auslösen. Durch eine Aktivierung der Proteinkinase C (z.B. durch den G-Protein-gekoppelten Rezeptor) wird RKIP spezifisch am Serin¹⁵³ phosphoryliert. Demzufolge dissoziiert RKIP von Raf und bindet an den N-Terminus der GRK2. Das freie Raf kann nun MEK aktivieren und den MAPK-Weg anschalten. Durch die Bildung des RKIP-GRK2-Komplexes wird die Phosphorylierung und Desensitisierung des μ -Opioidrezeptors vermindert und die Signalgebung verlängert (Keller et al., 2004). **Abbildung 21** verdeutlicht den Einfluss des RKIP auf Raf und die MAPK-Kaskade, sowie auf die μ -Opioidrezeptor-Phosphorylierung,

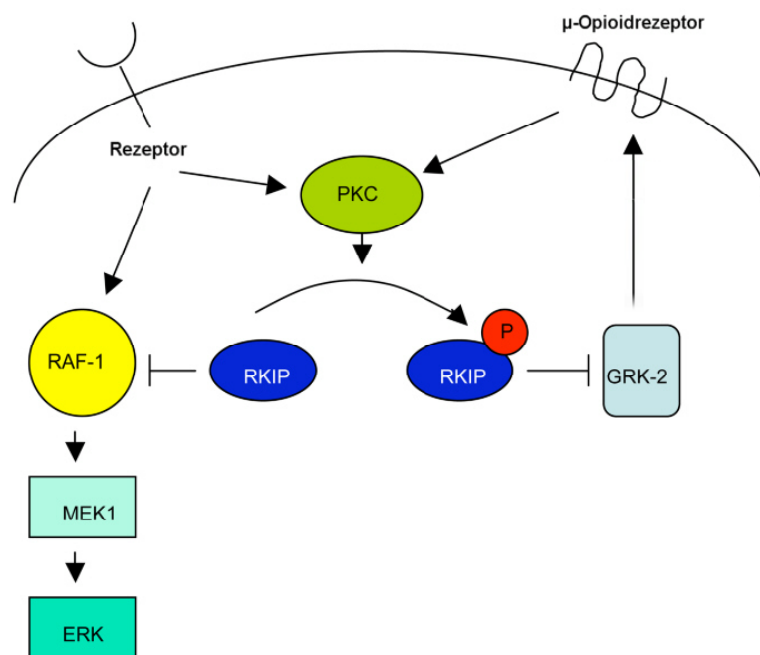


Abbildung 21: RKIP moduliert Raf und die G-Protein-Signalgebung.

RKIP verhindert durch Bindung an Raf die Aktivierung von MEK und ERK. Der G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) kann durch die GRK2 phosphoryliert werden und somit die Entkopplung des Rezeptors vom G-Protein auslösen. Durch Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) wird RKIP phosphoryliert und bindet an die GRK2, wodurch die Phosphorylierung und Desensitisierung des MOP vermindert und die Signalgebung erhöht wird. Das nun freie Raf kann MEK aktivieren und somit die MAPK-Signalkaskade auslösen. Schema nach Klysik et al., 2008.

Unsere Ergebnisse zeigen, dass nach einer 5-minütigen Stimulation mit DAMGO die Aktivierung von ERK 1/2 erfolgt. Nach einer RKIP-Koexpression ist diese vermindert. Eine RKIP-S153A-Koexpression führte sogar zu einer stärkeren Inhibition der ERK 1/2-Aktivierung. Durch die verhinderte Phosphorylierung dieser RKIP-Negativmutante kann RKIP sich nicht aus dem Komplex von Raf lösen und damit kann auch Raf nicht den MAPK-Weg auslösen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sowohl das Hitzeschockprotein *Heat Shock Cognate 70* als auch das *Raf Kinase Inhibitor Protein* die Funktionen des μ -Opioidrezeptors beeinflussen können. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass durch Verminderung der Hsc70-Genexpression die Endozytose des μ -Opioidrezeptors reduziert wurde und die Desensibilisierung tendenziell verstärkt ist. Da der μ -Opioidrezeptor über die clathrin-vermittelte Endozytose internalisiert, bestätigen unsere Ergebnisse die Vermutungen, dass Hsc70 eine bedeutende Rolle in diesem Zyklus übernimmt.

Des Weiteren konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Koexpression von RKIP zu einer verminderten Desensibilisierung des μ -Opioidrezeptors führt, vermutlich aufgrund der verminderten GRK2-Phosphorylierung und der damit verbundenen verlängerten Signaltransduktion des MOPr. Diese Annahme wird durch die in dieser Arbeit durchgeführten Phosphorylierungsexperimente unterstützt, die eine Hemmung der G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinase 2 (GRK2) durch RKIP nachweisen. Eine RKIP-S153A-Mutante, erzeugt durch Sequenzveränderung der spezifischen Phosphorylierungsstelle des RKIP, kann die GRK2 nicht mehr binden und inhibieren, demzufolge ist die Phosphorylierung des C-Terminus des μ -Opioidrezeptors durch die GRK2 unbeeinflusst. Durch die verminderte Phosphorylierung des MOPr ist auch die agonist-induzierte Endozytose des μ -Opioidrezeptors vermindert. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen zusätzlich den inhibierenden Einfluss des RKIP auf die μ -opioidrezeptor-regulierte Aktivität der MAPK-Signalkaskade dar.

6. Zusammenfassung

Die durch Opiate ausgelösten Effekte wie Analgesie, Stimmungsveränderungen, Atemdepression oder gastrointestinale Reaktionen werden durch die Bindung an spezifische G-Protein-gekoppelte Opioidrezeptoren vermittelt. Nach Ligandenbindung und Aktivierung wird der μ -Opioidrezeptor zunächst durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder durch *second messenger*-abhängige Kinasen phosphoryliert. Die Bindung von β -Arrestinen an den phosphorylierten Rezeptor ist verbunden mit der G-Protein-Entkopplung, welche die Rezeptor-Desensibilisierung auslöst. Die Endozytose der Liganden-Rezeptor-Komplexe erfolgt anschließend durch clathrin-bedeckte Vesikel. Die Reaktivierung geschieht dann durch Rücktransport (Recycling) der Rezeptoren zur Zellmembran. Auf der Suche nach Proteinen, die an der Regulation des μ -Opioidrezeptors beteiligt sind, wurden das Hitzeschockprotein Hsc70 und das *Raf Kinase Inhibitor Protein* RKIP identifiziert. Hsc70 ist ein zytosolisches Protein der 70-kDa-Hitzeschockprotein-Familie und wird in hohem Maße konstitutiv exprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Hsc70 auf die agonisten-induzierte Endozytose und Desensibilisierung des MOPr näher untersucht. Durch Stimulation mit dem MOPr-Agonisten DAMGO wurde eine Endozytose der μ -Opioidrezeptoren ausgelöst. Konfokalmikroskopische Studien zeigten, dass durch Verminderung der Hsc70-Expression die MOPr-Endozytose gesenkt wird. Mittels ELISA-Technik wurde die Internalisierung quantifiziert und die Beobachtung der verringerten Endozytose des MOPr bestätigt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass Hsc70 ein wichtiger Regulator der clathrin-vermittelten Endozytose ist und somit den zellulären Transport des MOPr beeinflusst. Darüber hinaus führte die verminderte Hsc70-Expression zu einer tendenziell beschleunigten DAMGO-induzierten Desensibilisierung des MOPr.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der regulatorische Einfluss des Raf Kinase Inhibitor Proteins (RKIP) auf die Phosphorylierung und Desensibilisierung des MOPr geprüft. Die DAMGO-vermittelte Desensibilisierung des MOPr konnte durch Koexpression von RKIP deutlich verzögert werden. Wir konnten zeigen, dass dieser Effekt auf einer verminderten Phosphorylierung einer GRK2-Phosphorylierungsstelle (S375) im C-Terminus des MOPr beruht. Demgegenüber führte eine Koexpression der RKIP-S153A-Mutante, die durch einen Aminosäureaustausch nicht mehr in der Lage ist die GRK2 zu inhibieren, zu keiner Reduktion der MOPr-Phosphorylierung. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass RKIP durch eine GRK2-Hemmung seine regulatorischen Effekte auf den MOPr ausübt. Quantitative Internalisierungs- und konfokalmikroskopische Studien zeigten, dass eine Koexpression von RKIP, jedoch nicht von RKIP-S153A, zu einer signifikant verringerten DAMGO-induzierten MOPr-Endozytose führt. Dies spricht dafür, dass die verminderte Phosphorylierung des MOPr, ausgelöst durch die GRK2-Inhibition, in einer verringerten agonisten-induzierten Endozytose des MOPr resultiert.

Wir konnten ebenfalls zeigen, dass die Aktivierung von ERK1/2 in der MAPK-Signalkaskade durch RKIP-Koexpression signifikant vermindert wird. Die Koexpression der RKIP-S153A-Mutante führt zu einer noch stärkeren Inhibition der ERK1/2-Aktivierung, da es durch die Mutation zu einer dauerhaften Hemmung der Raf-abhängigen Blockade der MAPK-Signalkaskade kommt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals sowohl die Beteiligung des Hsc70 als auch den Einfluss des RKIP auf die Endozytose und Desensibilisierung des MOPr aufzeigen.

Summary

Opiate-initiated effects like analgesia, mood changes, respiratory depression or gastrointestinal reactions are mediated by binding to specific G-protein-coupled opioid receptors. After ligand-binding and activation, the opioid receptor is phosphorylated by G-protein-coupled receptor kinases (GRKs) or *second messenger*-dependent kinases. Binding of β -arrestins to the phosphorylated receptor is associated with uncoupling from G-proteins, which results in receptor desensitization. Endocytosis of ligand-receptor-complexes is mediated via clathrin-coated vesicles. Then reactivation passes through recycling of receptors back to cell membrane. In search of proteins that are involved in the regulation of μ -opioid receptor endocytosis and desensitization, two proteins were identified: *Heat shock cognate 70* (Hsc70) and *Raf Kinase Inhibitor Protein* (RKIP). Hsc70 is a cytosolic protein of the 70-kDa-heat shock protein-family and is highly constitutively expressed. In the present study we investigated the influence of Hsc70 on the agonist-induced endocytosis and desensitization of MOPr. Confocal microscopic studies revealed that stimulation with the MOPr-agonist DAMGO in cells with diminished Hsc70-expression resulted in a decreased MOPr-endocytosis. The diminished endocytosis of MOPr was confirmed by a quantitative internalization assay (ELISA-technique). These results suggest that Hsc70 is an important regulator of clathrin-mediated endocytosis and hence influences the transport of MOPr. Furthermore, reduced Hsc70-expression tends to an accelerated DAMGO-induced desensitization of MOPr. This is most probably due to the decrease of endocytosis and recycling of the receptor which counteracts sensitization.

In a second part of this study, the regulatory influence of the Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) on MOPr-phosphorylation and -desensitization was investigated. After prolonged pretreatment with the MOPr-agonist DAMGO coexpression of RKIP lead to a decelerated MOPr-desensitization based on a diminished phosphorylation of one specific GRK2-phosphorylation site (S375) at the C-terminus of MOPr. On the other hand, coexpression of the RKIP-S153A-mutant, which is not able to inhibit GRK2, revealed no reduction of MOPr-phosphorylation. These findings suggest that RKIP exerts its regulatory effects on MOPr through a GRK2-inhibition. Quantitative internalization- and confocal microscopic studies show a significantly decreased DAMGO-induced MOPr-endocytosis after coexpression of RKIP, but not of RKIP-S153A. These findings indicate that a reduced MOPr-phosphorylation, triggered by GRK2-inhibition, results also in a reduced agonist-induced endocytosis. Furthermore, we showed, that activation of ERK1/2 in the MAPK-pathway is significantly decreased after RKIP-coexpression. Coexpression of the RKIP-S153A-mutant leads to a stronger inhibition of ERK1/2-activation, because the mutated RKIP cannot be released from Raf by phosphorylation resulting in a prolonged inhibition of the MAPK-pathway.

Taken together, results of these study reveal a role of Hsc70 and of RKIP in endocytosis and desensitization of the MOPr.

7. Literaturverzeichnis

Adachi M, Fukuda M and Nishida E (2000) Nuclear export of MAP kinase (ERK) involves a MAP kinase kinase (MEK)-dependent active transport mechanism. *J Cell Biol* 148(5):849-856.

Ammon-Treiber S, Grecksch G, Angelidis C, Vezyraki P, Hollt V and Becker A (2007) Pentylentetrazol-kindling in mice overexpressing heat shock protein 70. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 375(2):115-121.

Ammon-Treiber S, Grecksch G, Stumm R, Riechert U, Tischmeyer H, Reichenauer A and Hollt V (2004) Rapid, transient, and dose-dependent expression of hsp70 messenger RNA in the rat brain after morphine treatment. *Cell Stress Chaperones* 9(2):182-197.

Bare LA, Mansson E and Yang D (1994) Expression of two variants of the human mu opioid receptor mRNA in SK-N-SH cells and human brain. *FEBS Lett* 354(2):213-216.

Barouch W, Prasad K, Greene L and Eisenberg E (1997) Auxilin-induced interaction of the molecular chaperone Hsc70 with clathrin baskets. *Biochemistry* 36(14):4303-4308.

Bartus RT, Dean RL, 3rd, Beer B and Lippa AS (1982) The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction. *Science* 217(4558):408-414.

Belcheva MM, Vogel Z, Ignatova E, Avidor-Reiss T, Zippel R, Levy R, Young EC, Barg J and Coscia CJ (1998) Opioid modulation of extracellular signal-regulated protein kinase activity is ras-dependent and involves Gbetagamma subunits. *J Neurochem* 70(2):635-645.

Bernier I and Jolles P (1984) Purification and characterization of a basic 23 kDa cytosolic protein from bovine brain. *Biochim Biophys Acta* 790(2):174-181.

Bollengier F and Mahler A (1988) Localization of the novel neuropolypeptide h3 in subsets of tissues from different species. *J Neurochem* 50(4):1210-1214.

- Brownstein MJ (1993) A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(12):5391-5393.
- Bucquoy S, Jolles P and Schoentgen F (1994) Relationships between molecular interactions (nucleotides, lipids and proteins) and structural features of the bovine brain 21-kDa protein. *Eur J Biochem* 225(3):1203-1210.
- Cadet P (2004) Mu opiate receptor subtypes. *Med Sci Monit* 10(6):MS28-32.
- Chang KJ, Cooper BR, Hazum E and Cuatrecasas P (1979) Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol* 16(1):91-104.
- Chang KJ and Cuatrecasas P (1979) Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J Biol Chem* 254(8):2610-2618.
- Chappell TG, Konforti BB, Schmid SL and Rothman JE (1987) The ATPase core of a clathrin uncoating protein. *J Biol Chem* 262(2):746-751.
- Chatterjee D, Bai Y, Wang Z, Beach S, Mott S, Roy R, Braastad C, Sun Y, Mukhopadhyay A, Aggarwal BB, Darnowski J, Pantazis P, Wyche J, Fu Z, Kitagwa Y, Keller ET, Sedivy JM and Yeung KC (2004) RKIP sensitizes prostate and breast cancer cells to drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 279(17):17515-17523.
- Chen Y, Mestek A, Liu J and Yu L (1993) Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 295 (Pt 3):625-628.
- Chung CT, Niemela SL and Miller RH (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(7):2172-2175.
- Conner SD and Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422(6927):37-44.

- Corbit KC, Trakul N, Eves EM, Diaz B, Marshall M and Rosner MR (2003) Activation of Raf-1 signaling by protein kinase C through a mechanism involving Raf kinase inhibitory protein. *J Biol Chem* 278(15):13061-13068.
- El Kouhen R, Burd AL, Erickson-Herbrandson LJ, Chang CY, Law PY and Loh HH (2001) Phosphorylation of Ser363, Thr370, and Ser375 residues within the carboxyl tail differentially regulates mu-opioid receptor internalization. *J Biol Chem* 276(16):12774-12780.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411(6836):494-498.
- Erttmann KD and Gallin MY (1996) *Onchocerca volvulus*: identification of cDNAs encoding a putative phosphatidyl-ethanolamine-binding protein and a putative partially processed mRNA precursor. *Gene* 174(2):203-207.
- Ferguson SS (2001) Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev* 53(1):1-24.
- Fields S and Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340(6230):245-246.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806-811.
- Fu Z, Smith PC, Zhang L, Rubin MA, Dunn RL, Yao Z and Keller ET (2003) Effects of raf kinase inhibitor protein expression on suppression of prostate cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 95(12):878-889.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M and Takeshima H (1993) Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Lett* 327(3):311-314.

- Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T and Mori K (1996) Functional coupling of the delta-, mu-, and kappa-opioid receptors to mitogen-activated protein kinase and arachidonate release in Chinese hamster ovary cells. *J Neurochem* 67(3):1309-1316.
- Gems D, Ferguson CJ, Robertson BD, Nieves R, Page AP, Blaxter ML and Maizels RM (1995) An abundant, trans-spliced mRNA from *Toxocara canis* infective larvae encodes a 26-kDa protein with homology to phosphatidylethanolamine-binding proteins. *J Biol Chem* 270(31):18517-18522.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC and Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36(1):59-74.
- Grandy DK, Hanneman E, Bunzow J, Shih M, Machida CA, Bidlack JM and Civelli O (1990) Purification, cloning, and tissue distribution of a 23-kDa rat protein isolated by morphine affinity chromatography. *Mol Endocrinol* 4(9):1370-1376.
- Günther E (1991) *Lehrbuch der Genetik*. Gustav Fischer Verlag, Jena.
- Hannan LA, Newmyer SL and Schmid SL (1998) ATP- and cytosol-dependent release of adaptor proteins from clathrin-coated vesicles: A dual role for Hsc70. *Mol Biol Cell* 9(8):2217-2229.
- Hendrick JP and Hartl FU (1993) Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem* 62:349-384.
- Holstein SE, Ungewickell H and Ungewickell E (1996) Mechanism of clathrin basket dissociation: separate functions of protein domains of the DnaJ homologue auxilin. *J Cell Biol* 135(4):925-937.
- Hori N, Chae KS, Murakawa K, Matoba R, Fukushima A, Okubo K and Matsubara K (1994) A human cDNA sequence homologue of bovine phosphatidylethanolamine-binding protein. *Gene* 140(2):293-294.

- Hu SM and Wang C (1996) Involvement of the 10-kDa C-terminal fragment of hsc70 in complexing with unfolded protein. *Arch Biochem Biophys* 332(1):163-169.
- Huang SP, Tsai MY, Tzou YM, Wu WG and Wang C (1993) Aspartyl residue 10 is essential for ATPase activity of rat hsc70. *J Biol Chem* 268(3):2063-2068.
- Iismaa T, Binden T and Shine J (1995) *G-protein-coupled receptor*. Springer-Verlag, Heidelberg.
- Ivanova-Nikolova TT, Nikolov EN, Hansen C and Robishaw JD (1998) Muscarinic K⁺ channel in the heart. Modal regulation by G protein beta gamma subunits. *J Gen Physiol* 112(2):199-210.
- Jazirehi AR, Vega MI, Chatterjee D, Goodglick L and Bonavida B (2004) Inhibition of the Raf-MEK1/2-ERK1/2 signaling pathway, Bcl-xL down-regulation, and chemosensitization of non-Hodgkin's lymphoma B cells by Rituximab. *Cancer Res* 64(19):7117-7126.
- Jiang RF, Greener T, Barouch W, Greene L and Eisenberg E (1997) Interaction of auxilin with the molecular chaperone, Hsc70. *J Biol Chem* 272(10):6141-6145.
- Jolly C and Morimoto RI (2000) Role of the heat shock response and molecular chaperones in oncogenesis and cell death. *J Natl Cancer Inst* 92(19):1564-1572.
- Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M and Satoh T (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349-400.
- Keller ET, Fu Z and Brennan M (2004) The role of Raf kinase inhibitor protein (RKIP) in health and disease. *Biochem Pharmacol* 68(6):1049-1053.
- Kitabwalla M and Ruprecht RM (2002) RNA interference--a new weapon against HIV and beyond. *N Engl J Med* 347(17):1364-1367.

- Klysik J, Theroux SJ, Sedivy JM, Moffit JS and Boekelheide K (2008) Signaling crossroads: the function of Raf kinase inhibitory protein in cancer, the central nervous system and reproduction. *Cell Signal* 20(1):1-9.
- Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schroder H, Kahl E and Hollt V (2001) C-terminal splice variants of the mouse mu-opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 276(33):31408-31414.
- Koch T, Schulz S, Schroder H, Wolf R, Raulf E and Hollt V (1998) Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 273(22):13652-13657.
- Kroslak T, Koch T, Kahl E and Hollt V (2001) Human phosphatidylethanolamine-binding protein facilitates heterotrimeric G protein-dependent signaling. *J Biol Chem* 276(43):39772-39778.
- Krupnick JG and Benovic JL (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:289-319.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685.
- Law PY, Wong YH and Loh HH (2000) Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 40:389-430.
- Lefkowitz RJ, Pitcher J, Krueger K and Daaka Y (1998) Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. *Adv Pharmacol* 42:416-420.
- Lohse MJ (1993) Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. *Biochim Biophys Acta* 1179(2):171-188.
- Lorenz K, Lohse MJ and Quidterer U (2003) Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. *Nature* 426(6966):574-579.

- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193(1):265-275.
- Mandel M and Higa A (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol* 53(1):159-162.
- Moore C, Perry AC, Love S and Hall L (1996) Sequence analysis and immunolocalisation of phosphatidylethanolamine binding protein (PBP) in human brain tissue. *Brain Res Mol Brain Res* 37(1-2):74-78.
- Mork A (1993) Actions of lithium on the cyclic AMP signalling system in various regions of the brain--possible relations to its psychotropic actions. A study on the adenylate cyclase in rat cerebral cortex, corpus striatum and hippocampus. *Pharmacol Toxicol* 73 Suppl 3:1-47.
- Newmyer SL and Schmid SL (2001) Dominant-interfering Hsc70 mutants disrupt multiple stages of the clathrin-coated vesicle cycle in vivo. *J Cell Biol* 152(3):607-620.
- Palczewski K, Kumasaka T, Hori T, Behnke CA, Motoshima H, Fox BA, Le Trong I, Teller DC, Okada T, Stenkamp RE, Yamamoto M and Miyano M (2000) Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science* 289(5480):739-745.
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Abbadie C, Chang A, Zuckerman A, Rossi G and Pasternak GW (1999) Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms. *Mol Pharmacol* 56(2):396-403.
- Pan YX, Xu J, Bolan E, Chang A, Mahurter L, Rossi G and Pasternak GW (2000) Isolation and expression of a novel alternatively spliced mu opioid receptor isoform, MOR-1F. *FEBS Lett* 466(2-3):337-340.
- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M and Pasternak GW (2001) Generation of the mu opioid receptor (MOR-1) protein by three new splice variants of the Oprm gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(24):14084-14089.

- Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK and Pasternak GW (2003) Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR-1O and hMOR-1X. *Biochem Biophys Res Commun* 301(4):1057-1061.
- Pasternak GW (1993) Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin Neuropharmacol* 16(1):1-18.
- Pasternak GW (2001) Incomplete cross tolerance and multiple mu opioid peptide receptors. *Trends Pharmacol Sci* 22(2):67-70.
- Perry AC, Hall L, Bell AE and Jones R (1994) Sequence analysis of a mammalian phospholipid-binding protein from testis and epididymis and its distribution between spermatozoa and extracellular secretions. *Biochem J* 301 (Pt 1):235-242.
- Pikielny CW, Hasan G, Rouyer F and Rosbash M (1994) Members of a family of *Drosophila* putative odorant-binding proteins are expressed in different subsets of olfactory hairs. *Neuron* 12(1):35-49.
- Robinson LC and Tatchell K (1991) TFS1: a suppressor of *cdc25* mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 230(1-2):241-250.
- Rothman JE and Schmid SL (1986) Enzymatic recycling of clathrin from coated vesicles. *Cell* 46(1):5-9.
- Roussel G, Nussbaum F, Schoentgen F, Jolles P and Nussbaum JL (1988) Immunological investigation of a 21-kilodalton cytosolic basic protein in rat brain. *Dev Neurosci* 10(2):65-74.
- Schlossman DM, Schmid SL, Braell WA and Rothman JE (1984) An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol* 99(2):723-733.
- Schmid D, Baici A, Gehring H and Christen P (1994) Kinetics of molecular chaperone action. *Science* 263(5149):971-973.

- Schoentgen F and Jolles P (1995) From structure to function: possible biological roles of a new widespread protein family binding hydrophobic ligands and displaying a nucleotide binding site. *FEBS Lett* 369(1):22-26.
- Schulz S, Mayer D, Pfeiffer M, Stumm R, Koch T and Hollt V (2004) Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *Embo J* 23(16):3282-3289.
- Seddiqi N, Bollengier F, Alliel PM, Perin JP, Bonnet F, Bucquoy S, Jolles P and Schoentgen F (1994) Amino acid sequence of the Homo sapiens brain 21-23-kDa protein (neuropolypeptide h3), comparison with its counterparts from Rattus norvegicus and Bos taurus species, and expression of its mRNA in different tissues. *J Mol Evol* 39(6):655-660.
- Slupsky JR, Quitterer U, Weber CK, Gierschik P, Lohse MJ and Rapp UR (1999) Binding of Gbetagamma subunits to cRaf1 downregulates G-protein-coupled receptor signalling. *Curr Biol* 9(17):971-974.
- Spencer RJ, Jin W, Thayer SA, Chakrabarti S, Law PY and Loh HH (1997) Mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores in transfected neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 54(7):809-818.
- Theysen H, Schuster HP, Packschies L, Bukau B and Reinstein J (1996) The second step of ATP binding to DnaK induces peptide release. *J Mol Biol* 263(5):657-670.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4354.
- Trottein F and Cowman AF (1995) The primary structure of a putative phosphatidylethanolamine-binding protein from Plasmodium falciparum. *Mol Biochem Parasitol* 70(1-2):235-239.

- Tsai MY and Wang C (1994) Uncoupling of peptide-stimulated ATPase and clathrin-uncoating activity in deletion mutant of hsc70. *J Biol Chem* 269(8):5958-5962.
- Ungewickell E, Ungewickell H, Holstein SE, Lindner R, Prasad K, Barouch W, Martin B, Greene LE and Eisenberg E (1995) Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature* 378(6557):632-635.
- Wang TF, Chang JH and Wang C (1993) Identification of the peptide binding domain of hsc70. 18-Kilodalton fragment located immediately after ATPase domain is sufficient for high affinity binding. *J Biol Chem* 268(35):26049-26051.
- Welch WJ (1993) Heat shock proteins functioning as molecular chaperones: their roles in normal and stressed cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 339(1289):327-333.
- Yeung K, Janosch P, McFerran B, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM and Kolch W (2000) Mechanism of suppression of the Raf/MEK/extracellular signal-regulated kinase pathway by the raf kinase inhibitor protein. *Mol Cell Biol* 20(9):3079-3085.
- Yeung K, Seitz T, Li S, Janosch P, McFerran B, Kaiser C, Fee F, Katsanakis KD, Rose DW, Mischak H, Sedivy JM and Kolch W (1999) Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401(6749):173-177.
- Yeung KC, Rose DW, Dhillon AS, Yaros D, Gustafsson M, Chatterjee D, McFerran B, Wyche J, Kolch W and Sedivy JM (2001) Raf kinase inhibitor protein interacts with NF-kappaB-inducing kinase and TAK1 and inhibits NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 21(21):7207-7217.
- Zhang J, Ferguson SS, Barak LS, Bodduluri SR, Laporte SA, Law PY and Caron MG (1998) Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):7157-7162.
- Zimprich A, Simon T and Holtt V (1995) Cloning and expression of an isoform of the rat mu opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist induced desensitization from rMOR1. *FEBS Lett* 359(2-3):142-146.

8. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Strukturformeln des Morphins, des Codeins und des Noscapins	Seite 1
Abb. 2:	Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors	Seite 4
Abb. 3:	Modell der agonist-induzierten Internalisierung des μ -Opioidrezeptors	Seite 6
Abb. 4:	Struktur der 70-kDa-Hitzeschockproteine	Seite 7
Abb. 5:	Rolle des <i>Heat shock cognate 70</i> bei der clathrin-vermittelten Endozytose	Seite 8
Abb. 6:	Struktur der Raf Kinase Inhibitor Proteine	Seite 10
Abb. 7:	Prinzip der RNA-Interferenz durch siRNA	Seite 20
Abb. 8:	Western Blot-Untersuchungen von Hsc70-siRNA-transfizierten MOPr/HEK293-Zellen	Seite 33
Abb. 9:	Western-Blot-Untersuchungen von AS-Hsc70-transfizierten MOPr/HEK293-Zellen	Seite 34
Abb. 10:	Vergleich der Endozytose des MOPr nach Transfektion von AS-Hsc70	Seite 35
Abb. 11:	Quantitative Analyse der DAMGO-induzierten Endozytose des MOPr nach Transfektion mit AS-Hsc70	Seite 36
Abb. 12:	DAMGO-induzierte Desensibilisierung des MOPr in MOPr-exprimierenden HEK293-Zellen nach Transfektion mit AS-Hsc70	Seite 38

Abb. 13:	DAMGO-induzierte Desensibilisierung des MOPr in MOPr- und MOPr/RKIP-exprimierenden HEK293-Zellen	Seite 39
Abb. 14:	DAMGO-induzierte Phosphorylierung des MOPr nach Koexpression von RKIP	Seite 41
Abb. 15:	Vergleich der DAMGO-induzierten Phosphorylierung des MOPr nach Koexpression von RKIP oder RKIP-S153A	Seite 42
Abb. 16:	Vergleich der Endozytose des MOPr nach Koexpression von RKIP oder RKIP-S153A	Seite 44
Abb. 17:	Quantitative Analyse der agonisten-induzierten Endozytose des MOPr	Seite 45
Abb. 18:	DAMGO-induzierte Phosphorylierung der MAP-Kinase ERK1/2	Seite 47
Abb. 19:	Hsc70 interagiert mit dem MOPr und beeinflusst die Endozytose des MOPr	Seite 50
Abb. 20:	Modell der GRK2-Inhibition durch das <i>Raf Kinase Inhibitor Protein</i> (RKIP)	Seite 52
Abb. 21:	RKIP moduliert Raf und die G-Protein-Signalgebung	Seite 53
Tab. 1:	Übersicht der Opioidrezeptor-Subtypen-vermittelten Effekte	Seite 2
Tab. 2:	Übersicht der Opioidrezeptor-Subtypen und ihren spezifischen Liganden	Seite 3

9. Abkürzungen und Dimensionen

Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kombinatorische Desoxyribonukleinsäure (<i>copy DNA</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanin 3.18
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-Enkephalin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOP	δ-Opioidrezeptor
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegration per minute</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(b-aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und Kollegen
FKS	Fötale Kälberserum
g	Gramm
<i>g</i>	Graviditätskonstante, 9,81 m/s ²
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Proteinkinase
h	Stunde
HCl	Salzsäure

HEK293-Zellen	humane embryonale Nieren-293 Zellen
Hsc70	<i>Heat shock cognate 70</i>
kDa	Kilodalton
KOP	κ -Opioidrezeptor
l	Liter
LB	Luria-Bertoni
μ M	Mikromolar
M	Molar
MAPK/MAP-Kinase	mitogen-aktivierte Proteinkinase
mA	Milliampere
MEK	mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOP	μ -Opioidrezeptor
MOPr	μ -Opioidrezeptor der Ratte
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure, Boten-Ribonukleinsäure
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{x nm}	Optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	Negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
PK A/ C	Proteinkinase A/ C
POD	Meerrettich-Peroxidase
RKIP	<i>Raf Kinase Inhibitor Protein</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

S.	Seite
SDS	Sodiumdodecylsulfat/ Natriumdodecylsulfat
SEM	Standard error of mean/ Standardfehler
siRNA	<i>small-interfering-RNA</i>
Taq	Thermus Aquaticus
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPBS	Tris- und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
WGA	Weizenkeim-Agglutinin
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

10. Anhang**10.1. Lebenslauf**

Name: Andrea Goschke, geb. Beyer
Geschlecht: weiblich
Geburtsdatum/ –ort: 07.03.1979 in Burg (bei Magdeburg)
Familienstand: verheiratet, 1 Kind (geb. 03.08.2007)
Beruf: Diplom-Humanbiologin

Schulbildung:

1985-1991 Gesamtschule Süd in Genthin

1991-1997 Bismarck-Gymnasium in Genthin, Abschluss: Abitur (Note 1,6)

beruflicher Werdegang:

1997-2002 Hochschulstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald,
Fachrichtung Humanbiologie

2001-2002 Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Abschluss des Studiums mit der Gesamtnote 2,0

2002-2006 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Magdeburg, den 25.08.2008

.....

Andrea Goschke

10.2. Wissenschaftliche Vorleistungen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Koch T., Brandenburg LO., Liang Y., Schulz S., Beyer A., Schröder H. and Höllt V. (2004) Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *J. Neurochem.* **88**, 680-688.

Beyer A., Koch T., Schröder H., Schulz S. and Höllt V. (2004) Effect of the A118G polymorphism on binding affinity, potency and agonist-mediated endocytosis, desensitization, and resensitization of the human mu-opioid receptor. *J. Neurochem.* **89**, 553-560.

Koch T., Widera A., Bartsch A., Schulz S., Brandenbrug LO., Wundrack N., Beyer A., Grecksch G. and Höllt V. (2005) Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Mol. Pharm.* **67**, 280-287

Wu DF., Yang LQ., Goschke A., Stumm R., Brandenburg LO., Liang YJ., Höllt V. and Koch T. (2008) Role of receptor internalization in the agonist-induced desensitization of cannabinoid type 1 receptors. *J. Neurochem.* **104**, 1132-43

Posterpräsentationen und Vorträge:

Beyer A., Koch T. and Höllt V.: Der Polymorphismus A118G beeinflusst nicht die Ligandenbindung und Aktivität des humanen mu-Opioidrezeptors. 44. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 17.-20.03.2003

Koch T., Widera A., Bartsch K., Kahl E., Beyer A., Schulz S. and Höllt V.: Internalization efficacies of clinically important opioids. International Narcotics Research Conference 2004, Kyoto, Japan, 18.-23.07.2004

Goschke A., Koch T. and Höllt V.: Raf Kinase Inhibitor Protein (RKIP) vermindert die Agonist-induzierte mu-Opioidrezeptor Phosphorylierung und Desensitisierung. 46. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 15.-17.03.2005

Yang LQ., Koch T., Wu DF., Goschke A. and Höllt V.: Role of phospholipase D2 in agonist-induced δ -opioidreceptor endocytosis. 47. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 04.-06.04.2006

10.3. Danksagung

Herrn Prof. Dr. Volker Höllt möchte ich für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Promotionsthemas am Institut der Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und die Unterstützung durch hilfreiche Diskussionen danken.

Herrn Prof. Dr. Georg Reiser möchte ich für seine großzügige Förderung dieser Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs danken.

Besonders danken möchte ich Herrn Dr. Thomas Koch für die praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit. Er stand mir stets bei allen Problemen hilfreich zur Seite und unterstützte mich bei all meinen wissenschaftlichen Bemühungen.

Bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schulz möchte ich mich für die Hilfe bei der Einführung in die für die Arbeit notwendigen Methoden sowie deren Auswertung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Für die praktische Unterstützung bei meiner Arbeit und vielen hilfreichen Tipps möchte ich mich bei Evelyn Kahl, Sandra Grosseheilmann, Sabrina Sattelkau, Dana Mayer, Anke Schmidt, Michaela Böx, Dr. Helmut Schröder, Karina Schäfer und Dr. Manuela Pfeiffer danken.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Instituts für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die zahlreichen angeregten Diskussionen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation während meiner Promotionszeit.