

Funktion der Phospholipase D2 bei der Desensibilisierung und Internalisierung 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.-Biopharm. Lars-Ove Brandenburg

geb. am 11. März 1975

in Greifswald

Gutachter: Prof. Dr. Volker Höllt

Prof. Dr. Wolfgang Meyerhof

Prof. Dr. Eckart D. Gundelfinger

Eingereicht am: 28. Oktober 2003

Verteidigung am: 13. April 2004

I.	Einleitung	1
	Aufgabenstellung.....	10
II.	Material und Methoden	11
1.	Material.....	11
1.1.	Verbrauchsmaterialien.....	11
1.2.	Chemikalien und Radioisotope.....	11
1.3.	Enzyme und Oligonukleotide.....	12
1.4.	Zelllinien.....	12
1.5.	Vektoren, rekombinante Expressionsplasmide und Antikörper.....	12
1.6.	Lösungen und Kulturmedien.....	13
1.7.	Geräte.....	16
2.	Methoden.....	18
2.1.	Amplifizierung und Subklonierung der PLD2-Mutante.....	18
2.1.1.	PCR-Mutagenese.....	18
2.1.2.	Restriktionsendonukleaseverdau von DNA.....	19
2.1.4.	Ligation von DNA-Fragmenten.....	19
2.1.5.	Sequenzierung.....	20
2.1.6.	Transformation und Amplifikation.....	20
2.2.	Zellkultivierung.....	22
2.2.1.	Methoden zur allgemeinen Handhabung der Zellen.....	22
2.2.2.	Transfektion und Selektion der HEK293-Zellen.....	22
2.3.	Radioligandenbindung.....	23
2.4.	PLD-Aktivitätsbestimmung.....	24
2.5.	Western Blot-Analysen.....	25
2.5.1.	Behandlungen.....	25
2.5.2.	Zellaufarbeitung und Zellyse.....	25
2.5.3.	Koimmunpräzipitation.....	26
2.5.4.	Anreicherung der Glykoproteine mittels Weizenkeim-Agglutinin.....	26
2.5.5.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE).....	27
2.5.6.	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen.....	27
2.5.7.	Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe.....	28
2.6.	Immunocytochemie.....	28

2.6.1. Konfokale Laserscan-Mikroskopie.....	28
2.6.2. Quantitativer Internalisierungsversuch.....	30
2.7. Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration.....	31
2.8. Datenanalyse.....	31
III. Ergebnisse.....	32
1. Einfluß der PLD2 auf die Expression von MOR1 HEK293-Zellen.....	32
2. PLD-Aktivitätsuntersuchungen.....	32
3. Interaktionsanalysen.....	35
3.1. Interaktion zwischen MOR1, PLD2 und ARF.....	35
3.2. Interaktion zwischen MOR1 und der negativen PLD2-Mutante (nPLD2).....	38
4. Untersuchungen der agonisten-induzierten Internalisierung des MOR1.....	40
4.1. Vergleich der subzellulären Verteilung von MOR1 und PLD2.....	40
4.2. Einfluß der PLD2-Aktivierung auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1.....	41
4.3. Einfluß der PLD2-Inhibition auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1.....	45
4.3.1. Hemmung der PLD2-Funktion durch den primären Alkohol 1-Butanol.....	45
4.3.2. Hemmung der PLD2-Funktion durch eine negative PLD2-Mutante (nPLD2).....	48
5. Untersuchungen zur De- und Resensitisierung des MOR1.....	50
5.1. Vergleich der De- und Resensitisierung von MOR1 zwischen MOR1- und MOR1- PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen.....	50
5.2. Beeinflussung der Desensitisierung von MOR1 durch 1-Butanol und Ethanol.....	52
5.3. Beeinflussung der De- und Resensitisierung des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante (nPLD2).....	55
IV. Diskussion.....	58
V. Zusammenfassung.....	68
VI. Literaturverzeichnis.....	69
VII. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen.....	78

VIII. Abkürzungen und Dimensionen	80
IX. Anhang	83
1. Lebenslauf.....	83
2. Wissenschaftliche Vorleistungen.....	84
3. Danksagung.....	85

I. Einleitung

Schon die alten Sumerer in Südbabylonien vor rund 6000 Jahren kannten die Wirkung des getrockneten Kapselsaftes aus Schlafmohn (*Papaver somniferum*). Eine erste schriftliche Erwähnung der schmerzlindernden Effekte dieses Pflanzenproduktes findet man bereits in den Schriften des Theophrastus im dritten Jahrhundert vor Christus. Doch erst 1804 konnte der Paderborner Apotheker Friedrich Sertürner das Hauptalkaloid des Opiums Morphin in seiner Reinstform isolieren. Im weiteren Verlauf des 19. Jahrhunderts wurden dann eine Reihe weitere Opiumalkaloide identifiziert, welche in der Medizin weltweite Verbreitung fanden, so zum Beispiel das Codein (entwickelt von Robiquet 1832) oder Papaverin (entwickelt von Merck 1848; zusammengefaßt dargestellt von Seefelder, 2000). Ihre Wirkung entfalten die Opiate vorwiegend im Nervensystem. Die dabei ausgelösten Effekte können zum Beispiel Analgesie, Schläfrigkeit, Stimmungsveränderungen (Euphorie / Dysphorie), Atemdepression, Antidiurese und Übelkeit sein. Aufgrund der Ausbildung von psychischer und physischer Abhängigkeit sowie der Toleranzentwicklung durch die Opiate ist ihre klinische Anwendbarkeit jedoch eingeschränkt. Andererseits finden die Opiate Verwendung als Rauschdrogen und die Vermarktung nimmt einen beträchtlichen Teil des international organisierten Verbrechens ein, deren Bekämpfung erhebliche volkswirtschaftliche Kosten hinterläßt.

Die Behandlung der Abhängigen und das Verständnis um die zellulären Hintergründe der Schmerzempfindung oder Sucht führten zu intensiven tierexperimentellen und molekularbiologischen, pharmakologischen Untersuchungen. In deren Verlauf zeigte sich, daß die Opiatwirkungen auf zellulärer Ebene durch die Bindung an spezifische Opioidrezeptoren vermittelt werden. Diese besitzen Bindungsstellen für pflanzliche Alkaloide als auch für körpereigene endogene Opioidpeptide, wie zum Beispiel β -Endorphin, Enkephalin und Dynorphin, welche durch die Rezeptoren mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden. Durch radioaktive Ligandenstudien konnte die Existenz von mehreren Opioidrezeptoren bestätigt werden (Chang und Cuatrecasas, 1979; Chang et al., 1979). Es wird zwischen μ -, κ - und δ -Opioidrezeptoren unterschieden, welche eine spezifische Verteilung im Gehirn und charakteristische pharmakologische Eigenschaften aufweisen. Gegenstand der Untersuchungen dieser Arbeit ist der μ -Opioidrezeptor (MOR1), der im Jahre 1993 kloniert werden konnte (Chen et al., 1993; Fukuda et al., 1993). Seit dieser Zeit wurden eine Reihe von Isotypen des μ -Opioidrezeptors der Ratte (rMOR1B; Zimprich et al., 1995(a))

beziehungsweise der Maus (mMOR1C-N) und des Menschen (hMOR-1A, -1O und -1X) identifiziert (Pan et al., 2001 und 2003).

Nach der Aktivierung des μ -Opioidrezeptors wie auch der κ - und δ -Rezeptoren hemmen diese die Adenylatzyklase-Aktivität (Evans et al., 1992) sowie Kalziumkanäle vom N-Typ (Tallent et al., 1994) und vom L-Typ (Piros et al., 1995), wohingegen die Aktivität der Phospholipase C gesteigert wird. Es kommt zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels (Spencer et al., 1997; Zimprich et al., 1995(b)), einer Aktivierung G-protein-gekoppelter Kaliumkanäle (Henry et al., 1995) und der mitogen-aktivierten Proteinkinasen ERK1 und ERK2 (Fukuda et al., 1996).

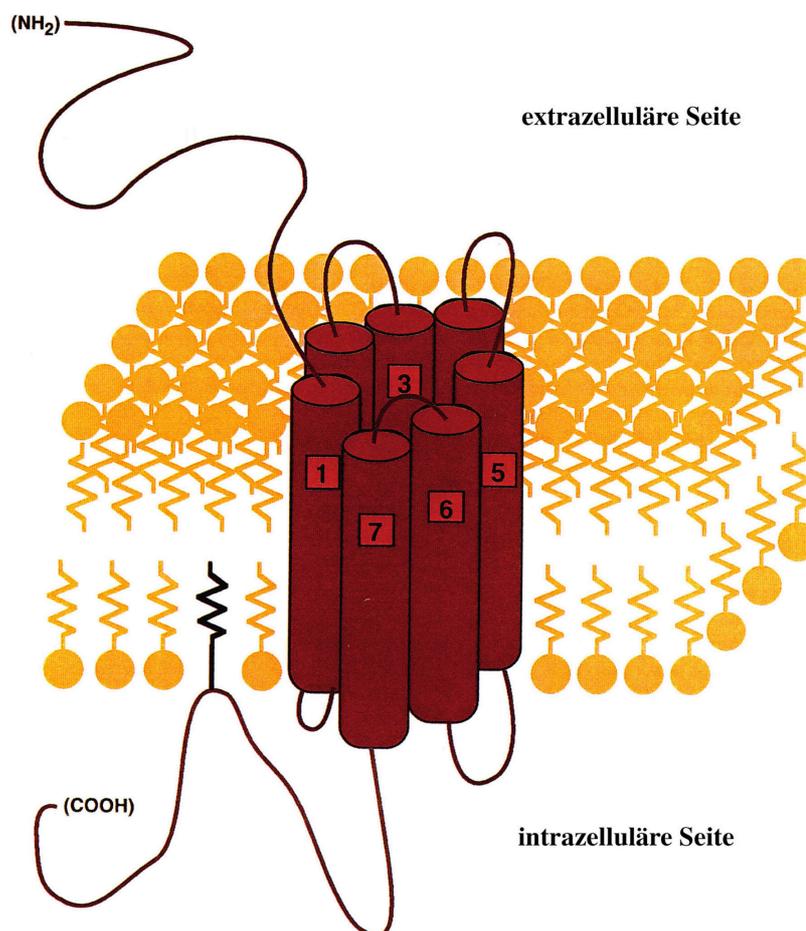


Abbildung 1: Darstellung eines G-protein-gekoppelten Rezeptors. Die 7 Transmembrandomänen sind als Zylinder gezeichnet. Die intrazellulären Schleifen und die benachbarten Transmembrandomänen sind für die G-Protein-Kopplung von Bedeutung. Schema nach Iismaa et al., 1995.

Die Opioidrezeptoren gehören zur Familie der G-protein-gekoppelten Rezeptoren, welche zirka 1000 bekannte Rezeptoren umfaßt. Diese Gruppe ist durch sieben hydrophobe helikale

Transmembrandomänen charakterisiert, die zur Verankerung des Rezeptors in der Membran dienen. Der N-Terminus befindet sich im Extrazellulärraum und der C-Terminus im Intrazellulärraum. Die sieben Transmembrandomänen sind durch drei unterschiedlich große intrazelluläre und extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden. In der **Abbildung 1** (S. 2) wurde der Aufbau eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors schematisch dargestellt. Mittels röntgenkristallographischer Analyse konnte die angenommene strukturelle Anordnung bestätigt werden, wonach die sieben Helices bündelförmig in die Membran eingebettet sind. Die Bindung der spezifischen Liganden (*first messenger*) erfolgt durch die extrazelluläre Domäne des Rezeptors mit hoher Affinität und führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, was eine Kopplung der intrazellulären Schleifen und direkt benachbarter Transmembrandomänen mit spezifischen G-Proteinen und deren Aktivierung zur Folge hat.

Ein G-Protein besteht aus den drei Untereinheiten α , β , und γ . Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanin-Nukleotide (Guanosindiphosphat [GDP] beziehungsweise Guanosintriphosphat [GTP]) und beinhaltet die GTPase-Aktivität. Über den hydrophoben Komplex der α - und β -Untereinheit ist das G-Protein in der Membran verankert, wo es im inaktiven Zustand als Trimer der drei Untereinheiten ohne Kopplung an den Rezeptor vorliegt. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor und der Assoziation mit dem trimeren G-Protein kommt es zum Austausch von GDP gegen GTP an der α -Untereinheit und der Abtrennung der $\beta\gamma$ -Untereinheit von dem ternären Komplex aus Ligand, Rezeptor und trimeren G-Protein. Die Aktivierung des G-Proteins führt zur Regulation von spezifischen Effektorsystemen durch die G-Protein-Untereinheiten α und $\beta\gamma$. Dadurch kommt es zur Bildung von sogenannten *second messenger*-Molekülen, die über nachgeschaltete Signaltransduktionskaskaden weitere Enzymsysteme kontrollieren.

Der Opioidrezeptor ist an ein G_i -Protein gekoppelt, ein inhibitorisches G-Protein, welches die Aktivität der Adenylatzyklase hemmt. Da das Enzym die Entstehung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) stimuliert, einem wichtigem *second messenger* der Zelle, verringert die Inhibition der Adenylatzyklase den cAMP-Spiegel der Zelle. Die Aktivierung der $\beta\gamma$ -Untereinheit kann zum Beispiel die Aktivität von G-protein-gekoppelten Kaliumkanälen oder Rezeptorkinasen regulieren. Aufgrund der konstitutiven enzymatischen Aktivität der α -Untereinheit wird anschließend das gebundene GTP hydrolysiert, was zur Auflösung des Komplexes mit dem Rezeptor und zur Heterotrimerisierung der Untereinheiten zum inaktiven G-Protein führt (Kaziro et al., 1991). Der Rezeptor kehrt entweder in seinen Ruhezustand zurück oder aktiviert weitere G-Proteine.

Der chronische Gebrauch von Agonisten hat eine Abnahme der Rezeptoraktivität zur Folge, so daß höhere Dosen notwendig sind um dieselbe Wirkung zu erzielen. Dieses als Toleranz (Gewöhnung) bezeichnete Phänomen wirkt sich insbesondere auf die zentral dämpfenden Eigenschaften der Opioidanalgetika aus, indem es die Effekte der Atemdepression, Analgesie und Sedation verringert. Für die Reduktion der Opioidrezeptoraktivität lassen sich drei verschiedene Mechanismen verantwortlich machen: die Desensibilisierung (Entkopplung des Rezeptors von rezeptor-aktivierten Effektorsystemen), die Internalisierung (Entfernung des Rezeptors aus der Membran) und die Verringerung der Rezeptorenzahl (*downregulation* = Herunterregulation). Dabei werden die Desensibilisierung und Internalisierung des Rezeptors als frühe adaptive Prozesse angesehen, während es sich bei der Herunterregulation um die Folge einer Langzeitanpassung der Zelle nach einer chronischen Agonistengabe handelt. Die Ursache der *downregulation* des Opioidrezeptors kann in einem Abbau (Degradation) des internalisierten Rezeptors und/oder in einer Abnahme der Rezeptorneusynthese (Verringerung der Expressionsrate) liegen. Der primäre Mechanismus der Desensibilisierung und Internalisierung des Opioidrezeptors ist die agonisten-induzierte Phosphorylierung des Rezeptors. Hierbei spielen G-protein-gekoppelte Proteinkinasen (GRKs) und *second messenger*-regulierte Proteinkinasen (zum Beispiel die CaM Kinase II) eine wichtige Rolle, indem sie nach der Bindung des Agonisten und der Aktivierung des Rezeptors Aminosäurereste (Serine und Threonine) am C-Terminus des Opioidrezeptors phosphorylieren. Die Phosphorylierung des aktivierten Rezeptors führt zur Bindung von β -Arrestinen und damit zur Entkopplung des Rezeptors von seinen G-Proteinen (Desensibilisierung). Darüber hinaus ist die Bindung von β -Arrestinen ein entscheidender Schritt für die Internalisierung des G-protein-gekoppelten Rezeptors. Sie führt zur Auslösung der Endozytose des Opioidrezeptors durch die membranäre Translokation von AP2 (Adapterprotein 2) und Clathrin (Conner und Schmid, 2003). Dieser Prozeß kann einerseits zur Reaktivierung des Rezeptors durch Dephosphorylierung und zum Rücktransport des Rezeptors in die Plasmamembran führen (Resensibilisierung) oder andererseits die Degradation des Rezeptors und somit eine Verringerung der Rezeptorenzahl nach sich ziehen. Die Entscheidung hängt von der Dauer der chronischen Agonistenbehandlung ab (Koch et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnten Tsao und von Zastrow (2000) das unterschiedliche postendozytische Schicksal des β -Opioidrezeptors im Vergleich zu den anderen Opioidrezeptoren zeigen. Nach der Endozytose des β -Opioidrezeptors kommt es nämlich

durch spezifische Sortierungsoperationen zu einer stärkeren Degradation des Rezeptors in den Lysosomen.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit wurde nach neuen intrazellulären Interaktionspartnern des μ -Opioidrezeptors gesucht, die an der Endozytose des Rezeptors beteiligt sein könnten. Dazu wurde das sogenannte *yeast two hybrid*-System verwendet (Fields et al., 1989). Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Induktion von Reportergenen, welche durch die Wechselwirkung zweier getrennter Domänen eines Transkriptionsfaktors ausgelöst werden. Der dazu verwendete Hefetranskriptionsfaktor GAL4 besteht aus einer Aktivierungs- und einer Bindungsdomäne. Die cDNA beider Domänen wird von zwei getrennten Vektoren kodiert. Für unsere Suche verwendeten wir auf der einen Seite eine cDNA-Bibliothek aus der Ratte als Vektor und auf der anderen Seite einen Teil des μ -Opioidrezeptors (MOR1; C-terminale Aminosäuren 340 bis 398) der gleichen Spezies. Im Falle einer Interaktion der Proteine führte die räumliche Annäherung der Aktivierungs- und DNA-Bindungsdomäne von GAL4 zur Expression des Reportergens. Auf diesem Wege konnten 280 positive Klone identifiziert werden. Davon wurden sechs Klone weiter untersucht und die Interaktion mittels nachfolgender Kontrollversuche des *yeast two hybrid*-System bestätigt. Bei einem Klon handelte es sich dabei um eine Ratten-cDNA, welche für den NH₂-Terminus der Phospholipase D2 kodierte (NH₂-terminale Aminosäuren 116 bis 226; Koch et al. 2003).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beziehung zwischen MOR1 und Phospholipase D2 (PLD2) untersucht. Die Phospholipase D hydrolysiert Phosphatidylcholin (PC) als Bestandteil von zellulären Membranen zu Phosphatidsäure (PA) und Cholin (Hanahan und Chaikoff, 1947). Daneben katalysiert die PLD eine Transesterifizierungs-Reaktion (Transphosphatidylierung). Das heißt, daß das Enzym neben Wasser auch kurzkettige primäre Alkohole als Phosphatidyl-Gruppen-Akzeptor zuläßt. Die resultierenden Phosphatidylalkohole werden nur durch die Phospholipasen gebildet und sind kein natürlicher Bestandteil biologischer Membranen. Sie finden daher als sensitive Marker der PLD-Aktivierung in kultivierten Zellen Verwendung (Morris et al., 1997). In der **Abbildung 2** (S. 6) sind die beiden PLD-Reaktionen schematisch dargestellt.

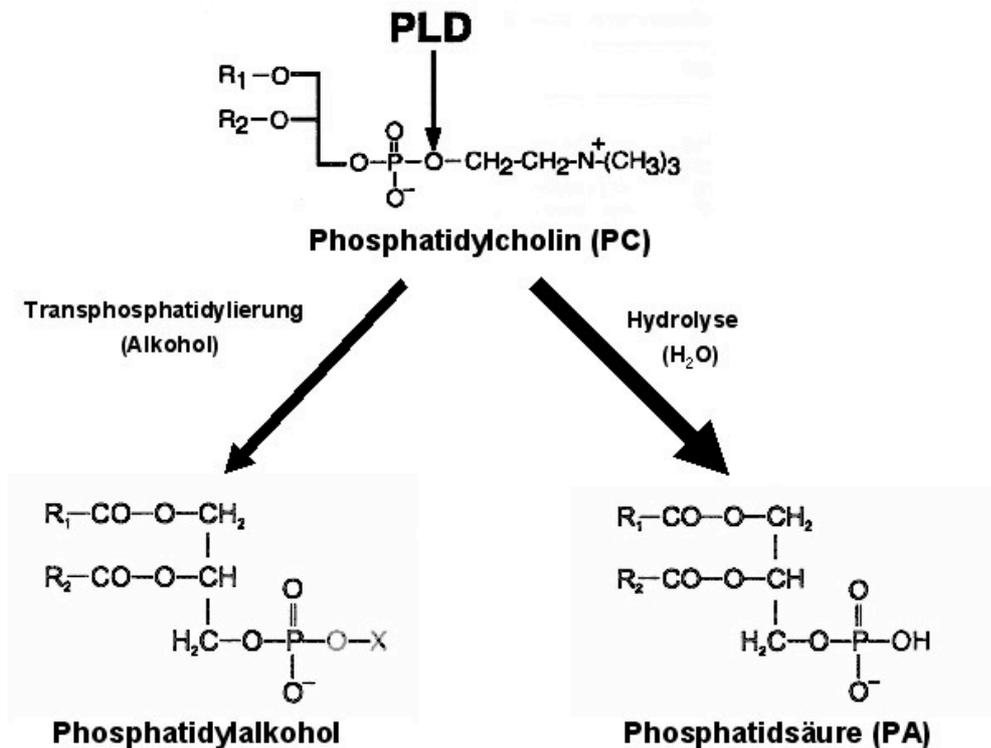


Abbildung 2: Hydrolyse und Transphosphatidylierung von Phosphatidylcholin durch die Phospholipase D. X = Kohlenstoffrest des Alkohol, z.B. C₂H₅ für Ethanol.

Die Phospholipase D gehört zusammen mit der Phospholipase C, der Phospholipase A₂ und der Shingomyelinase zur Gruppe der phosphoinositid-spezifischen Proteine. Dabei handelt es sich um phospholipid-degradierende Enzyme, nach deren Aktivierung biologisch aktive Produkte entstehen, welche wichtige Funktionen in der Zellregulation einnehmen. Die Aktivität dieser Enzyme kann durch zahlreiche Rezeptoren und Agonisten stimuliert werden und resultiert in einer Modifikation von verschiedenen Lipidbestandteilen der Membranen und führt zur Translokation und Modulierung von spezifischen Zielproteinen (Liscovitch et al., 2000).

Zusammen mit der Phosphatidylserinsynthase, Cardiolipinsynthase, tyrosyl-DNA Phosphodiesterase, zwei bakteriellen Endonukleasen, einem Toxin des Bakteriums *Yersinia pestis* und zwei Hüllproteinen des Poxvirus gehört die PLD zu einer PLD-Superfamilie, welche durch die Gegenwart eines oder mehrerer HxKxxxxD-Motive (HKD; Histidin-Lysin-Asparaginsäure **Abbildung 3**, S. 8) gekennzeichnet sind. Eine Mutagenese dieses Motivs führt zum Verlust der katalytischen Funktion des Enzyms. Bei Säugetieren werden zwei

Isoformen der PLD unterschieden, wobei die Phospholipase D1 noch in die Spleißvarianten 1a und b unterteilt werden kann. Zwischen der PLD1 und 2 besteht eine Homologie von 50-53% (**Tabelle 1**).

	PLD1	PLD2
Strukturelle Eigenschaften:	2 existierende Spleißvarianten: PLD1a (1072 AS) und PLD1b (1036 AS)	PLD2 (933 AS), 50 % Homologie mit der PLD1
Aktivierbar durch: Gehemmt durch:	ARF, RhoA, PKC	ARF, PKC Synuclein
Höchste Expression:	PLD1a: Lunge, Herz, Milz PLD1b: Nieren, Dünn- und Dickdarm, Leber	Gehirn, Herz, Nieren
Subzelluläre Lokalisation:	Intrazelluläre Membranen: Kernhülle, Endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Transport/sekretorische Vesikel	Plasmamembran, Vesikel nahe der Plasmamembran (endozytische Vesikel), Caveolae
Mögliche Funktion:	Regulation der Exozytose	Regulation der Endozytose

Tabelle 1: Vergleich der PLD-Isoformen.

Die PLD2 besitzt vier konservierte Regionen, eine Pleckstrin-Homologie- (PH) sowie Phox-Homologie-Domäne (PX) im Tandem am NH₂-Terminus. Die Domänen sind für die Phospholipid- und Proteinbindung verantwortlich. Im Zusammenhang mit dem möglichen Bindungsort zwischen dem MOR1 und PLD2 ist von Interesse, daß es sich bei dem Stück der PLD2, welches im *yeast two hybrid*-System identifiziert werden konnte, um den Hauptteil der Phox-Homologie-Domäne handelt (Aminosäuren 63-192; **Abbildung 3**, S. 8).

Die Aktivität der Phospholipase D ist von der Konzentration an Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat (PIP₂) abhängig (Divecha et al., 2000). Die PH-Domäne und eine konservierte Sequenz zwischen den Domänen II und III sind Bindungsstellen für PIP₂. Das Phospholipid, deren Hydrolyse durch die Phospholipase C zu Diacylglycerol und Inositol 1,4,5-triphosphat (IP₃) die Proteinkinase C aktiviert und die Kalzium-Freisetzung erhöht, wirkt als Kofaktor bei

der Regulation der PLD-Aktivität. Die Steuerung der beiden Säugetier-PLDs erfolgt dabei mittels unterschiedlicher Mediatoren. So wird die PLD1 durch ARF (ADP-Ribosylierungsfaktor) und RhoA, zwei kleinen G-Proteinen, positiv reguliert. Außerdem führt die Stimulierung der Proteinkinase C zu einer Aktivitätssteigerung der Phospholipase D1. Die PLD2 wird in erster Linie durch ARF positiv reguliert, während das cytosolische Protein Synuclein die Funktion der Phospholipase D2 hemmt (Tabelle 1, S. 7; Pronin et al., 2000). Diskutiert wird auch, daß die Tyrosinkinaseaktivität steuernd in den Prozeß der PLD2-Aktivierung eingreift und daß die PLD2-Lokalisierung und -Aktivität durch die Tyrosin-Phosphorylierung beeinflusst wird (Exton, 2002).

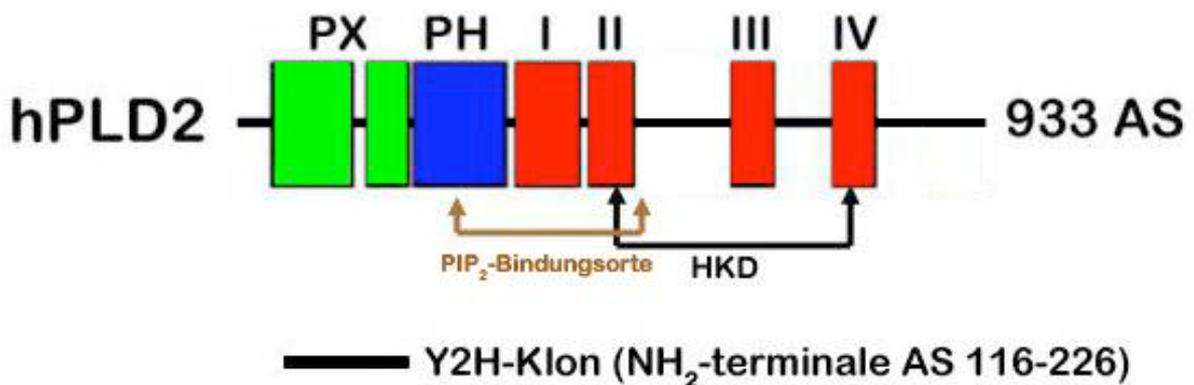


Abbildung 3: Struktur der PLD2 und Lage des identifizierten *yeast two hybrid*-Klons. I-IV (rot), konservierte Domänen, Bestandteil aller PLDs. Die Phox-Homologie-Domäne (hellgrün) befindet sich am N-terminalen Ende der Sequenz. An die PX-Domäne schließt sich die Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH; blau) an. Struktur der PLD2 nach Liscovitch et al. (2000). Die Domänen II und IV enthalten ein kurzes Sequenzmotiv (HKD), das eine bedeutende Rolle in der katalytischen Funktion des Enzyms spielt (Sung et al., 1997; Gottlin et al., 1998). Die PH-Domäne und eine konservierte Sequenz zwischen den Domänen II und III enthält Bindungsstellen für PIP₂ (Exton, 2002).

Unterschiede zwischen der PLD1 und 2 gibt es auch hinsichtlich der Expression in den verschiedenen Säugetier-Geweben. Die PLD1 weist die höchsten Expressionsraten in den Nieren und der Lunge aus, wobei die Phospholipase D1b als Hauptform hauptsächlich in den Nieren, dem Dün- und Dickdarm und der Leber exprimiert wird, wohingegen die PLD1a vorwiegend in der Lunge, Milz und dem Herzen der Ratte zu finden ist. Die PLD2 wird ubiquitär exprimiert. Höchste Konzentrationen finden sich im Gehirn, Herzen und in den Nieren von Nagetieren. Im Menschen finden sich sehr hohe PLD2-Spiegel in der Prostata, Placenta und dem Thymus, Herzen, Pankreas, den Nieren und der Lunge (Tabelle 1 (S. 7); Lopez et al., 1998; Liscovitch et al., 2000).

Die PLD1 und PLD2 sind membran-assoziierte Enzyme. Posttranslationale Modifikationen beeinflussen die Interaktion mit den Membranen. Xie et al. (2002) konnten zum Beispiel zeigen, daß Modifikationen in Form einer Palmitoylierung oder Serin/Threonin-Phosphorylierung essentiell für die enzymatische Aktivität und Membranlokalisierung der PLD1 und PLD2 sind. Zwischen der PLD1 und PLD2 gibt es jedoch deutliche Unterschiede hinsichtlich der subzellulären Lokalisation. Während die PLD1 in der Kernhülle, dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Golgi-Apparat zu finden ist, handelt es sich bei der PLD2 um ein plasmamembran-assoziiertes Enzym. Aufgrund des Vorhandenseins der PLD1 in den Membranen der Transport- und sekretorischen Vesikel wird auf eine mögliche Aufgabe in der Exozytose geschlossen. Im Gegensatz dazu dürfte die Aufgabe der endosomal- beziehungsweise plasmamembran-lokalisierten PLD2 in der Endozytose liegen (**Tabelle 1**, S.7; Liscovitch et al., 2000).

Extrazelluläre Stimuli in Form von Neurotransmittern, Hormonen, Wachstumsfaktoren und Zytokinen/Chemokinen können die PLD2 aktivieren. So wird die PLD durch zahlreiche G-protein-gekoppelte Rezeptoren wie den Vasoaktiven-intestinalen-Polypeptid- und Pituitären-Adenylatzyklase-aktivierenden-Polypeptid-Rezeptoren (VPAC- und PAC-Rezeptoren), dem metabotropen Glutamat-Rezeptor, den M₁-M₄-muscarinergen Rezeptoren oder dem D₂-Dopamin-Rezeptor stimuliert (McCulloch et al., 2001; Sandmann et al., 1991; Senogles et al., 2000). Für das weitere Verständnis der Funktion der PLD trug die Identifizierung der Interaktion zwischen der Phospholipase D und dem Epidermalen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R) bei. Slaaby et al. (1998) konnten zeigen, daß die EGF-Rezeptor-Stimulierung durch EGF zur Aktivierung der PLD1 und D2 führte. Darauf aufbauend untersuchten Shen et al. (2001) die Rolle der PLD in der rezeptor-vermittelten Endozytose des EGF-Rezeptors. Sie fanden heraus, daß die Überexpression der PLD und deren Regulatoren (zum Beispiel PKC α) zu einer beschleunigten Internalisierung des Rezeptors führt, während katalytisch inaktive Mutanten der PLD1 und D2 eine Hemmung der Endozytose zur Folge haben. Es ist daher vorstellbar, daß die Phospholipase D eine wichtige Rolle im Prozeß der agonisten-vermittelten Endozytose von Rezeptoren spielt. Um diese Hypothese zu untermauern, sollten die Untersuchungen zur liganden-induzierten Endozytose auch auf andere G-protein-gekoppelte Rezeptoren ausgedehnt werden. In der vorliegenden Arbeit sollte deshalb der Einfluß der Phospholipase D2 auf die Rezeptoraktivität des MOR1 als Beispiel eines G-protein-gekoppelten Rezeptors demonstriert werden.

Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Funktion der Phospholipase D2 bei der Desensibilisierung und Internalisierung des μ -Opioidrezeptors zu charakterisieren. Ausgehend von den Befunden im *yeast two hybrid*-System sollte die Interaktion zwischen MOR1 und PLD2 mit Hilfe der Koimmunopräzipitation in eukaryontischen Zellen bestätigt werden. Weiterhin müßte der Mechanismus der PLD2-Aktivierung durch den MOR1 analysiert werden, insbesondere sollte geklärt werden ob die Aktivierung ARF- oder PKC-abhängig erfolgt. In einem weiteren Ansatz sollte der Einfluß der Phospholipase D2 auf die MOR1-Endozytose untersucht werden. Dabei müßte geprüft werden, wie sich die Stimulierung oder Hemmung der PLD2-Aktivität auf die agonisten-induzierte Internalisierung des MOR1 auswirkt. Schließlich ist das Ziel dieser Arbeit, den Einfluß der Aktivierung beziehungsweise Hemmung der PLD2 auf die De- und Resensitisierung des MOR1 zu bestimmen. Die Untersuchungen sollten dazu beitragen, neue Einblicke in die Mechanismen der agonisten-induzierten Endozytose des μ -Opioidrezeptors zu ermöglichen.

II. Material und Methoden**1. Material****1.1. Verbrauchsmaterialien**

- *Deckgläser*, rund Ø 15 mm, Firma. Gaudig, Osterweddingen
- *DC-Fertigplatten*, SIL G-25, Fa. Machery-Nagel, Düren
- *Objektträger*, Glas, SuperFrost und SuperFrost Plus, Fa. Menzel, Braunschweig
- *Einmalpipetten*, verschiedene Größen, Fa. Greiner, Frikenhausen
- *Pipettenspitzen*, verschiedene Größen, Fa. Greiner, Frikenhausen
- *Gewebekulturflaschen / Gewebekulturschalen*, Fa. Greiner, Frikenhausen
- *Zentrifugenröhrchen*, aus Polypropylen, 15 und 50 ml, Fa. Greiner, Frikenhausen
- *Reaktionsgefäße*, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- *Zellkulturplatten*, 6, 12 oder 24 Vertiefungen, Fa. Biochrom, Berlin
- *96-Loch-Platten*, Fa. Greiner, Frikenhausen
- *Szintillatorröhrchen*, aus Polypropylen, 8 ml, Fa. Packard, USA
- *Dia-Filme / Fotopapier*, Agfa beziehungsweise Fuji

Ferner das übliche Laborzubehör und *Glasgebrauchsmaterial*.

1.2. Chemikalien und Radioisotope

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

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

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

Reagenzansätze:

- *cAMP-radioimmunoassay-Kit*, Fa. Amersham Bioscience, Braunschweig
- *Sequenzier-Kit*, Fa. Li-cor, USA
- *DNA-Aufreinigung-Kits*, Fa. Qiagen, Hilden
- *ABTS-Lösung* (Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)), Fa. Roche Molecular Biochemicals

Radioisotope:

- [1,2,3-³H]-Glycerol (1 µCi/ml; 40 Ci/mmol), American Radiolabeled Chemicals, USA
- [³H]-DAMGO (1 µCi/ml; 50 Ci/mmol), PerkinElmer, Belgien

1.3. Enzyme und Oligonukleotide

Die verwendeten Enzyme wurden bezogen von:

- *PCR-Reagenzien*, Fa. Promega
- *Ligase, Ligationspuffer*, Fa. Gibco, Eggenstein
- *Restriktionsenzyme*: Hind III, Xba I, Fa. New England Biolabs, Frankfurt a. M.
- *Oligonukleotide*, Fa. Metabion, Martinsried.

Verwendete Oligonukleotide:

- pcDNA3.1-*HindIII forward* (Sequenz 5'-GCG GCC GCG **AAG CTT** ATG ACG GCG ACC CCT GAG -3')
- pcDNA3.1-*XbaI revers* (Sequenz 5'-CCA GCC ACC **TCT** AGA ACC AGC GAT AAC AAA CTT -3')

1.4. Zelllinien

HEK293: humane embryonale Nierenzelllinie (ATTC CRL 1573)

1.5. Vektoren, rekombinante Expressionsplasmide und Antikörper

pEAK10 (Edge Bio System, USA)

pcDNA3.1 (Invitrogen, Karlsruhe)

verwendete rekombinante Expressionsplasmide:

- *rMOR1-Expressionsplasmid*

Die cDNA des μ -Opioidrezeptors aus der Ratte wurde von Dr. Thomas Koch am NH₂-Terminus mit HA (Hämagglutinin) markiert und in ein pEAK10-Expressionsvektor subkloniert.

- *hPLD2- bzw. hPLD1b-Expressionsplasmid*

hPLD2- bzw. hPLD1b-pcDNA3.1 (zur Verfügung gestellt von Dr. S. Ryo, Pohang, Südkorea)

Verwendete Antikörper:

- Kaninchen Anti-Mensch Phospholipase D Antikörper (Dr. S. Ryo, Südkorea)
- Maus Anti-Mensch ARF (ADP-Ribosylierungsfaktor) Antikörper (Dianova, Hamburg)
- Affinitätsgereinigter polyklonaler Kaninchen Anti-HA Antikörper (Gramsch Laboratorium, Schwabhausen)
- Cyanin 3 Anti-Kaninchen HA, sekundärer Antikörper (Dianova, Hamburg)
- Meerrettichperoxidase Anti-Kaninchen/Maus (Amersham Bioscience, Braunschweig)

1.6. Lösungen und Kulturmedien

- *Anodenpuffer I*

bestehend aus:

0,3 M Tris

20% Methanol

- *Anodenpuffer II*

bestehend aus:

25 mM Tris

20% Methanol

- *2x BES-buffered Solution (BBS)*

bestehend aus:

50 mM BES (N,N-bis[2-Hydroxyethyl]-2-aminosulfonsäure)

280 mM NaCl

1,5 mM Na₂HPO₄ x 2 H₂O

Die Substanzen werden in 400 ml Aqua bidest gelöst, der pH auf 6,95 mit 1 N NaOH eingestellt, auf 500 ml aufgefüllt, steril filtriert und bei -20°C in Reaktionsgefäßen aufbewahrt.

- *Ethylendiamintetraessigsäure* (EDTA) (0,5 M, pH 8,0)

18,6 g EDTA x 2 H₂O werden in 80 ml Aqua bidest gelöst, der pH wird auf 8,0 mit NaOH eingestellt und anschließend autoklaviert.

- *Homogenisierungspuffer (pH 7,6)*

bestehend aus:

10 mM TRIS

5 mM EDTA

3 mM EGTA

250 mM Sucrose

Proteinaseinhibitoren (10 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Pepstatin A, 1 µg/ml Aprotinin, 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 10 µg/ml Bacitracin)
Iodoacetamid (1,85 mg/ml; 10 mM)

- *Hepes-Puffer*

bestehend aus:

150 mM NaCl

20 mM Hepes

5 mM EDTA

3 mM EGTA

Proteinaseinhibitoren (siehe Homogenisierungspuffer)

Dodecyl- β -maltosid (4 mg/ml)

- *Kathodenpuffer*

bestehend aus:

40 mM 6-Aminocapronsäure

20% Methanol

- *LB-Medium*

20 g *LB broth base* werden mit Aqua bidest auf 1 l aufgefüllt, gründlich gerührt und autoklaviert.

- *LB-Ampicillin-Agar*

Die benötigte Menge an autoklaviertem LB-Agar wird geschmolzen und auf 55 °C abgekühlt. Die entstandene Suspension wird mit Ampicillin (100 µg/ml) versetzt und auf Petrischalen verteilt.

- *SDS-Probenpuffer*

bestehend aus:

62,5 mM TrisHCl (pH 6,8)

100 mM DL-Dithiothreitol

2% SDS (Dodecylsulfate)

20% Glycerol

0,005 Bromphenolblau

- *Tris/phosphate-buffered saline (TPBS 15 x)*

bestehend aus:

7,5 g Thimerosal

18,6 g Tris

135 g NaCl

0,2 M Phosphatpuffer:

132,8 ml Lösung A: 27,9 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua bidest und

566,7 ml Lösung B: 35,63 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ auf 1 l Aqua bidest

Die Substanzen werden in 800 ml Aqua bidest gelöst, der pH auf 7,5 mit konzentrierter HCl eingestellt und auf 1 l aufgefüllt.

- *Zamboni-Fixierlösung*

350 ml gesättigte Pikrinsäure und 80 g Paraformaldehyd werden in einer 500 ml Flasche auf 60°C erhitzt. Tropfenweise wird NaOH-Lösung dazugegeben bis das Paraformaldehyd gelöst ist. Das Gemisch wird in eine 2 l Flasche filtriert und mit

Phosphatpuffer (6,62 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ und 44,8 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ gelöst in 2 l Aqua bidest) aufgefüllt.

- *Zellkulturmedien und Zusätze:*
 - DMEM-Medium (*Dulbecco's modified Eagle-Medium*, Fa. BioWhittaker Europe, Belgien)
 - RPMI 1640-Medium (*Roswell Park Memorial Institute*, Fa. BioWhittaker Europe, Belgien)
 - OptiMEM-Medium (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
 - FKS (fötales Kälberserum, Endkonzentration im Medium: 10%)
 - Trypsin/EDTA-Lösung: Die Trypsinkonzentration wird auf 0,05% in 1xPBS verdünnt. Auf 500 ml dieser Lösung werden 500 μl 0,5 M EDTA gegeben.
 - PBS (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung, Gibco, Belgien)
 - G418 (Geneticin, Stocklösung: 50 mg/ml)
 - Puromycin (2,5 mg/ml, Endkonzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$)
 - Einfriermedium (2x: 10 ml DMSO, 15 ml FKS, 25 ml DMEM-Medium ohne Zusätze)

1.7. Geräte

- *Brutschrank „BB 6220 CU“*, Fa. Waldner-Laboreinrichtungen, Wangen
- *Blotting-Apparatur „Pharmacia LKB Multiphor II“*, Fa. Pharmacia,
- *2-D-Elektrophoresekammer „Protean II XL-System“*, Bio-RAD, München
- *Spannungsquelle „Elektrophoresis Power Supply Modell 3000 xi“*, Bio-RAD, München
- *DNA-Sequenzier „Modell 4000“*, Fa. LI-COR, USA
- *Drucker „Hewlett Packard Laser Jet 2100 TN“*, Fa. Hewlett Packard, USA
- *Durchlichtmikroskop „Televa 31“*, Fa. Zeiss, Jena
- *Gene Pulser II*, Fa. Biorad, München
- *Gilsonpipetten „Pipetman“*, verschiedene Größen, Fa. Abimed, Langenfeld
- *Konfokales Laser Scan Mikroskop „Leica TCS NT“*, Fa. Leica Instruments, Heidelberg
- *Kühlzentrifuge „AllegraTM 21R“*, Fa. Beckman, USA

- *Kühlzentrifuge „Avanti™ 30“*, Fa. Beckman, USA
- *Kühlzentrifuge „J2-MC“*, Fa. Beckman, USA
- *Homogenisator*, Fa. Braun, Melsungen
- *Microplate Reader Model 450*, Fa. Bio-RAD, München
- *pH-Meter „AR 15“*, Fa. Fischer, USA
- *PCR-Gerät „DNA Engine PTC-200“* (Peltier Thermal Cycler), Fa. Biozym
- *Präzisionswaage*, Fa. Sartorius, USA
- *37 °C-Schüttel-Inkubator „Certomat“*, Fa. Saur, Reutlingen
- *Schüttler „Heidolph UNIMAX 2010“*, Fa. Bachofer, Reutlingen
- *Spektralphotometer*, Fa. Biochrom, UK
- *Tri-Carb 1900 TR Liquid Scintillation Analyser*, Fa. Packard, USA
- *Trockenschrank*, Fa. Memmert, Schwabach
- *Vakuumpumpe (200 mbar)*, Fa. Inotech, Schweiz
- *Vakuumbzentrifuge „Concentrator 5301“*, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg
- *Vortex*, Fa. Bachofer, Reutlingen
- *Wasserbad*, Fa. Julabo, Seelbach
- *Zentrifuge „Eppendorf 5415C“*, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz, Hamburg

2. Methoden

2.1. Amplifizierung und Subklonierung der PLD2-Mutante

Ausgehend von dem hPLD2-pcDNA3.1-Expressionsplasmid wurde eine katalytisch inaktive Mutante der PLD2 konstruiert. Die PLD2-Mutante sollte nur die NH₂-terminalen Aminosäuren 1-235 der Phospholipase D2 ohne die Aktivierungsmotive (HKD; siehe **Abbildung 3**, S. 8) exprimieren. Das PLD2-Fragment enthält die Phox-Homologie-Domäne und kann darüber mit dem MOR1 interagieren. Mit Hilfe der PCR-Mutagenese wurden die notwendigen Restriktionsstellen in das Plasmid eingeführt.

2.1.1. PCR-Mutagenese

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der spezifischen Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Dabei kann durch den Einsatz von zwei Oligonukleotiden (Primer) unterschiedlicher Orientierung die gewünschte DNA-Sequenz zwischen den anhand der Primer definierten Sequenzen amplifiziert werden. Aufgrund dieser Eigenschaft können die Primer dazu verwendet werden gezielt Mutationen in die Sequenz einzuführen. Im Falle der Konstruktion einer negativen PLD2-Mutante wurde ein *HindIII*- und *XbaI*-Schnitt in die amplifizierte Sequenz der PLD2 eingefügt. Der reverse Primer enthielt dabei neben einer *XbaI*-Restriktionsstelle ein Stop-Codon an der Aminosäureposition 235. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (50 µl) beinhaltete folgende Komponenten:

Aqua bidest	37,5 µl
PCR-Puffer (10x)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	3 µl
dNTP (20 mM)	1 µl
<i>HindIII-forward</i> -Primer	1 µl
<i>XbaI-revers</i> -Primer	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
hPLD2-pcDNA3.1 (< 1 µg)	1 µl

Die PCR wird in drei Reaktionsschritte unterteilt: Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation. Während der einminütigen Denaturierungsphase wurden zunächst die Einzelstränge der doppelsträngigen DNA bei 95°C voneinander getrennt. Im nächsten Schritt

lagern sich die Oligonukleotide an ihre komplementären Sequenzen an. Die optimale Temperatur für die Anlagerung hängt vom Verhältnis der Primerbasen ab (für jedes A:T 2°C, für jedes G:C 4°C). An die Anlagerung schließt sich die zweiminütige Phase der Verlängerung der Primersequenz anhand der DNA-Matrize durch die Taq-Polymerase an. Anschließend wurde die neusynthetisierte DNA bei 95°C denaturiert und die Abfolge wiederholte sich (30 Zyklen). Die Reaktion wurde in einem DNA Engine PTC-200 (Peltier Thermal Cycler) in dünnwandigen 500 µl-PCR-Reaktionsgefäßen (Biozym) durchgeführt. Die Analyse der amplifizierten DNA erfolgte in der Agarosegelelektrophorese, wobei 1%ige Agarose-Gele benutzt wurden. Das Reaktionsprodukt wurde dann bei 4°C aufbewahrt oder mit Hilfe und nach Anleitung des „PCR Purification Kit“ (Fa. Qiagen, Hilden) aufgereinigt.

2.1.2. Restriktionsendonukleaseverdau von DNA

Der Vektor als auch der amplifizierte verkürzte Rezeptor wurden mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III (5'-A₁AG-CTT-3') und *Xba* I (5'-T₁CT-AGA-3') bei 37°C für 1 – 2 Stunden gespalten. Die Reaktionsansätze sahen wie folgt aus:

Vektor:	Rezeptor:
5 µl pcDNA3.1	50 µl hPLD2 (PCR-Produkt)
1 µl <i>Hind</i> III	2 µl <i>Hind</i> III
1 µl <i>Xba</i> I	2 µl <i>Xba</i> I
2 µl Restriktionspuffer 2	<u>6 µl Restriktionspuffer 2</u>
<u>11 µl Aqua bidest</u>	60 µl Gesamtvolumen
20 µl Gesamtvolumen	

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

2.1.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Der Einbau des 695-Basenpaar-großen NH₂-terminalen DNA-Fragments der PLD2 in den Vektor (Ligation) wurde bei 15°C über Nacht durchgeführt.

Ligationsansatz:

- 20 µl nPLD2 (*Hind* III und *Xba* I geschnitten)
- 10 µl pcDNA3.1 (*Hind* III und *Xba* I geschnitten)
- 8 µl 5x Ligase-Puffer
- 2 µl Ligase
- 40 µl Gesamtvolumen

2.1.5. Sequenzierung

Mit Hilfe eines Licor DNA Sequencer (Modell 4000) wurde die Sequenzierung halbautomatisch durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte nach der Didesoxynukleotid-Methode durch *Cycle Sequencing*, 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. 200 fmol *Template*-DNA und 2 pmol IRD 800-markierte Primer (T7-Primer und SP6-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 je 25 sec bei 95°C (Denaturierung), 20 sec bei 63°C (Primer-Anlagerung), 40 sec bei 70°C (Reaktion). Anschließend wurden die Proben bis zur Nutzung bei 4°C aufbewahrt.

Vor dem Auftragen auf das Sequenziergel wurden die Proben 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 7M Harnstoff verwendet.

2.1.6. Transformation und Amplifikation

Die Transformation erfolgte mit Hilfe der Elektroporation. Bei dieser Transformationsmethode wird die Zellmembran der Bakterien für kurze Zeit durch einen elektrischen Impuls instabilisiert, so daß extrazellulär gelegene DNA in das Innere der Zelle diffundieren kann. Dazu wurden 300 ml LB-Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer optischen Dichte (OD_{590nm}) von 0,6 kultiviert. Die Bakterien wurden im Eisbad 15 min vorgekühlt, auf Zentrifugenröhrchen verteilt und 5 min bei 6000

Upm pelletiert. Bei allen nachfolgenden Schritten befanden sich die Proben auf Eis. Der Überstand wurde dekantiert, 15 ml 5%iges eiskaltes Glycerol auf das Pellet pipettiert und der Ansatz gut vermischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt bei 2°C wurde der Überstand abgegossen und mit 15 ml 5%igem eiskaltem Glycerol aufgefüllt. Dieser Ansatz wurde ebenfalls gut gemischt und nochmals zentrifugiert (5 min, 6000 Upm, 2°C). Das entstandene Pellet wurde in 1 ml 5%igem eiskaltem Glycerol resuspendiert und mit 100 µl 87%igem Glycerol vermischt (Endkonzentration = 10%ig). Je 80 µl wurden in Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C bis zur Verwendung aufbewahrt.

Die Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und die Elektroporationsküvetten vorgekühlt. Pro Ansatz wurde 1 ml LB-Medium vorgewärmt. Danach wurde die DNA (1 µl) zu den aufgetauten Bakterien gegeben, kurz vermischt und in die vorgekühlte Küvette pipettiert. Nachdem der Elektroimpuls mit Hilfe des Genpulsers auf die abgetrocknete Küvette übertragen wurde, konnte die Küvette mit 1 ml LB-Medium aufgefüllt werden. Von dem Ansatz wurden 100 µl auf ampicillin-haltige Agar-Platten ausgespatelt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Das Ampicillin wird verwendet, um die Wirtszellen zu isolieren, welche die gewünschte Plasmid-DNA besitzen. Die verwendeten Plasmide beinhalten nämlich eine Ampicillin-Resistenz und demzufolge können sich nur die Wirtszellen auf den Selektiv-Agar-Platten vermehren, die die Plasmid-DNA neben ihrem eigenen Genom replizieren.

Jedenfalls wurden von den Platten einzelne Klone mit Hilfe eines Zahnstochers aufgenommen und in 2 ml ampicillin-haltigem LB-Medium überführt, wo die Bakterien für einige Stunden bei 37°C wachsen konnten. Anschließend wurde die Lösung in einen Kolben mit 50 ml ampicillin-haltigem LB-Medium übertragen und die Bakterien über Nacht bei 37°C im Schüttler vermehrt (Chung et al., 1989). Die Plasmide wurden aus 25 ml Bakterienkultur mit Hilfe eines „Plasmid-Isolierungs-Kit“ (Qiagen) nach Angabe der mitgelieferten Protokolle isoliert.

2.2. Zellkultivierung

2.2.1. Methoden zur allgemeinen Handhabung der Zellen

Humane embryonale Nierenzellen (HEK293; Graham et al., 1977) wurden bei 37°C und 10% Kohlendioxid kultiviert. Grundlage der dauerhaften Kultivierung bildete „*Dulbecco's Modified Eagle Medium*“ (DMEM), welchem 10% fötales Kälberserum (FKS) und die den transfizierten Expressionsplasmiden entsprechenden Antibiotika zugesetzt wurden. Das Medium der Zellen wurde regelmäßig alle 2-3 Tage erneuert oder vorzeitig ausgetauscht, wenn die Indikatorfarbe des Mediums von rot-orange auf gelb-orange wechselte. Dazu mußte das verbrauchte Medium mit der Pipette steril abgesaugt werden (Vakuumpumpe), ohne dabei die Monolayer-Kultur zu beschädigen. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit frischem, auf 37°C vorgewärmtem, Medium bedeckt. Danach erfolgte die Reinkubation bei 37°C und 10% Kohlendioxid im Brutschrank.

Sobald der Boden eines Kulturgefäßes dicht bewachsen war, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Nach der Entfernung des PBS wurden die Zellen durch Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung und leichtes Klopfen auf den Boden des Kulturgefäßes abgelöst. Die Zellsuspension wurde dann im Verhältnis 1:3 bis 1:5 auf neue Kulturgefäße mit frischem Medium verteilt. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Einfriermedium bei -140°C (flüssiger Stickstoff).

2.2.2. Transfektion und Selektion der HEK293-Zellen

Die Transfektionen wurden nach der modifizierten Kalziumphosphat-Methode (Chen und Okayama, 1988), sowie mit Hilfe eines Transfektionssystems der Firma Qiagen durchgeführt. Für die Kalziumphosphat-Methode wurden die HEK293-Zellen in Zellkulturschalen mit 6 Vertiefungen in einer Dichte von 10^5 Zellen pro Vertiefung ausgesät und in DMEM, welches 10% FKS enthielt, über Nacht bei 37°C und einem CO₂-Gehalt von 10% inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach der Kalziumphosphat-Präzipitationsmethode transfiziert. In ein Reaktionsgefäß wurden 20 µg DNA des aufgearbeiteten Plasmids, circa 450 µl Aqua bidest, 50 µl 2,5 M CaCl₂ und 500 µl 2x BBS pipettiert. Die DNA-Lösung wurde mit einer Pipette gut durchgelüftet, 10 bis 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und mit einer Pipette kreisförmig auf das Medium getropft. Die Kulturschalen wurden dann

über Nacht bei 35°C und 3% Kohlendioxidgehalt kultiviert. Stabil transfizierte Zellen wurden durch den Zusatz von 1 µg Puromycin pro ml Medium selektiert.

Zur Erzeugung von Zelllinien die neben dem µ-Opioidrezeptor der Ratte auch die PLD1b, PLD2 oder die katalytisch-inaktive Mutante der PLD2 exprimieren, wurde mit Hilfe eines nicht-liposomalen Transfektionssystem der Firma Qiagen eine zweite Transfektion durchgeführt. Damit konnte eine zusätzliche DNA, die ein anderes Resistenzgen enthielt (Neomycin-Phosphotransferasegen), in die Zellen eingebracht werden, deren Aktivität die eukaryontischen Zellen gegen das Neomycinanalogon G418 resistent machte. Bei dieser Methode wurde die DNA mit einem Puffer, der positiv geladene Moleküle enthält, gemischt. Das führte dazu, daß die negativ geladene DNA nach 2-5 min kondensierte. Nachdem das micellenartige Transfektionsreagenz *Effectene*TM zugegeben wurde, bildete sich nach 5-10 min ein *Effectene*TM-DNA-Komplex, der zum Kulturmedium auf den Zellen hinzugefügt wurde.

Die Zellen wurden weiterhin bei 37°C und 10% Kohlendioxid kultiviert und durch Puromycin- und G418-haltiges Medium selektiert. Dabei wurden Konzentrationen von 1 µg Puromycin sowie 500 µg G418 pro ml Medium verwendet. Die längerfristige Aufbewahrung der Zellen erfolgte in Einfriermedium bei -140°C (flüssiger Stickstoff).

2.3. Radioligandenbindung

Die entsprechenden Zellen wurden geerntet und anschließend bei -80°C in PBS eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen bei 20.000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert und dann in Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, 3 mM EGTA, 5 mM EDTA, pH 7,4) homogenisiert. Die Zellmembranen wurden durch eine weitere Zentrifugation bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert, einmal mit Lyse-Puffer gewaschen und in Bindungs-Puffer (10 mM HEPES, 5 mM MgCl₂, 5 µg/ml Bacitracin, pH 7,5) resuspendiert. Anschließend wurde der Proteingehalt der Membranpräparation bestimmt.

Für die Sättigungsbindungsstudien wurden jeweils 25 µg Protein der Membranpräparation mit ansteigenden Konzentrationen von 0,3 bis 9 nM des [³H]-DAMGO inkubiert. Die Anzahl der Bindungsstellen (B_{max}) und die Liganden-Affinitäten (K_D) wurden aus den Mittelwerten mehrerer Doppel-Experimente nach der Scatchard-Methode ermittelt. Die nichtspezifische Bindung wurde als diejenige gebundene Radioaktivität angesehen, die in Gegenwart von 1 µM nicht radioaktiv markiertem DAMGO gemessen wurde.

2.4. PLD-Aktivitätsbestimmung

Die PLD-Aktivität wurde anhand der Transphosphatidylierungsreaktion bestimmt. Für die Versuche wurden HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD2 beziehungsweise die PLD1b koexprimieren, in 80 mm Kulturschalen ausgesät. Hatten die Zellen eine Wachstumsdichte von maximal 80% erreicht (ca. $6,82 \times 10^6$ Zellen) wurde das Medium der Schalen durch serumfreies OptiMEM-Medium ersetzt, welches [1,2,3- ^3H]-Glycerol in einer Konzentration von 1 $\mu\text{Ci/ml}$ enthielt. Die Zellen wurden mit diesem Medium über 24 h bei 37°C inkubiert, um die Phospholipide der Zellen zu markieren.

Nach dem Ablauf der 24 h wurde das Medium entfernt und die Zellen mit frischem serumfreien OptiMEM überschichtet, welches die verwendeten Agonisten beziehungsweise Antagonisten sowie 2% Ethanol enthielt. Die folgenden Substanzen wurden als wässrige Lösung in den angeführten Endkonzentration verwendet: 1 μM DAMGO, 1 μM Morphin, 1 μM Naloxon, 1 μM Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA), 1 μM Calphostin C und 25 $\mu\text{g/ml}$ Brefeldin A (BFA). Das BFA wurde 15 min vor den anderen Substanzen dem Medium zugegeben. Die Länge der Behandlung mit den Agonisten/Antagonisten dauerte maximal 30 min. Nach der entsprechenden Zeit wurde das Medium abgesaugt, die Zellen vorsichtig mit kaltem PBS gewaschen und mittels 2,5 ml eiskaltem Methanol/Wasser (3:2, v/v) pro Schale aufgeschlossen. Die Zellen wurden anschließend mit einem Zellschaber gründlich vom Boden der Kulturschalen gekratzt und in ein 15 ml-Röhrchen überführt. Die 2,5 ml Methanol/Wasser wurden durch 1,5 ml Chloroform und 0,35 ml Aqua bidest ergänzt (Methanol/Chloroform/Wasser, 10:10:9, v/v/v). Nachdem die Röhrchen geschwenkt und kurz zentrifugiert wurden, zeigten sich zwei Phasen. Die obere Phase (63%) bestand aus Methanol und Wasser, während die Untere (37%) Methanol und Chloroform enthielt. In der unteren Phase lösten sich die Lipide der aufgeschlossenen Zellen, weshalb diese Phase vorsichtig in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übernommen wurde.

Das Gemisch wurde in einer Vakuumzentrifuge eingedampft und in 25 μl Chloroform/Methanol (1:1, v/v) aufgenommen. Die Proben und die Standards (Phosphatidylethanol, Phosphatidsäure und Phosphatidylcholin) wurden auf eine Silicia Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetropft und gut getrocknet (alle weiteren Schritte unter dem Abzug). Bevor die Phospholipide mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie getrennt werden konnte, mußte die Kammer zirka 30 min lang mit dem Laufmittel equilibriert werden. Zur Herstellung des Laufmittels wurden Ethylacetate/Isooctane/Essigsäure/Wasser

im Verhältnis 13:2:3:10 (v/v/v/v) gemischt. Von den entstehenden zwei Phasen wurde die obere als Laufmittel verwendet.

Die Platte wurde in die equilibrierte Kammer hineingestellt und die Kammer geschlossen. Nach einer erreichten Laufhöhe von 15 cm wurde die Platte herausgenommen, gut getrocknet und in eine zweite vorher mit elementarem Jod equilibrierte Kammer gestellt, solange bis die Phospholipide durch das Jod sichtbar wurden. Die der Laufhöhe der Standards entsprechenden Flecken wurden mit Bleistift markiert und nach dem Verdampfen des Jods und dem Befeuchten der Platte abgekratzt und in Szintillationsröhrchen transferiert. Die gebundene Radioaktivität wurde nach Zugabe von 2,5 ml Szintillationsflüssigkeit im β -Counter 1900TR, Packard, bestimmt. Das Verhältnis entsprach dem Anteil des [^3H]-Phosphatidylethanol an der zellulären [^3H]-Phosphatidylcholin-Konzentration.

2.5. Western Blot-Analysen

2.5.1. Behandlungen

Sowohl die HEK293-Zellen, die entweder den μ -Opioidrezeptor oder die PLD2 oder beides zusammen exprimieren, als auch die MOR1-PLD1b- oder MOR1-nPLD2-exprimierenden Zellen wurden in Poly-L-Lysin-beschichteten Zellkulturschalen (0,1 mg pro ml PBS) mit einem Durchmesser von 140 mm kultiviert. Für die weiteren Versuche wurden Kulturschalen mit einer Wachstumsdichte von 80% (ca. $15\text{-}16 \times 10^6$ Zellen) verwendet. Das Kulturmedium wurde aus den Schalen entfernt und durch serumfreies OptiMEM-Medium ersetzt. Zur Untersuchung der ligandenabhängigen Bindung zwischen dem Rezeptor und der PLD2 wurde dem Medium der entsprechenden Kulturschale der MOR1-Agonist DAMGO mit einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ zugegeben. Anschließend wurden die Zellen für 30 min bei 37°C inkubiert.

2.5.2. Zellaufarbeitung und Zellyse

Nach den Behandlungen wurden die Medien aus den Schalen entfernt, zweimal mit kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer 30 min auf Eis geschwenkt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Schale entfernt und 2 min mit Hilfe eines Homogenisators aufgearbeitet. In einem ersten Zentrifugationsschritt über

5 min bei 500 x g und 4°C wurden unaufgeschlossene Zellen und Zellkerne vom Homogenat abgetrennt. Die sich im Überstand befindenden Membranen wurden in einer zweiten Zentrifugation über 30 min bei 20.000 x g und 4°C sedimentiert, anschließend in HEPES-Puffer aufgenommen und 1 h auf Eis geschüttelt. Das Lysat wurde dann nochmals 30 min bei 20.000 x g und 4°C zentrifugiert und der resultierende Überstand entweder für die Immunpräzipitation verwendet oder die enthaltenden Glykoproteine wurden mittels Weizenkeim-Agglutinin angereichert.

2.5.3. Koimmunpräzipitation

Vor der Immunpräzipitation mußten pro Probe 100 µl Protein A-Agarose Kügelchen mit 10 µg affinitätsgereinigten Anti-HA-Antikörpern beladen werden. Dazu wurden die Kügelchen zweimal vorsichtig mit HEPES-Puffer ohne Maltosid gewaschen, um anschließend mit 800 µl desselbigen Puffers und der Antikörperlösung überschichtet zu werden. Die Kügelchen wurden dann für mindestens 4 h bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Nachdem die Kügelchen wieder sedimentiert und gewaschen wurden, konnten sie mit dem resultierenden Überstand aus **Abschnitt 2.5.2.** überschichtet werden und über Nacht bei 4°C und leichter Bewegung den µ-Opioidrezeptor und die daran gebundenen Proteine koimmunopräzipitieren. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen durch Zentrifugation vom Überstand getrennt und fünfmal mit kaltem HEPES-Puffer ohne Maltosid gewaschen. Durch Zugabe von 200 µl SDS-Probenpuffer und 20-minütiger Inkubation bei 60°C wurden die Immunpräzipitate von den Kügelchen eluiert und nach dem Erkalten auf das Gel aufgetragen.

2.5.4. Anreicherung der Glykoproteine mittels Weizenkeim-Agglutinin

Die Lysate im HEPES-Puffer (1ml) wurden mit 100 µl Weizenkeim-Agglutinin, das an Agarosekügelchen gebunden ist, über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Kügelchen mit den absorbierten Glykoproteinen durch Zentrifugation sedimentiert, fünfmal mit kaltem HEPES-Puffer ohne Maltosid gewaschen und 20 min bei 60°C in 200 µl SDS-Probenpuffer inkubiert. Danach wurden die abgekühlten, eluierten Proteine auf das Gel aufgetragen. Da für die Quantifizierung gleiche Proteinmengen auf das Gel aufgetragen werden mußten, wurden vor dem Laden der Proben die Proteinmengen nach der von Lowry et al. (1951) beschriebenen Methode bestimmt.

2.5.5. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Bei den Experimenten dieser Arbeit wurde eine diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese in einem Tris-HCl-Glycin-Puffersystem durchgeführt. Diese Methode ermöglicht hohe Auflösungen und Bandenschärfen der Proteine. Die Proben wurden vor dem Auftragen im SDS-Probenpuffer erhitzt. Das anionische Detergenz SDS umhüllt dabei das geladen vorliegende Protein, so daß eine Trennung anhand des Molekulargewichtes möglich ist. Für die Versuche wurden Trenngele mit unterschiedlichen Acrylamid-Konzentrationen verwendet, da die zu untersuchenden Proteine in verschiedenen Molekularbereichen getrennt werden sollten. Die elektrophoretische Trennung des MOR1 und der PLD2 beziehungsweise PLD1b wurde mit Trenngelen durchgeführt, die einen 8%igen Acrylamid-Gehalt aufwiesen. Für die Separation des ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) und der nPLD2 wurden 14%ige Trenngele verwendet. Die Sammelgele sowie die 0,1%ige SDS-Konzentration waren für alle Anwendungen gleich.

Äquivalente Proteinmengen (ca. 100 µl) der Proben in SDS-Probenpuffer wurden in die taschenartigen Vertiefungen der Sammelgele appliziert. Zusätzlich zu den Proben wurde auf jedes Gel ein geeigneter Molekulargewichts-Standard aufgetragen. Die Elektrophorese wurde über Nacht bei einer Stromstärke zwischen 8 und 10 mA pro Gel durchgeführt, bis die bromphenolblaue Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hatte (Laemmli, 1970). Das Gel wurde aus den Glasplatten gehoben und in die Anodenlösung I eingelegt.

2.5.6. Übertragung der Proteine auf Nitrozellulosemembranen

Nach der elektrischen Auftrennung der Proben wurden die Proteine aus der Gelmatrix des Trenngels auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und dort immobilisiert. Die Übertragung erfolgte durch das Halbtrocken-Blotverfahren, wobei Gel und immobilisierende Membran zwischen in Transferpuffer getränkte Filterpapiere gelegt wurden, die direkten Kontakt zu zwei horizontalen Graphitplatten-Elektroden hatten (Towbin et al., 1979).

Auf die Anode der Blotting-Apparatur wurden zuerst 3 Lagen in Anodenpuffer I getränktes Filterpapier gelegt. Darauf wurde die Nitrozellulosemembran positioniert (zuvor 30 min in Anodenpuffer I eingelegt) und dann das Gel. Der Stapel wurde mit 6 Lagen in Anodenpuffer II und 9 in Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere abgedeckt. Beim Aufbau des Blotstapels wurden Luftblasen mit Hilfe eines Handrollers herausgerollt. Auf die obere Schicht wurde die

Kathode der Apparatur aufgesetzt und die Stromversorgung eingerichtet. Die Transferzeit, die abhängig von der Gelporengröße und des Proteingehaltes ist, betrug ca. 2 h und die angelegte Stromstärke, abhängig von der Gelgröße, wurde wie folgt berechnet:

Betriebsstromstärke [mA] = Fläche des Gels [cm²] x 0,85 [mA].

Nach dem Ablauf der Zeit wurde die Nitrozellulosemembran aus der Blotapparatur entnommen und für 2 h in einer Lösung aus 5% fettfreiem Milchpulver in PBS-T (PBS, pH 7,4; 0,1% Tween) inkubiert. Dieser Schritt diente der Blockade der freien Bindungsstellen der Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde die Membran gründlich mit PBS-T gewaschen und mit den entsprechenden Antikörperlösungen in PBS-T über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran nach 30-minütigem Waschen in PBS-T für 2 h in eine PBS-T-Lösung gelegt, die den sekundären Antikörper enthielt. Der sekundäre Antikörper ist an eine Meerrettichperoxidase gekoppelt, was eine Detektion des Komplexes mit einem verstärkten Chemilumineszenz-System erlaubte.

2.5.7. Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe

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

2.6. Immunozytochemie

2.6.1. Konfokale Laserscan-Mikroskopie

Für die immunozytochemischen Untersuchungen am μ -Opioidrezeptor und der PLD2 wurde die Methode der indirekten Immunfluoreszenz-Färbung verwendet. Dazu wurden am Vortag autoklavierte Deckgläschen (\emptyset 15 mm) in Zellkulturplatten (12 Vertiefungen) mit Poly-L-

Lysin beschichtet. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Vertiefungen zweimal mit PBS gewaschen und Komplettmedium vorgelegt. Danach wurden ungefähr $7,5 \times 10^4$ Zellen pro Vertiefung ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Zellen auf den Deckgläschen einmal mit OptiMEM gespült und anschließend 1,5-2 Stunden mit dem Primärantikörper (Kaninchen-HA beziehungsweise Ratten-HA bei Doppelmarkierungen in OptiMEM, jeweils 1 µg pro ml) bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschrift mit OptiMEM und die Zellen wurden dann, je nach Versuchsablauf, mit der entsprechenden Substanz (Ansätze in OptiMEM) bei 37°C stimuliert. Nach dem Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und 40 min in einer Zamboni-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Zellen je dreimal mit TPBS gewaschen. Dann wurden die Zellen je 3 min in 50%igem und 100%igem Methanol permeabilisiert. Nach drei weiteren Waschschriften mit TPBS und einem Schritt mit TPBS + 1% NGS (Ziegenerum) für 3 min wurden die unspezifischen Bindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in TPBS + 3% NGS geblockt. Bei Doppelmarkierungen des MOR1 und der PLD2 oder der Einzelmarkierung der negativen PLD2-Mutante schloß sich daran die Inkubation des zweiten Primärantikörpers (1:2000) in TPBS + 1%NGS über Nacht bei Raumtemperatur an. Danach wurde erneut dreimal 3 min mit TPBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (Cy3-markiertes Anti-Kaninchen-Serum und Cy5-markiertes Anti-Ratten-Serum in TPBS + 1% NGS) für 3 bis 4 h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Deckgläschen mit den Zellen wurden im weiteren Verlauf wieder dreimal mit TPBS gewaschen, mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (70, 80, 90, 100% Ethanol) entwässert, mit Rotihistol I und II entfettet und abschließend durch DPX auf Objektträger eingebettet. Nach mehrstündiger Trockenzeit konnten die mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Zellen am konfokalen Laserfluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Das Mikroskop blendet unscharfe Informationen, die sich nicht in der Brennebene befinden, aus und ermöglicht nichtinvasive optische Schnitte durch das Präparat. Anhand kompletter Schnittserien kann man die dreidimensionale Verteilung des Signals im Präparat untersuchen.

Cy3 markierte Strukturen werden im Mikroskop durch eine Wellenlänge von 568 nm und einem Bandpass-Emissions-Filter von 570 bis 630 nm angeregt, während für die Aussendung der Fluoreszenz des Cy5 markierten Proteins eine Wellenlänge von 647 nm und ein Langpaß-Emissions-Filter von 665 nm notwendig sind.

2.6.2. Quantitativer Internalisierungsversuch

Zur Quantifizierung der Internalisierung des μ -Opioidrezeptors der Ratte wurde auf einen Versuchsablauf zurückgegriffen, der an einen ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) angelehnt wurde. Bevor jeweils ca. 200.000 Zellen in die Vertiefungen der Zellkulturplatten (24 Vertiefungen) in Kompletmedium ausgesät werden konnten, wurden die Vertiefungen mit Poly-L-Lysin beschichtet. Anschließend wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Vertiefungen einmal mit OptiMEM gespült und die Zellen mindestens für 2 h mit dem Primärantikörper (Kaninchen-Anti-HA in OptiMEM, 2 μ g pro ml) bei 4°C inkubiert. Nach einem anschließenden Waschschrift mit OptiMEM wurden die Zellen je nach Ansatz mit der entsprechenden Substanz in OptiMEM behandelt und bei 37°C inkubiert. Um zu verhindern, daß die internalisierten Rezeptoren zurück an die Membran gelangen, wurde das Medium bei der Behandlung mit 25 μ M Monensin ergänzt. Die folgende Fixierung der Zellen nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurde durch die 45-minütige Inkubation mit einer Zamboni-Lösung erreicht. Danach wurden die Zellen solange mit PBS/CaCl₂ (1 mM CaCl₂) gewaschen bis die gelbe Zamboni-Lösung vollständig entfernt war (viermal 3 Minuten). Weiterhin wurden die Zellen für 2 h mit dem Sekundär-Antikörper (Meerrettichperoxidase-konjugierte Anti-Kaninchen in OptiMEM, 1:1000) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Vertiefungen dreimal 5 min mit PBS/CaCl₂ gewaschen und nach dem letzten Waschschrift jeweils 250 μ l ABTS (Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)) auf die Zellen gegeben. Die Meerrettichperoxidase bildet einen Komplex mit Wasserstoffperoxid und ist daher zur Oxidation organischer Substrate befähigt. Als besonders gut geeignetes Substrat hat sich ABTS erwiesen. 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 wurden 200 μ l der Entwicklungslösung von jeder Vertiefung in eine Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen überführt und die Platten bei 410 nm in einem Microplattenleser analysiert.

2.7. Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration

Es wurden 10^5 Zellen pro Vertiefung in 12er-Zellkulturplatten in Kulturmedium ausgesät. Das Medium wurde am nächsten Tag durch serumfreies Medium ersetzt, welches die Testsubstanzen enthielt (1 μ M DAMGO oder Morphin) und für weitere 0, 0.5, 1, 2, oder 4 h bei 37°C inkubiert. Für die Resensitisierungsuntersuchungen wurden die Zellen nach 4 h DAMGO oder Morphin gewaschen. Es folgte ein agonisten-freies Intervall von 0, 10, 20, 30, 40 oder 50 min. Danach wurde bei allen Untersuchungen die Lösungen abgesaugt und mit serumfreien RPMI-Medium gewaschen. Für die Messung der cAMP-Konzentration wurden die Zellen anschließend mit serumfreien Medium für 15 min bei 37°C inkubiert. Das Medium enthielt dabei je nach Ansatz keine Zusätze, 25 μ M Forskolin, 25 μ M Forskolin plus 1 μ M DAMGO oder Morphin. Weiterhin wurden die Vertiefungen einmal mit PBS gewaschen und die Zellkulturplatten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden in 1 ml eiskalter Salzsäure/Ethanol-Lösung, Mischungsverhältnis: 1/100 (1 M HCl/100% Ethanol) lysiert und in Reaktionsgefäße überführt. Nach dem Eindampfen der Proben in der Vakuumzentrifuge wurde der Rückstand in einer Tris-EDTA-Pufferlösung (Amersham) resuspendiert. Die Bestimmung der cAMP-Konzentration erfolgte nach Anleitung und mit Hilfe des „cAMP [3 H] assay system“ der Firma Amersham (Braunschweig).

Das Prinzip des Assays basiert auf einer Kompetition zwischen unmarkiertem cAMP und einer stets konstanten Menge [3 H]-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 [3 H]-markiertes cAMP am Protein gemessen wird, desto geringer ist der Anteil an unmarkiertem cAMP in der Probe.

2.8. Datenanalyse

Die Daten der Radioligandenbindungsstudien, der PLD-Aktivitätsbestimmungen und cAMP-Messungen wurden mit Hilfe des Computerprogramms *GraphPad Prism 3.0* durch nicht-lineare Regressionskurven ermittelt.

Die Proteinbanden auf den ECL-empfindlichen Filmen der Western Blot-Analysen wurden densitometrisch mittels des Computerprogramms *NIH-Image 1.57* analysiert.

III. Ergebnisse

1. Einfluß der PLD2 auf die Expression von MOR1 in HEK293-Zellen

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente wurden HEK293-Zellen verwendet, die entweder stabil den μ -Opioidrezeptor 1 (MOR1) exprimieren oder den MOR1 und die PLD2 koexprimieren. Zunächst wurde der Einfluß der PLD2 auf die Expression des Rezeptors und die Affinität des Liganden zum Rezeptor untersucht. Die in **Tabelle 2** dargestellten Ergebnisse der Bindungsstudien zeigten keine Unterschiede in der Affinität (K_D) zwischen den beiden Zelllinien. Die Tendenz zur erniedrigten Expression vom MOR1 in den MOR1-PLD2-Zellen ist nicht signifikant. Es konnte damit kein Einfluß der PLD2 auf die Expression des Rezeptors und der Ligandenbindung an den Rezeptor nachgewiesen werden.

Zelltyp	K_D	B_{max}
MOR1	$1,4 \pm 0,3$ nm	1329 ± 399 fmol/mg
MOR1-PLD2	$1,4 \pm 0,4$ nm	938 ± 107 fmol/mg

Tabelle 2: Funktionelle Eigenschaften der Rezeptoren in stabil exprimierenden HEK293-Zellen, die den MOR1 exprimieren und den MOR1 und die PLD2 koexprimieren. Die K_D - und B_{max} -Werte wurden durch die Scatchard-Analyse nach Bindung von [3 H]-DAMGO an den Zellmembranen bestimmt (n = 3-5).

2. PLD-Aktivitätsuntersuchungen

Im nächsten Schritt sollte die Aktivierbarkeit der Phospholipase D2 durch den μ -Opioidrezeptor untersucht werden. Der Versuchsablauf für die Messungen der PLD2-Aktivität basierte dabei auf den enzymatischen Eigenschaften der Phospholipase D (siehe **Abbildung 2**, S. 6). Die MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen wurden für 2, 5, 10, 20 und 30 min mit dem μ -Agonisten DAMGO inkubiert und die relative PLD2-Aktivität bestimmt. Die Ergebnisse zeigten, daß DAMGO zu einer zeit-abhängigen Aktivierung der PLD2 mit einem Maximum (3-fache Zunahme der Aktivität) nach 30 min führt. Eine längere Inkubation hatte keine weitere prozentuale Zunahme des erzeugten Phosphatidylethanol-Anteils am

Gesamt-Phosphatidylcholins (PC) zur Folge (Versuchsergebnisse nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu vermochte eine 30-minütige Inkubation der Zellen mit Morphin keine Aktivierung der PLD2 auszulösen, obwohl es ein Agonist am MOR1 ist (**Abbildung 4**). Koch et al. (2001) konnten mit ihrer Arbeit zeigen, daß Morphin zu keiner Internalisierung des MOR1 führt.

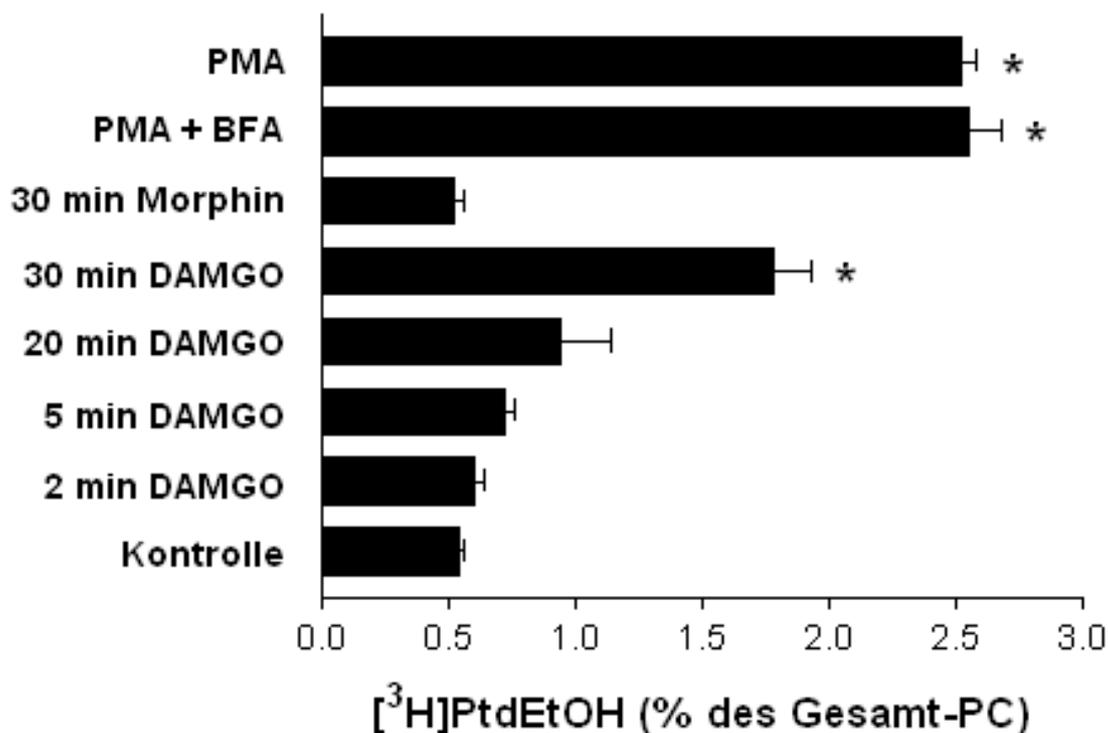


Abbildung 4: μ -Opioidrezeptor-vermittelte Aktivierung der PLD2. HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD2 stabil koexprimieren, wurden in serumfreiem Medium inkubiert, das 2% Ethanol und 1 μ M PMA, 25 μ g/ml Brefeldin A (BFA), 1 μ M DAMGO, 1 μ M Morphin oder ohne Zusätze für 30 min bzw. die angegebenen Zeitperioden enthielt. Die Graphen repräsentieren Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit der ethanol-behandelten Kontrolle, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Die Expression der PLD2 wurde durch die direkte Stimulierung mit dem Phorbolster PMA (Phorbol-12-myristate-13-acetate), der die PLD2 über die PKC aktiviert, nachgewiesen. Die in **Abbildung 4** dargestellten Ergebnisse zeigen eine 4,5-fache Zunahme der PLD2-Aktivität nach einer 30minütigen PMA-Inkubation im Vergleich zur Kontrolle, in der die Zellen mit 2% Ethanol inkubiert wurden. Brefeldin A (BFA) als Inhibitor des ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) konnte die Erzeugung von Phosphatidylethanol durch die PLD2 nach einer PMA-Stimulierung nicht beeinflussen.

Andererseits ist die Aktivierbarkeit der PLD2 durch DAMGO Opioidrezeptor-vermittelt, denn sie ließ sich komplett mit dem Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon blockieren (**Abbildung 5**). Weiterhin konnte die DAMGO-induzierte Aktivierung der PLD2 durch den PKC-Inhibitor Calphostin C nicht gehemmt werden. Das spricht dafür, daß die Aktivierung der Proteinkinase C nicht die Hauptrolle im Prozeß der Opioidrezeptor-vermittelten PLD2-Aktivierung in den HEK293-Zellen spielt. Auf der anderen Seite deuten die Ergebnisse vielmehr darauf hin, daß an der Aktivierung der PLD2 durch den MOR1 das kleine G-Protein ARF beteiligt zu sein scheint. Wie in der **Abbildung 5** ersichtlich ist, kann die DAMGO-induzierte Aktivierung der PLD2 komplett durch den ARF-Inhibitor Brefeldin A, einem Produkt des Pilzes *penicillium brefeldinum*, das die Struktur und Funktion des Golgi-Apparates beeinträchtigt, gehemmt werden. Die Aktivierung der PLD2 durch den Opioidrezeptor erfolgt also ARF-abhängig.

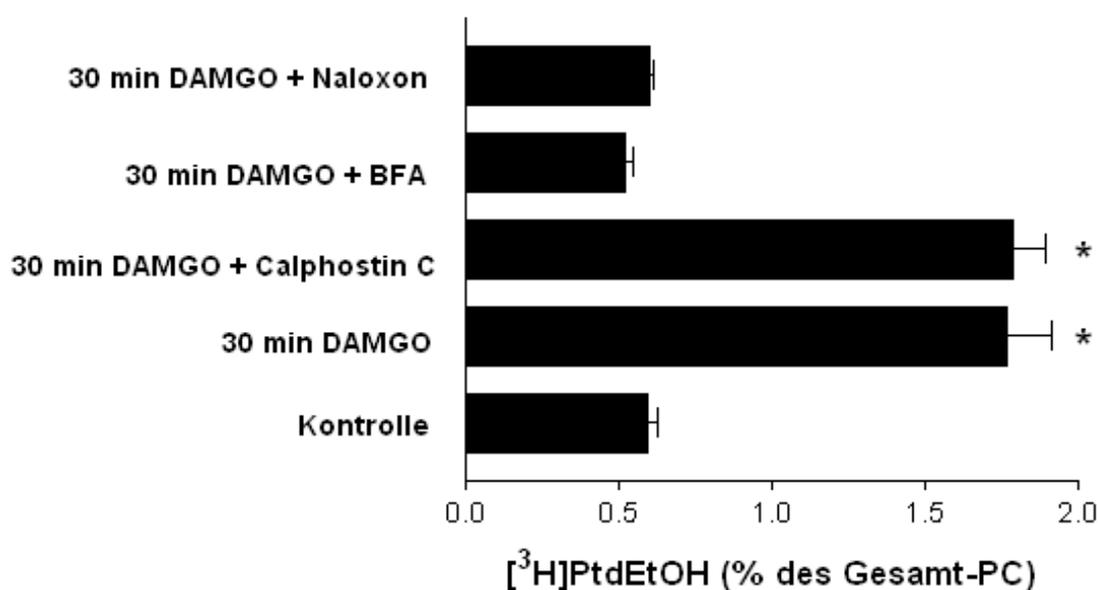


Abbildung 5: Hemmung der DAMGO-vermittelten Aktivierung der PLD2. HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD2 stabil koexprimieren, wurden in serumfreiem Medium für 30 min inkubiert, das 2% Ethanol und 1 μ M DAMGO, 1 μ M Naloxon, 25 μ g/ml Brefeldin A (BFA), 1 μ M Calphostin C oder keine Zusätze enthielt. Die Graphen zeigen die Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit der ethanol-behandelten Kontrolle, kalkuliert mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Im Weiteren wurde die Stimulierbarkeit der Phospholipase D1b durch den MOR1 untersucht. Die **Abbildung 6** (S. 35) zeigt, daß in den MOR1- und PLD1b exprimierenden HEK293-Zellen eine 4,5- bis 5-fache Zunahme der PLD1b-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle induziert wurde. Doch im Gegensatz zur PLD2 führte die DAMGO-Inkubation zu keiner

Zunahme der PLD1b-Aktivität. Das läßt erkennen, daß der μ -Opioidrezeptor spezifisch die PLD2 und nicht die PLD1b aktiviert.

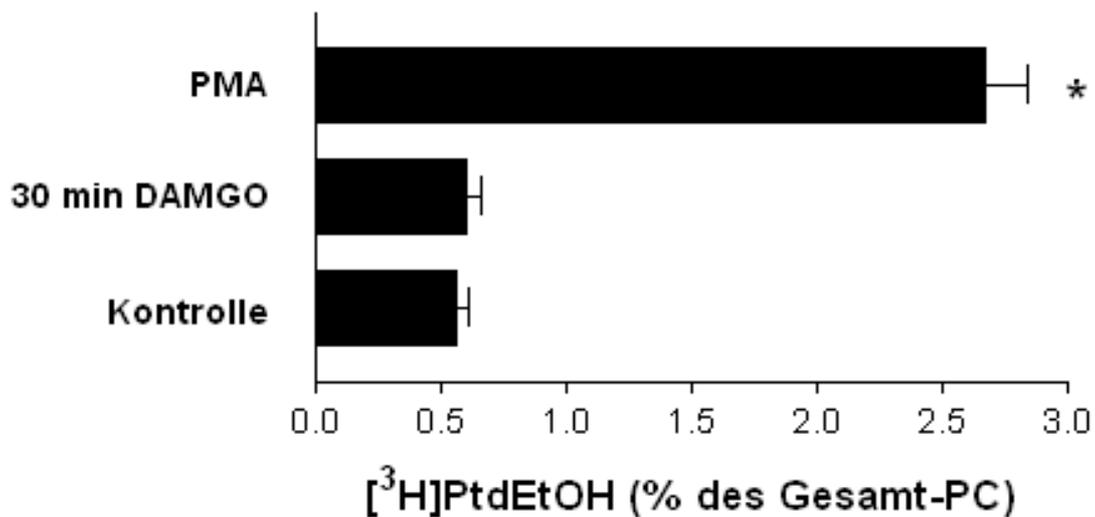


Abbildung 6: μ -Opioidrezeptor-vermittelte Aktivierung der PLD1b. HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD1b stabil koexprimieren, wurden in serum-freien Medium inkubiert, das 2% Ethanol und 1 μ M DAMGO, 1 μ M PMA oder keine Zusätze für 30 min enthielt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte dreier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sternchen verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) verglichen mit der ethanol-behandelten Kontrolle, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

3. Interaktionsanalysen

3.1. Interaktion zwischen MOR1, PLD2 und ARF

Um die Interaktion zwischen MOR1, PLD2 und ARF zu analysieren, wurden stabil transfizierte HEK293-Zellen verwendet, die entweder den MOR1, der mit dem Epitop HA (Hämagglutinin) markiert wurde, oder die PLD2 alleine exprimierten oder den HA-MOR1 und die PLD2 oder HA-MOR1 und PLD1b koexprimierten. Die HEK293-Zellen wurden für die Transfektion mit der Plasmid-DNA des MOR1 ausgewählt, da sie endogen keine μ -Opioidrezeptoren exprimieren. Weil die Menge an PLD in den Wildtyp-HEK293-Zellen für eine Detektion im Western-Blot oder mittels Immunocytochemie nicht ausreichte, wurden die Zellen stabil mit der Phospholipase übertransfiziert. Meier et al. (1999) konnten in diesem Zusammenhang die endogene Genexpression der PLD1 und PLD2 in HEK293-Zellen mit Hilfe des Northern-Blots nachweisen. Die Aktivität der PLD in der gleichen Zelllinie konnte

ebenfalls gezeigt werden (Rümenapp et al., 1997; Voß et al., 1999). Aus den Zellen wurden die Membranen präpariert und HA-MOR1 mit Hilfe von Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden durch die Polyacrylamid-Gelelektrophorese getrennt, die aufgereinigten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und anschließend mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert.

In der **Abbildung 7** (S. 37) sind die Ergebnisse der Interaktionsanalyse dargestellt. Die Expression vom MOR1, PLD2 und PLD1b sowie von ARF wurden durch direktes Immunblotting des Lysates von HEK293-Zellen mit spezifischen Antikörpern gegen HA-MOR1, PLD1b, PLD2 und ARF untersucht. Auf den Blots sind die immunreaktiven Banden der gesuchten Proteine in ihrer entsprechenden Höhe zu sehen (**Abb. 7A und B**, Spur 1, Lysat). Für den MOR1 zeigte sich eine Bande zwischen 70 bis 80 kDa, für die PLD1b und 2 bei 124 beziehungsweise 106 kDa und für ARF in der Höhe von 21 kDa.

Für die Koimmunopräzipitation wurde der μ -Opioidrezeptor aus dem Lysat von MOR1 exprimierenden und MOR1 und PLD1b oder PLD2 koexprimierenden Zellen mit Anti-HA Antikörpern präzipitiert. Die resultierenden Präzipitate wurden mit den spezifischen Antikörpern gegen die PLD1b, PLD2 oder ARF hybridisiert. In den Spuren 2 und 3 der **Abbildung 7A** sind die immunreaktiven Banden zu sehen, die wie im Lysat der PLD2 und ARF entsprechen. Dies läßt vermuten, daß der MOR1 *in vivo* physiologisch assoziiert mit der PLD2 und ARF vorliegt. Da allerdings ARF nur in den MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen koimmunopräzipitiert werden konnte, aber nicht in HEK293-Zellen die den MOR1 alleine exprimieren, dürfte ARF an einen MOR1-PLD2 Signalkomplex binden und nicht direkt an den MOR1 (**Abb. 7A**, vergleiche Spure 2 mit 4). Nach einer 30-minütigen Behandlung der MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen mit DAMGO kommt es zu einer Abnahme der Menge der koimmunopräzipitierten PLD2 (**Abb. 7A**, Spur 3). Densitometrische Messungen zeigten, daß die Menge der koimmunopräzipitierten PLD2 nach der Agonistenbehandlung von $68 \pm 8\%$ in Spur 2 auf $35 \pm 6\%$ in Spur 3 der **Abbildung 7** abnahm. Im Gegensatz dazu nahm die Menge an präzipitierbarem ARF von $4 \pm 1\%$ in Spur 2 auf $8 \pm 2\%$ in Spur 3 nach einer 30minütigen Inkubation der MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen mit DAMGO zu (**Abb. 7C**).

In den Immunopräzipitaten von MOR1-exprimierenden HEK293-Zellen konnte keine PLD2 detektiert werden, was möglicherweise auf die zu niedrige basale Expression der PLD2 in diesen Zellen zurückzuführen ist (**Abb. 7A**, Spur 4). Anhand der Spur 6 in der **Abbildung 7A** ist erkennbar, daß die PLD2 und ARF nicht unspezifisch mit dem Anti-HA Antikörpern

interagieren, denn in den alleinig PLD2-exprimierenden Zellen konnte weder PLD2 noch ARF mit den Anti-HA Antikörpern immunpräzipitiert werden. Weiterhin konnten in den MOR1-PLD1b koexprimierenden HEK293-Zellen keine PLD1b oder ARF mit dem MOR1 koimmunoprecipitiert werden (**Abb. 7B**). Dies bestätigt die Annahme, daß der MOR1 *in vivo* in keiner assoziierten Form mit der PLD1b vorliegt.

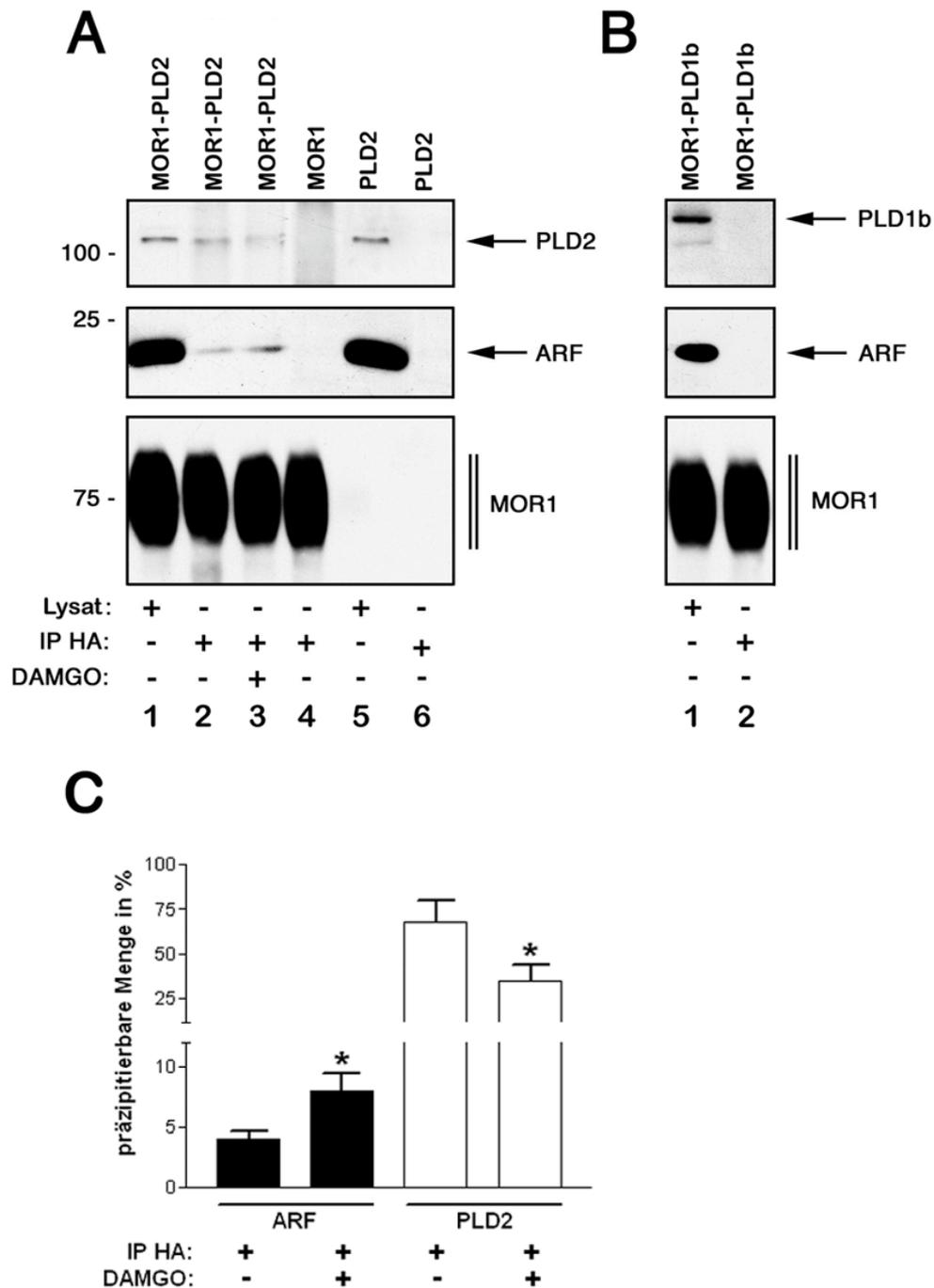


Abbildung 7: Interaktion zwischen HA-MOR1, PLD2 und ARF. Membran-Proteine von HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD1b (MOR1-PLD1b) oder PLD2 (MOR1-PLD2) stabil exprimieren, wurden extrahiert

und direkt hybridisiert (**A** und **B**, Spur 1, Lysat) oder mit Anti-HA Antikörpern immunpräzipitiert (**A** und **B**, Spur 2, IP HA). MOR1 und PLD2 koexprimierende HEK293-Zellen wurden für 30 min mit DAMGO vorbehandelt, die Membran-Proteine anschließend extrahiert und mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A**, Spur 3). Membran-Proteine von HEK293-Zellen, die den MOR1 exprimieren, wurden extrahiert und mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A**, Spur 4). Membran-Proteine von PLD2 exprimierenden HEK293-Zellen wurden extrahiert und direkt hybridisiert (**A**, Spur 5) oder mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A**, Spur 6). Die resultierenden Immunpräzipitate wurden elektrophoretisch aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Anti-PLD, Anti-ARF oder Anti-HA detektiert. Die Position des Molekulargewichts-Standard (in kDa) ist am Blot links zu finden. Die Pfeile markieren die PLD1b, PLD2 und ARF. Zwei weitere voneinander unabhängige Experimente ergaben die gleichen Resultate. Die Banden wurden densitometrisch vermessen und die durchschnittliche Menge an präzipitierbarem ARF bzw. PLD2 graphisch dargestellt (**C**, n=3). Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen der DAMGO- und nichtbehandelten Koimmunpräzipitation, bestimmt mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

3.2. Interaktion zwischen dem MOR1 und der negativen PLD2-Mutante (nPLD2)

Die PLD2 wurde bei der Suche nach neuen Interaktionspartnern des MOR1 mit Hilfe des *yeast two hybrid*-System identifiziert. Dabei interagierten die NH₂-terminalen Aminosäuren 116 bis 226 der PLD2 mit dem C-Terminus des MOR1. Die phosphoinositid-bindende Phox-Homologie-Domäne (PX) der PLD2 scheint für die Interaktion des Enzyms mit dem μ -Opioidrezeptor von Bedeutung zu sein, denn der identifizierte *yeast two hybrid*-Klon enthält den Hauptteil der PX-Domäne der PLD2.

Anhand dieser Informationen wurde, wie im **Material- und Methoden**-Teil beschrieben (**Abschnitt II, 2.1.**, S. 18), eine katalytisch inaktive Mutante der PLD2 konstruiert, die zwar für die PX-Domäne kodiert, aber keine Aktivierungsmotive beinhaltet. Die als nPLD2 bezeichnete Mutante exprimiert nur die NH₂-terminalen Aminosäuren 1-235 der Phospholipase D2 und besitzt eine errechnete Größe von circa 27 kDa. Für die folgenden Untersuchungen wurde die nPLD2 stabil in MOR1-exprimierende HEK293-Zellen transfiziert.

In der **Abbildung 8** (S. 39) ist in der Spur 1 (**Abb. 8A** und **B**, Lysat) die Expression des MOR1 und der nPLD2 beziehungsweise der PLD2 als Vergleich anhand der immunreaktiven Banden der gesuchten Proteine in ihrer entsprechenden Höhe auf dem Blot zu erkennen. Für die Koimmunpräzipitation wurde der μ -Opioidrezeptor aus dem Lysat von MOR1-exprimierenden und MOR1 und nPLD2 oder PLD2-koexprimierenden Zellen mit Anti-HA Antikörpern präzipitiert. Die resultierenden Präzipitate wurden mit den spezifischen

Antikörpern gegen die PLD2 immunblotet. In der Spur 2 der **Abbildung 8A** und **B** sind die immunreaktiven Banden zu sehen, die anhand der gleichen Höhe wie im Lysat der nPLD2 und PLD2 entsprechen. Die Höhe der nPLD2-Bande im Gel beträgt dabei ungefähr 23 kDa. Densitometrische Messungen zeigten, daß in den MOR1-nPLD2-koexprimierenden Zellen vergleichbare Mengen an nPLD2 ($57\pm 6\%$, $n=3$) koimmunopräzipitierbar waren, im Vergleich zur PLD2 ($68\pm 8\%$, $n=3$) in den MOR1-PLD2-Zellen. Die damit gezeigte Koimmunopräzipitation zwischen dem MOR1 und der nPLD2 in den MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen bestätigt die Assoziation des μ -Opioidrezeptors mit dem NH₂-Terminus der PLD2. Anhand der Spur 4 in der **Abbildung 8A** und **B** ist erkennbar, daß die nPLD2 und PLD2 nicht unspezifisch mit dem Anti-HA Antikörpern interagiert.

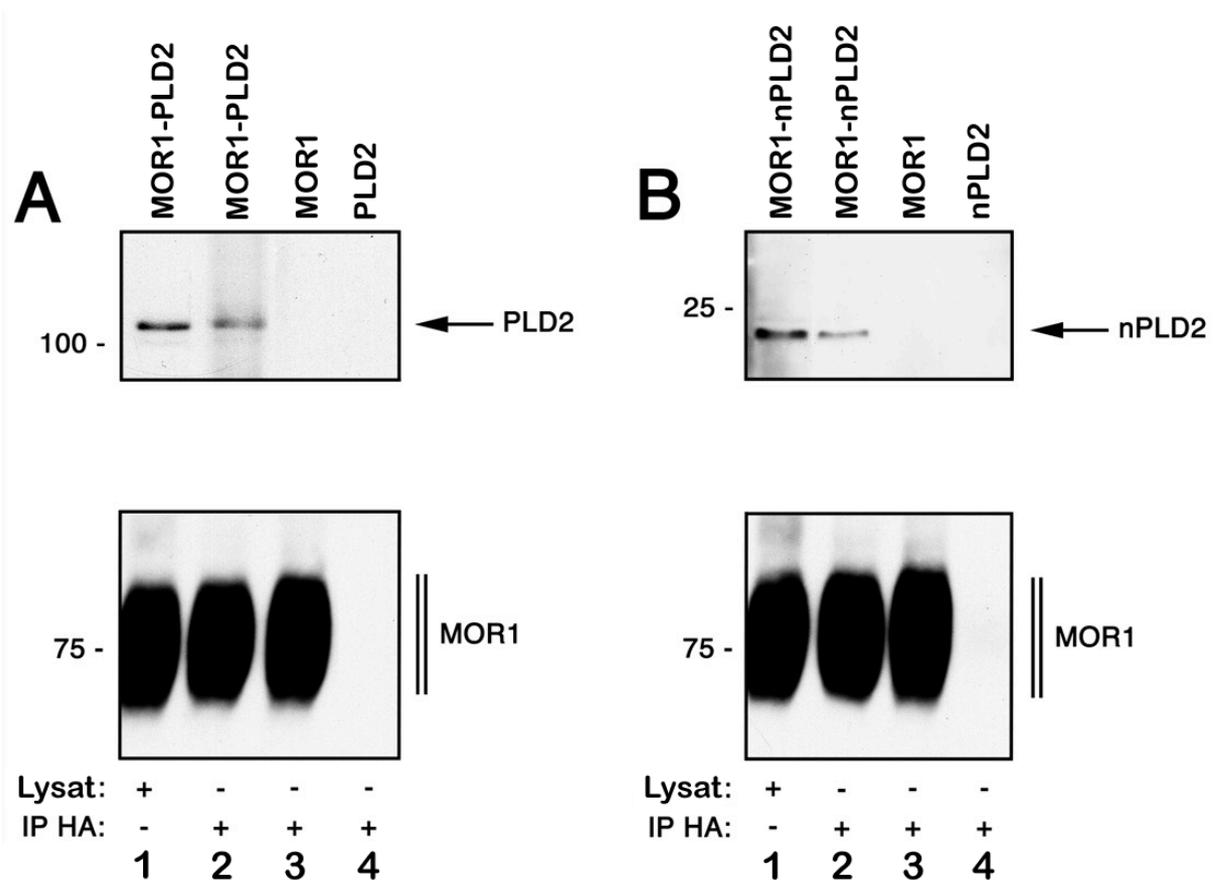


Abbildung 8: Interaktion zwischen MOR1 und PLD2 beziehungsweise nPLD2. Membran-Proteine von HEK293-Zellen, die den MOR1 und die PLD2 (MOR1-PLD2) oder nPLD2 (MOR1-nPLD2) stabil koexprimieren, wurden extrahiert und direkt hybridisiert (**A** und **B**, Spur 1, Lysat) oder mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A** und **B**, Spur 2, IP HA). Membran-Proteine von HEK293-Zellen, die den MOR1 exprimieren, wurden extrahiert und mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A** und **B**, Spur 3). Membran-Proteine von PLD2 exprimierenden HEK293-Zellen wurden extrahiert und mit Anti-HA-Antikörpern immunpräzipitiert (**A** und **B**, Spur 4). Die resultierenden Immunpräzipitate wurden elektrophoretisch

aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen transferiert und mit Anti-PLD oder Anti-HA detektiert. Die Position des Molekulargewichts-Standard (in kDa) ist am Blot links zu finden. Die Pfeile markieren die PLD2 oder nPLD2. Zwei weitere voneinander unabhängige Experimente ergaben ähnliche Resultate.

4. Untersuchungen der agonisten-induzierten Internalisierung des MOR1

4.1. Vergleich der subzellularen Verteilung von MOR1 und PLD2

In einem weiteren Ansatz wurde die agonisten-induzierte Internalisierung des μ -Opioidrezeptors untersucht. Zuerst wurde die subzelluläre Verteilung des MOR1 und der PLD2 mittels konfokaler Doppel-Immunfluoreszenz-Mikroskopie an MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen analysiert. Dazu wurden die intakten Zellen zunächst mit dem Ratten-HA-Antikörper bei 4°C inkubiert, um nur membranständige Rezeptoren zu markieren. Danach wurden die Zellen für 30 min mit DAMGO bei 37°C behandelt. Um zu verhindern, daß die internalisierten Rezeptoren zurück an die Membran gelangen, wurde das Medium bei der Behandlung mit 25 μ M des Recyclingsblockers Monensin ergänzt. Nach der Fixierung wurden die permeabilisierten Zellen mit dem zweiten Primärantikörper (Anti-PLD aus dem Kaninchen) bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend mit dem entsprechenden fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundär-Antikörper versetzt (Cy3-markiertes Anti-Kaninchen-Serum und Cy5-markiertes Anti-Ratten-Serum) und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert.

Wie aus der **Abbildung 9** (S. 41) ersichtlich, sind die PLD2 und der MOR1 in den unbehandelten Zellen (**A** und **A'**, Kontrolle) an der Plasmamembran lokalisiert. Nach einer 30-minütigen Behandlung mit dem μ -Agonisten DAMGO ist erkennbar, daß nur der MOR1 in vesikel-ähnlichen Strukturen innerhalb des Zytoplasmas detektierbar ist, während die PLD2 weiterhin in der Plasmamembran verbleibt (**B** und **B'**, DAMGO). Die Behandlung mit dem Agonisten führt demnach nur zu einer Internalisierung des Rezeptors und nicht zu einer Kointernalisierung von PLD2. Das Ergebnis bestätigt auch das Resultat der Koimmunopräzipitation in der **Abbildung 8A** (S. 39, Spur 2 und 3), wonach die präzipitierbare Menge, der an der Membran verbleibenden PLD2, nach der Agonistenbehandlung von $68 \pm 8\%$ in Spur 2 auf $35 \pm 6\%$ in Spur 3 abnimmt.

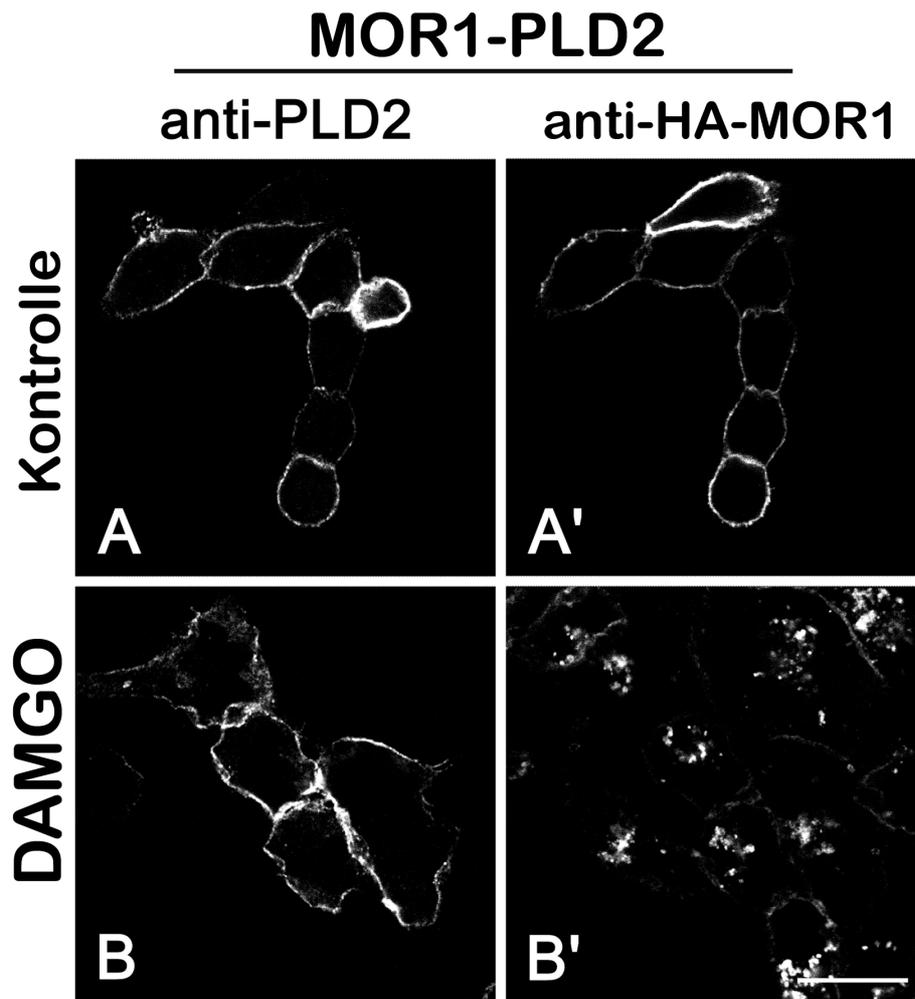


Abbildung 9: Subzelluläre Verteilung von MOR1 und PLD2 in HEK293-Zellen. Stabil transfizierte HEK293-Zellen, die MOR1 und PLD2 koexprimieren, wurden nach der Vorbehandlung mit dem ersten Primärantikörper (Ratten-Anti-HA, erkennt HA-epitop-markierten MOR1) entweder nicht behandelt (**A** und **A'**, Kontrolle) oder mit 1 μM DAMGO und 25 μM Monensin für 30 min bei 37°C inkubiert (**B** und **B'**). Nach der Fixierung wurden die permeabilisierten Zellen mit dem zweiten Primärantikörper (Kaninchen-Anti-PLD) inkubiert, jeweils mit dem entsprechenden fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundär-Antikörper markiert und mittels konfokaler Mikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. Skalierungsband: 20 μm .

4.2. Einfluß der PLD2-Aktivierung auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1

Im nächsten Schritt wurde die Internalisierung des μ -Opioidrezeptors zwischen MOR1- und MOR1-PLD2-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 in der clathrin-vermittelten Endozytose

übernimmt. Im Gegensatz zu dem Opioidagonisten DAMGO hat die Bindung von Morphin an den Rezeptor keine starke Phosphorylierung des Opioidrezeptors zur Folge, so daß keine Internalisierung des Rezeptors ausgelöst werden kann (Koch et al., 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit haben weiterhin gezeigt, daß Morphin zu keiner Aktivierung der PLD2 über den MOR1 führt.

Eine Analyse der agonisten-vermittelten Endozytose ergab (**Abbildung 10**, S. 43), daß der MOR1 mit oder ohne PLD2-Koexpression nach einer Inkubation mit 1 μ M DAMGO für 30 min bei 37°C internalisiert, während eine 30minütige Behandlung mit 1 μ M Morphin zu keiner Endozytose des Rezeptors führt. Die alleinige Inkubation der MOR1- beziehungsweise MOR1-PLD2-Zellen mit dem PKC-Aktivatoren PMA führte zu keiner Endozytose des MOR1. Erst die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Morphin und PMA für 30 min bei 37°C resultierte in den MOR1-Zellen, welche die PLD2 überexprimierten, in einer starken Internalisierung des μ -Opioidrezeptors. Das läßt darauf schließen, daß für die Endozytose des Rezeptors die agonisten-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors und andererseits die Stimulierung der PLD2-Aktivität notwendig sind.

Um eine genauere Aussage über das Ausmaß der Internalisierung des MOR1 treffen zu können, wurde auf eine Quantifizierung der Internalisierung mittels einer ELISA-Technik zurückgegriffen. Dazu wurden MOR1-exprimierende oder MOR1-PLD2-koexprimierende HEK293-Zellen mit Anti-HA-MOR1 aus dem Kaninchen bei 4°C inkubiert, um sicherzugehen, daß nur die membranständigen μ -Opioidrezeptoren markiert werden. Um zu verhindern, daß die internalisierten Rezeptoren zurück an die Membran gelangen, wurde dem Medium 25 μ M Monensin zugesetzt. Nach der 60-minütigen Behandlung mit den Agonisten bei 37°C wurden die Zellen fixiert und mit dem sekundären Antikörper inkubiert (meerrettichperoxidase-konjugierter Anti-Kaninchen-Antikörper).

Die anschließende Quantifizierung der Rezeptor-Internalisierung baute dabei auf einem ELISA auf, indem die Umsetzung eines geeigneten Substrates der Peroxidase photometrisch bestimmt wurde (siehe **Material und Methoden**, S. 30). Anhand des prozentualen Verlustes an Oberflächenrezeptoren in den agonisten-behandelten Zellen konnte auf die Internalisierung des MOR1 geschlossen werden.

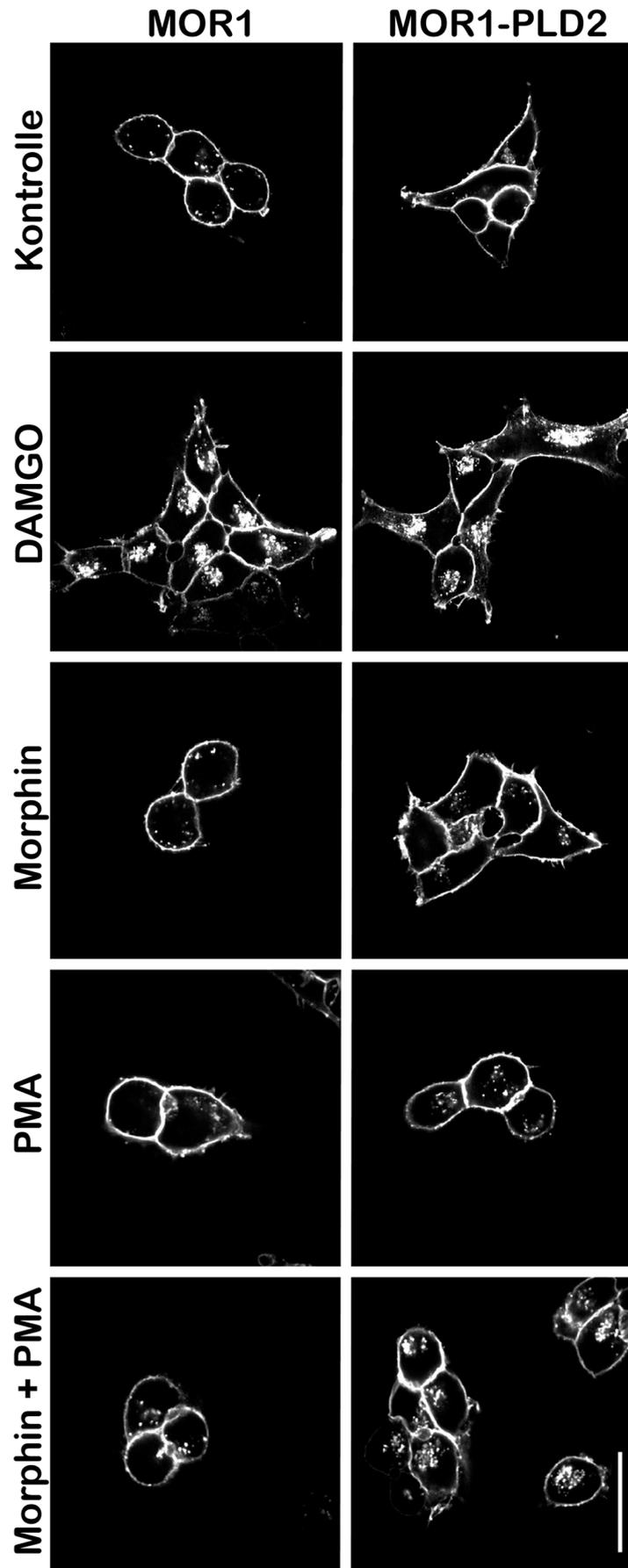


Abbildung 10: Einfluß der PLD2 auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1. HEK293-Zellen, die den MOR1 exprimieren und MOR1 und die PLD2 stabil koexprimieren, wurden nach der Vorbehandlung mit Anti-HA-MOR1 bei 4°C nicht oder mit 1 µM DAMGO, 1 µM Morphin und/oder 1 µM PMA plus 25 µM Monensin für 30 min bei 37°C behandelt. Die Zellen wurden anschließend fixiert und die subzelluläre Verteilung des Rezeptors mit Hilfe der konfokalen Mikroskopie untersucht. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. Scalierungsband: 20 µm.

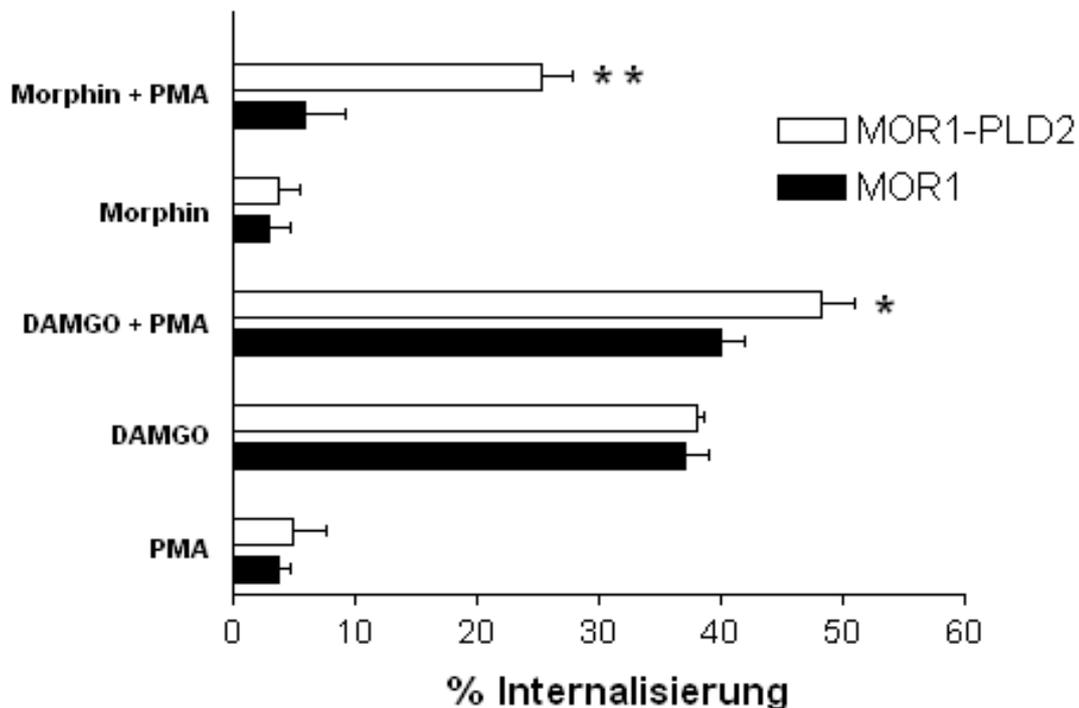


Abbildung 11: Quantitative Analyse der agonisten-induzierte Endozytose des MOR1. MOR1- oder MOR1-PLD2-exprimierende HEK293-Zellen wurden nicht oder mit 1 µM DAMGO beziehungsweise 1 µM Morphin in Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 µM PMA für 60 min bei 37°C plus 25 µM Monensin behandelt. Die Zellen wurden vor der Inkubation mit Anti-HA-MOR1 bei 4°C markiert, nach der Behandlung fixiert und mit peroxidase-konjugierten Anti-Kaninchen-Antikörpern inkubiert. Die Rezeptor-Internalisierung, gemessen als der prozentuale Verlust an Oberflächenrezeptoren in Agonisten-behandelten Zellen, wurde durch einen ELISA bestimmt wie im **Material- und Methoden**-Teil beschrieben. Die Abbildung repräsentiert die Mittelwerte fünf voneinander unabhängiger Doppel-Bestimmungen. Die Sterne und Doppel-Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$) zwischen MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden Zellen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

In der **Abbildung 11** sind die Ergebnisse dargestellt, welche die Internalisierung des MOR1 zwischen MOR1 exprimierenden und MOR1-PLD2 koexprimierenden HEK293-Zellen vergleichen. Die quantitative Analyse konnte dabei die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie bestätigen. Demnach führte eine 60-minütige Behandlung der Zellen mit

DAMGO, Morphin oder PMA bei 37°C zu keinen Unterschieden hinsichtlich des Ausmaßes der Internalisierung des μ -Opioidrezeptors zwischen den MOR1- und MOR1-PLD2-Zellen. Erst die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Morphin und PMA hat eine drei- bis vierfache Zunahme der Endozytose des MOR1 in den MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen, im Vergleich zu den MOR1-exprimierenden Zellen, zur Folge. Darüber hinaus verursacht auch die gleichzeitige Inkubation der MOR1-PLD2-Zellen mit DAMGO und PMA, im Vergleich zu den MOR1-Zellen, einen signifikanten Anstieg der Internalisierung des μ -Opioidrezeptors um rund 10%.

Da die alleinige Behandlung der MOR1-Zellen mit PMA nicht zu einem signifikanten Anstieg der agonisten-induzierten Endozytose des Rezeptors führt, kann davon ausgegangen werden, daß die PMA-induzierte Rezeptor-Endozytose vom MOR1/PLD2-Komplex abhängig ist und nicht durch die Zunahme der PKC-Aktivität in diesen Zellen verursacht wird.

4.3. Einfluß der PLD2-Inhibition auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1

4.3.1. Hemmung der PLD2-Funktion durch den primären Alkohol 1-Butanol

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde geprüft, ob die Inhibition der Phosphatidsäure-Produktion zu einer Hemmung der Endozytose des MOR1 führt. Aus diesem Grunde wurde als erstes der primäre Alkohol 1-Butanol zur Hemmung der natürlichen PLD-Reaktion verwendet. Dieser Ansatz fußt auf der Eigenschaft der PLD2, daß die Hydrolysereaktion mit der Transphosphatidylierungsreaktion konkurriert. Das heißt, daß neben Wasser auch primärer Alkohol als Substrat akzeptiert wird. An der Stelle von Phosphatidsäure entsteht dann Phosphatidylalkohol (im Falle von Butanol also Phosphatidylbutanol; siehe **Abb. 2**, S. 6). Die Transphosphatidylierungsreaktion ist hoch spezifisch für die primären Alkohole (z.B. Ethanol oder 1-Butanol), denn sekundäre Alkohole wie zum Beispiel Isobutanol, werden nicht durch die PLD2 umgesetzt. Butanolkonzentrationen von 1,5% und höher führen dabei zu einer deutlichen Hemmung der PLD2-Aktivität, aber auch zu toxischen Effekten für die behandelten Zellen (Skippen et al. 2002). Für die Versuche wurden deshalb Konzentrationen von 0,7% an Butanol-Isomeren verwendet.

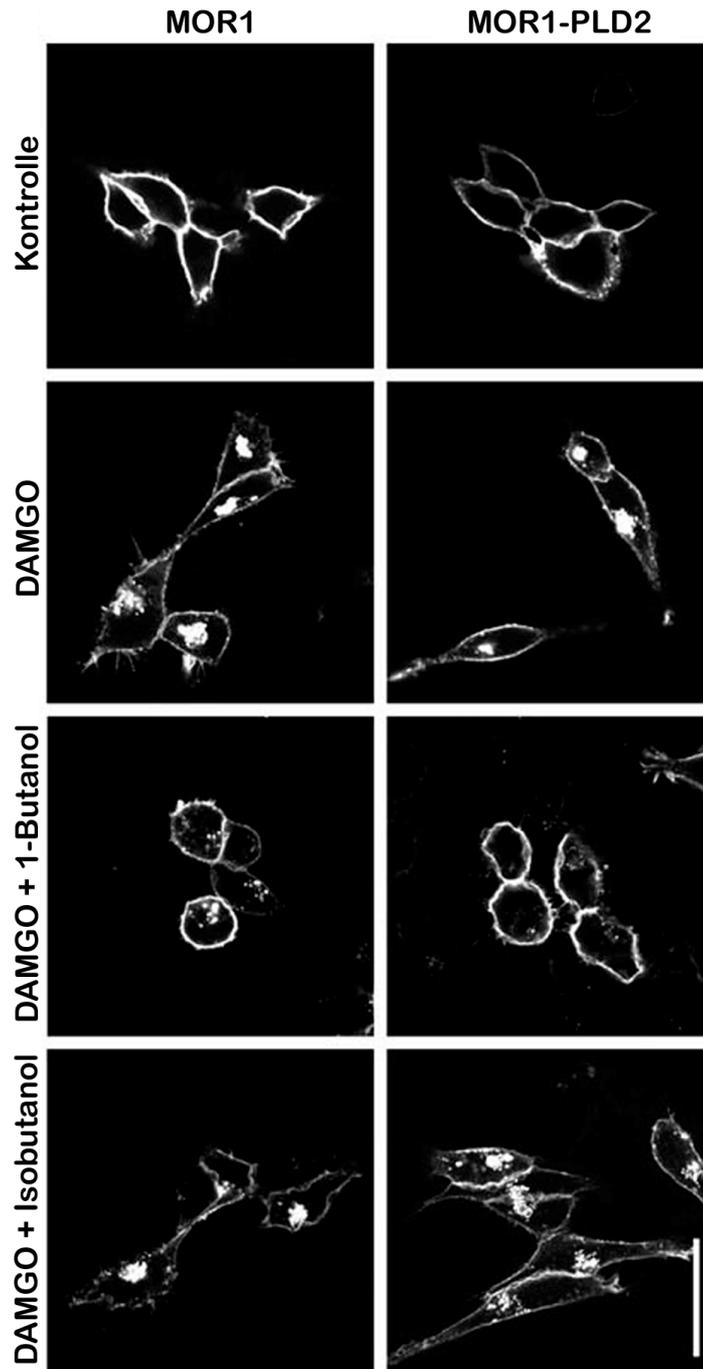


Abbildung 12: Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch 1-Butanol. MOR1 exprimierende oder MOR1-PLD2 koexprimierende HEK293-Zellen wurden nicht oder für 30 min bei 37°C mit 1 μ M DAMGO mit oder ohne 0,7% 1-Butanol oder 0,7% Isobutanol plus 25 μ M Monensin inkubiert. Die Zellen wurden vor der Behandlung mit Anti-HA-MOR1 bei 4°C markiert, nach der Behandlung fixiert und die subzelluläre Verteilung des Rezeptorproteins mittels der Konfokalmikroskopie analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von vier unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. Skalierungsband: 20 μ m.

In der **Abbildung 12** (S. 46) sind die Ergebnisse der konfokalen Mikroskopie dargestellt. Die Behandlung der MOR1-exprimierenden und MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen mit DAMGO für 30 min bei 37°C führte in beiden Zelllinien zu einer starken Internalisierung des Rezeptors. Eine gleichzeitige Inkubation mit 1-Butanol hatte jedoch eine fast vollständige Inhibition der DAMGO-vermittelten Endozytose des μ -Opioidrezeptors in den MOR1 als auch MOR1-PLD2-Zellen zur Folge. Der sekundäre Alkohol Isobutanol zeigte hingegen keinen Einfluß auf die agonisten-induzierte Endozytose des Rezeptors. Die Daten sprechen also dafür, daß die Phosphatidsäure-Produktion der PLD2 für die Induktion der μ -Opioidrezeptor-Endozytose notwendig ist.

Die Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch 1-Butanol wurde anschließend ebenfalls quantifiziert. Für die Versuche wurden 0,7%ige 1-Butanol-beziehungsweise Isobutanolkonzentrationen verwendet. Wie aus der **Abbildung 13** ersichtlich ist, resultierte die 60-minütige Behandlung der MOR1- und MOR1-PLD2-Zellen mit DAMGO bei 37°C in einer rund 40%igen Internalisierung des MOR1 in beiden Zelllinien. Wurden die Zellen jedoch gleichzeitig mit 1-Butanol inkubiert, hatte dies eine Reduktion der Endozytose um 75% auf einviertel des Ausgangswertes (DAMGO-induzierte Internalisierung) in den MOR1- als auch MOR1-PLD2-Zellen zur Folge. Der sekundäre Alkohol Isobutanol zeigte hingegen keinen Einfluß auf die agonisten-induzierte Internalisierung des Rezeptors.

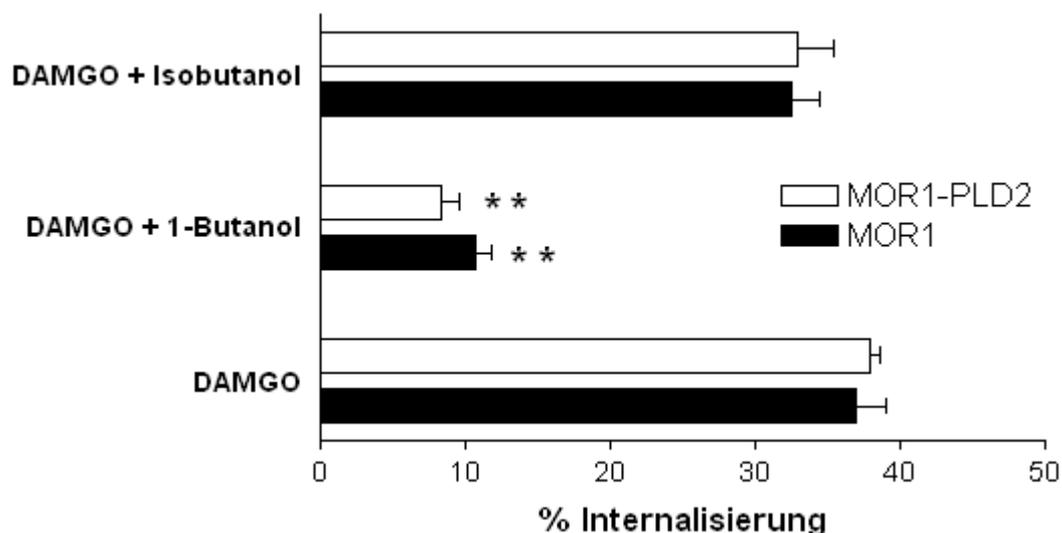


Abbildung 13: Quantifizierung der Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch 1-Butanol. Nach der Markierung der Oberflächenrezeptoren mit Anti-HA-MOR1 Antikörpern bei 4°C wurden die MOR1- oder MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen mit 1 μ M DAMGO mit oder ohne 1% 1-Butanol

oder 1% Isobutanol für 60 min bei 37°C plus 25 μ M Monensin inkubiert. Weitere Behandlung siehe Legende **Abb. 11**. Die Graphen repräsentieren Mittelwerte fünf voneinander unabhängiger Doppel-Bestimmungen. Die Doppelsterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen nur mit DAMGO behandelten Zellen und Zellen, die mit DAMGO plus 1-Butanol oder Isobutanol behandelt wurden, kalkuliert mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

4.3.2. Hemmung der PLD2-Funktion durch eine negative PLD2-Mutante (nPLD2)

Neben der Hemmung der PLD2 durch den primären Alkohol 1-Butanol kann die Inhibition des Enzyms auch über die Verwendung einer negativen PLD2-Mutante erfolgen. Dieser Ansatz basiert auf der Idee, wonach eine katalytisch inaktive PLD2-Mutante (nPLD2) mit der physiologisch aktiven endogenen PLD2 um die Bindung an den μ -Opioidrezeptor konkurriert und damit die Aktivität der PLD2 maskiert. Nachdem die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation (**Abschnitt 3.2.**, S. 38) die Interaktion zwischen dem MOR1 und der nPLD2 bestätigten, sollte der Einfluß der nPLD2 auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1 untersucht werden. Dazu wurde das Ausmaß der Internalisierung des MOR1 zwischen MOR1- und MOR1-nPLD2-exprimierenden HEK293-Zellen verglichen.

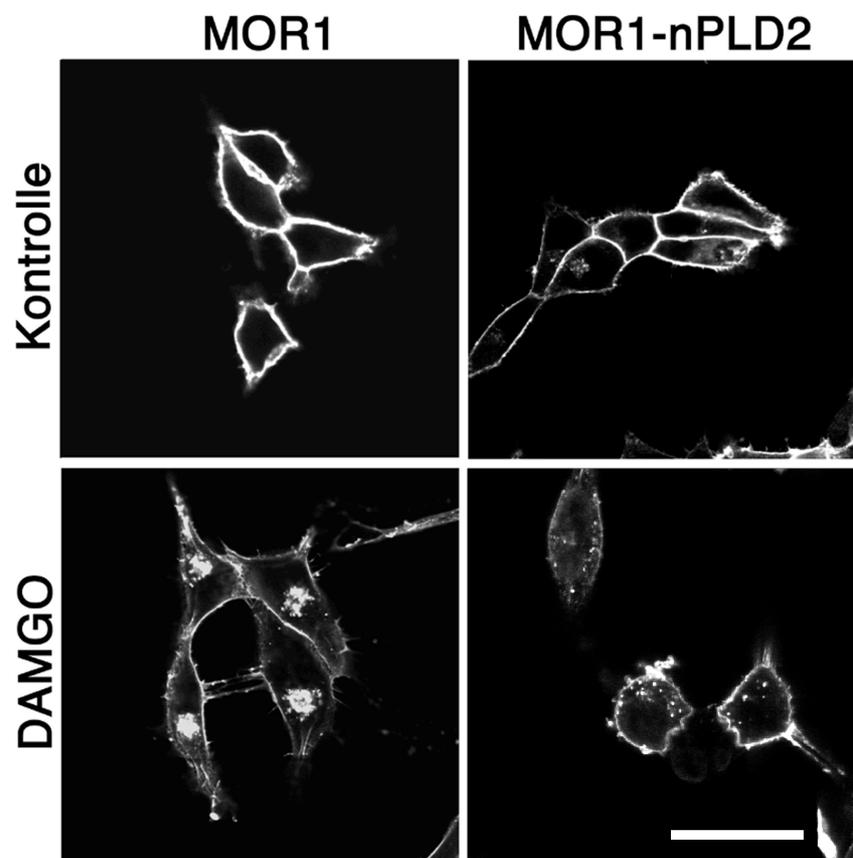


Abbildung 14: Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante. MOR1 exprimierende oder MOR1-PLD2 koexprimierende HEK293-Zellen wurden nicht oder für 30 min bei 37°C mit 1 µM DAMGO plus 25 µM Monensin behandelt. Die Zellen wurden zuvor mit Anti-HA-MOR1 bei 4°C markiert, fixiert und die subzelluläre Verteilung des Rezeptorproteins mittels der Konfokalmikroskopie analysiert. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit Doppelbestimmungen. Skalierungsband: 20 µm.

Die Analyse der konfokalmikroskopischen Bilder ergab dann auch, daß es in den Zellen, welche die nPLD2 überexprimieren, zu einer Hemmung der DAMGO-induzierten Endozytose des MOR1, im Vergleich zu den MOR1-exprimierenden Zellen, kam (**Abbildung 14**, S. 48). Dies bestätigt die Idee einer Konkurrenz zwischen der endogenen und katalytisch inaktiven PLD2 und zeigt, daß die Hemmung der PLD2-Aktivität die Beeinträchtigung der agonisten-induzierten Internalisierung des MOR1 zur Folge hat.

Das Ausmaß der Internalisierung des MOR1 in den MOR1- und MOR1-nPLD2-Zellen wurde ebenfalls quantifiziert. Die in der **Abbildung 15** (S. 50) dargestellten Ergebnisse zeigen, daß in den MOR1-nPLD2-Zellen die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1 um rund 50% reduziert war, im Vergleich zu den Zellen, die nur den MOR1 exprimieren. Darüber hinaus führte die gleichzeitige Inkubation der MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen mit DAMGO und PMA zu einer Wiederherstellung der Rezeptor-Endozytose. Die Rezeptoren der MOR1-nPLD2-Zellen zeigten unter diesen Bedingungen die gleiche Internalisierungsrate (rund 40%) wie die in den MOR1-Zellen. Somit hat die PMA-abhängige Stimulierung der endogenen PLD2 die Aufhebung des Effekts der nPLD2 zur Folge. Dieser Effekt ist nicht auf die zunehmende PKC-Aktivität in diesen Zellen zurückzuführen, denn die alleinige PMA-Behandlung führt nicht zu einer Induzierung der Endozytose des MOR1 in MOR1-exprimierenden und MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen.

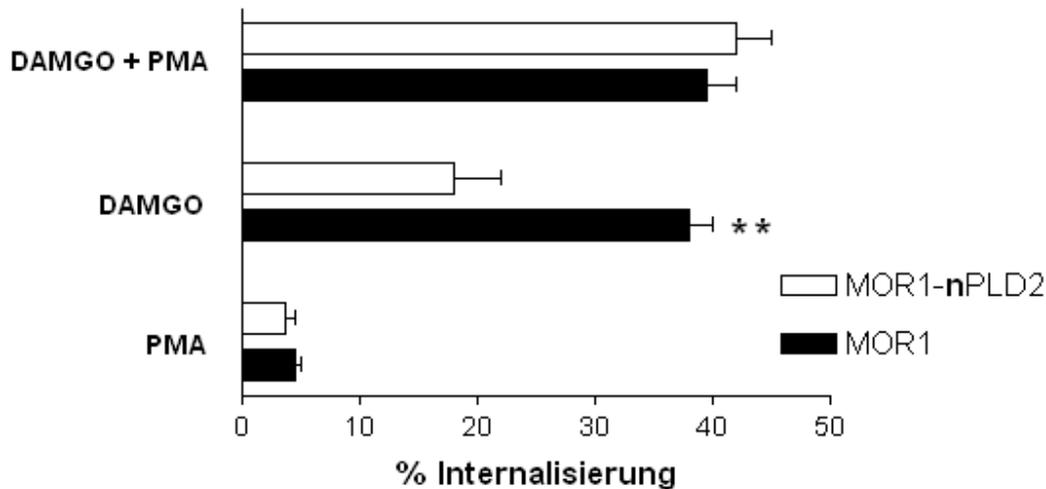


Abbildung 15: Reduktion der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante. Nach der Markierung der Oberflächenrezeptoren mit Anti-HA-MOR1-Antikörper bei 4°C wurden MOR1-exprimierende oder MOR1-nPLD2-koexprimierende HEK293-Zellen mit 1 μ M DAMGO und/oder 1 μ M PMA für 60 min bei 37°C plus 25 μ M Monensin inkubiert. Weitere Behandlung siehe Legende **Abb. 11**. Die beschriebene Abbildung repräsentiert die Mittelwerte fünf voneinander unabhängiger Doppel-Bestimmungen. Die Doppelsterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,001$) zwischen MOR1- und MOR1-nPLD2-exprimierenden Zellen, bestimmt mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

5. Untersuchungen zur De- und Resensibilisierung des MOR1

5.1. Vergleich der De- und Resensibilisierung des MOR1 zwischen MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen

Aufbauend auf den vorangegangenen Versuchen, die zeigten, daß der μ -Opioidrezeptor die PLD2 stimuliert und die PLD2 andererseits die Internalisierung des MOR1 beeinflusst, sollte nun geprüft werden, welchen Einfluß die PLD2 auf die De- und Resensibilisierung des MOR1 ausübt. Der Vergleich der De- und Resensibilisierung zwischen MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen erfolgte dabei über die Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration. Nach der Ligandenbindung an den μ -Opioidrezeptor kommt es über die Hemmung der Adenylatzyklase zu einer Verringerung des intrazellulären cAMP-Gehaltes. Durch die kontinuierliche Inkubation mit Agonisten nimmt die Empfindlichkeit auf den fortgesetzten Reiz ab, ein Prozeß der als Desensibilisierung bezeichnet wird. Das Signal wird unter den Bedingungen der Desensibilisierung nicht mehr oder nur in abgeschwächter Form ins

Zellinnere weitergegeben. Im Falle des MOR1 nimmt also die Fähigkeit des Rezeptors zur Hemmung des cAMP-Spiegels ab.

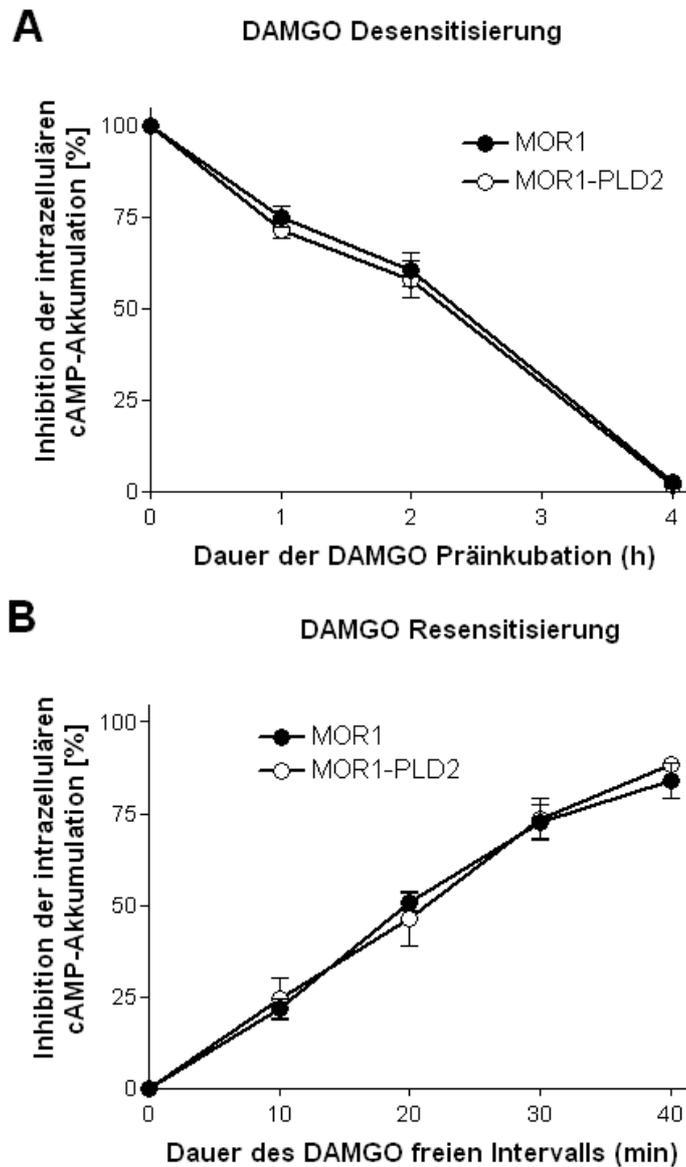


Abbildung 16: Vergleich der De- und Resensitisierung unter/nach DAMGO in MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen.

A: Für die Analyse der Rezeptor-Desensitisierung wurden MOR1- bzw. MOR1-PLD2-Zellen bei 37°C in dem angegebenen Zeitraum mit 1 μ M DAMGO präinkubiert. Nach dem Entfernen des Präinkubationsmediums wurden die Zellen für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO (1 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt.

B: Für die Analyse der Rezeptor-Resensitisierung wurden MOR1- bzw. MOR1-PLD2-Zellen bei 37°C für 8 h mit 1 μ M DAMGO präinkubiert, gefolgt von einem agonisten-freien Intervall von 0, 10, 20, 30 und 40 min. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO (1 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt.

Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen dreier voneinander unabhängiger Experimente.

Für die Messungen der agonisten-vermittelten Desensibilisierung wurden die MOR1- und MOR1-PLD2-Zellen mit dem μ -Opioidrezeptoragonisten DAMGO für 1, 2 und 4 h präinkubiert. Anschließend wurde die Inhibition der forskolin-stimulierten cAMP-Akkumulation durch Stimulation mit demselben Agonisten untersucht. Die maximale Reduktion des forskolin-stimulierten cAMP-Gehalts durch DAMGO wurde dabei als 100% definiert. Die Ergebnisse zeigen, daß die Behandlung mit DAMGO zu einer ähnlichen zeitabhängigen Abnahme der Hemmung der cAMP-Akkumulation in beiden Zelllinien führt (**Abbildung 16A**, S. 51). Nach vier Stunden wurde jeweils die maximale Desensibilisierung erreicht.

An den Vergleich der Desensibilisierung des MOR1 zwischen den MOR1-exprimierenden und MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen schlossen sich die Untersuchungen zur Resensibilisierung des MOR1 in beiden Zelllinien an. Die Resensibilisierung wurde gemessen als die zunehmende Fähigkeit des zuvor desensibilisierten Rezeptors die forskolin-stimulierte Adenylatzyklase-Aktivität nach einem agonisten-freien Intervall wieder zu hemmen. Die MOR1- beziehungsweise MOR1-PLD2-Zellen wurden für 8 h mit 1 μ M DAMGO präinkubiert und die Zellen intensiv gewaschen. Nach einem agonisten-freien Intervall von 0, 10, 20, 30 und 40 min wurde die Hemmung der forskolin-stimulierten Adenylatzyklase durch DAMGO bestimmt. Wie aus der **Abbildung 16B** ersichtlich, konnten auch hinsichtlich der Resensibilisierungs-Rate keine signifikanten Unterschiede zwischen den MOR1-exprimierenden und MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen identifiziert werden.

5.2. Beeinflussung der Desensibilisierung von MOR1 durch 1-Butanol und Ethanol

Die Untersuchungen der Internalisierung des MOR1 hatten gezeigt, daß die Phosphatidsäure-Produktion der PLD2 eine wichtige Rolle bei der Endozytose des μ -Opioidrezeptors spielt. Eine Hemmung der PLD2-Funktion durch 1-Butanol führte zu einer starken Inhibition der DAMGO-vermittelten Internalisierung des MOR1. Im nächsten Schritt wurde nun untersucht, inwieweit sich die Beeinflussung der Internalisierung auf die Desensibilisierungsrate des MOR1 in MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen auswirkte.

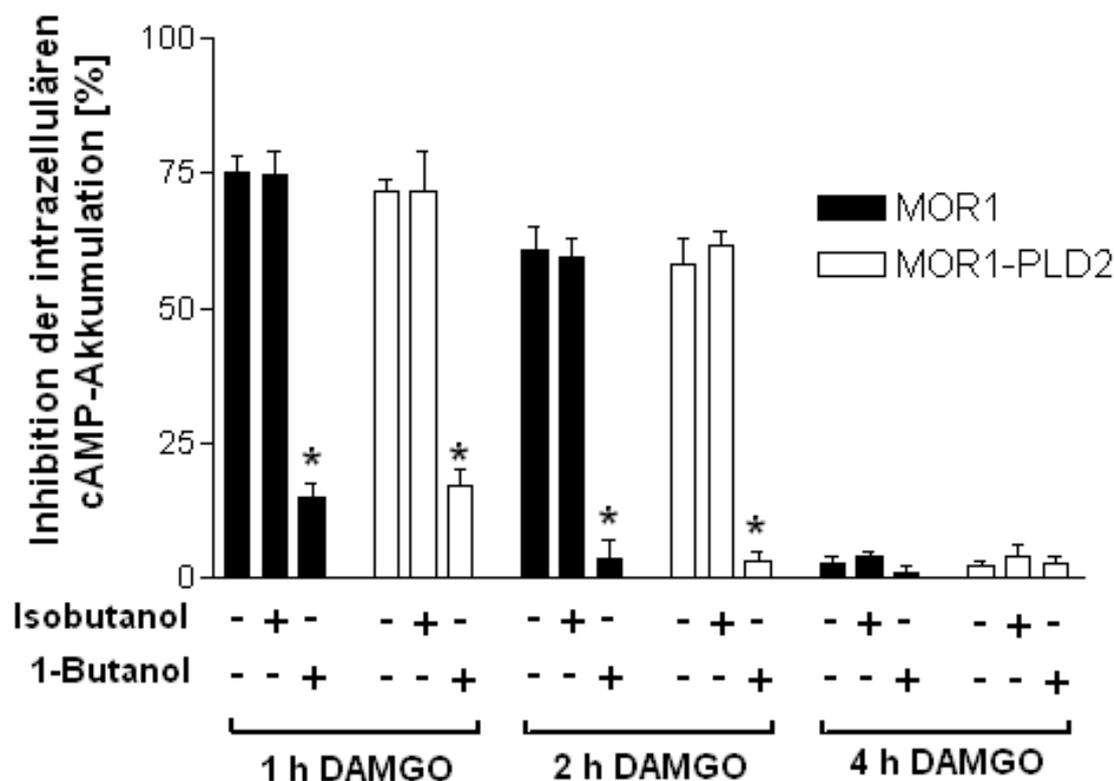


Abbildung 17: Verstärkung der agonisten-induzierten Desensibilisierung des MOR1 durch 1-Butanol. MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit 1 μ M DAMGO ohne oder mit 0,7% 1-Butanol oder 0,7% Isobutanol für 1, 2 oder 4 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit 25 μ M Forskolin oder 25 μ M Forskolin plus 1 μ M DAMGO für 15 min behandelt und der cAMP-Gehalt wurde bestimmt (siehe **Material und Methoden**, S. 32). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen vier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen mit 1-Butanol behandelten und unbehandelten Zellen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

In der **Abbildung 17** sind die Ergebnisse der Untersuchungen dargestellt. Nach einer einstündigen DAMGO-Vorbehandlung mit 1-Butanol zeigte der μ -Opioidrezeptor in MOR1-exprimierenden HEK293-Zellen eine Desensibilisierungsrate von rund 85%, verglichen mit rund 25% bei MOR1-Zellen, die nur mit DAMGO inkubiert wurden. Die Gegenwart von 1-Butanol und DAMGO führte nach einer weiteren Stunde der Präinkubation (2 h) zur fast vollständigen Desensibilisierung des MOR1, während der Rezeptor nach der zweistündigen Vorbehandlung mit DAMGO ohne 1-Butanol nur zu rund 40% desensibilisiert war. Ähnliche Resultate konnten auch für die MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen gefunden werden. Die Ergebnisse sind dabei nicht auf einen unspezifischen Alkoholeffekt zurückzuführen, denn die Behandlung der Zellen mit Isobutanol hatte keine Änderung der

Desensibilisierung des MOR1 in den MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden Zellen zur Folge.

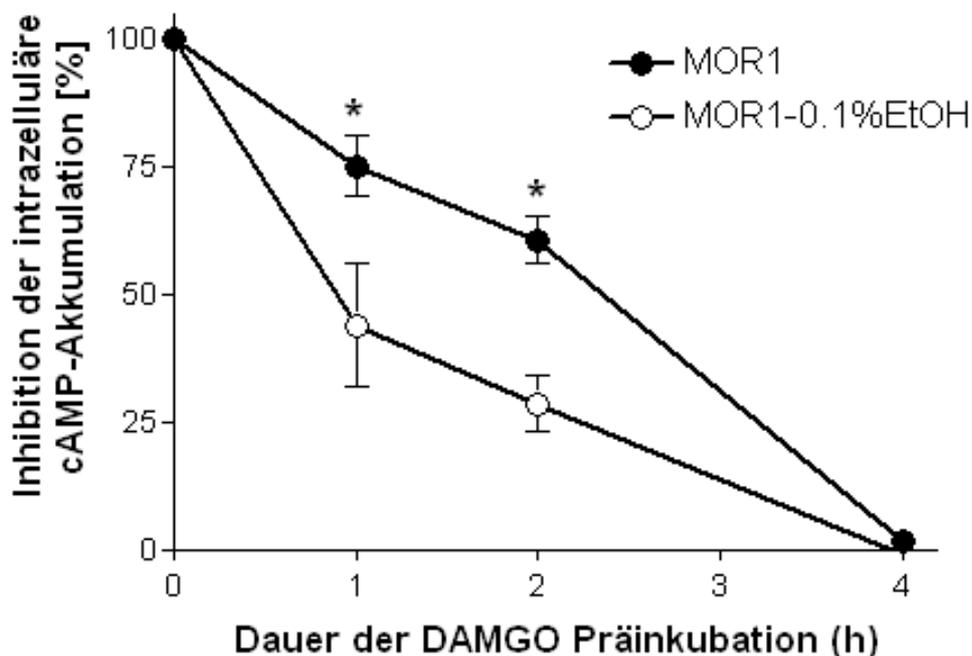


Abbildung 18: Verstärkung der agonisten-induzierten Desensibilisierung des MOR1 durch 0,1% Ethanol. MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierende HEK293-Zellen wurden mit oder ohne 0,1% Ethanol für 72 h bei 37°C inkubiert. Dann wurden die Zellen mit 1 μ M DAMGO mit oder ohne 0,1% Ethanol für 1, 2 oder 4 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden die Zellen mit 25 μ M Forskolin oder 25 μ M Forskolin plus 1 μ M DAMGO für 15 min behandelt und der cAMP-Gehalt wurde bestimmt (siehe **Material und Methoden**, S. 32). Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen vier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen mit Ethanol behandelten und unbehandelten Zellen, bestimmt mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Anschließend wurde untersucht, inwieweit sich eine chronische Behandlung der Zellen mit einer physiologisch relevanten Alkoholkonzentration (0,1% Ethanol), im Vergleich zu einer akuten Behandlung mit einer 0,7%igen 1-Butanollösung, auf die DAMGO-vermittelte Desensibilisierungsrate des MOR1 auswirkte. Dazu wurden MOR1-exprimierenden HEK293-Zellen für 72 h mit einer 0,1%igen Ethanollösung inkubiert und nach einer Vorbehandlung der Zellen mit DAMGO, mit oder ohne Ethanol für verschiedene Zeitperioden, der cAMP-Gehalt bestimmt. Die **Abbildung 18** zeigt eine beschleunigte Desensibilisierung des MOR1 in den mit Ethanol behandelten Zellen, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Eine Inkubation der MOR1-Zellen mit 0,1% Ethanol für 24 beziehungsweise 48 h zeigte tendenziell ähnliche Ergebnisse, die jedoch nicht signifikant waren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Insgesamt zeigten die Untersuchungen, daß die DAMGO-vermittelte Desensibilisierung des μ -Opioidrezeptors mit oder ohne Überexpression der PLD2 durch zwei primäre Alkohole (1-Butanol und Ethanol) verstärkt wird, wohingegen ein sekundärer Alkohol (Isobutanol) keinen Einfluß zeigte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die beobachtete Beschleunigung der Desensibilisierungsrate des MOR1 nach der Behandlung mit dem primären Alkohol eine Folge der reduzierten PLD2-vermittelten PA-Produktion und der daraus folgenden Beeinträchtigung der Rezeptor-Endozytose und des Recyclings ist. Der Internalisierung kommt also eine wichtige Funktion in der agonisten-induzierten Desensibilisierung zu.

5.3. Beeinflussung der De- und Resensibilisierung des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante (nPLD2)

Weiterhin wurde der Einfluß der Überexpression einer negativen PLD2-Mutante auf die De- und Resensibilisierung des MOR1 untersucht. Dazu wurde das Ausmaß der De- und Resensibilisierung nach einer DAMGO- und Morphin-Vorbehandlung zwischen MOR1-exprimierenden und MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen verglichen.

Die Ergebnisse der **Abbildung 19A** (S. 56) zeigen, daß die Überexpression der nPLD2 zu einer drastischen Beschleunigung der DAMGO-induzierten Desensibilisierung des MOR1, im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur den MOR1 exprimieren, führte. Nach einer einstündigen 1 μ M DAMGO-Präinkubation war die Hemmung der cAMP-Akkumulation auf rund 75% für die MOR1- und ungefähr 10% für die MOR1-nPLD2-Zellen gefallen. Auch die zweistündige Vorbehandlung der Zellen mit DAMGO hatte einen signifikanten Unterschied der Desensibilisierung zwischen den MOR1-exprimierenden und MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen in der Form zur Folge, daß der μ -Opioidrezeptor in den MOR1-nPLD2-Zellen fast vollständig desensibilisiert war, während der MOR1 in den MOR1-Zellen die cAMP-Akkumulation noch zu rund 60% hemmte. Die Desensibilisierungsrate des MOR1 nach der Hemmung der PLD2 durch die Überexpression der nPLD2 stimmte also mit der Rezeptor-Desensibilisierung nach der Blockade der PLD2-vermittelten PA-Synthese durch 1-Butanol überein.

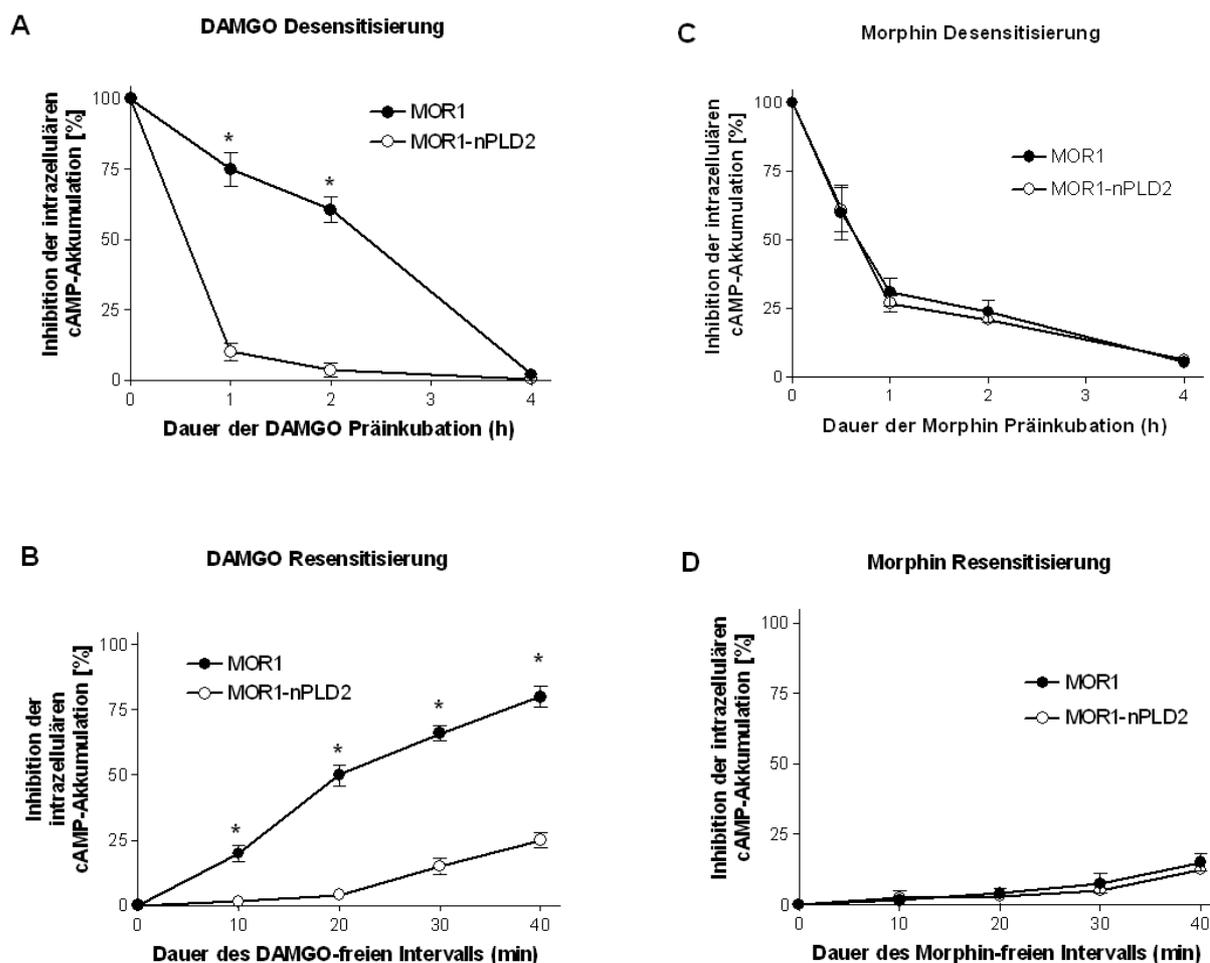


Abbildung 19: Einfluß der negativen PLD2-Mutante auf die agonisten-induzierte De- und Resensibilisierung des MOR1.

A und C: Für die Analyse der Rezeptor-Desensibilisierung wurden die MOR1- bzw. MOR1-nPLD2-Zellen bei 37°C in dem angegebenen Zeitraum mit 1 μ M DAMGO bzw. Morphin präinkubiert. Nach dem Entfernen des Präinkubationsmediums wurden die Zellen für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO oder Morphin (jeweils 1 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt.

B und D: Für die Analyse der Rezeptor-Resensibilisierung wurden MOR1- bzw. MOR1-nPLD2-Zellen bei 37°C für 8 h mit 1 μ M DAMGO bzw. Morphin präinkubiert, gefolgt von einem agonisten-freien Intervall von 0, 10, 20, 30 und 40 min. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, für 15 min mit Forskolin (25 μ M) und DAMGO oder Morphin (jeweils 1 μ M) behandelt und der cAMP-Gehalt der Zellen bestimmt.

Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus Doppelbestimmungen vier voneinander unabhängiger Experimente. Die Sterne verdeutlichen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$) zwischen MOR1- und MOR1-nPLD2-Zellen, berechnet mittels ANOVA, gefolgt durch den Bonferroni-Test.

Im Vergleich zu DAMGO resultierte die Vorbehandlung der MOR1- und MOR1-nPLD2-Zellen mit 1 μ M Morphin in einer schnelleren Desensibilisierung des MOR1 in beiden Zelllinien

(**Abbildung 19C**, S. 56). Die Überexpression der nPLD2 führte zu keiner Veränderung der Desensibilisierungsrate des MOR1 unter Morphin, im Gegensatz zur beschleunigten Desensibilisierung unter DAMGO. Dies knüpfte an die Ergebnisse der Untersuchungen zur PLD-Aktivität und Internalisierung an, die zeigten, daß Morphin nicht in der Lage war, die PLD2 zu aktivieren und zu keiner deutlichen Endozytose des MOR1 führte (**Abbildung 4**, S. 33).

Neben dem Einfluß der nPLD2 auf die Desensibilisierung des MOR1 wurden die Auswirkungen auf die Resensibilisierung des Rezeptors untersucht. In der **Abbildung 19B** sind die Ergebnisse der Resensibilisierung des MOR1 nach einer achtstündigen Vorbehandlung mit DAMGO dargestellt. Es zeigte sich, daß die Überexpression der nPLD2 zu einer starken Hemmung der Rezeptor-Resensibilisierung führte, im Vergleich zu den MOR1-exprimierenden HEK293-Zellen.

Demgegenüber zeigen die Ergebnisse der **Abbildung 19D**, daß der MOR1 in den MOR1- als auch MOR1-nPLD2-Zellen nach einer Vorbehandlung mit 1 μ M Morphin fast keine Resensibilisierung aufwies. Insgesamt lassen die Ergebnisse also den Schluß zu, daß die Hemmung der PLD2-Funktion zu einer Verstärkung der μ -Opioidrezeptor-Desensibilisierung durch die Beeinträchtigung der Rezeptor-Resensibilisierung führte.

IV. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der PLD2 auf die Internalisierung und De-beziehungsweise Resensitisierung des μ -Opioidrezeptors untersucht.

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte die im *yeast two hybrid*-System identifizierte Interaktion zwischen dem MOR1 und der PLD2 durch Koimmunopräzipitations-Experimente bestätigt und die Stimulierung der PLD2 durch MOR1 nachgewiesen werden. Die PLD2 wurde durch DAMGO aktiviert, wohingegen Morphin zu keiner Aktivitätssteigerung führte. Aufgrund der Blockierbarkeit der DAMGO-vermittelten PLD2-Aktivierung durch Naloxon konnte gezeigt werden, daß die PLD2-Aktivierung durch MOR1 vermittelt wird. MOR1 aktivierte die PLD2 über ARF und nicht durch die PKC. Daneben zeigten die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation, daß der MOR1 mit PLD2 und ARF interagiert.

Der zweite Teil der Arbeit machte den Einfluß der PLD2 auf die agonisten-induzierte Internalisierung des MOR1 deutlich. Die heterologe Stimulierung der PLD2 durch PMA führte auch zu einer deutlichen Internalisierung des MOR1 unter Morphin. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der PLD2-vermittelten Phosphatidsäure-Produktion durch 1-Butanol oder die Überexpression einer katalytisch inaktiven PLD2-Mutante (nPLD2) eine drastische Verringerung der agonisten-vermittelten Internalisierung des MOR1 zur Folge hatte.

Der Einfluß der PLD2 auf die De- und Resensitisierung des MOR1 wurde im dritten Teil dieser Arbeit untersucht. Die Ergebnisse demonstrierten, daß die Hemmung der PLD2-Aktivität in einer schnelleren Desensitisierung des MOR1 resultierte und die Resensitierungsrate des μ -Opioidrezeptors stark beeinträchtigt wurde.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse für eine wichtige Rolle der PLD2 im Prozeß der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1. In der **Abbildung 20** (S. 59) wurde zusammenfassend folgendes Modell des Einflusses der PLD2 auf die Internalisierung des MOR1 dargestellt: Nach der Aktivierung des μ -Opioidrezeptors durch den Liganden kommt es zur agonisten-induzierten Desensibilisierung des MOR1, in deren Verlauf der Rezeptor durch intrazelluläre Kinasen, wie zum Beispiel die G-protein-gekoppelte-Rezeptor-Kinasen (GRK) oder die Kalzium/Calmodulin-abhängige (CaM)-Kinase II, phosphoryliert wird. Der phosphorylierte Rezeptor bindet β -Arrestin. Diese Vorgänge führen zur Entkopplung des MOR1 von seinem G-Protein (Ferguson, 2001). Der Rezeptor verliert damit seine Aktivität,

er desensibilisiert. Die Bindung des Agonisten an den MOR1 führt andererseits auch zur ARF-abhängigen Aktivierung der PLD2, was wiederum in einer PA-reichen Membran resultiert. Dieser Wechsel der physiologischen Eigenschaften der Zellmembran ermöglicht die Translokation von β -Arrestin, AP-2, Dynamin und Clathrin an die Membran und löst damit die clathrin-vermittelte Rezeptor-Endozytose des MOR1 aus. Im Verlauf dieses Prozesses kommt es dann zum erneuten Einbau des Rezeptors in die Zellmembran (Recycling). Der μ -Opioidrezeptor wird dadurch wieder reaktiviert oder in Lysosomen abgebaut, wodurch sich die Rezeptordichte der Zellmembran verringert.

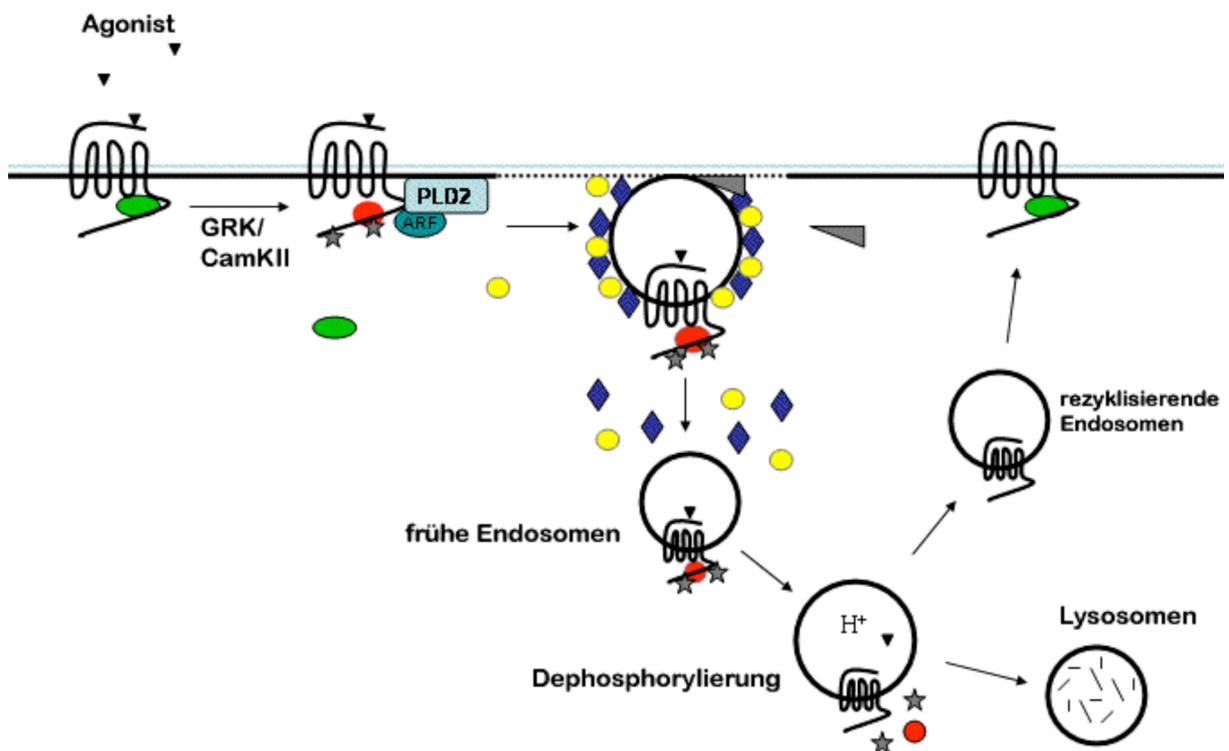


Abbildung 20: Modell der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 und die mögliche Rolle der PLD2 bei der Endozytose. Das G-Protein ist durch einen grünen ovalen Kreis dargestellt, β -Arrestin durch einen roten Kreis. Die Sterne symbolisieren Phosphorylierungsstellen. Die blauen Vierecke stehen für Clathrin, die gelben Kreise für AP2 und Dynamin ist durch die grauen Dreiecke dargestellt. Die schwarze gestrichelte Linie entspricht der PA-reichen Zellmembran. Erläuterungen im Text.

Wie die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation zeigten, interagiert der μ -Opioidrezeptor spezifisch mit der PLD2 und nicht mit der PLD1b. Für die Bindung zwischen dem MOR1 und der PLD2 scheint dabei die Phox-Homologie-Domäne (PX-Domäne) im NH_2 -Terminus der PLD2 und der COOH-Terminus des MOR1 verantwortlich zu sein. Im *yeast two hybrid*-System konnte nämlich ein mit dem C-Terminus des MOR1 interagierender Klon als NH_2 -

Terminus der PLD2 identifiziert werden (NH₂-terminale Aminosäuren 116 bis 226). Auf diesem PLD2-Fragment befindet sich der Hauptteil der Phox-Homologie-Domäne (Aminosäuren 63-192; **Abbildung 3**, S. 8).

Auch die positiven Befunde der Koimmunopräzipitation zwischen dem MOR1 und einer negativen PLD2-Mutante (nPLD2) sprechen für die Phox-Homologie-Domäne als den gemeinsamen Bindungsort der beiden Proteine. Durch die Konstruktion der nPLD2 wurden nämlich nur die NH₂-terminalen Aminosäuren 1-235 der Phospholipase D2 exprimiert, was dafür spricht, daß der COOH-Terminus des MOR1 an die PX-Domäne der PLD2 im NH₂-Terminus bindet.

Bei der PX-Domäne handelt es sich um ein phosphoinositid-bindendes Motiv, das bisher in einer Vielzahl von Signal- und Adapterproteinen gefunden wurde (Xu et al., 2001). Die Ergebnisse von Phillips et al. (2001) und Haft et al. (1998) zeigen, daß die PX-Domäne nicht nur für die Assoziation mit der Zellmembran benötigt wird, sondern auch eine Funktion in der Interaktion mit verschiedenen Rezeptoren, wie zum Beispiel dem Epidermalen-Wachstumsfaktor- (EGF-) und Plättchen-Wachstumsfaktor-Rezeptor (PGF-R), besitzt. Die Phospholipase D1b und 2 besitzen beide eine PX-Domäne in ihrem NH₂-Terminus. Aber nur für die PLD2 konnte eine Interaktion mit dem MOR1 im *yeast two hybrid*-System und der Koimmunopräzipitation nachgewiesen werden. Dies könnte auf die vorhandenen Sequenzunterschiede zwischen dem NH₂-Terminus der PLD1b und 2 zurückzuführen sein.

Die nach Agonistenbehandlung zu beobachtende Reduktion des koimmunopräzipitierbaren Anteils an PLD2 könnte auf die Separierung des MOR1 und der membran-lokalisierten PLD2 nach der agonisten-induzierten Rezeptor-Internalisierung zurückzuführen sein.

Die Befunde der Koimmunopräzipitation bestätigten auch, daß in die Aktivierung der PLD2 durch den MOR1 das kleine G-Protein ARF (ADP-Ribosylierungsfaktor) eingebunden ist. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, daß es zu einer direkten Interaktion zwischen dem MOR1 und dem kleinen G-Protein ARF kommt. Dafür spricht die Identifikation eines hochkonservierten NPXXY-Motivs innerhalb der siebten Transmembran-Domäne zahlreicher G-protein-gekoppelter Rezeptoren einschließlich des μ -Opioidrezeptors. Mitchell et al. (1998) konnten demonstrieren, daß es sich bei dem Motiv um einen spezifischen ARF-Bindungsort handelt, der in die rezeptor-vermittelte PLD-Aktivierung involviert ist.

Andererseits kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß die Interaktion zwischen dem MOR1 und ARF über dritte Proteine, wie zum Beispiel die PLD2, vermittelt wird. Diese

Hypothese wird durch Ergebnisse unterstützt, die zeigten, daß die Koimmunopräzipitation zwischen dem MOR1 und ARF die Gegenwart der PLD2 benötigt. Demnach konnte ARF nur im Koimmunopräzipitat der MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen detektiert werden, aber nicht in dem der MOR1-exprimierenden Zellen, obwohl im Lysat der MOR1-PLD2- als auch MOR1-Zellen ARF nachgewiesen werden konnte. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, daß ein Wechsel der Konformation des μ -Opioidrezeptors im MOR1-PLD2-Signalkomplex notwendig ist, um die Bindung von ARF an den MOR1 zu ermöglichen.

Insgesamt betrachtet, führte die Stimulierung der MOR1-PLD2-Zellen mit dem Agonisten zu einem 50%igen Anstieg des koimmunopräzipitierbaren Anteils an ARF. Das unterstützt die Hypothese eines ARF-abhängigen Aktivierungswegs der PLD2 durch den MOR1.

Bei dem ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF) handelt es sich um ein 21 kDa großes G-Protein, dessen Rolle als kritische Komponente in verschiedenen vesikulären Transportwegen in allen eukaryontischen Zellen bekannt ist und das als spezifischer Aktivator der Phospholipase D identifiziert werden konnte (Moss et al. 1998). Mitchell et al. (2003) konnten darüber hinaus in jüngsten Untersuchungen zeigen, daß der m_3 -muscarinerge Rezeptor die PLD2 über ARF6 aktiviert. Bei ARF6 handelt es sich um eine Isoform der zellulären ARFs, die hauptsächlich an der Plasmamembran lokalisiert sind. Die Behandlung der MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK-Zellen mit dem ARF-Inhibitor Brefeldin A, welches ARF-spezifische Guanin-Nukleotid-Austausch-Proteine blockiert, führte zu einer Verhinderung der PLD2-Aktivierung durch DAMGO.

Im Gegensatz dazu hatte die Blockade der PKC, als einem weiteren potentiellen Aktivator der PLD durch den Inhibitor Calphostin C, keine Abnahme der DAMGO-induzierten PLD2-Aktivität zur Folge. Dies spricht dafür, daß die PKC keine Rolle in der μ -Opioidrezeptor-vermittelten PLD2-Aktivierung spielt. Genauso wenig scheint die PKC die agonisten-induzierte μ -Opioidrezeptor-Phosphorylierung zu vermitteln. Dies verdeutlichen die Zellkulturarbeiten von Zhang et al. (1996). Die Ergebnisse der PLD-Aktivitätsuntersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigten, daß die Stimulierung der PKC durch PMA zu einer Aktivierung der PLD2 und 1b führte. Der dafür verantwortliche Mechanismus ist noch immer unklar (Exton, 2002).

Die Untersuchungen von Kim et al. (2000) lassen erkennen, daß die Behandlung der Zellen mit dem Phorbolster (PMA) zu einer Phosphorylierung der Serin- und Threoninreste der PLD1 führte. Dies ist jedoch kein Beweis für die Annahme, daß die Phosphorylierung der

PLD1 eine Voraussetzung für die Enzymaktivierung ist. Denn eine PKC ζ -Mutante, der die Kinase-Funktion fehlte, war in der Lage die PLD1 zu aktivieren. Demnach ist die initiale Aktivierung der PLD1 durch PMA mit der direkten Interaktion zwischen PLD1 und PKC ζ verbunden (Hu und Exton, 2003). Weiterhin könnten auch andere in diesem Zusammenhang noch nicht identifizierte Kinasen in der Phosphorylierung der PLD mitwirken.

Der zweite und dritte Teil dieser Arbeit beschäftigte sich mit der Funktion der PLD2 im Prozeß der agonisten-induzierten Endozytose und De- und Resensitisierung des MOR1. In der **Abbildung 20** (S. 59) wurde eine mögliche Rolle der PLD2 als Modell dargestellt. Ähnlich wie die Phospholipase C, Phospholipase A2 und Sphingomyelinase ist die PLD2 eine signal- und rezeptor-aktivierbare Phospholipase. Über die zellulären Effekte der PLD2 und ihres primären Metaboliten Phosphatidsäure (PA) ist jedoch noch immer wenig bekannt. Klar ist, daß der *second messenger* PA die Phosphatidylinositol-4-Phosphat-5-Kinase (PIP-5-Kinase) aktiviert, welche für die Produktion von PIP₂ verantwortlich ist (Jenkins et al., 1994). Honda et al. (1999) und Jones et al. (2000) konnten weiterhin zeigen, daß nicht nur PA, sondern auch ARF die Aktivität der PIP-5-Kinase *in vitro* regulieren kann. In Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Vesikel können PA oder ARF die PIP-5-Kinase unabhängig voneinander beeinflussen. PIP₂ wiederum aktiviert die PLD in einer positiven Rückkopplung. Die daraus resultierende Zunahme der PA-Konzentration nach der PLD-Aktivierung führt zu einem Wechsel der physiologischen Eigenschaften der Zellmembran in Form von Veränderungen der Ladung und des pH-Wertes, was wiederum Voraussetzung für die Bildung der Vesikel ist. Der niedrige pH-Wert der PA-reichen Plasmamembran könnte dabei in einer Protonierung der Proteine resultieren, welche aus diesem Grunde durch die negative Ladung des Phosphatrestes der Phosphatidsäure (PA) angezogen werden. In diesem Sinne scheint die PLD1 eine Rolle bei der Vesikelformierung des Golgi-Apparates zu spielen (Ktistakis et al., 1995 und 1996), während die PLD2 bei der Vesikelbildung der Plasmamembran eine Rolle spielt. Darüber hinaus hatte die Überexpression der PLD2 in Fibroblasten aus Rattenembryonen morphologische Änderungen der Zellen zur Folge, was den Schluß zuläßt, daß die PLD2 in die Neuordnung des Actin-Cytoskelett eingebunden ist (Cockcroft, 2001; Colley et al., 1997).

Während also die PLD1 eine Aufgabe in der Exozytose zu übernehmen scheint, sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit für eine Beteiligung der PLD2 an endozytotischen Prozessen. Die

zelluläre Lokalisierung von MOR1 und PLD2 zeigte, daß sich die beiden Proteine in der Plasmamembran befinden. Allerdings konnte keine Kointernalisierung des MOR1 und der PLD2 nach der Behandlung mit dem μ -Opioidrezeptoragonisten DAMGO beobachtet werden. Diese Befunde unterstützen auch die Ergebnisse der Koimmunopräzipitation, denn die Stimulierung der MOR1-PLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen mit DAMGO führte zu einer Abnahme an koimmunopräzipitierbarer PLD2 um rund 50%. Anhand der Durchführung der Methode konnte dabei sichergestellt werden, daß auch internalisierte Rezeptoren in den Vesikeln immunpräzipitiert wurden (**Material und Methoden, Abschnitt 2.5.2.**, S. 25). Die vergleichende Quantifizierung der Internalisierung des MOR1 mit Hilfe einer ELISA-Technik ergab, daß rund 40% des μ -Opioidrezeptors nach der Behandlung mit dem Agonisten DAMGO internalisierten.

Weiterhin wurde die Internalisierung des μ -Opioidrezeptors in den MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen verglichen. Der Rezeptor zeigte unter DAMGO eine deutliche Internalisierung, während die Behandlung mit Morphin zu keiner Endozytose des MOR1 in beiden Zelllinien führte. Ebenfalls hatte die alleinige Inkubation der Zellen mit dem PKC-Aktivator PMA keine Auslösung der Internalisierung des Rezeptors zur Folge, obwohl PMA nachweislich die PLD2 aktivierte.

Wurden die MOR1-PLD2-Zellen jedoch gleichzeitig mit Morphin und PMA behandelt, kam es zu einer 20 bis 30%igen Internalisierung des MOR1. Da Morphin keine Aktivierung der PLD2 induzieren kann, scheint die heterologe PLD2-Aktivierung durch PKC in Kombination mit der Agonisten-Inkubation die Internalisierung auszulösen.

Durch die Behandlung der Zellen mit einem primären Alkohol (1-Butanol) wurde die PLD2 gehemmt (Shen et al., 2001; Skippen et al., 2002). Dies führte zu einer 80%igen Reduktion der agonisten-induzierten Endozytose des μ -Opioidrezeptors. Für die Versuche wurde eine 0,7%ige Butanolkonzentration verwendet, die einerseits eine ausreichende maximale Transphosphatidylierung zur Folge hatte und andererseits toxische Alkoholeffekte ausschloß. Die Kontrollversuche mit Isobutanol, welches von der PLD2 nicht als Substrat genutzt wird, führten trotz vergleichbarer möglicher Toxizität zu keiner Veränderung der G-Protein-Kopplung des μ -Opioidrezeptors und damit zu keiner Hemmung der Endozytose des MOR1 in beiden Zelllinien.

Andererseits wurde durch die Überexpression einer inaktiven PLD2-Mutante (nPLD2) in den MOR1-Zellen die endogen exprimierte PLD2 aus der Bindung mit dem MOR1 verdrängt.

Dies resultierte in einer rund 50%igen Reduktion der DAMGO-induzierten Internalisierung des μ -Opioidrezeptors. Interessanterweise hatte die heterologe Aktivierung der endogenen PLD2 in den MOR1-nPLD2-koexprimierenden HEK293-Zellen durch PMA zusammen mit der DAMGO-Behandlung die Aufhebung der nPLD2-vermittelten Hemmung der Rezeptorinternalisierung zur Folge. Indem die durch nPLD2 vermittelte Blockierung der rezeptor-induzierten PLD2-Aktivierung mittels PMA-Behandlung umgangen wurde, kam es zu einer rund 40%igen Internalisierung des MOR1 unter DAMGO plus PMA. Damit entsprach die Internalisierung des MOR1 in diesen Zellen dem des μ -Opioidrezeptors in den MOR1-exprimierenden Zellen unter gleichen Bedingungen beziehungsweise der vorher ermittelten DAMGO-induzierten Endozytose des MOR1 in den MOR1-Zellen.

Wurden im Vergleich dazu die MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen gleichzeitig mit DAMGO und PMA inkubiert, führte dies zu einem signifikanten Anstieg der Internalisierung des μ -Opioidrezeptors. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf die Menge der exprimierten PLD2 zurückzuführen. Denn während in den MOR1-nPLD2- und MOR1-Zellen nur die endogen exprimierte PLD2 der HEK293-Zellen zu finden ist, wurde in den MOR1-PLD2-Zellen die PLD2 überexprimiert. Damit dürfte sicherlich die verstärkte PMA-Wirkung zu erklären sein.

Die heterologe PLD2-Aktivierung durch PMA führte zur Induzierung einer μ -Opioidrezeptor-Internalisierung unter Morphin. Aus diesem Grunde kann vermutet werden, daß für die Rezeptor-Endozytose zwei Prozesse wichtig sind, zum einen die agonisten-induzierte Konformationsänderung des Rezeptors und zum anderen die Stimulierung der PLD2-Aktivität.

In Hinblick auf das Unvermögen von Morphin zur Auslösung der Internalisierung des MOR1 wurde vermutet, daß Morphin den Rezeptor in einer Konformation zurückhält, die keine GRK-vermittelte Phosphorylierung und anschließende β -Arrestin-Bindung erlaubt (Whistler et al., 1999; Koch et al., 2001). Diese Hypothese wurde auch durch andere Ergebnisse unterstützt, die zeigten, daß Morphin zwar keine starke Phosphorylierung des MOR1 auslösen kann, aber sehr wohl zur Phosphorylierung anderer Splicevarianten des Rezeptors (MOR1D und MOR1E) in Lage ist. Die beiden Varianten internalisieren auch nach der Behandlung mit Morphin (Koch et al., 2001).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Interaktion von β -Arrestin mit β 2-Adaptin (AP-2) zur Initiation der clathrin-vermittelten Rezeptor-Endozytose führt (Laporte et al., 2002). Die

Bindung von AP-2 wird durch eine PA-reiche Membran erleichtert, die aus der PA-Produktion der durch ARF aktivierten PLD2 resultiert (Liscovitch und Cantley, 1995; De Camilli et al., 1996).

Dies läßt erkennen, daß die Rezeptor-Endozytose nicht nur durch die Rezeptor-Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung moduliert wird, sondern auch durch die PLD2-induzierte PA-Produktion, welche wiederum die Translokation von AP-2 und Clathrin an die Plasmamembran ermöglicht. Daraus läßt sich folgern, daß der Aktivierung der PLD2 die Schlüsselrolle während der Induktion der agonisten-induzierten Endozytose des μ -Opioidrezeptors zukommt.

Aufgrund von Studien, die zeigten, daß die Endozytose und das Recycling des Rezeptors entscheidende Faktoren für die Rate der agonisten-induzierten μ -Opioidrezeptor-Desensibilisierung sind (Koch et al., 1998 und 2001; Law et al., 2000), konnte angenommen werden, daß die PLD2 in die Regulation der Reaktivierung und auch der Desensibilisierung des MOR1 involviert sein könnte.

Deshalb wurde zuerst die Auswirkung einer Überexpression der PLD2 auf die De-beziehungsweise Resensibilisierungs-Rate des MOR1 untersucht. Es stellte sich heraus, daß die Koexpression der PLD2 zu keinen Veränderungen der agonisten-induzierten MOR1-Desensibilisierung oder Resensibilisierung führte. Dies stimmt mit den Befunden zur agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 überein. Denn auch hier führte die zusätzliche Überexpression der PLD2 zu keiner Verstärkung der basalen Rate der Rezeptor-Endozytose in den HEK293-Zellen. Die endogen exprimierte Menge an PLD2 scheint somit für die Induktion der Rezeptor-Endozytose und des Recyclings des Rezeptors ausreichend zu sein.

Jedoch läßt die Zunahme der agonisten-induzierten μ -Opioidrezeptor-Endozytose unter Morphin, nach einer heterologen Stimulierung der PLD2 durch die PKC mittels PMA, die Rolle der PLD2-Aktivität für die Induktion der Rezeptor-Endozytose erkennen. Daher wurde im weiteren Verlauf der Einfluß einer PLD2-Inhibition auf die De-beziehungsweise Resensibilisierung-Rate des MOR1 in HEK293-Zellen determiniert. Auf der einen Seite wurde deshalb die PLD2-vermittelte PA-Produktion durch die Behandlung der Zellen mit einer 0,7%igen 1-Butanollösung gehemmt. In den MOR1-exprimierenden als auch MOR1-PLD2-koexprimierenden Zellen führte dies zu einer drastischen Zunahme der Desensibilisierungsrate des MOR1, im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die isobutanol-behandelten Kontrollzellen zeigten dagegen keine Änderung hinsichtlich der Desensibilisierung des MOR1.

Für den Einfluß der PA-Produktion auf die Desensibilisierung spricht auch die Hemmung der PLD2 durch eine physiologische Ethanolkonzentration (0,1%). Die Behandlung der MOR1-exprimierenden Zellen führte ebenfalls zu einer Zunahme der Desensibilisierungsrate des MOR1.

Auf der anderen Seite wurde die katalytisch inaktive nPLD2 zur Hemmung der MOR1-vermittelten PLD2-Aktivierung und anschließender PA-Synthese verwendet. Die Überexpression der nPLD2 in den MOR1-Zellen resultierte in einer deutlich schnelleren DAMGO-induzierten Rezeptor-Desensibilisierung. Außerdem wurde auch die Resensibilisierung des μ -Opioidrezeptors stark beeinträchtigt. Im Vergleich dazu wurde die DAMGO-induzierte Internalisierung des MOR1 durch die nPLD2 aber nur um rund 50% reduziert (**Abbildung 15**, S. 50). Die stark verzögerte Resensibilisierungsrate des MOR1 in Folge der Überexpression der nPLD2 läßt erkennen, daß die Aktivierung der PLD2 neben ihrer wichtigen Funktion in der agonisten-induzierten Endozytose in die Reaktivierung des MOR1 eingebunden ist. Choi et al. (2002) konnten mit Hilfe von Mastzellen zeigen, daß die dort endogen exprimierten Phospholipasen D1 und D2 unterschiedliche Phasen der Exozytose regulieren. Ihre Ergebnisse verdeutlichten die Beteiligung der PLD2 an sekretorischen Prozessen, denn die Expression einer katalytisch inaktiven PLD2 führte zur Blockierung der Sekretion. Für den Verlauf der Exozytose postulierten sie, daß die Translokation der Granula zur Zellperipherie in Mastzellen durch die granula-assoziierte PLD1 reguliert wird. Die kalzium-abhängige Fusion der Granula mit der Plasmamembran wird durch die PLD2 gesteuert und möglicherweise durch die PLD1 beeinflusst. Daneben konnte demonstriert werden, daß die PLD2 in die Neuordnung des Actin-Cytoskelett (Cockcroft, 2001; Colley et al., 1997) und der Änderung der Membranstruktur (Honda et al., 1999) eingebunden ist. Damit beteiligt sich die PLD2 an den vesikulären Transportprozessen der Zellmembran. Auf Grund dessen könnte die beobachtete Zunahme der DAMGO-induzierten MOR1-Desensibilisierung in Folge der nPLD2-Überexpression auf einem kombinatorischen Effekt aus abnehmender Rezeptor-Endozytose und beeinträchtigtem Rezeptor-Recycling zurückzuführen sein. Über welche Zielproteine und Signalwege die PLD2 in die Reaktivierung des MOR1 eingebunden ist, sollten weitergehende Untersuchungen zeigen.

Abschließend lassen die Resultate erkennen, daß die Blockierung der Fähigkeit des μ -Opioidrezeptors zur Reaktivierung das Vermögen des Agonisten zur Desensibilisierung des Rezeptors verstärkt. Dies entspricht dem Modell, wonach die schnelle Rezeptor-Internalisierung ein bedeutender Mechanismus für die Reaktivierung des MOR1 ist. Die

Abbildung 21 (S. 67) verdeutlicht dies anhand des Unterschiedes der liganden-abhängigen Rezeptor-Desensibilisierung des MOR1 zwischen Morphin und DAMGO. Während Morphin aufgrund der fehlenden Internalisierung zu einer schnellen Rezeptor-Desensibilisierung führt, hat die starke Internalisierung des MOR1 nach DAMGO und der folgenden Resensibilisierung eine langsamere Rezeptor-Desensibilisierung zur Folge (**Abbildung 19A und C**, S. 56).

Die Stimulierung der PLD2-Aktivität durch zahlreiche G-protein-gekoppelte Rezeptoren einschließlich den VPAC und PAC-Rezeptoren, dem Endothelin-Rezeptor oder D₂-Dopamin-Rezeptor (McCulloch et al., 2001; Ambar et al., 1993; Senogles et al., 2000) konnte bisher nachgewiesen werden. Trotzdem ist der Mechanismus der PLD2-Aktivierung durch die G-protein-gekoppelten Rezeptoren und die zelluläre Funktion der aktivierten PLD2 nahezu unverstanden. Diese Arbeit konnte daher erstmals die essentielle Rolle der PLD2 in der agonisten-induzierten Endozytose des μ -Opioidrezeptors als Beispiel eines G-protein-gekoppelten Rezeptors aufzeigen.

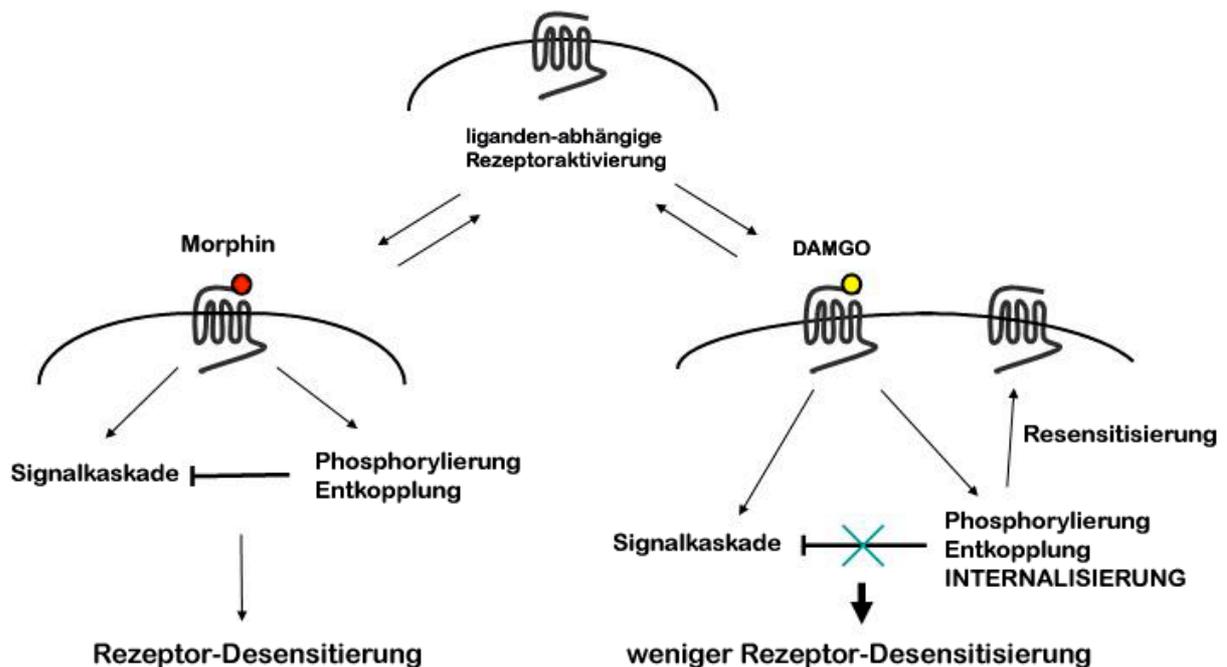


Abbildung 21: Vergleich der liganden-abhängigen Rezeptor-Desensibilisierung zwischen Morphin und DAMGO. Erläuterungen im Text.

V. Zusammenfassung

Auf der Suche nach intrazellulären Proteinen, die an der Endozytose des μ -Opioidrezeptors (MOR1) beteiligt sind, wurde die Phospholipase D2 (PLD2) als ein mit dem Rezeptor interagierendes Protein identifiziert. Bei der PLD2 handelt es sich um eine plasmamembran-assoziierte Phosphodiesterase, die eine Rolle bei der Bildung endozytotischer Vesikel spielt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der PLD2 auf die agonisten-induzierte Internalisierung und Desensibilisierung des MOR1 untersucht. HEK293-Zellen wurden für die Untersuchungen mit MOR1 und PLD2 kotransfiziert. Die Interaktion zwischen dem MOR1 und der PLD2 konnte mit Hilfe der Koimmunopräzipitation bestätigt werden. Die Stimulierung der Zellen mit dem Rezeptor-Agonisten DAMGO hatte eine dreifache Zunahme der PLD2-Aktivität zur Folge. Im Gegensatz dazu führte Morphin, das keine Internalisierung des MOR1 induziert, zu keiner PLD2-Aktivierung. Die DAMGO-vermittelte PLD2-Aktivierung konnte durch Brefeldin A, einem Inhibitor des ADP-Ribosylierungsfaktor (ARF), gehemmt werden, wohingegen der Proteinkinase C-Inhibitor Calphostin C die Aktivierung nicht beeinflussen konnte. Dies spricht dafür, daß die MOR1-vermittelte PLD2-Aktivierung ARF- und nicht PKC-abhängig erfolgt.

Der zweite Teil dieser Arbeit verdeutlichte, daß die alleinige Behandlung der Zellen mit Morphin oder dem Phorbolster PMA, welches die PLD2 über die PKC aktiviert, zu keiner Endozytose des MOR1 führte. Erst die kombinierte Stimulierung des MOR1 durch Morphin und der PLD2 durch PMA zog eine Internalisierung des MOR1 nach sich. Umgekehrt konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der PLD2-vermittelten Phosphatidsäure-Produktion durch 1-Butanol oder die Überexpression einer katalytisch inaktiven PLD2-Mutante (nPLD2) eine drastische Verringerung der agonisten-vermittelten Internalisierung zur Folge hatte.

Im dritten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluß der PLD2 auf die agonisten-induzierte De- und Resensibilisierung des MOR1 untersucht. Die Ergebnisse zeigten, daß die Inhibition der PLD2 in einer beschleunigten Desensibilisierungsrate und verzögerten Resensibilisierung des MOR1 resultierte. Dies spricht für das Modell, wonach die Rezeptor-Internalisierung ein bedeutender Mechanismus für die Reaktivierung des MOR1 ist.

Damit konnten die Ergebnisse dieser Arbeit erstmals die essentielle Rolle der PLD2 in der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 aufzeigen.

VI. Literaturverzeichnis

Ambar I, Sokolovsky M (1993): Endothelin receptors stimulate both phospholipase C and phospholipase D activities in different cell lines. *Eur J Pharmacol* 245:31-41.

Capeyrou R, Riond J, Corbani M, Lepage JF, Bertin B, Emorine LJ (1997): Agonist-induced signalling and trafficking of the mu-opioid receptor: role of serine and threonine residue in the third cytoplasmic loop and C-terminal domain. *FEBS Letters* 415:200-205.

Chang KJ, Cooper BR, Hazum E, Cuatrecasas P (1979): Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides. *Mol Pharmacol* 16:91-104.

Chang KJ, Cuatrecasas P (1979): Multiple opiate receptors. Enkephalins and morphine bind to receptors of different specificity. *J Biol Chem* 254:2610-2618.

Chen CA, Okayama H (1988): Calcium phosphate-mediated gene transfer: a highly efficient transfection system for stably transforming cells with plasmid DNA. *Biotechniques* 6:632-638.

Chen Y, Mestek A, Liu J, Yu L (1993): Molecular cloning of a rat kappa opioid receptor reveals sequence similarities to the mu and delta opioid receptors. *Biochem J* 295:625-628.

Choi WS, Kim YM, Combs C, Frohman MA, Beaven MA (2002): Phospholipases D1 and D2 regulate different phases of exocytosis in mast cells. *J Immunol* 168:5682-5689.

Chung CT, Niemela SL, Miller RH (1989): One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2172-2175.

Cockcroft S (2001): Signalling roles of mammalian Phospholipase D1 and D2. *Cell Mol Life Sci* 58:1674-1687.

Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA (1997): Phospholipase D2, a distinct Phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7:191-201.

Conner SD, Schmid SL (2003): Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422:37-44.

De Camilli P, Emr SD, McPherson PS, Novick P (1996): Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. *Science* 271:1533-1539.

Deng HB, Yu Y, Pak Y, O'Dowd BF, George SR, Surrat CK, Uhö GR, Wang JB (2000): Role of the C-terminus in agonist-induced μ opioid receptor phosphorylation and desensitization. *Biochemistry* 39:5492-5499.

Divecha N, Roefs M, Halstead J, D'Andrea S, Fernandez-Borga M, Oomen L, Saqib K, Wakelam M, Santos C (2000): Interaction of the Type I \square PIPkinase with Phospholipase D: a role for the local generation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the regulation of PLD2 activity. *EMBO J* 19:5440-5449.

Evans CJ, Keith DE Jr, Morrison H, Magendzo K, Edwards RH (1992): Cloning of a delta opioid receptor by functional expression. *Science* 258:1952-1955.

Exton J (2002): Regulation of phospholipase D. *FEBS Letters* 531:58-61.

Ferguson SS (2001): Evolving concepts in G-protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signalling. *Pharmacol Rew* 53:1-24.

Fields S, Song O (1989): A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340 (6230):245-6.

Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H (1993): Primary structures and expression from cDNAs of rat opioid receptor delta- and mu-subtypes. *FEBS Letters* 327:311-314.

Fukuda K, Kato S, Morikawa H, Shoda T, 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* 67:1309-1316.

Gottlin EB, Rudolph AE, Zhao Y., Matthews HR, Dixon JE (1998): Catalytic mechanism of the phospholipase D superfamily proceeds via a covalent phosphohistidine intermediate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 9202-9207.

Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.

Haft CR, de la Luz Sierra M, Barr VA, Haft DH, Tayler SI (1998): Identification of a family of sorting nexin molecules and characterization of their association with receptors. *Mol Cell Biol* 18:7278-7287.

Hanahan DJ, Chaikoff JL (1947) *J Biol Chem* 168: 233-240; 172:191-198.

Henry DJ, Grandy DK, Lester HA, Davidson N, Chavkin C (1995): Kappa-opioid receptors couple to inwardly rectifying potassium channels when coexpressed by *Xenopus* oocytes. *Mol Pharm* 47:551-557.

Honda A, Nogami M, Yokozeki T, Yamzaki M, Nakamura H, Watanabe H, Kawayama K, Morris AJ, Frohman MA, Kanaho Y (1999): Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase alpha is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. *Cell* 99:521-532.

Hu T, Exton JH (2003): Mechanisms of regulation of phospholipase D1 by protein kinase Calpha. *J Biol Chem* 278:2348-2355.

Jenkins GH, Fiset PL, Anderson RA (1994): Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms are specifically stimulated by phosphatidic acid. *J Biol Chem* 269:11547-11554.

Jones DH, Morris JB, Morgan CP, Kondo H, Irvine RF, Cockcroft S (2000): Type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase directly interacts with ADP-ribosylation factor 1 and is responsible for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in the golgi compartment. *J Biol Chem* 275:13962-13966.

Iismaa TP, Binden TJ, Shine J (1995): G-protein coupled receptor. Springer-Verlag, Heidelberg.

Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991): Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349-400.

Kim Y, Han JM, Han BR, Lee KA, Kim JH, Lee BD, Jang IH, Suh PG, Ryu SH (2000): Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane *J Biol Chem* 275:11596-11604.

Koch T, Schulz S, Schröder H, Wolf R, Raulf E, Höllt V (1998): Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 273:13652-13657.

Koch T, Schulz S, Pfeiffer M, Klutzny M, Schröder H, Kahl E, Höllt V (2001): C-terminal splice variants of the mouse μ -opioid receptor differ in morphine-induced internalization and receptor resensitization. *J Biol Chem* 276:31408-31414.

Koch T, Schulz S, Höllt V (2002): Different intracellular signaling systems involved in opioid tolerance/dependence. *Molecular Biology of Drug Addiction*, Humana Press Inc. 45-60.

Koch T, Brandenburg LO, Schulz S, Liang Y, Klein J, Höllt V (2003): ADP-ribosylation factor-dependent Phospholipase D2 activation is required for agonist-induced μ -opioid receptor endocytosis. *J Biol Chem* 278:9979-9985.

Kovoor A, Henry DJ, Chavkin C (1995): Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor-coupled potassium channel (GIRK1). *J Biol Chem* 270:589-595.

Ktistakis NT, Brown HA, Sternweis PC, Roth MG (1995): Phospholipase D is present on Golgi-enriched membranes and its activation by ADP ribosylation factor is sensitive to brefeldin A. *Natl Acad Sci USA* 92:4952-4956.

Ktistakis NT, Brown HA, Waters MG, Sternweis PC, Roth MG (1996): Evidence that phospholipase D mediates ADP ribosylation factor-dependent formation of Golgi coated vesicles. *J Cell Biol* 134:295-306.

Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.

Laporte SA, Miller WE, Kim KM, Caron MG (2002): beta-Arrestin/AP-2 interaction in G protein-coupled receptor internalization: identification of a beta-arrestin binding site in beta 2-adaptin. *J Biol Chem* 277:9247-9254.

Law PY, Erickson LJ, El-Kouhen R, Dicker L, Solberg, Wang W, Miller E, Burd AL, Loh HH (2000): Receptor density and recycling affect the rate of agonist-induced desensitization of mu-opioid receptor. *Mol Pharm* 58:388-398.

Liscovitch M, Cantley LC (1995): Signal transduction and membrane traffic: the PITP/phosphoinositide connection. *Cell* 81:659-662.

Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000): Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345:401-415.

Lopez I, Arnold RS, Lambeth JD (1998): Cloning and initial characterization of a human Phospholipase D2 (hPLD2). *J Biol Chem* 273 (21):12846-12852.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275.

McCulloch DA, Lutz EM, Johnson MS, Robertson DN, Mackenzie CJ, Holland PJ, Mitchell R (2001): ADP-Ribosylation factor-dependent Phospholipase D activation by VPAC receptors and a PAC₁ receptor splice variant. *Mol Pharm* 59:1523-1532.

Meier KE, Gibbs TC, Knoepp SM, Ella KM (1999): Expression of Phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochem Biophys Acta* 1439:199-213.

Mitchell R, McCulloch D, Lutz EM, Johnson MS, MacKenzie C, Fennell M, Fink G, Zhou W, Sealfon SC (1998): Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature* 392:411-414.

Mitchell R, Robertson DN, Holland PJ, Collins D, Lutz EM, Johnson MS (2003): ADP-ribosylation factor-dependent Phospholipase D activation by the m₃ muscarinic receptor. *J Biol Chem* 278:33818-33830.

Moritz A, De Graan PN, Gispen WH, Wirtz KW (1992): Phosphatidic acid is a specific activator of phosphatidylinositol-4-phosphate kinase. *J Biol Chem* 267:7207-7210.

Morris AJ, Frohman MA, Engebrecht J (1997): Measurement of Phospholipase D activity. *Anal Biochem* 252:1-9.

Moss J, Vaughan M (1998): Molecules in the ARF orbit. *J Biol Chem* 273:21431-21434.

Pan YX, Xu J, Mahurter L, Bolan E, Xu M, 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 USA* 98:14084-14089.

Pan YX, Xu J, Mahurter L, Xu M, Gilbert AK, Pasternak GW (2003): Identification and characterization of two new human mu opioid receptor splice variants, hMOR1-1O and hMOR1-1X. *Biochem Biophys Res Commun* 301:1057-1061.

Phillips SA, Barr VA, Haft DH, Tayler SI, Haft CR (2001): Identification and characterization of SNX15, a novel sorting nexin involved in protein trafficking. *J Biol Chem* 276:5074-5084.

Piros ET, Prather PL, Loh HH, Law PY, Evans CJ, Hales TG (1995): Ca²⁺ channel and adenylyl cyclase modulation by cloned mu-opioid receptors in GH3 cells. *Mol Pharmacol* 47:1041-1049.

Pronin AN, Morris AJ, Surguchov A, Benovic JL (2000): Synucleins are a novel class of substrates for G protein-coupled receptor kinases. *J Biol Chem* 275 (34):26515-26522.

Rümenapp U, Schmidt M, Wahn F, Tapp E, Grannass A, Jakobs KH (1997): Characteristics of protein kinase C and ADP ribosylation factor-stimulated Phospholipase D activities in human embryonic kidney cells. *Eur J Biochem* 248:407-414.

Sandmann J, Peralta EG, Wurtman RJ (1991): Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to Phospholipase D. *J Biol Chem* 266 (10):6031-6034.

Seefelder M (2000): *Opium. Eine Kulturgeschichte*. Nikol Verlagsges.

Senogles SE (2000): The D_{2s} dopamine receptor stimulates Phospholipase D activity: a novel signalling pathway for dopamine. *Mol Pharm* 58:455-462.

Shen Y, Xu L, Foster DA (2001): Role for Phospholipase D in receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol* 21 (2):595-602.

Skippen A, Jones DH, Morgan CP, Li M, Cockcroft S (2002): Mechanism of ADP ribosylation factor-stimulated phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synthesis in HL60 cells. *J Biol Chem* 277:5823-5831.

Slaaby R, Jensen T, Hansen HS, Frohman MA, Seedorf K (1998): PLD2 complexes with the EGF receptor and undergoes tyrosine phosphorylation at a single site upon agonist stimulation. *J Biol Chem* 273 (50): 33722-33727.

Spencer RJ, Jin W, Thayer SA, Chakrabarti S, Law PY, Loh HH (1997): Mobilization of Ca²⁺ from intracellular stores in transfected Neuro2a cells by activation of multiple opioid receptor subtypes. *Biochem Pharmacol* 54:809-818.

Sung TC, Roper RL, Zhang Y, Rudge SA, Temel R, Hammond SM, Morris AJ, Moss B, Engebrecht J, Frohman MA (1997): Mutagenesis of phospholipase D defines a superfamily including a trans-Golgi viral protein required for poxvirus pathogenicity. *EMBO J.*, 16:4519-4530.

Tallent M, Dichter MA, Bell GI, Reisine T (1994): The cloned kappa opioid receptor couples to an N-type calcium current in undifferentiated PC-12 cells. *Neuroscience* 63:1033-1040.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:4350-4354.

Tsao PI, von Zastrow M (2000): Type-specific sorting of G protein-coupled receptors after endocytosis. *J Biol Chem* 275:11130-11140.

Voß M, Weernink PAO, Hauptenthal S, Möller U, Cool RH, Bauer B, Camonis JH, Jakobs KH, Schmidt M (1999): Phospholipase D stimulation by receptor tyrosine kinases mediated by protein kinase C and a ras/ral signaling cascade. *J Biol Chem* 274:34691-34698.

Whistler JL, Chuang HH, Chu P, Jan LY, von Zastrow M (1999): Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* 23:737-746.

Xie Z, Ho WT, Exton JH (2002): Functional implications of post-translational modifications of Phospholipases D1 and D2. *Biochem Biophys Acta* 1580:9-21.

Xu Y, Seet LF, Hanson B, Hong W (2001): The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem J* 360:513-530.

Zimprich A, Simon T, Höllt V (1995(a)): Cloning and expression of an isoform of the rat mu opioid receptor (rMOR1B) which differs in agonist induced desensitization from rMOR1. *FEBS Letters* 359:142-146.

Zhang L, Yu Y, Mackin S, Weight FF, Uhl GR, Wang JB (1996): Differential mu opiate receptor phosphorylation and desensitization induced by agonists and phorbol esters. *J Biol Chem* 271:11449-11454.

Zimprich A, Simon T, Höllt V (1995(b)): Transfected rat mu opioid receptors (rMOR1 and rMOR1B) stimulate phospholipase C and Ca²⁺ mobilization. *Neuroreport* 29:54-56.

VII. Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1:	Darstellung eines G-protein-gekoppelten Rezeptors.....	Seite 2
Abb. 2:	Hydrolyse und Transphosphatidylierung von Phosphatidylcholin durch die Phospholipase D.....	Seite 6
Abb. 3:	Struktur der PLD2 und Lage des identifizierten <i>yeast two hybrid</i> -Klons.....	Seite 8
Abb. 4:	μ -Opioidrezeptor-vermittelte Aktivierung der PLD2.....	Seite 33
Abb. 5:	Hemmung der DAMGO-vermittelten Aktivierung der PLD2.....	Seite 34
Abb. 6:	μ -Opioidrezeptor-vermittelte Aktivierung der PLD1b.....	Seite 35
Abb. 7:	Interaktion zwischen HA-MOR1, PLD2 und ARF.....	Seite 37
Abb. 8:	Interaktion zwischen MOR1 und PLD2 beziehungsweise nPLD2.....	Seite 39
Abb. 9:	Subzelluläre Verteilung von MOR1 und PLD2 in HEK293-Zellen.....	Seite 41
Abb. 10:	Einfluß der PLD2 auf die agonisten-induzierte Endozytose des MOR1.....	Seite 43
Abb. 11:	Quantitative Analyse der agonisten-induzierte Endozytose des MOR1.....	Seite 44
Abb. 12:	Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch 1-Butanol.....	Seite 46
Abb. 13:	Quantifizierung der Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch 1-Butanol.....	Seite 47

Abb. 14:	Inhibition der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante.....	Seite 48
Abb. 15:	Reduktion der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 durch die Überexpression einer negativen PLD2-Mutante.....	Seite 50
Abb. 16:	Vergleich der De- und Resensitisierung unter/nach DAMGO in MOR1- und MOR1-PLD2-exprimierenden HEK293-Zellen.....	Seite 51
Abb. 17:	Verstärkung der agonisten-induzierten Desensitisierung des MOR1 durch 1-Butanol.....	Seite 53
Abb. 18:	Verstärkung der agonisten-induzierten Desensitisierung des MOR1 durch 0,1% Ethanol.....	Seite 54
Abb. 19:	Einfluß der negativen PLD2-Mutante auf die agonisten-induzierte De- und Resensitisierung des MOR1.....	Seite 56
Abb. 20:	Modell der agonisten-induzierten Endozytose des MOR1 und die mögliche Rolle der PLD2 bei der Endozytose.....	Seite 59
Abb. 21:	Vergleich der liganden-abhängigen Rezeptor-Desensitisierung zwischen Morphin und DAMGO.....	Seite 67
Tab. 1:	Vergleich der PLD-Isoformen.....	Seite 7
Tab. 2:	Funktionelle Eigenschaften der Rezeptoren in stabil exprimierenden HEK293-Zellen, die den MOR1 exprimieren und den MOR1 und die PLD2 koexprimieren.....	Seite 32

VIII. Abkürzungen und Dimensionen

Abb.	Abbildung
ABTS	Diammonium-2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazolin-sulfonat)
AMP, ADP, ATP	Adenosin-5'-mono-, -di-, triphosphat
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
AS	Aminosäuren
BBS	BES-gepufferte Lösung
BES	N,N-bis(2-Hydroxyethyl)-2-aminosulfonsäure
BFA	Brefeldin A
B _{max}	Konzentration an den Bindungsstellen
°C	Grad Celsius
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	kombinatorische Desoxyribonukleinsäure (<i>copy DNA</i>)
cm	Zentimeter
C-Terminus	Carboxyterminus
Cy3	Cyanin 3.18
Cy5	Cyanin 5.18
DAMGO	[D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , Gly-ol ⁵]-Enkephalin
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle-Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
dpm	Zerfälle pro Minute (<i>desintegration per minute</i>)
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	und Kollegen
fmol	Femtomol
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm
g	Gravitationskonstante, 9,81 m/s ²
G418	Geneticinsulfat

GABA	gamma-Aminobuttersäure
GDP, GTP	Guanosin-5'-di-, -triphosphat
G-Protein	Guanosinnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein-Rezeptor-Kinase
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEK293-Zellen	humane embryonale Nieren-293 Zellen
HEPES	2-[4-(Hydroxyethyl-1-piperazinyl)]-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl- β -D-1-thiogalactopyranosid
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertoni
μ Ci	Mikro...
μ m	Mikrometer
μ M	Mikromolar
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOR1	μ -Opioidrezeptor 1
mRNA	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure, Boten-Ribonukleinsäure
N	Normal
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
N-Terminus	Aminoterminus
OD _{x nm}	Optische Dichte bei $\lambda = x$ nm
PAC-Rezeptor	Pituitäre-Adenylatzyklase-aktivierende-Polypeptid-Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMA	Phorbol-12-myristate-13-acetate
POD	Meerrettich-Peroxidase
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S.	Seite
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus Aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TPBS	Tris- und Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
VPAC-Rezeptor	Vasoaktive-Intestinale-Polypeptid-Rezeptor
x-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranosid
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

IX. Anhang**1. Lebenslauf**

Name: Lars-Ove Brandenburg

Geschlecht: männlich

Geburtstag und –ort: 11.03.1975, Greifswald

Staatsangehörigkeit: deutsch

Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981-1991 Schulbildung in Greifswald

1991-1994 Abitur am Alexander-von-Humboldt-Gymnasium in Greifswald

Grundwehrdienst:

1994-1995 Wehrdienst bei der Luftwaffe
(22./Luftwaffenausbildungsregiment 1 in Holzdorf)

beruflicher Werdegang:

1995-2000 Hochschulstudium an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität
Greifswald, Fachrichtung Biopharmakologie

1999-2000 Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg, Abschluß des
Studium mit der Gesamtnote 1,6

seit März 2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie
und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Magdeburg, den 12.05.2004

.....

Lars-Ove Brandenburg

2. Wissenschaftliche Vorleistungen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Koch T, Brandenburg LO, Schulz S, Liang Y, Klein J, Höllt V (2003): ARF-dependent Phospholipase D2 activation is required for agonist-induced mu-opioid receptor endocytosis. *J Biol Chem* 278:9979-9985.

Koch T¹, Brandenburg LO¹, Liang Y, Schulz S, Beyer A, Schröder H, Höllt V: Phospholipase D2 modulates agonist-induced mu-opioid receptor desensitization and resensitization. *J Neuro Chem*, zur Publikation angenommen, ¹ haben gleichermaßen zur Arbeit beigetragen.

Posterpräsentationen und Vorträge:

DIE ROLLE DER PLD2 IN DER AGONISTEN-VERMITTELTEN ENDOZYTULOSE DES μ -OPIOIDREZEPTORS. Brandenburg LO, Koch T, Schulz S, Liang Y, Kahl E, Großheilmann S, Klein J, Höllt V; *Naunym-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Supplement Number 1 to Volume 365, März 2002

DAMGO-STIMULATED MU-OPIOID RECEPTOR ACTIVATES PHOSPHOLIPASE D2 IN AN ARF-DEPENDENT MANNER. Schulz S, Brandenburg LO, Koch T, Liang Y, and Höllt V; 33. Meeting of the International Narcotics Research Conference, Programme and Abstracts, Asilomar, 2002

MU-OPIOID RECEPTOR-MEDIATED ACTIVATION OF PHOSPHOLIPASE D2 ENHANCES RECEPTOR ENDOCYTOSIS IN HEK293 CELLS. Koch T, Brandenburg LO, Schulz S, Liang Y, and Höllt V; 33. Meeting of the International Narcotics Research Conference, Programme and Abstracts, Asilomar, 2002

PHOSPHOLIPASE D2 AFFECTS INTERNALIZATION AND DESENSITIZATION OF THE MU-OPIOID RECEPTOR. Brandenburg LO, Koch T, Schulz S, Höllt V; *Naunym-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Supplement Number 1 to Volume 367, März 2003

3. Danksagung

Für die Möglichkeit der Bearbeitung dieses Promotionsthemas am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg und die großzügige Unterstützung bei demselbigen möchte ich Herrn Prof. Dr. Volker Höllt recht herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Thomas Koch für die praktische und theoretische Betreuung dieser Arbeit. Erst seine rastlose Unterstützung und die konstruktive Kritik beim Erstellen der Arbeit haben diese Studie ermöglicht. Das freundschaftliche Klima im Labor oder privat hatte daran einen nicht unwesentlichen Anteil, wofür ich ihm herzlich danken möchte.

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

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

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Großmutter für ihre unermüdliche Unterstützung und Motivation während meiner Promotionszeit. Meinen Eltern sei diese Arbeit gewidmet!