



**Differenzierte β -Arrestin2 Rekrutierung am μ -Opioid Rezeptor durch klinisch
eingesetzte Opiode**

**Differential Opioid-induced β -Arrestin2 Recruitment at the μ -Opioid Receptor
Using Clinically Relevant Opioids**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse: Biomedizin

vorgelegt von
Stefanie Mayer
aus
Salzgitter

Würzburg, 2021



Eingereicht am: _____

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. med. Ralf C. Bargou

1. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Carsten Hoffmann

2. Betreuer: Prof. Dr. med. Heike Rittner

3. Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Antje Gohla

Tag des Promotionskolloquiums: _____

Doktorurkunde ausgehändigt am: _____

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einführung.....	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ihre Signaltransduktion.....	1
1.1.1 Rezeptoraktivierung	2
1.1.2 G-Proteine	3
1.1.2 Arrestine und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen.....	4
1.2 Opioidrezeptoren und ihre Liganden.....	8
1.2.1 μ -Opioid Rezeptor	8
1.2.2 Liganden	10
1.2.3 Molekulare Mechanismen von unerwünschten Wirkungen	12
1.3 Lumineszenz und ihre Anwendung in Lebenswissenschaften.....	14
1.3.1 Fluoreszierende Proteine	15
1.3.2 Biolumineszenz	16
1.4 Zielsetzung.....	18
2 Material und Methoden.....	20
2.1 Material	20
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	20
2.1.2 Liganden	21
2.1.3 Plasmide	22
2.1.4 Zelllinien	22
2.2 Methoden.....	23
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.1.1 Transformation kompetenter <i>E. coli</i>	23
2.2.1.2 Plasmid-Präparation	23

2.2.2 Zellbiologische Methoden	24
2.2.2.1 HEK293 Zellen für Konfokalmikroskopie	24
2.2.2.1.1 Zellkultur und Aufbewahrung von Zellen	24
2.2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen auf Deckgläser	25
2.2.2.1.3 Transiente Transfektion	25
2.2.2.2 HEK293 ELucC-OPRM1/ARRB2-ELucN Zellen für Biolumineszenz Experimente	26
2.2.2.2.1 Beschreibung der Zelllinie und Zellkultur	26
2.2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer und Ausplattieren der Zellen in Mikrotiterplatten	27
2.2.3 Biophysikalische Methoden	28
2.2.3.1 Lebendzell-Konfokalmikroskopie	28
2.2.3.2 Biolumineszenz-Messung mittels Luciferase-Komplementierung ..	30
3 Ergebnisse	32
3.1 Konfokalmikroskopie	32
3.1.1 Bestimmung der Transfektionsbedingungen und Mikroskopieeinstellungen	32
3.1.2 Maximale β -Arrestin2-Translokation und Rezeptorinternalisierung	34
3.1.3 Hemmung der Rezeptorendozytose	40
3.2 Biolumineszenz-Messung	44
3.2.1 Assay-Etablierung	44
3.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven	45
3.3 Ergebnisvergleich Konfokal- und Luciferase-Assay	47
4 Diskussion	49
4.1 Pharmakologische Parameter im Vergleich	50

4.2 Rezeptorinternalisierung	54
4.3 Limitationen und Ausblick.....	59
5 Zusammenfassung	63
5.1 Deutsch	63
5.2 English.....	64
Abkürzungsverzeichnis.....	66
Referenzen.....	68
Eidesstattliche Erklärung.....	84
Affidavit.....	84
Lebenslauf.....	85

1 EINFÜHRUNG

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ihre Signaltransduktion

Membranrezeptoren sind ein wichtiger Bestandteil der zellulären Kommunikation und sorgen bei der Signaltransduktion für die Übertragung von extra- in intrazelluläre Signale. Neben Liganden-gesteuerten Ionenkanälen und Enzym-assoziierten Rezeptoren bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) mit über 800 Rezeptoren im menschlichen Genom die größte Rezeptorfamilie.¹ Sie reagieren auf vielfältige extrazelluläre Stimuli einschließlich Hormone, Neurotransmitter, Chemokine, Peptide, Lipide oder sensorische Stimuli und sind somit an zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Es ist daher nicht verwunderlich, dass sie die häufigste Zielstruktur von Arzneimitteln sind. Ungefähr 35 % aller zugelassenen Medikamente wirken direkt oder indirekt an GPCRs.² Die Bedeutung dieser Rezeptorklasse wird nicht zuletzt durch die Verleihung des Nobel Preises für Chemie an Robert J. Lefkowitz und Brian K. Kobilka im Jahr 2012 für ihre Untersuchungen an GPCRs unterstrichen.

GPCRs zeichnen sich durch sieben helikale Transmembrandomänen (TM) mit einem extrazellulären Amino (N)-Terminus und einem intrazellulären Carboxy (C)-Terminus aus. Die Transmembrandomänen sind über je drei extra- und intrazelluläre Schleifen (ICL und ECL, engl. „intra- bzw. extracellular loop“) miteinander verbunden. Basierend auf phylogenetischen Analysen wird die Superfamilie der GPCRs nach dem System der NC-IUPHAR (International Union of Pharmacology, Committee on Receptor Nomenclature and Classification) in verschiedene Klassen eingeteilt:³⁻⁵

Klasse A: Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren,

Klasse B: Sekretin-ähnliche Rezeptoren,

Klasse C: metabotrope Glutamat Rezeptoren und

Klasse F: Frizzled Rezeptoren.

Klasse E und Klasse D Rezeptoren kommen nicht bei Vertebraten vor. Die größte und am besten untersuchte Rezeptorfamilie ist die der Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren, zu der neben den adrenergen Rezeptoren, Serotonin- und Dopaminrezeptoren auch die Opioidrezeptoren gehören, welche Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind. Die Kristallstruktur des μ -Opioidrezeptors ist exemplarisch in **Abb. 1** gezeigt.

Prinzipiell führt die Bindung eines Liganden an der extrazellulären Seite des GPCRs zur Konformationsänderung des Rezeptors, welche die Kopplung von intrazellulären Effektorproteinen wie heterotrimeren Guanosintriphosphat (GTP)-bindenden-Proteinen (G-Proteinen) oder Arrestinen an den Rezeptor ermöglicht. Dies führt zur Aktivierung von Signalkaskaden, die schließlich in einer physiologischen Antwort münden. Viele GPCRs haben eine basale Aktivität, die durch Liganden unterschiedlicher Wirkstärke moduliert werden kann. Dabei führen sogenannte Vollagonisten zur maximalen Signalantwort, während Partialagonisten und inverse Agonisten entsprechend eine submaximale Antwort bzw. Reduktion der basalen Aktivität induzieren. Antagonisten verändern die basale Rezeptoraktivität nicht, verhindern aber die Bindung und damit den Effekt von Agonisten.

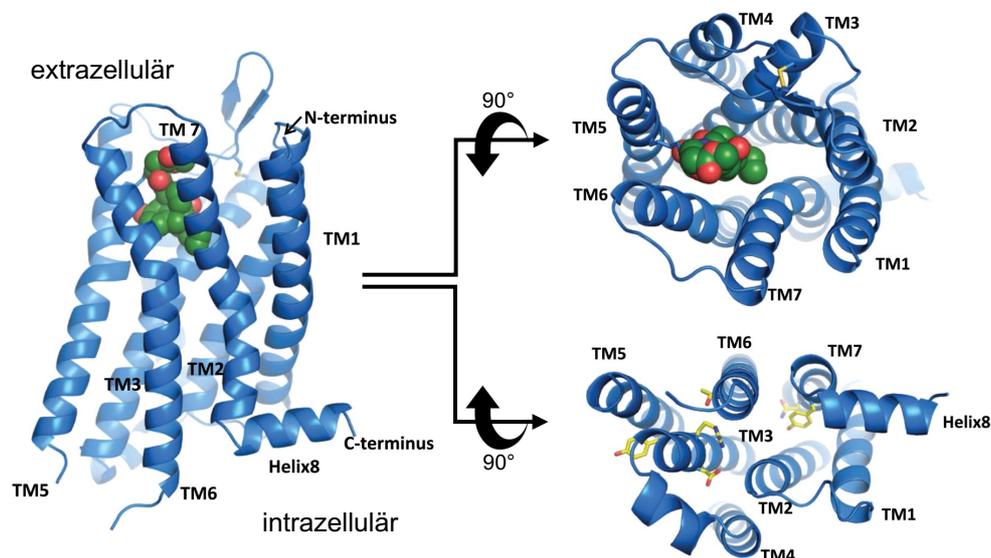


Abb. 1: Kristallstruktur des μ -Opioidrezeptors gebunden an einen Antagonisten in 2,8 Å Auflösung. In der Ansicht von Membran-Ebene (links), extrazellulär (rechts oben) und intrazellulär (rechts unten) ist die typische Struktur eines GPCRs mit sieben TMD verbunden über ICL1-3 und ECL1-3 erkennbar. Entnommen und angepasst aus Manglik, A. et al., 2012⁶ mit Genehmigung von Springer Nature.

1.1.1 Rezeptoraktivierung

Angefangen am Rhodopsin- und β -adrenergen Rezeptor konnte im letzten Jahrzehnt durch Auflösung der Kristallstruktur vielzähliger GPCRs, sowohl in inaktiver als auch aktiver Form, eine detaillierte Einsicht in ihre molekulare Funktionsweisen gewonnen werden.^{7,8} Die Ligandenbindung der meisten Klasse A Rezeptoren erfolgt an topologisch äquivalenten Aminosäureresten der TM3, 6 und 7, die die Ligandenbindungstasche des Rezeptors bilden.⁵ Variationen in diesen Abschnitten

werden für die Ligandenspezifität verantwortlich gemacht. Im Rahmen der Liganden-induzierten Rezeptoraktivierung kommt es zunächst zu kleineren Konformationsänderungen im Kern der Transmembrandomänen, gefolgt von größeren strukturellen Neuordnungen auf der zytoplasmatischen Seite mit einer nach außen gerichteten Bewegung der TM6 in Kombination mit Umlagerung anderer Helices. Dies führt zur Freilegung einer intrazellulären Tasche, die nun mit zytoplasmatischen Effektorproteinen interagieren kann.⁹

Entgegen des klassischen pharmakologischen Modells der „Zwei-Rezeptorzustände“, bei dem sich der Rezeptor entweder in einem an- oder abgeschalteten Zustand befindet, gehen aktuellere Erkenntnisse von einem Konzept multipler Rezeptorkonformationen aus.^{10,11} Demnach können verschiedene Liganden unterschiedliche Rezeptorkonformationen induzieren, welche zu differenzierten Aktivierungsmustern nachgeschalteter Signalwege führen. Das bedeutet, dass Liganden selektiv bestimmte Signalwege verstärkt auf Kosten anderer Signalwege aktivieren können, also beispielsweise für den einen Signalweg als Partialagonist oder Antagonist und für den anderen Signalweg als Vollagonist agieren können. Dieses Prinzip wird als funktionelle Selektivität oder „biased agonism“ bezeichnet.

1.1.2 G-Proteine

Die klassische Signaltransduktion durch den Liganden-aktivierten Rezeptor erfolgt durch Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen. Diese bestehen aus einer $G\alpha$ -, $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit, wobei die $G\alpha$ -Untereinheit eine intrinsische GTPase besitzt und die $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheit einen dimeren Komplex bilden. Durch Bindung von Guanosindiphosphat (GDP) assoziiert $G\alpha$ mit dem $G\beta\gamma$ -Dimer zur inaktiven Form. Die Wechselwirkung mit dem Rezeptor ermöglicht den Austausch von GDP gegen GTP und somit die Aktivierung des G-Proteins.¹² Die nachfolgende Konformationsänderung der $G\alpha$ -Untereinheit führt zur Dissoziation in $G\alpha$ und $G\beta\gamma$, die wiederum ihre intrazellulären Effektoren aktivieren. Das Signal wird beendet, indem GTP durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit zu GDP hydrolysiert wird und somit der Ausgangszustand wiederhergestellt ist.

Basierend auf der Sequenzhomologie der $G\alpha$ -Untereinheit wurden vier G-Protein-Familien klassifiziert.¹³ Mitglieder der G_s -Familie stimulieren Adenylylcyclasen, was zur Entstehung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) führt, welches als sekundärer Botenstoff („second messenger“) unter anderem zur Aktivierung der

Proteinkinase A führt. $G_{i/o}$ -Proteine hingegen inhibieren Adenylylcyclasen. Die $G_{q/11}$ -Familie aktiviert vorrangig Phospholipase $C\beta$, während die $G_{12/13}$ -Proteine an der Aktivierung von GTPasen der Rho-Familie beteiligt sind.¹⁴ Daneben fungiert das $G\beta\gamma$ -Dimer selbst neben seiner Rolle als Modulator der $G\alpha$ -Untereinheit als Signalmolekül und kann dabei G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) zur Membran rekrutieren, Ionenkanäle modulieren und ebenfalls mit Adenylylcyclasen interagieren.¹⁵ Auch von den $G\beta$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten wurden mehrere Subtypen identifiziert, was zur Diversität von G-Proteinen in der Zelle beiträgt.¹⁶

1.1.2 Arrestine und G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen

Neben G-Proteinen interagieren auch Arrestine direkt mit GPCRs. Mit ihrer streng regulierten Rezeptorbindung blockieren sie bestimmte Signalwege, während sie gleichzeitig neue vermitteln. Zudem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Rezeptorinternalisierung, also der Verlagerung des Rezeptors von der Zelloberfläche in das Zellinnere.

Arrestine sind ca. 45 kDa schwere Proteine,^{17,18} von denen im Gegensatz zur Vielfalt der G-Proteinen nur vier verschiedene Isoformen beschrieben sind. Arrestin1 und 4 sind die sog. visuellen Arrestine, die vorrangig in der Retina exprimiert werden und an der Regulation des Lichtrezeptors Rhodopsin und der Farb-Opsine in Zapfen bzw. Stäbchen beteiligt sind. Arrestin2 und 3 hingegen sind nicht-visuelle Arrestine und werden ubiquitär exprimiert. Ihre gängigere Bezeichnung ist β -Arrestin1 (Arrestin2) bzw. β -Arrestin2 (Arrestin3) und beruht auf ihrer initialen Beschreibung als Interaktionspartner des β -adrenergen Rezeptors.¹⁸ β -Arrestin1 und 2 stimmen in ca. 80% ihrer Aminosäuresequenz überein¹⁹, was zur Annahme einer überwiegenden funktionellen Redundanz beider Isoformen führte. In den letzten Jahren verdichtete sich jedoch die Evidenz, dass die beiden nicht-visuellen Arrestine eigenständige Rollen in der GPCR-Regulation und -Signaltransduktion spielen und dabei nicht nur eine Rezeptor- sondern auch Ligandenspezifität zeigen.²⁰⁻²⁵

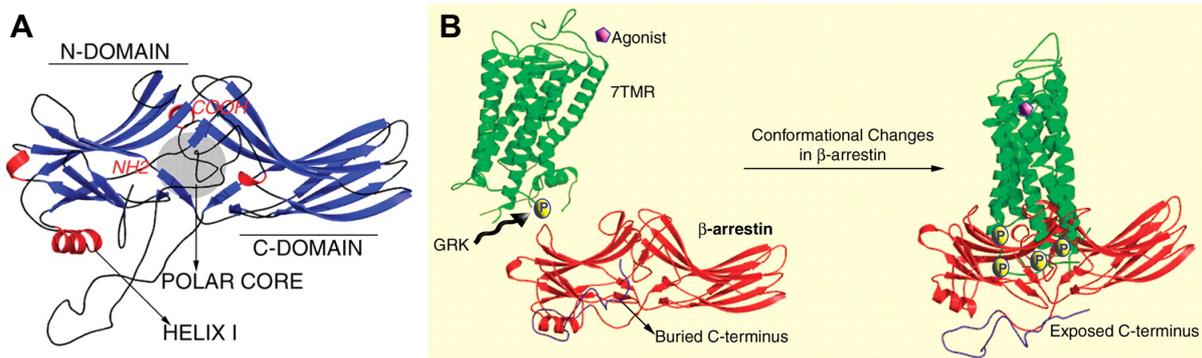


Abb. 2: β -Arrestin2: Strukturmodell und Konformationsänderung. **A** Bändermodell mit C- und N-Domäne bestehend aus β -Faltblättern (blau), „polar core“ (hellgrau) und α -Helix (rot). Verbindende Schleifen und verlängertes C-terminales Ende sind schwarz dargestellt. **B** GPCR (grün) induzierte Konformationsänderung in β -Arrestin. Links: Inaktive β -Arrestin Konformation mit „vergrabenem“ verlängerten C-terminalen Ende (violett). Rechts: Ligandenstimulation führt zu GRK-vermittelter Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten am C-Terminus des GPCR. Interaktion von β -Arrestin mit den Phosphatresten führt zu Zerstörung des „polar core“ und Konformationsänderungen im β -Arrestinmolekül, was zur Freilegung des verlängerten C-terminalen Endes führt, das nun mit Bindungspartnern interagieren kann. Entnommen aus Lefkowitz, R. J. et Shenoy, S. K., 2005²⁶ mit Genehmigung der American Association for the Advancement of Science (ASSS).

Die Kristallstruktur der Arrestin-Isoformen ist vergleichbar und besteht aus zwei konkaven Domänen aus antiparallelen β -Faltblättern, der C- und N-Domäne.²⁷ Diese sind über ein Netzwerk aus geladenen Aminosäureresten, hydrophoben Interaktionen und Salzbrücken, das als „hinge region“ oder „polar core“ bezeichnet wird, verbunden.²⁸ Zusätzlich existiert eine kurze N-terminale α -Helix. Die Rezeptorbindung erfolgt an der konkaven Seite der Arrestine, während an der konvexen Seite die Interaktion mit Effektorproteinen erfolgt.²⁹ Der „polar core“ wird durch ein verlängertes C-terminales Ende stabilisiert und fixiert Arrestin in seiner inaktiven Konformation.²⁷ Die Aktivierung von Arrestin durch Rezeptorbindung führt zu Konformationsänderungen des Arrestinmoleküls mit relativer Rotation der beiden Domänen zueinander, Zerstörung des „polar core“ sowie Freilegung des verlängerten C-terminalen Endes und erlaubt so die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern.³⁰ Die Rezeptorbindung von Arrestin und damit die Arrestinaktivierung setzt allerdings zwei Bedingungen voraus: die Agonisten-induzierte Rezeptoraktivierung (vgl. 1.1.1) und die Rezeptorphosphorylierung.^{23,31} β -Arrestine besitzen dafür eine „Phosphorylierungs-Erkennungsdomäne“ im Zentrum des Proteins²⁸ und eine bislang weniger gut beschriebene „Sensorregion“ für die Erkennung aktiver Rezeptorkonformationen.^{32,33} Eine hochaffine Bindung an den Rezeptor kann erst erfolgen, wenn beide „Sensorregionen“ den Rezeptor erkennen.³³

Die Rezeptorphosphorylierung von Serin- und Threonin-reichen Regionen vor allem am C-Terminus und der ICL3 erfolgt vorrangig durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs).³⁴ Auch weitere Rezeptorkinasen wie Proteinkinase A und C können eine Rezeptorphosphorylierung induzieren, spielen für die vorliegende Arbeit jedoch nur eine untergeordnete Rolle und werden daher hier nicht weiter beschrieben. Von den sieben bekannten GRK Isoformen, werden GRK1 und 7 in der Retina exprimiert und sie regulieren gemeinsam mit Arrestin1 und 4 das Sehvermögen.^{35,36} GRK4 wird überwiegend im Gehirn, in den Nieren und Hoden exprimiert,³⁷⁻⁴⁰ wohingegen GRK2, 3, 5 und 6 ubiquitär vorkommen. Wie auch die β -Arrestine zeigen die GRKs nicht nur eine unterschiedliche zelluläre Lokalisation sondern auch eine Ligandenspezifität., d.h. durch Bindung unterschiedlicher Liganden am gleichen Rezeptor kann die Signaltransduktion über verschiedene GRKs erfolgen.^{41,42} GPCRs sind allerdings erst in ihrer Agonisten-induzierten aktiven Konformation gute Substrate für GRKs, denn durch die Aktivierung kann das $G\beta\gamma$ -Dimer als Ankerprotein für die GRKs fungieren.^{43,44} Dabei führen verschiedene GRKs zu differenzierten Phosphorylierungsmustern der Serin- und Threonin-Reste, was zur sog. „phosphorylation bar code“-Hypothese führte.⁴⁵⁻⁴⁷ Demnach werden diese „bar codes“ von β -Arrestinen differenziert „ausgelesen“ und führen so zu unterschiedlichen β -Arrestinkonformationen und Rezeptor/ β -Arrestin-Affinitäten, die wiederum in einer spezifischen Signalantwort münden. Insgesamt entsteht so eine enorme Heterogenität und Komplexität der Signaltransduktion.

Zusammenfassend induziert die Ligandenbindung an den GPCR eine spezifische aktive Rezeptorkonformation mit nachfolgender Aktivierung des G-Proteins. Der aktivierte Rezeptor rekrutiert anschließend eine oder mehrere GRKs, die zur Rezeptorphosphorylierung führen. β -Arrestine binden daraufhin an den GRK-phosphorylierten Rezeptor. Die β -Arrestinbindung hat im Wesentlichen drei funktionelle Effekte: erstens die Beendigung des G-Protein-Signals, zweitens die Aktivierung eigener Signalkaskaden und drittens die Induktion der Rezeptorinternalisierung.

Durch β -Arrestinbindung an den GPCR wird die G-Protein-Bindung sterisch blockiert.⁴⁸ Die Entkopplung von Rezeptor und G-Protein wird Desensibilisierung genannt und ist ein Mechanismus, der innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Agonistenstimulation auftritt. Zusätzlich fungieren β -Arrestine als Adaptorproteine für Phosphodiesterasen (PDE) und Diacylglycerolkinasen (DGK), die von G-Protein

generierte „second messenger“ degradieren.⁴⁹ Dadurch kann die Effizienz der Desensibilisierung weiter gesteigert werden.

Daneben können β -Arrestine auch eigene, G-Protein-unabhängige Signalwege aktivieren. Auch hier erlaubt die Funktion als Adaptorprotein die Interaktion mit multiplen Signalmolekülen. Zu den wichtigsten Klassen gehören Nicht-Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie das Protoonkogen c-Src, Komponenten der Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Kaskade und die Kinasen Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und Akt, was die Phosphorylierung und damit Modulierung vielzähliger intrazellulärer Zielstrukturen mit unterschiedlichsten Funktionen ermöglicht.^{23,34} Zunehmend werden weitere, auch Kinase-unabhängige Interaktionspartner beschrieben.^{23,26,48,49}

Zuletzt dienen β -Arrestine auch als Adaptorproteine für Elemente der Endozytosemaschinerie wie Clathrin und Adaptorprotein-2 (AP-2).^{50,51} Im Rahmen der Rezeptorinternalisierung, ein Begriff der synonym mit Rezeptorendozytose verwendet werden kann, wird der Rezeptor von der Zelloberfläche über die Bildung sogenannter Clathrin-beschichteter Vesikel in intrazelluläre Membrankompartimente transportiert. Die Abschnürung dieser Vesikel von der Zellmembran erfolgt über bestimmte GTPasen, sogenannte Dynamine.^{52,53} Die internalisierten Rezeptoren können nun entweder im Lysosom abgebaut werden („Degradation“) oder als intakte Rezeptoren wieder an die Zellmembran zurück transportiert werden („Recycling“), um dort Liganden erneut zur Verfügung zu stehen.^{26,49} Als „Downregulation“ bezeichnet man eine verminderte Anzahl funktionsfähiger Rezeptoren an der Zelloberfläche, die entweder auf eine vermehrte Degradation und/oder auf eine verminderte Rezeptorbiosynthese zurückzuführen ist.⁵⁴ Diese Abnahme der Rezeptordichte führt schließlich zu vermindertem zellulären Ansprechen gegenüber Liganden und ist erst nach Stunden bis Tagen detektierbar. Paradoxe Weise können β -Arrestine die Signalantwort durch G-Proteine auch verlängern, anstatt sie nur zu beenden. Gemessen am cAMP-Spiegel konnte u.a. für den Thyroid-stimulierenden Hormonrezeptor⁵⁵, Parathormonrezeptor⁵⁶ und den Sphingosin1-Phosphatrezeptor⁵⁷ ein G-Protein-Signal nach Rezeptorinternalisierung detektiert werden. Diese dritte „Signalwelle“ ausgehend von internalisierten Rezeptoren gefolgt von den Signalwellen durch initiale G-Protein- und β -Arrestin-Aktivierung steht im Gegensatz zu früheren Annahmen, dass internalisierte Rezeptoren funktionell inaktiv sind und ist Gegenstand aktueller Diskussion.^{23,49,58} Somit koordinieren β -Arrestine die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion in zeitlich und räumlich regulierter Weise.

1.2 Opioidrezeptoren und ihre Liganden

Opioide werden seit der Antike zur Schmerzlinderung und aufgrund ihres psychotropen Effekts verwendet und gehören bis heute zu den potentesten Analgetika mit weitem klinischen Einsatz.⁵⁹ Ihre Anwendung ist begrenzt durch unerwünschte Wirkungen wie Atemdepression, Sedierung, Übelkeit und Obstipation, aber insbesondere bei chronischem Einsatz durch Toleranzentwicklung und Abhängigkeit.⁶⁰ Toleranz gegenüber des analgetischen Effekts bedeutet ein Wirksamkeitsverlust der Analgesie bei gleichbleibender Opioid-Dosis mit der Folge einer notwendigen Dosissteigerung und damit auch möglicher Zunahme anderer Nebenwirkungen. Schon früh entstanden daher Bestrebungen Opioide zu entwickeln, die frei von diesen unerwünschten Wirkungen sind. Es wurden zahlreiche Studien auf molekularer, zellulärer und Systemebene durchgeführt, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu verstehen. Die Identifikation reduzierter Opioid-Empfindlichkeit in ex vivo Präparaten von toleranten Tieren und Untersuchungen, die eine reduzierte Opioid-Sensitivität in Zellkultursystemen nachweisen konnten, führten zu Überlegungen, dass es sich bei Opioid Toleranz um ein zellbiologisches Problem handelt.⁶¹

1.2.1 μ -Opioid Rezeptor

Opioidrezeptoren gehören zur Klasse A der GPCRs.⁶² Die NC-IUPHAR unterscheidet vier verschiedene Opioidrezeptortypen, die jeweils von einem eigenen Gen, allerdings mit ausgeprägter Sequenzhomologie, kodiert werden:⁶³

- μ -Opioidrezeptoren,
- δ -Opioidrezeptoren,
- κ -Opioidrezeptoren und
- Nociceptin-Rezeptoren.

Opioidrezeptoren binden nach ihrer Aktivierung inhibitorische $G_{i/o}$ -Proteine. Dies führt auf zellulärer Ebene zur Reduktion des intrazellulären cAMP-Spiegels durch Hemmung der Adenylylcyclase sowie Inhibition von spannungsgesteuerten Calciumkanälen und Stimulation von hyperpolarisierende Kaliumkanälen durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit.⁶⁴ Auf systemischer Ebene hat das die Herabsetzung neuronaler Erregbarkeit mit Unterdrückung der Weiterleitung nozizeptiver Impulse im Rückenmark zur Folge. Zudem kommt es zur Aktivierung des absteigenden,

schmerzhemmenden Systems sowie Modulation der Schmerzwahrnehmung im limbischen System.⁶⁵ Opioid-Analgetika üben nahezu all ihre klinisch relevanten Effekte über Stimulation des μ -Opioidrezeptors (OPRM) aus,⁶⁶ weshalb sich der Fokus dieser Arbeit auf diesen Subtyp konzentriert.

Obwohl für den OPRM nur ein kodierendes Gen bekannt ist, wurden Unterformen auf mRNA- und Proteinebene entdeckt, die auf alternatives Spleißen der prä-mRNA zurückgeführt werden. Bisher wurden über zehn Spleißvarianten des menschlichen OPRM identifiziert.⁶⁷ Ihre physiologische Funktion bleibt bislang jedoch weitestgehend ungeklärt, da manche von ihnen keine zelluläre Aktivität zeigen, wohingegen andere Varianten Unterschiede in ihrer Signaltransduktion und der Rezeptorinternalisierung zeigten.⁶⁸ Letzteres ist insbesondere für Varianten beschrieben, die die Struktur des C-terminalen Rezeptorendes beeinflussen.

Die Auflösung von Kristallstrukturen des OPRM hat einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Rezeptorfunktion geleistet. 2012 konnte der OPRM erstmals als Antagonisten-gebundene Kristallstruktur, also in seiner vermeintlich inaktive Konformation, aufgelöst werden.⁶ Drei Jahre später gelang die Auflösung der Kristallstruktur mit einem Agonisten und einem G-Protein-imitierenden Nanoantikörper.⁶⁹ Die grundlegende Struktur ist vergleichbar mit der anderer GPCRs, allerdings zeigte sich die Bindungstasche, die bei den meisten GPCRs von Aminosäureresten bedeckt ist, deutlich stärker exponiert und damit leichter zugänglich für Liganden. Interessanterweise kristallisierte der OPRM als symmetrisches Dimer mit einer ausreichend großen Kontaktfläche, die das Dimer auch potentiell in vivo stabilisieren kann. Die Rolle der OPRM-Rezeptoroligomerisation für die Rezeptorregulation sowohl als Homodimer und auch als Heterodimer mit den anderen Opioidrezeptoren ist ein wachsendes Forschungsgebiet mit noch vielen ungeklärten Fragen.^{70,71}

OPRMs werden regional unterschiedlich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Hohe Konzentrationen finden sich u.a. im Thalamus, Putamen, Neocortex und der Amygdala sowie im Hinterhorn des Rückenmarks.^{72,73} Eine moderate Rezeptordichte konnte im periaquäduktalen Grau und im Nucleus raphe magnus, Gehirnregionen mit einer wichtigen Rollen im nozizeptiven System, nachgewiesen werden.⁷⁴ Zunehmendes Interesse als therapeutischer Ansatzpunkt gewinnen auch OPRMs am peripheren Nerven, in der Hoffnung durch ihre gezielte Aktivierung zentral-vermittelte Nebenwirkungen minimieren zu können.^{75,76} Auch im Plexus

mesentericus konnten OPRMs nachgewiesen werden und werden hier für gastrointestinale Wirkungen wie Obstipation verantwortlich gemacht.

1.2.2 Liganden

„Opioide“ ist ein Überbegriff für Stoffe mit morphinartigen Wirkungen, unabhängig von ihrem Ursprung und ihrer chemischen Struktur. Morphin ist das Hauptalkaloid des Opiums, dem getrockneten Saft des Schlafmohns *Papaver somniferum* und wurde erstmals 1805 von dem deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner isoliert.⁷⁷ Alle im Opium enthaltenen Substanzen mit morphinartiger Wirkung einschließlich Codein, Thebain, Papavarin und Noscapin werden als „Opiate“ bezeichnet viele moderne Opioid-Analgetika beruhen auf ihrer Struktur. Der OPRM wurde in den 1970er Jahre ursprünglich über seine hohe Affinität für Morphin definiert und pharmakologisch beschrieben.^{78,79} Erst kurz darauf wurden auch körpereigene Liganden des OPRMs, wie die Opioidpeptide β -Endorphin, Enkephaline und Dynorphine identifiziert, die ein endogenes System zur Modulation von Nozizeption bilden. Dem gegenübergestellt werden also exogene Opioide, die in pharmakotherapeutischer oder missbräuchlicher Absicht appliziert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Opioide, mit Schwerpunkt auf Opioid-Analgetika in häufiger klinischer Anwendung, verwendet:

Morphin hat mit 10 – 12 % den größten Opiatanteil von Opium und wird noch heute daraus gewonnen, da die chemische Synthese sehr aufwändig ist.⁶⁵ Morphin-6-glucuronid (M6G) ist sein wichtigster aktiver Metabolit und wird hauptsächlich für die analgetische Wirkung verantwortlich gemacht. Durch die Glucuronidierung ist die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke erschwert. Wird dies durch intracerebroventrikuläre Injektion umgangen, wirkt M6G bis zu 50-fach potenter als Morphin.⁶⁷ M6G wird nicht weiter metabolisiert und renal eliminiert.

Hydromorphon wird aus Morphin synthetisiert und hat eine ca. 7,5-fach höhere Wirkstärke gegenüber seiner Muttersubstanz. Eine Glucuronidierung an Position 6 ist aufgrund einer Ketogruppe nicht möglich, weshalb im Gegensatz zu Morphin keine Akkumulationsgefahr von M6G bei Niereninsuffizienz besteht. Oxycodon und Buprenorphin sind Derivate des Opiats Thebain. Dabei zeichnet sich Buprenorphin durch seine hohe Rezeptoraffinität zum OPRM aus, besitzt aber auch im geringeren Ausmaß Affinität für andere Opioidrezeptoren, und findet unter anderem aufgrund der langen Halbwertszeit Anwendung in der Substitutionstherapie.⁸⁰

Fentanyl, Remifentanyl, und Sufentanyl sind synthetische, hochpotente Opioide, von denen Sufentanyl mit einer 1000-fachen Wirkstärke gegenüber Morphin das potenteste Opioid in klinischer Anwendung ist.⁶⁵ Remifentanyl zeichnet sich durch eine ultrakurze Halbwertszeit aus und unterscheidet sich im Metabolismus von den anderen Substanzen dahingehend, als dass es von unspezifischen Esterasen abgebaut wird. Diese Eigenschaften werden sich im Rahmen der intraoperativen Narkosesteuerung zu Nutze gemacht. Fentanyl besitzt eine hohe Lipophilie und reichert sich in Fett- und Muskelgewebe an. Die Wirkstärke im Vergleich zu Morphin ist ca. 100-fach.

Methadon liegt als Racemat aus Dextro- und Levomethadon vor, von denen das hier verwendete Levomethadon für den analgetischen Effekt verantwortlich ist. Es ist ebenfalls stark lipophil mit einem langsamen Wirkeintritt und langer Halbwertszeit, weshalb es ebenfalls in der Substitutionstherapie eingesetzt wird.⁸¹ Piritramid ist ein Methadon-strukturverwandtes, ausschließlich parenteral applizierbares Opioid und wird vorrangig zur Behandlung postoperativer und posttraumatischer Schmerzen eingesetzt.⁸² Pethidin hat nur ca. ein Fünftel der Wirkstärke von Morphin. Der Metabolit Norpethidin zeigt Neurotoxizität und krampfauslösendes Potential.⁸³

Die bisher aufgezählten Opioid-Analgetika werden als stark wirksame Opioid-Analgetika klassifiziert. Im Gegensatz dazu gelten Tilidin und Tramadol als schwach wirksame Opioid-Analgetika. Tilidin ist ein Prodrug, das hepatisch zur aktiven Substanz Nortilidin metabolisiert wird.⁸⁴ Es ist in Deutschland in Kombination mit dem Antagonisten Naloxon zugelassen, um Missbrauch zu vermeiden.⁸⁵ Tramadol hat ein Zehntel der analgetischen Potenz von Morphin und liegt als Racemat vor. Das (+)-Enantiomer besitzt eine geringe Affinität zum OPRM, die analgetische Wirkung wird vor allem durch den aktiven Metaboliten O-Desmethyltramadol vermittelt.⁸⁶ Zudem hemmt das (-)-Enantiomer die Wiederaufnahme von Serotonin und Noradrenalin und greift somit über einen weiteren Mechanismus an der deszendierenden Schmerzhemmung auf spinaler Ebenen an. Die erst 2010 zugelassene Substanz Tapentadol ist eine Weiterentwicklung von Tramadol. Sie besitzt ebenfalls ein duales Wirkprinzip aus Opioidwirkung und Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmung, liegt allerdings nicht als Racemat vor.⁸⁷ Daher ist Tapentadol trotz seiner geringen Affinität zum OPRM nur zwei- bis dreimal schwächer analgetisch wirksam als Morphin und wird daher den starken Opioid-analgetika zugeordnet.

Naloxon und Naltrexon sind als reine OPRM Antagonisten beschrieben. Naloxon wird als Antidot bei Opioid-Überdosierung verwendet, wohingegen Naltrexon aufgrund der längeren Halbwertszeit und spezieller Retardformulierungen auch zur Rückfallprophylaxe bei Opioid- und Alkoholabhängigkeit eingesetzt wird.⁸⁸

[D-Ala²,N-Me-Phe⁴,Gly⁵-ol]-enkephalin (DAMGO) ist wie die endogenen Liganden ein Opioidpeptid, allerdings synthetisch hergestellt.⁸⁹ Es ist eine in der Literatur gängige Referenzsubstanz für Untersuchungen am OPRM.

1.2.3 Molekulare Mechanismen von unerwünschten Wirkungen

Opioide werden seit Jahrtausenden angewendet, doch die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen insbesondere der unerwünschten Wirkungen sind bis heute nicht ausreichend erklärt.

Seitdem für β -Arrestin2-Knockout Mäuse demonstriert werden konnte, dass sie nach Morphin-Applikation eine verlängerte Analgesie bei reduzierter Atemdepression und Obstipation zeigten, entstand die Idee, dass Analgesie primär G-Protein vermittelt ist und Nebenwirkungen vorrangig β -Arrestin vermittelt sind.^{90,91} Seit über einer Dekade wurden daher enorme Anstrengungen unternommen Liganden mit funktioneller Selektivität zu identifizieren und zu entwickeln, die bevorzugt G-Protein assoziierte Signalwege gegenüber β -Arrestin vermittelten Signalwegen aktivieren.⁹²⁻⁹⁴ Dies mündete schließlich in den USA in der Zulassung der G-Protein-„biased“ Substanz Oliceridin (TRV130) zur Behandlung akuter Schmerzen, die in der Phase 3 Studie jedoch keine Überlegenheit gegenüber Morphin in Bezug auf Atemdepression zeigen konnte.⁹⁵ Im Einklang damit stellen jüngste Forschungsergebnisse die ursprünglich formulierte Hypothese der therapeutischen Überlegenheit von G-Protein-„biased“ Opioiden in Frage. Untersuchungen an Neuronen des Atemzentrums konnten zeigen, dass G-Proteine hier maßgeblich an der Entstehung von Atemdepression nach Opioid-Gabe beteiligt sind.^{96,97} Andere Labore konnten kürzlich außerdem die Ergebnisse von reduzierter Atemdepression in β -Arrestin2-Knockout Modellen nicht reproduzieren.⁹⁸ Hierbei verwendeten die Untersucher einen neuen experimentellen Ansatz. Während ein globaler β -Arrestin2-Knockout alle Systeme beeinflusst, die durch dieses ubiquitär exprimierte Protein reguliert werden, entwickelte die Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Schulz ein genetisches Knockin-Maus-Modell, in dem C-terminale Serin- und Threoninreste des OPRM zu Alanin mutiert wurden.⁹⁹ Dadurch wurde die Phosphorylierung und β -Arrestin-Bindung unterbunden und zwar nicht im

gesamten System sondern isoliert auf Ebene des OPRM. In diesem Modell führte sowohl Morphin als auch Fentanyl zu Atemdepression, was in Zusammenschau mit den zuvor genannten Ergebnissen an Neuronen des Atemzentrums den Schluss zulässt, dass OPRM/ β -Arrestin-Interaktionen nicht essentiell für die Entstehung von Atemdepression sind.⁹⁸ Für die meisten physiologischen *in vivo* Antworten nach Opioid-Exposition ist weiterhin unklar inwieweit sie G-Protein- oder β -Arrestin-vermittelt sind.¹⁰⁰

Auch wenn der Vorteil von G-Protein-„biased“ Liganden in der Entwicklung neuer Opioid-Analgetika nun zunehmend kritisch diskutiert wird,⁹⁷ so rückt die Rolle des „Rezeptorrecycling“ für die Entstehung von Toleranz und Abhängigkeit weiter in den Fokus. Bereits seit den 1990ern gibt es Hinweise, dass die Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung entscheidend zur Toleranzentstehung beitragen und es Liganden-abhängige Unterschiede gibt.^{101,102} Allerdings konnte die frühere Annahme der Toleranzentwicklung aufgrund reduzierter Anzahl von Rezeptoren an der Plasmamembran durch Rezeptorendozytose mehrfach widerlegt werden.¹⁰³ Vielmehr werden zum einen internalisierte OPRMs nicht im Lysosom degradiert, sondern vorrangig dephosphoryliert und in reaktivierbarem Status wieder an die Membran zurücktransportiert und zum anderen sind Rezeptordesensibilisierung und -internalisierung voneinander unabhängige Prozesse.^{104,105} Somit spielt die Rezeptorinternalisierung eine wichtige Rolle, um Toleranzentstehung nach chronischer Opioid-Exposition zu minimieren. Für die Rezeptordesensibilisierung ist noch unklar, ob die Rezeptorphosphorylierung selbst oder die β -Arrestin-Bindung durch sterische Hinderung des G-Proteins ursächlich sind.⁶¹ OPRMs binden β -Arrestin2 mit höherer Affinität als β -Arrestin1, doch auch hier gibt es Ligandenspezifische Unterschiede.¹⁰⁶ So rekrutiert DAMGO beide β -Arrestin-Isoformen, während Morphin nur β -Arrestin2 rekrutiert und das in geringerem Ausmaß.^{107,108}

Ein noch detaillierteres Verständnis der Rezeptorregulation konnte in den letzten Jahren erlangt werden: Die Internalisierung des OPRM erfordert die Rezeptorphosphorylierung und die Rekrutierung von regulierenden Proteinen wie β -Arrestin2. Dabei erfolgt Agonisten-induzierte Rezeptorphosphorylierung am distalen C-terminalen Ende zuerst an Serin-375.¹⁰⁹ Nachrangige weitere Phosphorylierungen an benachbarten Aminosäuren innerhalb des 370-TREHPSTANT-379-Motivs bestimmen die Fähigkeit zur Rezeptorinternalisierung.¹¹⁰ Unterschiedliche Opiode produzieren verschiedene Phosphorylierungsmuster. Nur Opiode wie DAMGO,

welche Aminosäuren an mehreren Stellen phosphorylieren, zeigen eine robuste Internalisierung, wohingegen Opioide, wie Morphin, die weniger Aminosäuren phosphorylieren, kaum Rezeptorinternalisierung induzieren.¹¹¹ Die Phosphorylierung im 370-TREHPSTANT-379-Motiv erfordert die Funktion von GRKs. Durch Überexpression von GRK2/3 kann auch durch Morphin die Phosphorylierung von Threonin-370 und Threonin-379 zusätzlich zu Serin-375 induziert werden, was sowohl zu einer gesteigerten β -Arrestin-Rekrutierung zum Rezeptor als auch einer gesteigerten Rezeptorinternalisierung führt.¹⁰⁸ Somit können nun bereits frühere Beobachtungen, dass Überexpression von GRK2 zu gesteigerter β -Arrestin-Rekrutierung führt, mechanistisch erklärt werden.^{112,113} Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der Morphin-aktivierte OPRM ein gutes Substrat für die Phosphorylierung durch GRK5, aber nur ein schwaches Substrat für Phosphorylierung durch GRK2/3 ist.⁴² Außerdem gibt es Hinweise, dass eine weitere Phosphorylierungsstelle, das 354-TSST-357-Motiv am proximalen C-Terminus für eine initiale, transiente Arrestin/Rezeptor-Interaktion, nicht aber für die Internalisierung verantwortlich ist, und dieser Abschnitt vermutlich als allosterischer Modulator der Stabilität von GRK/Rezeptor- beziehungsweise β -Arrestin/Rezeptor-Interaktion fungiert.^{108,114}

Bei den beschriebenen Vorgängen der Toleranzentwicklung handelt es sich um kurzfristige Adaptationsprozesse, die von langfristigen Adaptationsprozessen wie OPRM-„Downregulation“ oder Hochregulation des cAMP-Signalwegs zu unterscheiden sind, welche hier nur der Vollständigkeit halber erwähnt werden.¹⁰⁴ GRKs und β -Arrestine sind also entscheidende regulierende Proteine, deren Interaktion mit dem OPRM wesentliche Auswirkungen für Rezeptorinternalisierung und die Signaltransduktion hat. Die detaillierten Mechanismen dieser Regulation und welche Auswirkungen sie auf die Rezeptordesensibilisierung und Toleranzentstehung haben sind noch unzureichend beantwortete Fragen.

1.3 Lumineszenz und ihre Anwendung in Lebenswissenschaften

Lumineszenz ist die optische Strahlung in einem physikalischen System, das durch von außen zugeführte Energie in einer angeregten, höher energetischen Zustand versetzt wird und beim Übergang in seinen Grundzustand Licht emittiert.¹¹⁵ Abhängig von der Art der zugeführten Energie zur Anregung des Systems unterscheidet man

verschiedene Formen der Lumineszenz. Bei Biolumineszenz entsteht die Energie zur Anregung durch eine enzymatische Reaktion in lebenden Organismen.¹¹⁶ Bei Photolumineszenz erfolgt die Anregung durch Photonen. Dabei kann die Photolumineszenz nach Dauer der Lichtabgabe in Fluoreszenz, die innerhalb von Sekundenbruchteilen wieder endet und Phosphoreszenz, die bis zu einigen Stunden andauern kann, unterschieden werden.¹¹⁵

1.3.1 Fluoreszierende Proteine

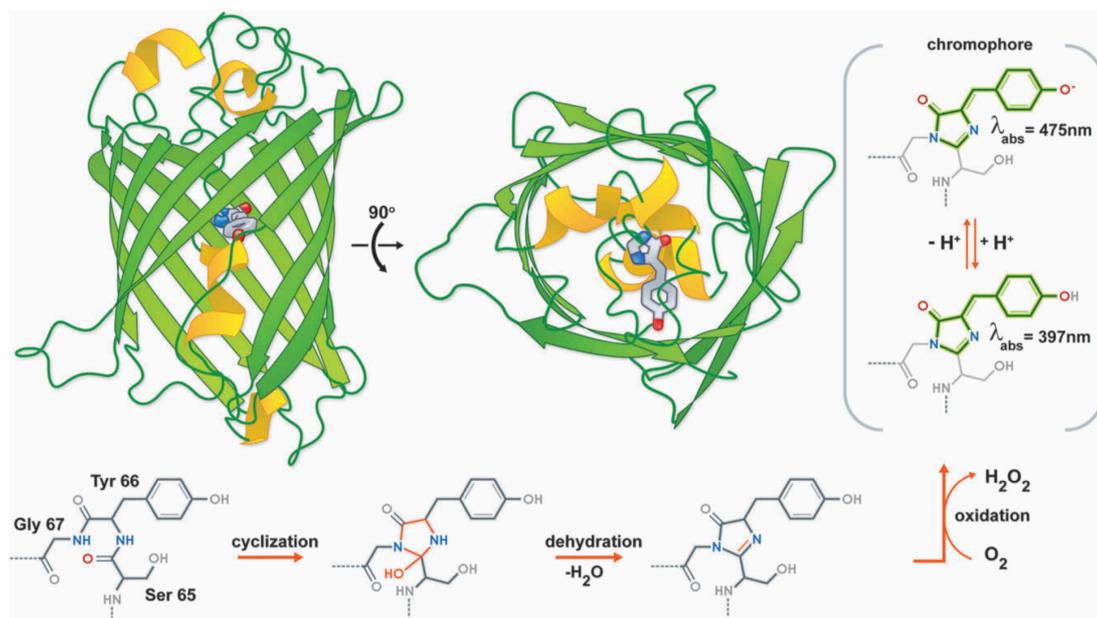


Abb. 3: Protein- und Fluorophorstruktur von GFP. β -Faltblätter des GFP-Proteins bilden eine Fassartige Struktur („ β -barrel“). Innerhalb des Proteins entsteht der Fluorophor autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Tripeptidsequenz 65-Serin-Tyrosin-Glycerin-67. Entnommen aus Frommer, W. B., 2009¹¹⁷ mit Genehmigung der Royal Society of Chemistry.

Intrinsisch fluoreszierende Proteine sind wichtige Werkzeuge der Zell- und Molekularbiologie. Sie gehen auf die Beschreibung des „green fluorescent protein (GFP)“ 1961 von Osamu Shimomura zurück, der gemeinsam mit Martin Chalfie und Roger Y. Tsien für die Entdeckung und Entwicklung von GFP 2008 den Nobelpreis für Chemie erhielt.^{118,119} GFP wurde in der Leuchtqualle *Aequorea victoria* entdeckt und besteht aus 238 Aminosäuren, die sich in β -Faltblättern zu einer zylindrischen Anordnung formieren („ β -barrel“).¹²⁰ Innerhalb des Proteins liegt der intrinsische Fluorophor, der autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Tripeptidsequenz 65-Serin-Tyrosin-Glycerin-67 entsteht.^{121,122} GFP hat zwei

Absorptionsbanden mit Maxima bei 395 nm (ultraviolettes Licht) und 465 nm (blaues Licht).¹²³ Das Emissionsmaximum liegt bei 508 nm im grünen Bereich.¹²³ Im Verlauf wurden viele GFP-Varianten mit verbesserter Helligkeit und pH-Stabilität entwickelt, die sich auch im Exzitations- und Emissionsspektrum unterscheiden, sodass mittlerweile der gesamte sichtbare Bereich des elektromagnetischen Spektrums abgedeckt werden kann.¹²⁴

Die enorme Bedeutung von GFP und seinen Varianten liegt in der Verwendung als Proteinmarker in lebenden Zellen und Organismen ohne der Notwendigkeit von Fixierung und zusätzlichem Anfärben der Proben sowie Zuführen von Substraten oder Kofaktoren.¹²⁵ Dabei wird die cDNA des Fluoreszenzproteins gentechnisch mit der DNA des zu untersuchenden Proteins fusioniert, sodass beide als ein gemeinsames Fusionsprotein exprimiert werden. Die räumliche und zeitliche Verteilung des Fusionsprotein kann dann durch Anregung im entsprechenden Absorptionsspektrums des Fluoreszenzproteins sichtbar gemacht werden. Damit finden fluoreszierende Proteine unter anderem Anwendung in der Analyse von Proteinlokalisierung und -transport, intramolekularen Konformationsänderungen sowie Protein-Protein-Interaktionen und Entwicklung von FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)-basierten Biosensoren.¹¹⁷ Zusammengefasst werden bei FRET-Sensoren ein Protein mit einem Donor- und das interagierende Protein mit einem Akzeptorfluorophor markiert. Durch strahlungsfreien Energietransfer kann die Emission des Akzeptors gemessen werden, obwohl nur das Donormolekül mit einer bestimmten Wellenlänge angeregt wurde, sofern sich Donor- und Akzeptorfluorophor in räumlicher Nähe befinden (1 – 10 nm).¹²⁶ Das Emissionsspektrum des Donors muss dabei im Exzitationsspektrum des Akzeptors liegen. Somit dient die Messung der Donor-Emission als Indikator für Protein-Protein-Interaktion. Allerdings kann GFP mit seiner Größe von 27 kDa physiologische Prozesse und insbesondere die zu untersuchenden Interaktionen stören.¹²⁷

1.3.2 Biolumineszenz

Biolumineszenz-Bildgebung gewinnt eine zunehmende Bedeutung als Alternative, beziehungsweise als Ergänzung zur Fluoreszenz-Bildgebung. Während bei der Fluoreszenz die Anregungsenergie durch eine exogene Lichtquelle erfolgt, stammt die Energie bei Biolumineszenz von einer chemischen Reaktion: Als Luciferasen bezeichnete Enzyme katalysieren die Oxidation von D-Luciferin zu Oxyluciferin, das

beim Zerfall Photonen freisetzt.¹²⁸ Luciferasen werden in verschiedensten Spezies einschließlich Insekten, Fische, Bakterien und Korallenarten gefunden.¹²⁹ Häufig werden Luciferasen jedoch aus Käfern wie die wohl am besten untersuchte „Firefly“ Luciferase aus Leuchtkäfern (Familie *Lampyridae*) oder die *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase, auch „Emerald“ Luciferase (ELuc) aufgrund ihres blaugrünen Emissionsspektrums genannt, aus Schnellkäfern (Familie *Elateridae*) eingesetzt.^{130,131} Die Schnellkäfer-Luciferasen haben gegenüber Leuchtkäfer-Luciferasen den Vorteil einer bis zu 10-fach größeren Photonenemission und geringeren pH-Empfindlichkeit.^{132,133} Durch genetische Mutation des Luciferase-Gens kann die Lichtemission weiter gesteigert werden.¹³⁴

Zwar sind Fluoreszenz-Sonden deutlich heller als Biolumineszenz-Sonden und daher besser für Anwendungen geeignet, die eine hohe räumliche und zeitliche Auflösung oder guten Kontrast erfordern, benötigen dafür aber eine exogene Lichtquelle.¹³⁵ Im Gegensatz dazu tritt bei der Biolumineszenz keine Phototoxizität oder Photobleichen, also der Verlust der Fluoreszenz eines Fluorophors durch die Bestrahlung mit dem Anregungslicht, auf. Daher eignen sich Biolumineszenz-Assays insbesondere für die Beobachtung länger andauernder und lichtempfindlicher Prozesse. Obwohl die Lichtemission bei der Biolumineszenz deutlich schwächer ist, zeigt sich kaum Hintergrundleuchten und damit ein verbessertes Signal-Rausch-Verhältnis, was eine bis zu 50-fach höhere Sensitivität gegenüber Fluoreszenz ermöglicht.^{136,137}

Biolumineszenz-Messungen können ebenfalls zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktion verwendet werden. Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) funktioniert im Prinzip wie FRET, allerdings mit einem biolumineszierenden Donor durch Fusion einer Luciferase und einem fluoreszierenden Akzeptor, sodass keine externe Lichtquelle erforderlich ist.¹²⁷ Ein alternativer Ansatz zur Biolumineszenz-basierten Messung der Protein-Protein-Interaktion basiert auf Luciferase-Komplementierung. Dabei wird die Luciferase gentechnisch gespalten und die entstandenen Luciferase-Fragmente jeweils an die beiden vermeintlich interagierenden Proteine fusioniert.¹³⁸ Befinden sich diese Proteine in räumlicher Nähe kommt es zur Rekonstitution der Luciferase-Fragmente zum funktionsfähigen Enzym, das in Gegenwart des Substrats Luciferin in Photonen messbare Lumineszenz emittiert. Das Ausmaß der Lumineszenz korreliert also mit der Protein-Protein-Interaktion, beispielsweise zwischen GPCR und β -Arrestin, wie in **Abb. 4** veranschaulicht.^{139,140}

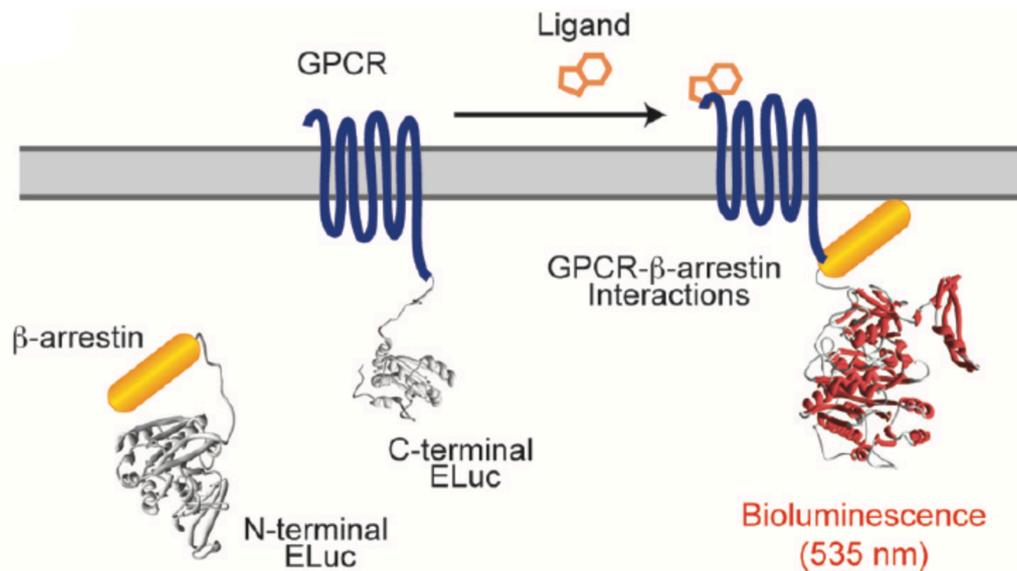


Abb. 4: Luciferase-Komplementierung. Die Luciferase (ELuc) ist in zwei Fragmente gespalten. Das C-terminale ELuc-Fragment ist an den C-Terminus des GPCRs fusioniert und das N-terminale ELuc-Fragment an β-Arrestin. Im Rahmen der GPCR/β-Arrestin-Interaktion rekonstituieren die ELuc-Fragmente zum funktionsfähigen Enzym und in Gegenwart des Substrats Luciferin wird Biolumineszenz emittiert. Entnommen aus Misawa, N., 2010¹³⁹ mit Genehmigung der American Chemical Society.

1.4 Zielsetzung

Wie bei kaum einer anderen Arzneimittelgruppe, geht bei den Opioid-Analgetika die klinische Anwendung dem Verständnis der molekularen Grundlage voraus. β-Arrestine konnten als Schlüsselmoleküle der Regulation des OPRM identifiziert werden, doch ihre endgültige Rolle insbesondere bei unerwünschten Phänomenen wie Toleranzentwicklung und Abhängigkeit ist ungeklärt.

Vereinbar mit dem Konzept verschiedener Rezeptorkonformationen konnte für einzelne Substanzen schon demonstriert werden, dass unterschiedliche OPRM-Liganden Unterschiede in der β-Arrestin-Rekrutierung zeigen. Ziel dieser Arbeit war es eine Vielzahl von klinisch häufig eingesetzten Opioid-analgetika hinsichtlich der β-Arrestin2-Rekrutierung zum OPRM systematisch zu untersuchen.

Der erste Schwerpunkt lag auf der Entwicklung eines Konfokalmikroskopie-basierten Echtzeit-Translokationsassays, mit dem in lebenden HEK293-Zellen die β-Arrestin2-Rekrutierung von „yellow fluorescent protein“ (YFP)-markiertem β-Arrestin2 zu „cyan fluorescent protein“ (CFP)-markierten OPRMs durch Stimulation mit den verschiedenen Opioiden quantifiziert werden kann. Die Fluorophor-Markierung des OPRMs sollte zudem Aufschluss über die Rezeptorendozytose geben.

Der weitere Fokus lag in der Erstellung von Konzentration-Wirkungs-Kurven der β -Arrestin2-Rekrutierung für die gleichen Opioide durch Etablierung eines Luciferase-Komplementierungs-Assays im Hochdurchsatzformat.

Aus diesen Untersuchungen gewonnene Erkenntnisse über detaillierte pharmakologische Eigenschaften der β -Arrestin2-Translokation für klinisch bereits bekannte Opioid-Analgetika können als Grundlage zum besseren Verständnis der Rezeptorregulation und damit einhergehender gewünschter und unerwünschter Wirkungen dienen.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-1)-ethansulfonsäure (HEPES)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Bright-Glo™ Luciferase Assay System	Promega GmbH, Fitchburg, WI, USA
Calciumchlorid (CaCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Deckgläser, Ø 24 mm	Hartenstein Laborbedarf GmbH, Würzburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 4,5 g/l Glucose	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) 4,5 g/l Glucose, ohne Phenolrot	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Dynamamin Inhibitor I, Dynasore	Merck KGaA, Darmstadt
Effectene® Transfection Reagent	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
fetales Kälberserum (FCS)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Geneticin (G418)	Gibco Life Technologies, Eggenstein
Immersionsöl (fluoreszenzfrei)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
L-Glutamin	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Mikrotiterplatten, 6-Loch: Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Mikrotiterplatten, 96-Loch: Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA

Mikrotiterplatten, 96-Loch: CulturPlate-96, Tissue Culture Treated, weiß	PerkinElmer GmbH, Waltham, MA, USA
Mikrotiterplatten, 96-Loch: ViewPlate-96, Tissue Culture Treated, weiß	PerkinElmer GmbH, Waltham, MA, USA
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin 100 U/ml / 0,1 mg/ml	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Plasmid Midi Kit	Qiagen GmbH, Venlo, Niederlande
Poly-D-Lysin	Sigma GmbH, München
Trypsin-EDTA	Pan Biotech GmbH, Aidenbach
Zellkulturschalen: Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Zeocin	InvivoGen, San Diego, CA, USA

2.1.2 Liganden

[D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]-enkephalin	Bachem, Weil am Rhein
Buprenorphin-Hydrochlorid	Reckitt Benckiser Healthcare (UK) Ltd., Slough, UK
Fentanyl-Citrat	Braun Melsungen AG, Melsungen
Hydromorphon-Hydrochlorid	Sigma GmbH, München
Levomethadon-Hydrochlorid	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH, Frankfurt
Morphin-Hydrochlorid	Caesar & Loretz GmbH, Hilden
Morphin-6-glucuronid	Sigma GmbH, München
Naloxon-Hydrochlorid	Braun Melsungen AG, Melsungen
Naltrexon-Hydrochlorid	Sigma GmbH, München
Oxycodon-Hydrochlorid	Mundipharma GmbH, Limburg
Pethidin-Hydrochlorid	Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln

Piritramid	Janssen-Cilag, Neuss
Remifentanil-Hydrochlorid	GlaxoSmithKline GmbH & Co. KG, München
Sufentanil-Dihydrogencitrat	Janssen-Cilag, Neuss
Tapentadol-Hydrochlorid	Sigma GmbH, München
Tilidin-Hydrochlorid-Hemihydrat	Gödecke GmbH, Berlin (jetzt Pfizer)
Tramadol-Hydrochlorid	Grünenthal GmbH, Aachen

2.1.3 Plasmide

pcDNA3-DynamainK44A	Dr. Cornelius Krasel, Würzburg / Marburg
pcDNA3-GRK2 (bovin)	Dr. Ulrike Zabel, Würzburg
pcDNA3-OPRM-CFP (human)	Prof. C. Hoffmann, Würzburg
pcDNA3- β -Arrestin2-YFP (bovin)	Dr. Cornelius Krasel, Würzburg / Marburg

2.1.4 Zelllinien

Human embryonic kidney (HEK) 293	Prof. Hoffmann, Würzburg
HEK293 ELucC-OPRM1/ARRB2-ELucN	Prof. Dr. Takeaki Ozawa, Tokyo, Japan
<i>Escherichia coli</i> (E. coli) DH5 α	Stratagene, Agilent Technologies, Waldbronn

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Transformation kompetenter *E. coli*

Als Transformation bezeichnet man die Aufnahme von DNA in Bakterienzellen, welche zur Amplifizierung von Plasmid-DNA genutzt wird. Bakterien, die die Fähigkeit besitzen DNA aufzunehmen werden als natürlich kompetent bezeichnet. Da *Escherichia coli* (*E. coli*) keine natürliche Kompetenz besitzen wurden sie durch die Behandlung mit Calciumionen künstlich kompetent gemacht. Diese kompetenten Bakterienzellen standen als eingefrorene Aliquots im Institut für Pharmakologie, Würzburg zur Verfügung.

Für die Transformation wurden 100 µl der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut, anschließend mit 100 µl KCM-Puffer und 1 µg Plasmid-DNA versetzt und für 20 Minuten auf Eis und weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zugabe von 900 µl LB-Medium wurde die Suspension bei 37 °C für 40 – 50 Minuten geschüttelt und daraufhin 100 µl des Ansatzes auf Agarplatten mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) zur Selektion ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert.

KCM-Puffer: 100 mM KCl
30 mM CaCl₂
50 mM MgCl₂
H₂O

LB-Medium: 1 % (M/V) Trypton
0,5 % (M/V) Hefeextrakt
1 % (M/V) NaCl
H₂O
(100 mg/l Ampicillin bei Bedarf)

2.2.1.2 Plasmid-Präparation

Zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie der Bakterienkultur gepickt, in 200 ml LB-Medium mit Ampicillin überimpft und über Nacht im Rotationsschüttler bei 37 °C inkubiert. Die Trennung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem

Qiagen Plasmid Midi Kit entsprechend dem Herstellerprotokoll. Dabei folgte nach alkalischer Lyse der Bakterien die Aufreinigung durch Zentrifugation und anschließender Anionenaustauschchromatographie. Verunreinigungen wurden ausgewaschen und die DNA Konzentrierung gelang mittels Isopropanol-Präzipitation und Zentrifugation. Das mit Ethanol gewaschene DNA-Pellet wurde nach Lufttrocknung in destilliertem Wasser resuspendiert.

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte computergestützt mit dem NanoDrop Spektrophotometer nach Herstelleranleitung. Die Verdünnung zur gewünschten Konzentration erfolgte mit destilliertem Wasser. Um Verunreinigungen mit Proteinen auszuschließen, wurde darauf geachtet, dass der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm bei $\geq 1,8$ lag.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 HEK293 Zellen für Konfokalmikroskopie

2.2.2.1.1 Zellkultur und Aufbewahrung von Zellen

Alle Arbeitsschritte erfolgten unter der Sterilbank. HEK293 Zellen wurden in Kompletmedium bei 37 °C und 7 % CO₂ in Zellkulturschalen kultiviert und dreimal wöchentlich passagiert. Dafür wurde das Kompletmedium abgesaugt und die adhärennten Zellen vorsichtig mit einigen Millilitern PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für eine Minute mit Trypsin-EDTA behandelt, welches Proteine, die für die Anhaftung der Zellen verantwortlich sind, spaltet. Durch leichtes Klopfen an den Schalenboden wurden die Zellen gelöst, in Kompletmedium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturschalen verteilt oder auf Deckgläschen ausgesät (s. 2.2.2.1.2). Die Zellen wurden ungefähr über 30 Passagen für Experimente verwendet.

Zur langfristigen Aufbewahrung wurden Zellen in DMSO- und FCS-haltigem Medium kryokonserviert. Zum Einfrieren wurden die Zellen wie im vorangegangenen Absatz beschrieben geerntet, drei Minuten bei 900 g zentrifugiert und das gewonnene Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert. Aliquots wurden in Kryogefäßen zunächst für zwei Stunden bei -20 °C eingefroren und anschließend bei -80 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt. Um zytotoxische Effekte des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zu minimieren, wurden die Zellen beim Auftauen zügig mit Kompletmedium resuspendiert und in eine

Zellkulturschale überführt. Nach ungefähr drei Stunden wurde das Medium gewechselt um das restliche DMSO zu entfernen.

Komplettmedium: DMEM 4,5 g/l Glucose
10 % (V/V) FCS
1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)
1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin
(100 U/ml Penicillin; 100 µg/ml Streptomycin)

Einfriermedium: 80 % (V/V) Komplettmedium
10 % (V/V) DMSO
10% (V/V) FCS

2.2.2.1.2 Ausplattieren von Zellen auf Deckgläser

Für die Konfokalmikroskopie wurden die Zellen auf runde Deckgläser (24 mm Durchmesser, steril) ausgesät. Um eine Anhaftung der Zellen auf gläsernem Untergrund zu ermöglichen, wurden die Deckgläser zunächst für 20 Minuten mit Poly-D-Lysin (100 µg/ml) beschichtet, welches durch einen Waschschrift mit PBS wieder entfernt wurde. Die Deckgläser wurden in 6-Loch Mikrotiterplatten mit je 2 ml Komplettmedium pro Loch gelegt. HEK293 Zellen wurden in einer 10 cm-Zellkulturschale bis zu einer Konfluenz von 70 – 80 % gezüchtet, wie in 2.2.2.1.1 beschrieben geerntet, in 10 ml Komplettmedium resuspendiert und 300 µl der Zellsuspension wurde in jedes Loch gegeben, um so eine Konfluenz von 40 – 50 % für die nachfolgende Transfektion zu erreichen. Die Bestimmung der Konfluenz erfolgte durch Lichtmikroskopie.

2.2.2.1.3 Transiente Transfektion

Der Begriff Transfektion beschreibt das Einbringen von Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen. Dabei wird zwischen einer vorübergehenden (= transienten) und einer dauerhaften (= stabilen) Transfektion unterschieden, wobei es bei letzterer zu einer Integration der Fremd-DNA ins Wirts-Genom kommt. Folglich wird bei der transienten Transfektion durch die fehlende Integration die eingeschleuste DNA bei der Zellteilung nicht an alle Zellen weitergegeben und das Ausmaß der Genexpression

ist abhängig von der Menge aufgenommener DNA, die sich von Zelle zu Zelle unterscheidet.

Für die Transfektion wurde Effectene® Transfection Reagent Kit verwendet, eine nicht-liposomale Lipidformulierung, deren Wirkprinzip auf zwei Schritten beruht: zuerst kondensiert ein Enhancer die DNA Moleküle, die anschließend durch das Effectene Reagent mit kationischen Lipiden überzogen werden. So wird durch Interaktion mit der Zellmembran das Einschleusen der DNA in die Zelle ermöglicht. Bei einer Konfluenz von 40 % wurden die Zellen nach Herstellerangaben mit optimierten Plasmid-DNA Mengen transfiziert (Angaben beziehen sich auf den Gesamtansatz für eine 6-Loch Platte):

300 µl Puffer
2,6 µg pcDNA3-OPRM-CFP
0,5 µg pcDNA3-β-Arrestin2-YFP
1,0 µg pcDNA3-GRK2
16,4 µl Enhancer
40 µl Effectene

Bei Experimenten zur Inhibierung der Endozytose mittels Dynamin-Mutante K44A wurden zusätzlich 1,8 µg pcDNA3-DynaminK44A transfiziert. Ein Mediumwechsel mit Kompletmedium erfolgte 24 Stunden nach Transfektion und nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für Konfokalmessungen verwendet.

2.2.2.2 HEK293 ELucC-OPRM1/ARRB2-ELucN Zellen für Biolumineszenz

Experimente

2.2.2.2.1 Beschreibung der Zelllinie und Zellkultur

Für Untersuchungen der OPRM/β-Arrestin2-Interaktion wurden HEK293 Zellen verwendet, die eine gespaltene Schnellkäfer Luciferase („Emerald“ Luciferase, ELuc) enthielten, von der je ein Fragment genetisch an β-Arrestin2 bzw. den OPRM gekoppelt war. Das C-terminale Ende der Luciferase wurde dabei an das C-terminale Ende des OPRM gekoppelt, das N-terminale Ende an das N-terminale Ende des β-Arrestin2 (HEK293 ELucC-OPRM1/ARRB2-ELucN). Die stabile Zelllinie wurde

großzügiger weise von Prof. Takeaki Ozawa, Tokyo bereit gestellt und analog zu vorangegangenen GPCR/ β -Arrestin2 Spalluciferase-Paaren hergestellt.¹³⁹

Die Zellen wurden wie in 2.2.2.1.1 beschrieben kultiviert und alle drei bis vier Tage passagiert. Zur Aufrechterhaltung der Genexpression stabiler Zellen wurde anstelle des Komplettmediums ein Selektionsmedium verwendet. Zur Verwendung für Biolumineszenz-Messungen wurden die Zellen nach dem Lösen vom Plattenboden in Phenolrot-freiem Messmedium resuspendiert, um Hintergrundstörungen bei den Messungen zu vermeiden, und nach Bestimmung der Zellzahl in 96-Loch Mikrotiterplatten ausgesät.

Die Kryokonservierung erfolgte ebenfalls wie in 2.2.2.1.1 beschrieben. Nach dem Auftauen wurden die Zellen zunächst über zwei bis drei Passagen in Komplettmedium gezogen bevor zum Selektionsmedium gewechselt wurde.

Selektionsmedium: DMEM 4,5 g/l Glucose

10 % (V/V) FCS

1 % (V/V) L-Glutamin (200 mM)

1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin

(100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin)

800 μ g/ml G418

40 μ g/ml Zeocin

Messmedium: DMEM 4,5 g/l Glucose, ohne Phenolrot

10 % (V/V) FCS

1 % (V/V) L-Glutamin

1 % (V/V) Penicillin/Streptomycin

(100 U/ml Penicillin; 100 μ g/ml Streptomycin)

2.2.2.2.2 Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer und Ausplattieren der Zellen in Mikrotiterplatten

Da das Luciferase-Komplementierungs-Experiment stark von der Anzahl der Zellen beeinflusst wird, erfolgte eine Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Wenige Mikroliter der Phenolrot-freien Zellsuspension wurden seitlich auf die mit einem Deckgläschen bedeckte Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden unter Zuhilfenahme des Mikroskops vier Großquadrate, die jeweils in 16

kleinere Quadrate unterteilt sind, ausgezählt. Der Mittelwert der vier Großquadrate wurde mit dem für die Neubauer Zählkammer spezifischen Faktor 10^4 multipliziert um die Zellzahl pro Milliliter zu errechnen. Anschließend wurde die Zellsuspension auf 800.000 Zellen/ml verdünnt und jeweils 90 μ l in die Nöpfchen einer weißen 96-Loch Mikrotiterplatte (ViewPlate-96 bzw. CulturPlate-96) pipettiert, was in einer absoluten Zellzahl von 72.000 Zellen/Nöpfchen resultierte. Die Zellen wurden bis zur Weiterverwendung für 24 Stunden bei 37°C und 7% CO₂ inkubiert.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

2.2.3.1 Lebendzell-Konfokalmikroskopie

Zur Messung der β -Arrestin2-Rekrutierung bei simultaner Aufnahme der Rezeptorinternalisierung wurden Zeitserien mit dem Leica TCS SP8 Laser Scanning Mikroskop (Leica, Wetzlar) mit Ölimmersionsobjektiv (HC PL APO CS2 63 x / 1.40 OIL) aufgenommen.

Dazu wurden die Deckgläser mit transient transfizierten HEK293 Zellen in eine Attofluor® Zell Kammer (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) gespannt und mit 900 μ l Messpuffer bedeckt und unter das Mikroskop gelegt. Nach Auffinden geeigneter Zellen wurde die Messung gestartet und es wurden in einem 15-Sek.-Intervall Aufnahmen über einen Zeitraum von 10 Min. erstellt. Die Stimulation der Zellen erfolgte durch direktes Zupipettieren von 100 μ l Liganden-Lösung unmittelbar nach Generierung des ersten Bildes. Anhand von bereits publizierten Bindungsdaten¹⁴¹⁻¹⁴³ wurden Rezeptor-sättigende Konzentrationen verwendet. Für Liganden ohne verfügbare Bindungsdaten wurden die sättigende Konzentration entweder durch Titration bestimmt oder die vom Hersteller höchst verfügbare Konzentration verwendet. Somit ergaben sich als Liganden-Konzentrationen: 300 nM Buprenorphin, 100 μ M DAMGO, 30 μ M Fentanyl, 100 μ M Hydromorphon, 100 μ M Levomethadon, 30 μ M Morphin, 30 μ M Morphin-6-Glucuronid (M6G), 10 μ M Naloxon, 100 μ M Naltrexon, 30 μ M Oxycodon, 3 mM Pethidin, 1 mM Piritramid, 100 μ M Remifentanyl, 1 μ M Sufentanyl, 300 μ M Tapentadol, 3 mM Tilidin und 3 mM Tramadol. Für Versuche mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore wurden die Zellen nach Einspannen in die Attofluor® Zell Kammer anstelle von Messpuffer mit 900 μ l 80 μ M Dynasore-Lösung (gelöst in 0,4 % DMSO) beschichtet und für 30 Minuten bei 37 °C und 7 % CO₂ inkubiert.

Das CFP-Fluorophor wurde mit einem Diodenlaser bei einer Wellenlänge von 442 nm angeregt und die Emission mit einem Hybrid Detector im Bereich von 450 – 505 nm gemessen. Zur Exzitation des YFP-Fluorophors wurde ein Argonlaser bei einer Wellenlänge von 514 nm verwendet, die Fluoreszenzemission wurde mit einem Photomultiplier (PMT) über den Bereich von 530 – 600 nm detektiert.

Die Aufnahmeeinstellungen wurden mit einem Format von 512 x 512 Pixel, einer Scangeschwindigkeit von 400 Hz, einem Zeilenmittel von 4 und einem Einzelbildmittel von 2 konstant gehalten, lediglich der Verstärkungsfaktor der Detektoren („gain“) und der PMT-Schwellenwert („offset“) wurde für jede Aufnahme individuell eingestellt. Alle Messungen wurden an mindestens 3 verschiedenen Tagen durchgeführt. Die angegebene n-Zahl entspricht der addierten Anzahl der ausgewerteten Zellen der Einzelexperimente.

Messpuffer: 10 mM HEPES, pH 7,3
140 mM NaCl
5,4 mM KCl
1 mM MgCl₂
2 mM CaCl₂

Die Quantifizierung der β -Arrestin2 Translokation wurde mit Hilfe der Leica Application Suite Advanced Fluorescence software package (LAS AF Version 4.0.11706) durchgeführt. Dabei wurden Bereiche („regions of interest“, ROIs) im Zytosol definiert, in denen über die aufgenommene Zeit die Lichtintensität gemessen wurde. Die Regionen wurden so gewählt, dass Zellbewegungen weder zu einem Verrutschen in die Membran noch in die Kernregion führten. Mögliches Fotbleichen wurde ausgeglichen, indem Kontrollregionen um ganze Zellen gelegt und die ROIs damit korrigiert wurden. Um die β -Arrestin2 Translokation darzustellen, wurden mit Origin 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) die resultierenden Lichtintensitäten auf den anfänglichen Wert normalisiert und gegen die Zeit aufgetragen. Zu Darstellungszwecken wurden die Bilder nach erfolgter Auswertung mit Fuji Image J bearbeitet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6. Die Normalverteilung der Werte wurde mit dem D'Agostino-Pearson Omnibus Test untersucht und die

statistische Signifikanz mit one-way ANOVA (Kontrolle für Mehrfachvergleiche mittels Dunnett-Test) getestet, wobei das Signifikanzniveau bei $p < 0.05$ lag.

2.2.3.2 Biolumineszenz-Messung mittels Luciferase-Komplementierung

Zur Erlangung von Konzentrations-Wirkungskurven wurde ein Hochdurchsatz Screening durchgeführt, welches die Aktivität von Luciferasen als Korrelat für β -Arrestin2-Opioidrezeptor-Interaktion misst.

Die in Phenolrot-freiem Messmedium ausgesäten Zellen (72.000 Zellen/Näpfchen) wurden nach 24 Stunden Inkubationszeit bei 37 °C und 7 % CO₂ zur Biolumineszenz-Messung verwendet. Mittels 8-Kanal-Pipette erfolgte die Zugabe von 10 μ l/well Liganden-Lösungen in gleicher Reihenfolge wie die der nachfolgenden Gerätemessung, sodass die zeitliche Verzögerung durch manuelles Zupipettieren zwischen den einzelnen Näpfchen minimiert wurde und die Zellen einheitlich für 12 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ mit Liganden inkubiert wurden. Anschließend wurden 100 μ l/well Bright-Glo™ Reagent mit der 8-Kanal Pipette zugefügt und weitere 2 Minuten im Mikrotiterplatten-Leser (EnVision 2104 Multilabel Reader, Perkin Elmer) inkubiert, um eine vollständige Zellyse und Lichtadaption zu gewährleisten.

Das Bright-Glo™ Luciferase Assay System besteht aus den beiden Komponenten Bright-Glo™ Luciferase Assay Substrate, welches das Substrat der Luciferase D-Luciferin enthält, und dem Bright-Glo™ Luciferase Assay Buffer. Beide Komponenten wurden gemischt und das so entstandene Bright-Glo™ Reagent wurde aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Erst kurz vor Versuchsbeginn wurde das Reagenz im Wasserbad auf Raumtemperatur erwärmt.

Die Aktivität der Luciferase wurde für 1 Sekunde/Näpfchen bei 25 °C mit einem Emissionsfilter für Lumineszenz von 400 – 700 nm (Filter Nr. 212: Luminescence 700, Spiegel Nr. 400: Luminescence) detektiert. Dafür wurde das Messprotokoll Luminescence EJ (Werkseinstellung) verwendet.

Pro Mikrotiterplatte wurden 4 Liganden in 11 verschiedenen Konzentrationen, jeweils als Duplikat, gemessen. Zusätzlich wurden 4 Näpfchen mit je 10 μ l Messpuffer befüllt, deren Mittelwert dann als Hintergrundstrahlung von den anderen Messwerten abgezogen wurde. Die übrigen 4 Näpfchen wurden mit 10 μ l DAMGO-Lösung als Referenzwert in einer Endkonzentration von 100 μ M besetzt und die Messwerte wurden auf den DAMGO-Mittelwert normalisiert. Für jede Konzentration erfolgten vier Messungen an voneinander unabhängigen Versuchstagen.

Alle Transformationen, Kurvenanpassungen und statistische Auswertungen wurden mit GraphPad Prism 6 durchgeführt. Um E_{\max} und EC_{50} Werte zu errechnen wurde eine nicht-lineare Regression basierend auf einer sigmoidalen Funktion mit drei anzupassenden Parametern („bottom“, „top“, $\log(EC_{50})$) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Konfokalmikroskopie

3.1.1 Bestimmung der Transfektionsbedingungen und Mikroskopieeinstellungen

Mit optischen Assays kann die Translokation von zytosolischen β -Arrestinen zu membranständigen GPCRs gut detektiert werden. Solch ein Translokationsassay, der die zytosolische Abnahme von Fluorophor-markiertem β -Arrestin2 durch die Rekrutierung zum Rezeptor misst, wurde bereits von der Arbeitsgruppe Hoffmann unter anderem für den Muskarin-, β_2 -adrenergen- und P_2Y -Rezeptor eingesetzt²⁵. Erstes Ziel dieser Arbeit war die Etablierung des Translokationsassays für den μ -Opioidrezeptor.

Zunächst mussten die benötigten Plasmidmengen bestimmt werden. Für eine aussagekräftige Messung ist das Verhältnis von Arrestin-Expression zu Rezeptordichte entscheidend: Bei zu starker Arrestin-Expression ist die Arrestin-Translokation nicht detektierbar, während bei niedrigem Arrestin-Anteil die Gefahr einer falschniedrigen Bestimmung besteht. Umgekehrt muss ausreichend Rezeptor zur Verfügung stehen, denn eine vollständige Rezeptorbelegung durch Arrestin führt bei noch verbliebenem zytosolischen Arrestin zur Unterschätzung der Rekrutierung.

In der Konfokalmikroskopie zeigten die unstimulierten Zellen eine diffuse zytosolische Verteilung des YFP-markierten β -Arrestin2 (gelb) und eine membranständige Expression von OPRM-CFP (cyan) in HEK293 Zellen (**Abb. 5A**). Um das optimale Plasmid-Verhältnis für den Translokationsassay zu bestimmen wurden iterative Messungen mit verschiedenen Plasmidmengen durchgeführt. In den Ausgangsmessungen mit je 1 $\mu\text{g}/6$ -Lochplatte β -Arrestin2-YFP, Wildtyp GRK2 und OPRM-CFP wurde eine Überexpression von Arrestin und eine zu schwache Expression von OPRM beobachtet. Mit entsprechend verdünnter Konzentrationen von 0,5 $\mu\text{g}/6$ -Lochplatte β -Arrestin2-YFP und auf titrierter Konzentration von 2,8 $\mu\text{g}/6$ -Lochplatte OPRM-CFP wurden stabile mikroskopische Ergebnisse erreicht, die eine geringe Laserintensität erlaubten, um einem Photobleichen vorzubeugen. Die nicht markierte GRK2 wurde als geschwindigkeitsbestimmender Schritt mit einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/6$ -Lochplatte im Verhältnis zu Arrestin überexprimiert, um eine

ausreichende Expression zu gewährleisten.³¹ Die beobachtete Transfektionseffizienz lag für OPRM-CFP bei ca. 40 % und für β -Arrestin2-YFP bei ca. 70 % (**Abb. 5B**).

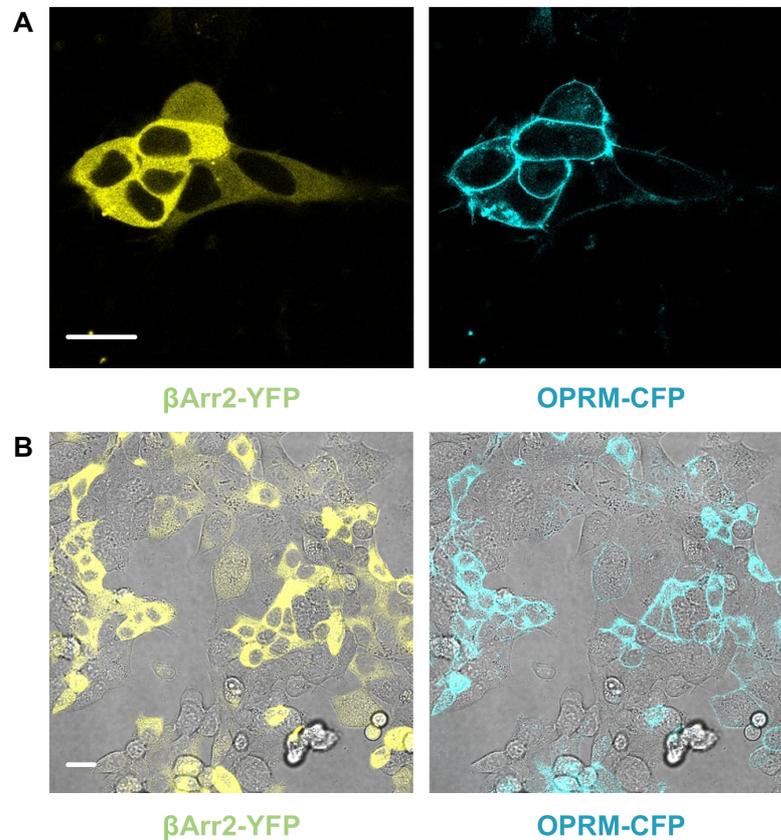


Abb. 5: Expression von β -Arrestin2-YFP und OPRM-CFP in HEK293 Zellen. **A** Zytosolische Verteilung von β -Arrestin2 und membranständige Expression von OPRM. **B** Überlappung von Auflichtmikroskopie- und YFP- bzw. CFP-Kanal. Transfektionseffizienz mit ca. 40 % für OPRM-CFP und 70 % für β -Arrestin2-YFP. Maßstab entspricht 20 μ m.

Unter Verwendung der optimierten Plasmidmengen wurden anschließend eine Standardisierung der Mikroskop-Parameter durchgeführt, um die quantitative und qualitative Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu sichern. Ziel war es in lebenden Zellen die Translokation des β -Arrestin2 an den OPRM in Echtzeit als Zeitserienmessung aufzunehmen, zu quantifizieren und gleichzeitig das Verhalten des OPRM zu beobachten.

Ausgehend von den Standardeinstellungen des Herstellers für CFP/YFP-Messungen wurde der Detektionsbereich so gewählt, dass ein „bleed through“, also eine unzureichende Trennung der Emissionswellen von CFP und YFP und somit eine Signalerkennung im falschen Kanal, minimiert wurde. Die optimale Trennung wurde bei einem Detektionsbereich für die Wellenlängen 450 – 505 nm für CFP bzw. 530 – 600 nm für YFP beobachtet. Das Signal-Rausch-Verhältnis und damit die Bildqualität

wurden durch viermaliges Scannen jeder Zeile und zweimaliges Scannen des Bildes mit anschließender Mittelung verbessert. Durch diese finalen Einstellungen konnte eine Bilderfassungszeit von 10,323 Sek. erreicht werden. Eine Messdauer von 10 Min. erwies sich als ausreichend, da die Translokation bereits in den ersten 2 Min. stattfindet, gefolgt von einer möglichen Rezeptorendozytose. Bei längerer Messung waren keine relevanten Veränderungen zu beobachten.

Die durchgeführte Optimierung der Plasmidmengen und die Standardisierung der Mikroskop-Aufnahmeeinstellung generierten reproduzierbare Ergebnisse. Mit diesem stabilen Assay konnten nun die 17 ausgewählten Opioide hinsichtlich des β -Arrestin2-Signalwegs untersucht werden.

3.1.2 Maximale β -Arrestin2-Translokation und Rezeptorinternalisierung

β -Arrestine spielen eine entscheidende Rolle beim Rezeptortrafficking und aktivieren darüber hinaus G-Protein unabhängige Signalwege. Ihre Rolle bei der Beeinflussung des Wirkungs- und insbesondere des Nebenwirkungsprofils von Opioiden ist Gegenstand aktueller Diskussionen. Deshalb sollten im Rahmen dieser Arbeit 15 klinisch häufig eingesetzte Opioide sowie der Morphin-Metabolit M6G hinsichtlich ihrer β -Arrestin2-Translokation charakterisiert werden. Als Referenzsubstanz wurde der μ -Opioidrezeptor spezifische Agonist DAMGO verwendet. Als Negativ-Kontrolle diente die Messpuffer-Lösung.

Nach Applikation der jeweiligen Opioid-Lösung wurde die Arrestin-Translokation als Abnahme des intrazellulären Fluoreszenzsignals, welches von Arrestin-YFP entsendet wurde, über die Zeit gemessen. Demnach entspricht das Minimum der resultierenden Funktionen der maximalen Arrestin-Rekrutierung. Der Graph erlaubt eine vorläufige Einteilung in Voll-, Partial- und Antagonisten (**Abb. 6**):

Vollantagonisten:	DAMGO, Fentanyl, Sufentanil, Levomethadon, Remifentanyl
Partialagonisten:	Tapentadol, Pethidin, Hydromorphon, Piritramid, Morphin, Oxycodon
Antagonisten:	Tilidin, Tramadol, Buprenorphin, Naltrexon, Naloxon

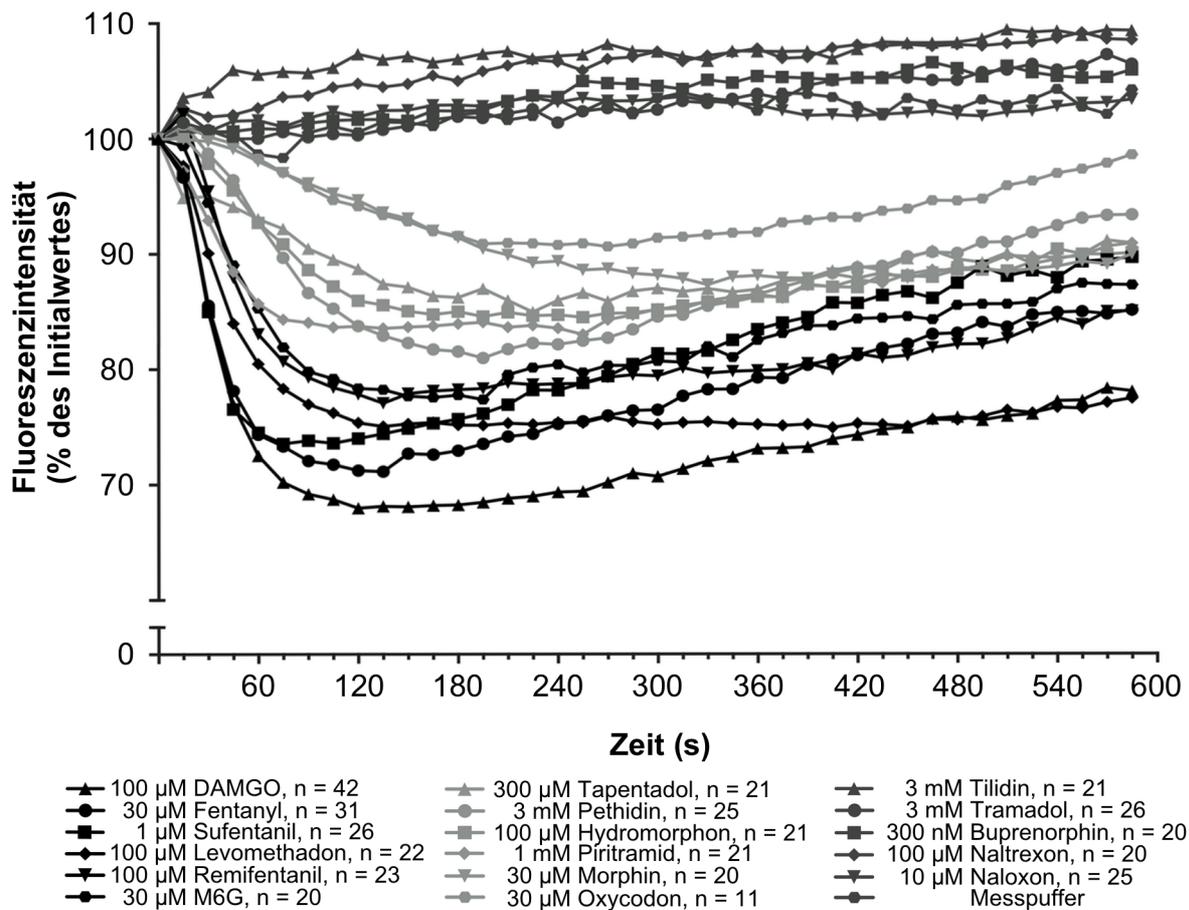
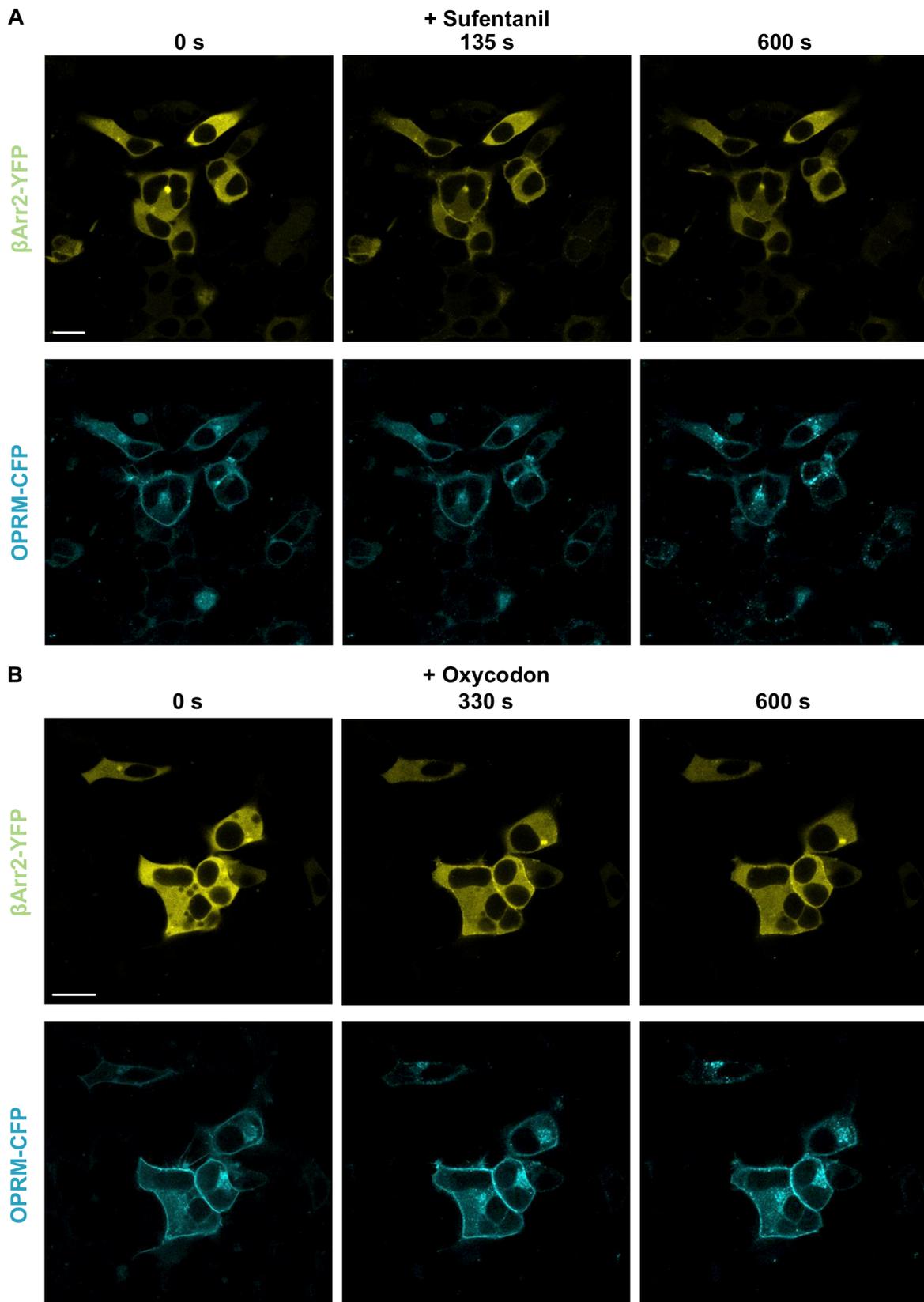


Abb. 6: Intensitätsverlust des zytosolischen YFP-Signals in Relation zum Initialwert über die Zeit. Gezeigt sind alle 17 getesteten Substanzen sowie die Pufferkontrolle. Die Funktionen erlauben eine vorläufige Einteilung in Vollagonisten (schwarz: DAMGO, Fentanyl, Sufentanil, Levomethadon, Remifentanil, M6G), Partialagonisten (hellgrau: Tapentadol, Pethidin, Hydromorphon, Piritramid, Morphin, Oxycodon) und Antagonisten (dunkelgrau: Tilidin, Tramadol, Buprenorphin, Naltrexon, Naloxon). N entspricht der Anzahl aller ausgewerteten Zellen an mind. 3 unterschiedlichen Versuchstagen.

Abb. 7 zeigt repräsentative Konfokalbilder aus Messungen mit Sufentanil, Oxycodon und Buprenorphin als jeweils einen Vertreter der drei Gruppen.

Für nahezu alle Substanzen zeigte sich interessanterweise nach dem Erreichen eines Minimums ein erneuter intrazellulärer Fluoreszenzanstieg. Die einzige Ausnahme bildeten die Opiode Morphin und Levomethadon, bei denen die Fluoreszenzintensität auf einem Plateau verblieb. Für die als Antagonisten eingeteilten Substanzen zeigte sich in der Quantifizierung eine Fluoreszenzintensität über 100 %. Dies entspräche einer Signalzunahme im Zytosol, welche in den Konfokalbildern jedoch visuell nicht beobachtet werden konnte.

Die Kinetik aller verwendeten Opiode ist weitestgehend vergleichbar mit Erreichen der maximalen Translokation nach 135 Sek. Lediglich Oxycodon und Morphin zeigten eine langsamere Kinetik mit Maximum nach 330 Sek.



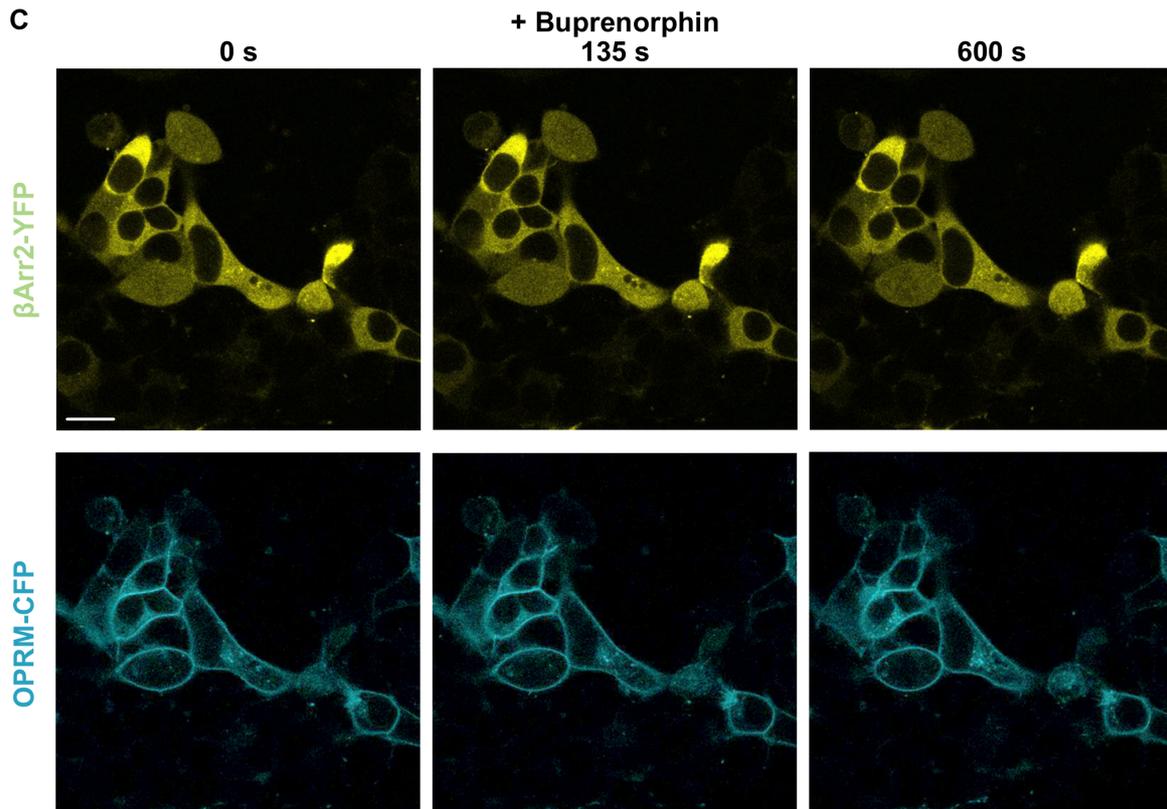


Abb. 7: Repräsentative Konfokalbilder für Voll-, Partial- und Antagonisten. HEK293-Zellen wurden dreifach transfiziert mit OPRM-CFP, GRK2 und β -Arrestin2-YFP. Simultane Aufnahme des YFP- und CFP Kanals für **A** Sufentanil **B** Oxycodon und **C** Buprenorphin als Vertreter eines Voll-, Partial- bzw. Antagonisten jeweils vor Liganden-Zugabe, bei Erreichen der maximalen β -Arrestin2-YFP-Translokation an die Membran nach 135 bzw. 330 Sek. bzw. für Buprenorphin ausbleibenden Translokation und am Ende der Messung nach 10 Min. Maßstab entspricht 20 μ m.

Auffallend waren vermehrte Zellbewegungen und blasenartige Membranausstülpungen nach der Applikation von Pethidin und Tramadol. Um festzustellen, ob es sich hierbei um rezeptorvermittelte Phänomene handelt, wurde eine Transfektion ohne OPRM, aber mit β -Arrestin2 und GRK2 durchgeführt. Unter diesen Bedingungen traten die beschriebenen Veränderungen nach Liganden-Applikation nicht auf (**Abb. 8**).

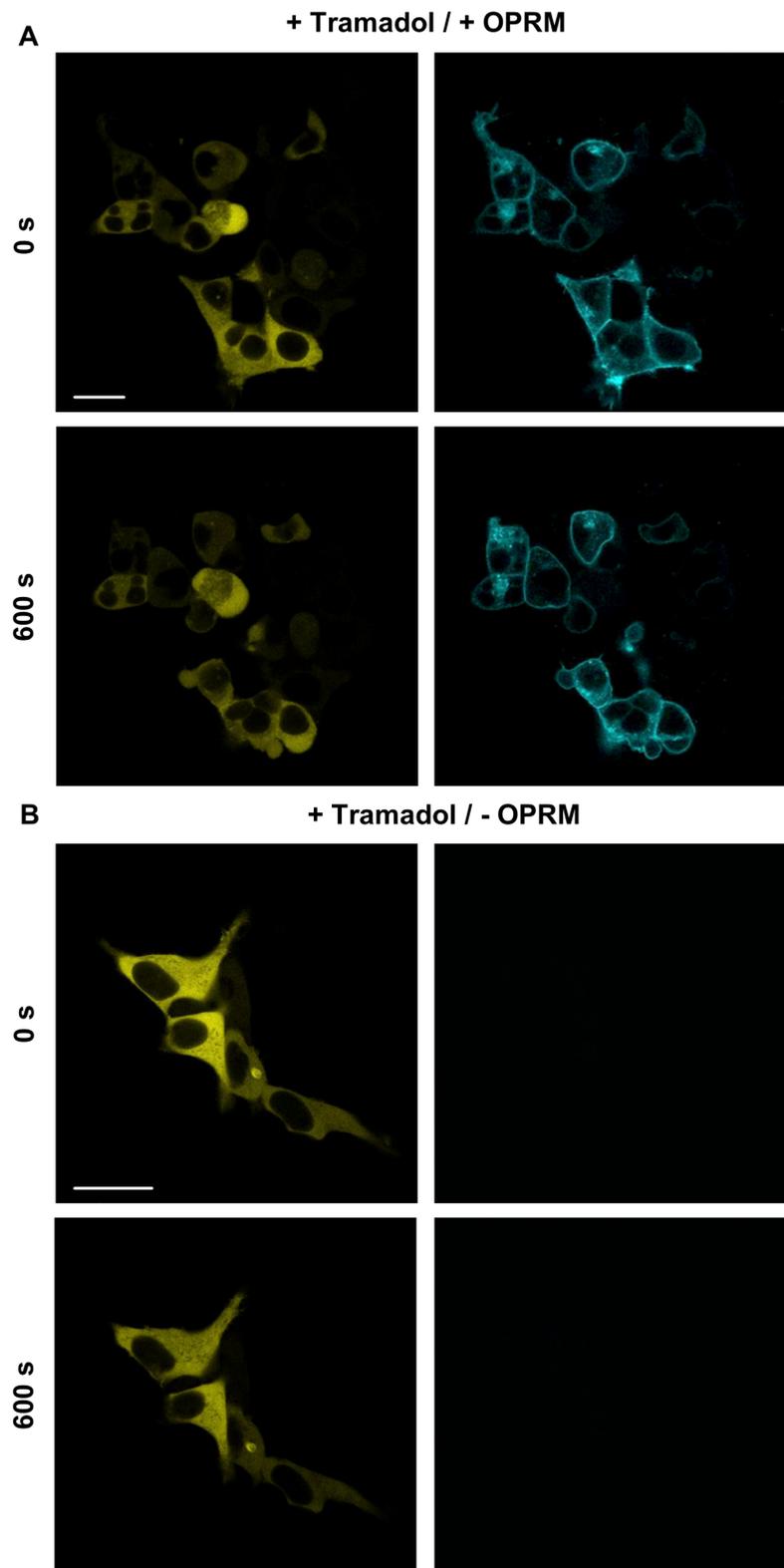


Abb. 8: Morphologische Zellveränderungen nach Zugabe von Tramadol. **A** Ausbildung von sphärischen Membranausstülpungen nach Liganden-Zugabe bei dreifach transfizierten HEK293-Zellen mit OPRM-CFP, GRK2 und β -Arrestin2-YFP. **B** Unveränderter Phänotyp ohne Ausbildung von Membranausstülpungen nach Liganden-Zugabe bei zweifach transfizierten HEK293-Zellen mit GRK2 und β -Arrestin2-YFP. Ohne Transfektion von OPRM-CFP ist im CFP-Kanal kein Signal sichtbar. Bildaquisition vor Liganden-Zugabe (links) und nach 10 Min (rechts). Maßstab entspricht 20 μ m.

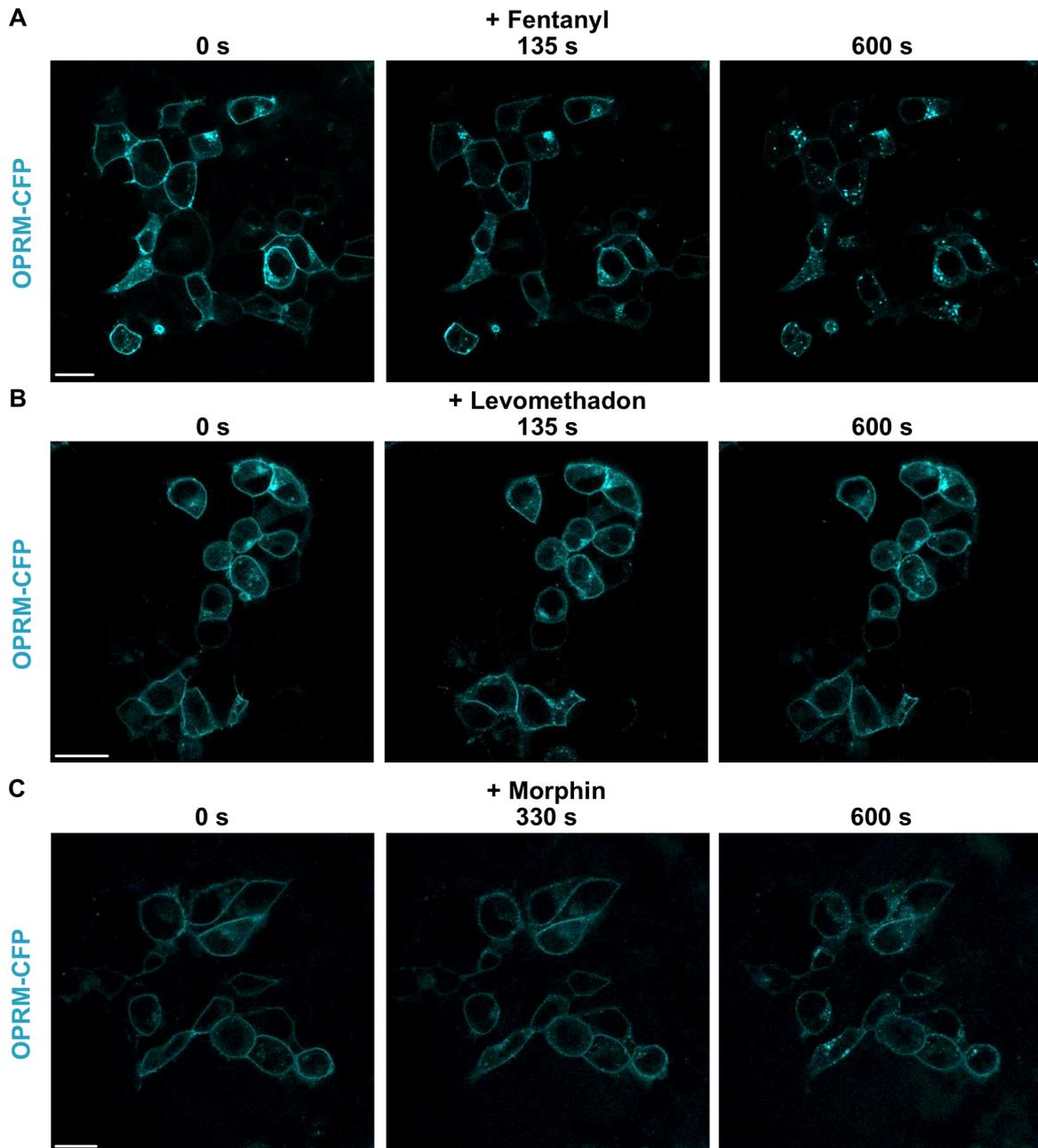


Abb. 9: OPRM-Internalisierung. Dreifach transfizierte HEK293 Zellen mit OPRM-CFP, GRK2 und β -Arrestin2-YFP zeigen nach Applikation von **A** Fentanyl eine über die Zeit zunehmende punktförmige Verlagerung des OPRM von der Zelloberfläche ins Zytosol. **B, C** Nach Zugabe von Methadon und Morphine bleibt der Rezeptor überwiegend an der Zelloberfläche gebunden. Dargestellt ist zu Übersichtszwecken nur der CFP-Kanal. Maßstab entspricht 20 μ m.

Zusammen mit der Arrestinrekrutierung konnte das Rezeptorverhalten beobachtet werden, während eine genaue Quantifizierung der Rezeptorinternalisierung im Sinne einer Fluoreszenzabnahme an der Membran jedoch nicht möglich war. Da die Vesikel der internalisierten Rezeptoren sehr nah an der Membran lokalisiert sind, konnte eine sichere Unterscheidung zwischen internalisiertem und membrangebundenem

Rezeptor nicht gewährleistet werden. Auch die CFP-Zunahme im Zytosol als Maß der Rezeptorinternalisierung stellte sich als ungeeignet heraus, da die Vesikel keine homogene Verteilung zeigten. Dennoch konnten in der Mikroskopie deutliche Unterschiede im Rezeptorverhalten festgestellt werden. So wurde für DAMGO, Fentanyl und Sufentanil eine deutliche Verlagerung des OPRM von der Zelloberfläche ins Zytosol beobachtet. Im Gegensatz dazu zeigten Morphin, Methadon und die Antagonisten kaum Vesikelbildung.

Um die einzelnen Liganden in ihrem Arrestin-Rekrutierungsvermögen miteinander vergleichen zu können, musste jeweils die maximale Rekrutierung bestimmt werden. Da es jedoch bei den meisten Liganden zu einem unklaren Fluoreszenzanstieg nach Durchlaufen eines Fluoreszenzminimums kam, während andere auf einem Plateau verblieben (**Abb. 6**), war keine eindeutige Bestimmung von Vergleichswerten möglich. Dieser Fluoreszenzanstieg war vor allem bei solchen Liganden zu beobachten, die auch eine verstärkte Rezeptorinternalisierung zeigten. In den nachfolgenden Experimenten wurde daher untersucht, ob durch eine Hemmung der Rezeptorendozytose ein erneutes Ansteigen des zytosolischen YFP-Signals unterdrückt werden kann.

3.1.3 Hemmung der Rezeptorendozytose

Die Endozytose des OPRM ist wie bei vielen GPCRs ein hauptsächlich Clathrin-vermittelter, Dynamin-abhängiger Prozess.¹⁴⁴ Zur Inhibition der Rezeptorendozytose wurden die Zellen mit dem Dynamin-Inhibitor Dynasore inkubiert.¹⁴⁵ Da Sufentanil und Fentanyl eine besonders starke Fluoreszenzzunahme zeigten, wurde an diesen Substanzen sowie der Referenzsubstanz DAMGO ein Grundsatzbeweis durchgeführt. Sowohl bei DAMGO als auch bei Sufentanil war unter Dynasore konfokalmikroskopisch eine verminderte Verlagerung der Rezeptorvesikel ins Zytosol zu beobachten. Ein Fluoreszenzanstieg des zytosolischen YFP-Signals nach Erreichen eines Minimums blieb aus und das Ausmaß der β -Arrestin2-Rekrutierung blieb konstant zu den Untersuchungsbedingungen ohne Zugabe von Dynasore. Im Gegensatz dazu konnte für Fentanyl auch unter Verwendung von Dynasore kein Fluoreszenzplateau erreicht werden. (**Abb. 10**).

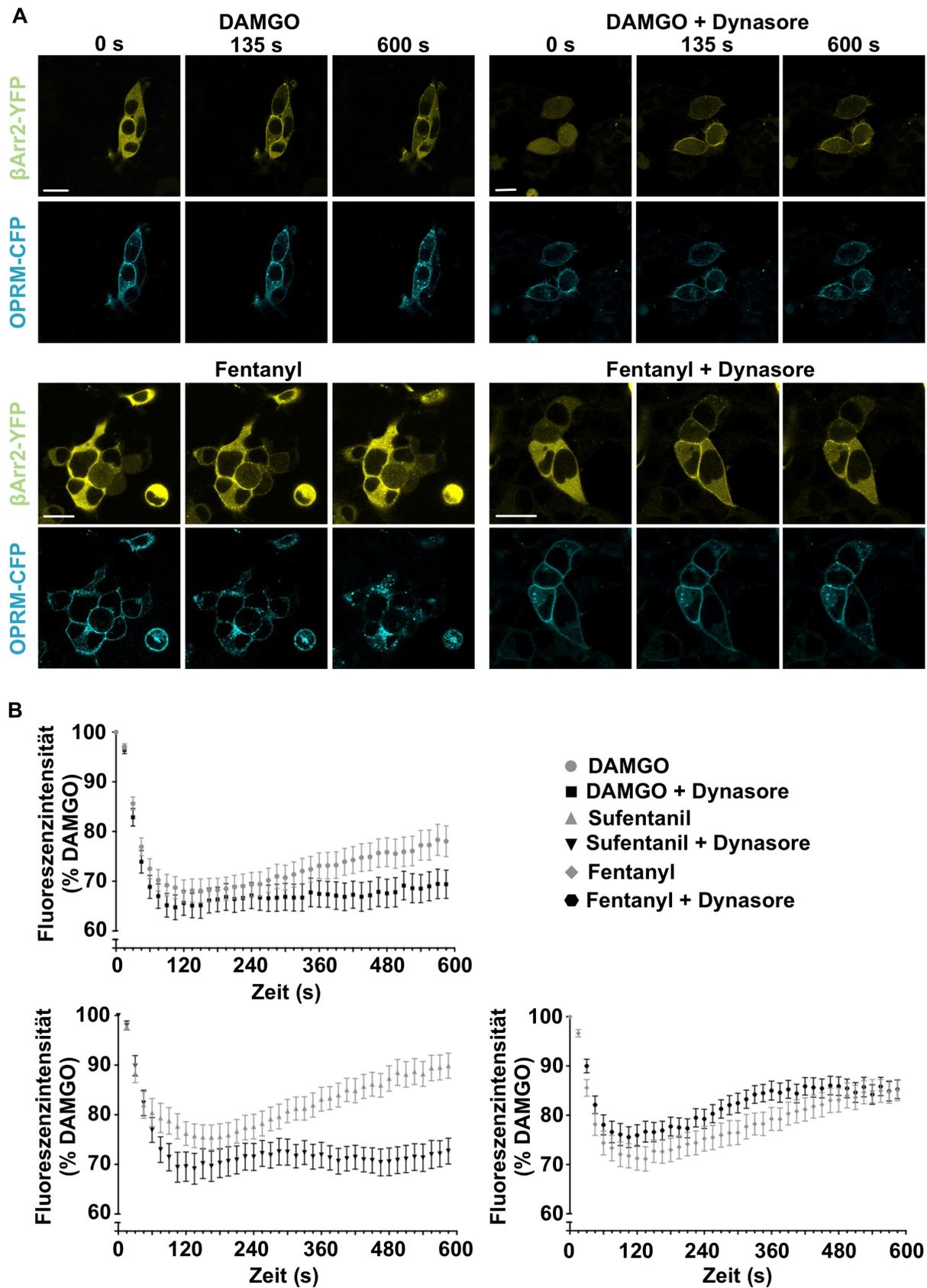


Abb. 10: Inhibition der Rezeptorendozytose durch Dynasore. **A** Repräsentative Konfokalbilder. Für DAMGO und Fentanyl ohne Zugabe von Dynasore zeigt sich im YFP-Kanal nach maximaler Arrestinrekrutierung an den OPRM nach 135 s im Verlauf eine Abnahme des membrangebundenen β -Arrestin-2-YFP. Im CFP-Kanal ist am Ende der Messung eine deutliche Internalisierung des Rezeptors

erkennbar. Mit Zugabe von Dynasore verbleibt bei DAMGO das β -Arrestin2-YFP auch nach 600 s an der Membran, eine Vesikelformation des OPRM-CFP an der Membran ist erkennbar, die Abschnürung ins Zytosol wird größtenteils unterdrückt. Für Fentanyl zeigen sich keine Veränderung zur Messung ohne Dynasore. **B** Graphische Darstellung der Messungen mit und ohne Dynasore für DAMGO, Sufentanil und Fentanyl. Für DAMGO und Sufentanil kann der Fluoreszenzanstieg durch Dynasore unterdrückt werden, für Fentanyl nicht. Maßstab entspricht 20 μ m.

Daher wurde als alternative Methode zur Unterdrückung der Rezeptorendozytose die Dynamin-negativ-Mutante Dynamin K44A verwendet. Mit der zusätzlichen Transfektion der Dynamin-Mutante verloren die Zellen jedoch ihre physiologische Morphologie. Diese Zellen waren deutlich abgerundet mit zum Teil spitzen Zytoplasmaausläufern und wiesen eine inhomogene Verteilung des zytosolischen β -Arrestin2 und vermehrte zytosolische Anreicherung des OPRM auf, was letztendlich eine quantitative Bestimmung eines erneuten zytosolischen Arrestinanstiegs als auch die Beurteilung der Rezeptorendozytose verhinderte, auch wenn eine Arrestintranslokation an die Membran zu beobachten war. (**Abb. 11**).

Obwohl für Fentanyl keine Unterdrückung der Rezeptorendozytose mittels Dynasore erzeugt werden konnte, kann durch die Versuche mit DAMGO und Sufentanil davon ausgegangen werden, dass das Minimum der Fluoreszenzintensitätskurve die maximale β -Arrestin2 Rekrutierung darstellt. Daher konnte der 135-Sekunden-Wert bzw. 330-Sekunden-Wert für Morphin und Oxycodon als Vergleichswert des Rekrutierungsverhalten der einzelnen Opiode verwendet werden. **Abb. 12** zeigt diese Werte in Relation zu DAMGO und bestätigt die Einteilung in Vollagonisten / starke Partialagonisten, Partialagonisten und Antagonisten.

Um die Pharmakoneffekte am OPRM genauer vergleichen zu können, sind zusätzlich Konzentrations-Wirkungs-Kurven von Relevanz. Dies war das nächste Ziel der vorliegenden Arbeit.

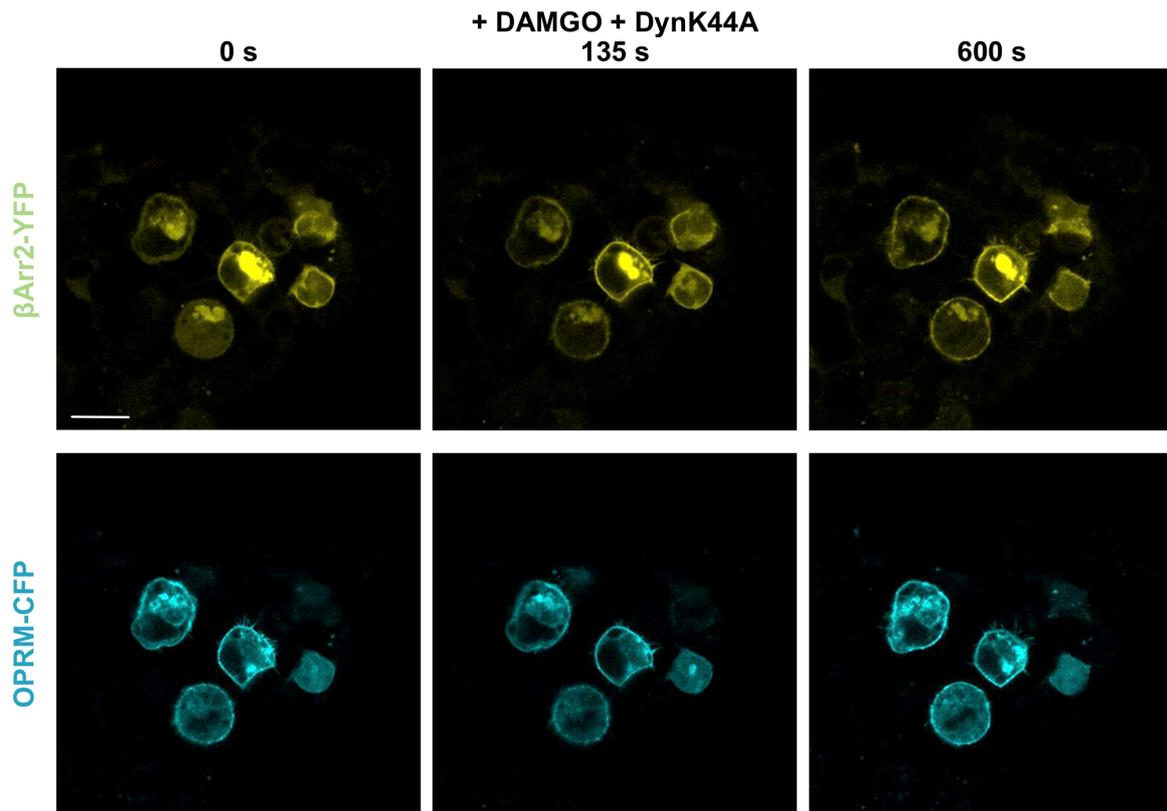


Abb. 11: Hemmung der Rezeptorendozytose durch Dynaminegativ-Mutante K44A. Starke morphologische Veränderungen mit Abrundung der Zellen und inhomogener zytosolischer Arrestinverteilung sowie vermehrter zytosolischer OPRM Anreicherung. Sichtbare β -Arrestin2-YFP-Translokation zum Rezeptor. Maßstab entspricht 20 μ m.

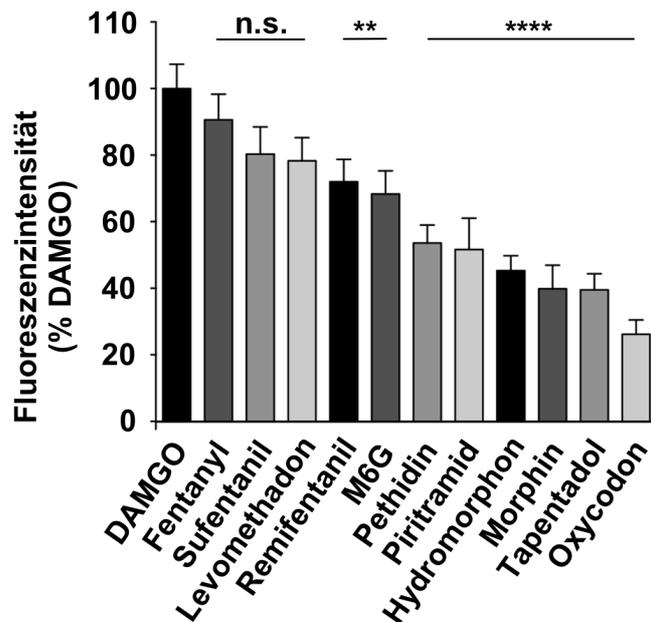


Abb. 12: Maximale β -Arrestin2-Rekrutierung in Relation zu DAMGO. Darstellung als Mittelwert + SEM 135 Sek. bzw. für Morphin und Oxycodon 330 Sek. nach Liganden-Zugabe. Fentanyl, Sufentanil und Methadon zeigen keinen signifikanten Unterschied zu DAMGO, während Remifentanil und M6G

eine signifikant geringere Arrestinrekrutierung induzieren. Ein weiterer Signifikanzsprung ist für Pethidin, Piritramid, Hydromorphon, Morphin, Tapentadol und Oxycodon zu beobachten, welche daher als Partialagonisten klassifiziert werden. Für Tramadol, Buprenorphin, Tilidin, Naloxon, Naltrexon und die Negativ-Kontrolle mit Messpuffer ist keine Rekrutierung messbar, weshalb die Substanzen zu Übersichtszwecken nicht dargestellt sind. Signifikanzanalyse durch One-way ANOVA. ns, nicht signifikant, $p > 0,05$; **, $p < 0,01$; ****, $p < 0,0001$

3.2 Biolumineszenz-Messung

3.2.1 Assay-Etablierung

Um die großen Datenmengen der Konzentrations-Wirkungs-Kurven 16 verschiedener Opioiden effizient erfassen zu können, wurde ein Hochdurchsatz Biolumineszenz-Assay verwendet. Die Ozawa-Arbeitsgruppe hat eine stabile HEK293 Zelllinie entwickelt, welche eine gespaltene Schnellkäfer Luciferase enthält, von der je ein Fragment genetisch an β -Arrestin2 bzw. den OPRM gekoppelt ist.¹³⁹ Bei Interaktion von β -Arrestin2 und OPRM kommt es zur Komplementierung der Luciferase und durch Umsetzen von vorhandenem Substrat zur Entstehung von Lumineszenz, welche quantitativ gemessen werden kann. Dass es sich hierbei um einen konzentrationsabhängigen-Prozess handelt – d.h. ein höheres Signal je mehr Arrestin rekrutiert wird – wurde bereits von der Ozawa-Gruppe für verschiedene GPCRs u.a. den β 2-adrenerger Rezeptor, Cholecystokinin B Rezeptor und Somatostatin Typ 2 Rezeptor beschrieben,^{139,146} jedoch zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht für den OPRM. Daher musste auch hierfür zunächst entsprechender Assay etabliert werden. Um in diesem Biolumineszenz-Assay ein ausreichend hohes Signal zu generieren, wurde in iterativen Experimenten eine Zellzahl von 800.000 Zellen/ μ l als geeignet ermittelt. Durch die Zugabe von 10 % statt 1 % FCS konnte das Signal zusätzlich verstärkt werden, während die Zellen gleichzeitig mikroskopisch ein homogeneres Wachstum zeigten.

Um die optimale Inkubationszeit der Opioid-Lösung zu ermitteln, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Referenzsubstanz DAMGO inkubiert und die Lumineszenz nach unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen (**Abb. 13A**). Für alle angewendeten Konzentrationen konnte nach 12 Min. Inkubation das stärkste Signal detektiert werden. Eine längere Inkubationszeit führte nicht zu weiterem Signalanstieg. Die Inkubationszeit für Bright-Glo™ Reagent wurde mit der nach Herstellerangaben zur Zellyse benötigten Mindestdauer von 2 Min. beibehalten. Eine längere Inkubationszeit führte zum Signalverlust (**Abb. 13B**). Durch die o.g.

Optimierungen konnten für DAMGO reproduzierbare Konzentration-Wirkungs-Kurven erstellt werden, sodass im nächsten Schritt die Messung der 16 ausgewählten Opiode erfolgen konnte.

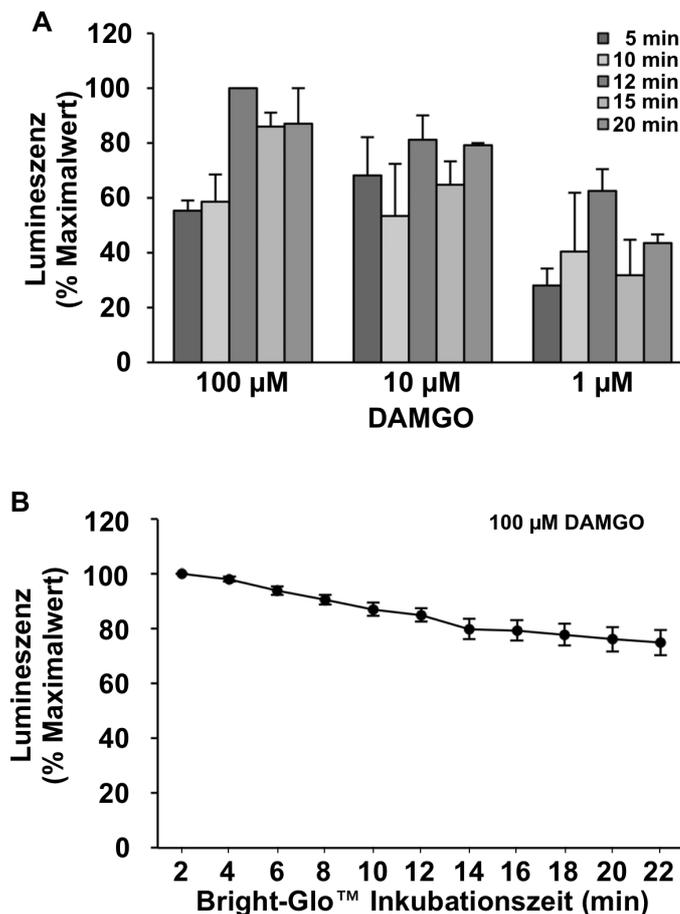


Abb. 13: Bestimmung der Inkubationszeiten des Luciferase-Komplementierungs-Assays. A Liganden-Inkubationszeit: Maximale Lumineszenz für unterschiedliche Inkubationszeiten mit DAMGO 1 µM, 10 µM und 100 µM. Höchstes Signal nach 12 Min, n=2. **B** Substrat-Inkubationszeit: Maximale Lumineszenz für unterschiedliche Inkubationszeiten für Bright-Glo Reagent nach Applikation von 100 µM DAMGO. Höchstes Signal nach 2 Min. mit abnehmender Lumineszenz über die Zeit, n=19. Darstellung als Mittelwert ± SEM.

3.2.2 Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Für jeden Liganden wurden vier unabhängige Experimente, jeweils als Duplikat, durchgeführt. Exemplarisch sind in **Abb. 14** jeweils die vier Konzentrations-Wirkungs-Kurven für DAMGO, Remifentanyl, Piritramid und Tilidin dargestellt. Die Einzelmessungen zeigten robuste Daten mit hohem dynamischen Umfang, wodurch auch Effekte mit geringer Amplitude zuverlässig detektiert werden konnten.

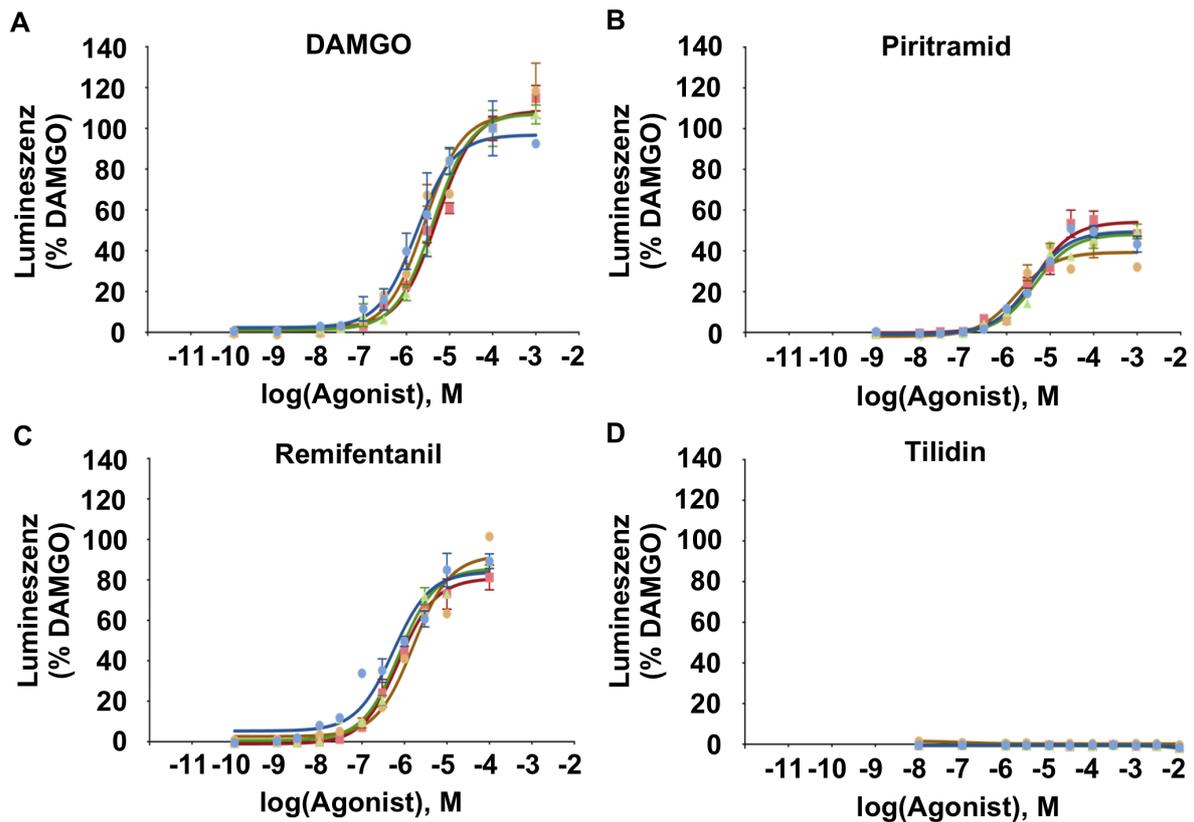


Abb. 14: Konzentrations-Wirkungskurven der β -Arrestin2-Rekrutierung einzelner Liganden zum OPRM. Vier unabhängige Einzelerperimente als Duplikat, exemplarische Abbildung für DAMGO (A), Piritramid (B), Remifentanyl (C) und Tilidin (D), Darstellung als Mittelwert \pm S.E.M in Relation zu DAMGO.

Wie auch im Konfokalmikroskopie Assay zeigte DAMGO die höchste Maximalwirkung. Vergleichbare Wirksamkeit konnte von Remifentanyl, Levomethadon und Sufentanyl erreicht werden (**Abb. 15**). Für Tramadol, Tilidin, Buprenorphin und die Antagonisten Naloxon und Naltrexon konnte auch in hoher Konzentration keine Lumineszenz detektiert werden. Die höchste Potenz zeigte Sufentanyl mit EC_{50} 2 log-Stufen kleiner als DAMGO gefolgt von Remifentanyl und Fentanyl mit 1 log-Stufe Unterschied. **Tab. 1** zeigt die $E_{max} \pm SEM$ für Konfokalmikroskopie und Luciferase-Assay sowie die EC_{50} -Werte im Luciferase-Assay für die verwendeten Liganden.

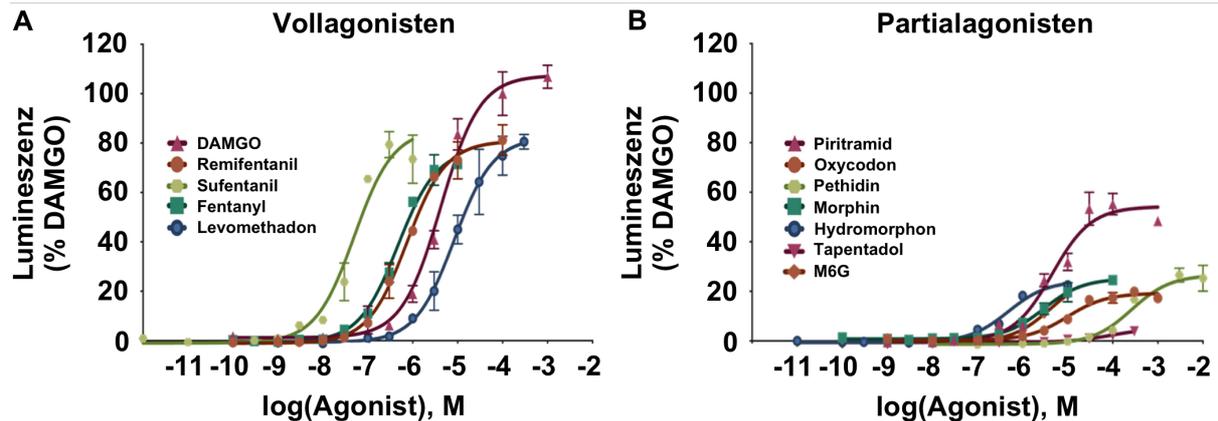


Abb. 15: Konzentrations-Wirkungs-Kurven der β -Arrestin2-Rekrutierung aller Liganden mit detektierbarer Lumineszenz in Relation zu DAMGO. Darstellung als Mittelwert \pm S.E.M, $n=4$. Liganden ohne Lumineszenzinduktion sind aus Übersichtsgründen nicht dargestellt (Tilidin, Tramadol, Buprenorphin, Naloxon, Naltrexon)

3.3 Ergebnisvergleich Konfokal- und Luciferase-Assay

Vergleicht man die Maximalwirkung der verschiedenen Liganden in den beiden durchgeführten Assays, so zeigt sich weitestgehend eine Übereinstimmung der Daten. Für Fentanyl, Morphin, M6G, Pethidin und Tapentadol waren die Abweichungen jedoch größer 10 % - hier war jeweils eine höhere E_{max} in der Konfokalmikroskopie gemessen worden. Die in der Konfokalmikroskopie als Antagonisten klassifizierten Liganden Buprenorphin, Tramadol, Tilidin, Naloxon und Naltrexon zeigten auch im Luciferase-Assay keine messbare Lumineszenz und bestätigten somit die Ergebnisse. Im Vergleich zur Konfokalmikroskopie ist die Kinetik der Arrestinrekrutierung in der Biolumineszenz-Messung deutlich langsamer: 135 bzw. 330 Sek. in der Konfokalmikroskopie gegenüber 12 Min. im Luciferase-Assay.

Ligand	Konfokalmikroskopie		Luciferase-Assay	
	E_{max}, \pm S.E.M	E_{max}, \pm S.E.M	EC_{50} [95% KI], μ M	$\log EC_{50}$
Buprenorphin	0,00	0,00	-	-
DAMGO	100 \pm 7,30	103,3 \pm 2,93	3,18 [1,46 – 6,92]	-5,74
Fentanyl	90,59 \pm 7,73	59,22 \pm 8,23	0,41 [0,29 – 0,57]	-6,39
Hydromorphon	45,33 \pm 4,43	20,59 \pm 2,67	0,36 [0,22 – 0,61]	-6,44
Levomethadon	78,29 \pm 6,94	82,10 \pm 5,36	5,32 [1,99 – 14,22]	-5,27

Morphin	39,85 ± 7,10	24,59 ± 3,04	2,96 [1,77 – 4,94]	-5,52
M6G	68,32 ± 6,96	21,58 ± 2,08	4,30 [2,97 – 6,19]	-5,37
Naloxon	0,00	0,00	-	-
Naltrexon	0,00	0,00	-	-
Oxycodon	24,19 ± 2,29	22,09 ± 2,99	19,54 [8,79 – 40,36]	-4,71
Pethidin	53,69 ± 5,40	25,79 ± 3,33	253,51 [237,68 – 271,02]	-3,60
Piritramid	51,63 ± 9,44	48,78 ± 2,76	3,36 [1,61 – 6,98]	-5,47
Remifentanil	71,99 ± 6,73	83,84 ± 2,34	0,84 [0,40 – 1,75]	-6,08
Sufentanil	80,29 ± 8,16	77,99 ± 8,10	0,04 [0,02 – 0,08]	-7,40
Tapentadol	39,54 ± 4,81	6,99 ± 1,16	114,55 [38,99 – 337,29]	-4,94
Tilidin	0,00	0,00	-	-
Tramadol	0,00	0,00	-	-

Tab. 1: Pharmakologische Eigenschaften von 17 Opioidrezeptor-Liganden für die β -Arrestin2-Rekrutierung zum OPRM. Angabe der maximalen β -Arrestin2 Rekrutierung des Konfokalmikroskopie- und Luciferase-Assays als $E_{max} \pm S.E.M.$ in Relation zu DAMGO sowie der im Luciferase-Assay ermittelten Potenz als EC_{50} mit 95% Konfidenzintervall (KI) in μM und in logarithmischer Darstellung als $\log EC_{50}$.

Zusammenfassend zeigen die untersuchten Opioide ein inhomogenes Spektrum der β -Arrestin2-Rekrutierung. Interessanterweise zeigte sich in beiden Assays eine fehlende Arrestinrekrutierung für die klinisch häufig in der Schmerzmedizin eingesetzten Substanzen Buprenorphin, Tramadol und Tilidin.

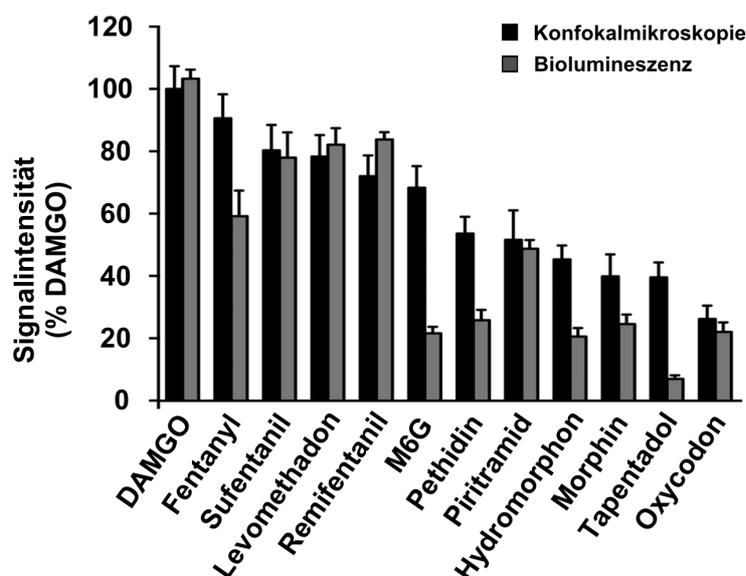


Abb. 16: Vergleich der maximalen β -Arrestin2-Rekrutierung im Konfokal- und Biolumineszenz-Assay. Signalintensität als Mittelwert relativ zur Referenzsubstanz DAMGO $\pm S.E.M.$ Für Buprenorphin, Tramadol, Tilidin, Naloxon und Naltrexon konnte in beiden Assays keine Arrestinrekrutierung detektiert werden, weshalb die Substanzen nicht abgebildet sind.

4 DISKUSSION

Opioide zählen zu den potentesten Analgetika im klinischen Einsatz. Ihre Anwendung findet Limitierung durch Toleranzentwicklung und anderen Nebenwirkungen einschließlich Atemdepression, Obstipation und Entzugerscheinungen.⁶⁰ Die Regulierung des μ -Opioidrezeptors und damit einhergehend des β -Arrestin-Signalwegs mit nachgeschalteter Rezeptorendozytose spielt eine Schlüsselrolle bei der Toleranzentwicklung, wobei die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen bis heute nicht abschließend geklärt sind.^{61,104,109,147} Untersuchungen mit β -Arrestin2-Knockout Mäusen legten eine positive Korrelation mit der Aktivierung des β -Arrestin-Signalwegs und dem Nebenwirkungsspektrum nahe.^{90,91} Somit entstanden Bestrebungen spezifische Liganden zu identifizieren, die selektiv das G_i -Protein aktivieren bei fehlender oder geringer Aktivierung von β -Arrestinen. Die Liganden-abhängige Bevorzugung eines bestimmten Signaltransduktionsweges gegenüber anderen möglichen Signaltransduktionswegen bezeichnet man als funktionelle Selektivität oder „biased agonism“ und ist Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Diskussion.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher 17 Opioid-Liganden hinsichtlich des β -Arrestin2-Signalwegs untersucht. Bei den verwendeten Liganden handelt es sich um 13 klinisch häufig applizierte Opioid-Analgetika und zwei μ -Opioidrezeptor Antagonisten Naloxon und Naltrexon. Zudem wurde der aktive Hauptmetabolit von Morphin, Morphin-6-Glucuronid (M6G), eingesetzt um an vorangegangene Untersuchungen aus dem gleichen Institut anzuschließen.¹⁴³ Als Referenzsubstanz wurde der in der Literatur gängige synthetische Peptidagonist DAMGO verwendet, der als Vollagonist sowohl für den G_i - als auch für den β -Arrestin-Signalweg fungiert.

Zunächst wurde mittels Konfokalmikroskopie die β -Arrestin2-Rekrutierung zum μ -Opioidrezeptor sowie die Rezeptorendozytose untersucht und anschließend durch einen Biolumineszenz-Assay Konzentrations-Wirkungs-Kurven für die β -Arrestin2 Rekrutierung erstellt. Im folgenden Kapitel sollen die erhobenen

Ergebnisse interpretiert und in den Kontext aktueller Forschungsergebnisse gestellt werden. Zudem werden methodische Limitationen beleuchtet sowie ein Ausblick auf mögliche Anwendungsgebiete gegeben.

4.1 Pharmakologische Parameter im Vergleich

Die Liganden-induzierte β -Arrestin2-Rekrutierung zum OPRM wurde bereits in der Vergangenheit von unterschiedlichen Autoren mit verschiedenen Methoden quantifiziert. Häufig erfolgte die Bestimmung mit dem Ziel der Berechnung von funktioneller Selektivität am OPRM. Ein breites Spektrum von Opioiden mit Überlappung der hier eingesetzten Liganden wurden von Molinari et al. und McPherson et al. mittels Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) bzw. mit einem Enzym-Komplementierungsbasiertem Assay (PathHunter®) getestet.^{141,148} In beiden Arbeiten wurde GRK2 nicht überexprimiert. Dr. Benedikt Schmid, Mitglied der gleichen Arbeitsgruppe, in der die vorliegende Arbeit entstand, hat ebenfalls zur Berechnung von funktioneller Selektivität die β -Arrestin2-Rekrutierung mittels NanoBRET® untersucht, bei dem eine optimierte Tiefseegarnelen Luciferase an OPRM und ein HaloTag an β -Arrestin gekoppelt war.¹⁴⁹ Hierbei wurden die gleichen 17 Liganden sowohl mit als auch ohne GRK2 Überexpression getestet. Diese Ergebnisse sind bislang im Rahmen der zugrundeliegenden naturwissenschaftlichen Dissertation veröffentlicht.¹⁴⁹

Vergleicht man nun zunächst die in der vorliegenden Arbeit erhobene maximale β -Arrestin2-Rekrutierung (E_{max}) der Konfokalmikroskopie und des Luciferase-Assays, so zeigt sich eine gute Übereinstimmung für einen Großteil der Liganden. Für Fentanyl, Morphin, M6G, Pethidin und Tapentadol konnten jedoch in der Konfokalmikroskopie höhere E_{max} -Werte bestimmt werden. Eine gute Erklärung hierfür ist die Überexpression von GRK2 in dem Konfokalmikroskopie Assay. Diverse Autoren konnten bereits zeigen, dass durch eine GRK2-Überexpression sowohl Wirkstärke als auch Potenz eines Liganden gesteigert werden können.^{112,113,150} Diese Arbeiten zeigen aber auch, dass das Steigerungspotential nicht für alle Liganden gleich ist, sondern dass insbesondere schwache Partialagonisten von einer GRK2 Überexpression profitieren, was gut mit den vorliegenden Daten übereinstimmt. Für das geringere

Signal von Morphin im Luciferase-Assay könnte auch eine zu kurz gewählte Inkubationszeit verantwortlich sein, da zur Bestimmung des Inkubationszeitpunktes lediglich die Referenzsubstanz DAMGO getestet wurde. Morphin und Oxycodon zeigen jedoch eine langsamere Kinetik als DAMGO in der Konfokalmikroskopie. Die E_{\max} von Oxycodon stimmt jedoch in beiden Assays gut überein.

Vor dem Hintergrund der fehlenden GRK2 Überexpression zeigt sich eine sehr gute Korrelation der E_{\max} des Luciferase Assays mit der ermittelten E_{\max} von Molinari et al. und McPherson et al. sowie mit dem Datensatz von Dr. Benedikt Schmid ohne GRK2 Ko-Transfektion, wie in **Tab. 2** dargestellt. Zu beachten ist, dass McPherson als Referenzsubstanz Alfentanil verwendet hat und DAMGO hier mit einer relativen E_{\max} von 1,24 als Superagonist agiert. Würden die Daten also auf DAMGO normiert werden, müssten die hier aufgeführten Werte etwas niedriger liegen. Für Molinari et al. verhält sich die Situation entgegengesetzt. Hier wurde auf [D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin (DADLE) normiert und DAMGO reagiert als starker Partialagonist, die Werte würden in Relation zu DAMGO also etwas höher liegen. Eine deutliche Diskrepanz ergibt sich jedoch für Tapentadol, welches bei Dr. Benedikt Schmid mit einer E_{\max} von 0,74 als starker Partialagonist reagierte, während im Luciferase-Assay lediglich eine E_{\max} von 0,07 gemessen werden konnte. Allerdings erreichte Tapentadol im Luciferase-Assay kein Plateau in der Konzentrations-Wirkungs-Kurve, sodass das Fehlen einer sättigenden Konzentration Erklärung hierfür sein kann, wobei es sich bereits um die vom Hersteller höchstmöglich verfügbare Konzentration handelte. Ebenso konnte McPherson et al. für Pethidin kein signifikantes Signal erzielen. Dies liegt vermutlich an der zu geringen Höchstkonzentration von 100 μM , während in dieser Arbeit die Zellen mit einer 10 mM Lösung stimuliert wurden und eine signifikante Antwort erst ab der Zugabe von 1 mM Lösung erreicht wurde. Eine offensichtliche Erklärung, warum Molinari et al. eine geringe Signalantwort für Buprenorphin messen konnte, wohin gegen Buprenorphin in allen anderen Datensätzen als Antagonist fungiert, ergibt sich nicht.

Die E_{\max} -Daten der Konfokalmikroskopie hingegen korrelieren gut mit den von Dr. Benedikt Schmid erhobenen Werten mit Überexpression von GRK2, wobei die

E_{\max} bei Dr. Benedikt Schmid tendenziell etwas höher liegen. Dr. Benedikt Schmid schloss mittels Western Blot eine unterschiedlich Basis-Expression von GRK2 in den von ihm verwendeten HEK293 Zellen und den in diesem Luciferase Assay verwendeten HEK293 ELucC-OPRM1/ARRB2-ELucN Zellen aus, sodass hier ein vergleichbares GRK2 Expressionsniveau vorliegt. Daten zu Quantifizierung von GRK2 nach Überexpression in den von Dr. Benedikt Schmid verwendeten HEK293 Zellen und den in dieser Arbeit für die Konfokalmikroskopie eingesetzten HEK293 Zellen existieren jedoch nicht, sodass möglicherweise das Expressionslevel bei Dr. Benedikt Schmid höher war und dies somit ein Grund für die höher erzielte E_{\max} sein könnte. Interessanterweise reagierte Tramadol durch die Überexpression von GRK2 bei Dr. Benedikt Schmid als schwacher Partialantagonist, während es ohne Überexpression als Antagonist fungierte. Möglicherweise ist in diesem Fall die Konfokalmikroskopie dem BRET Assay in der Sensitivität methodisch unterlegen, denn hier ist für Tramadol trotz Überexpression von GRK2 kein Signal messbar.

	McPherson	Molinari	Schmid ohne GRK2	Schmid mit GRK	Diese Arbeit Konfokal	Diese Arbeit Luciferase
DAMGO	1,24	0,89	0,97	0,98	1	1,03
Buprenorphin	0	0,02	0	0	0	0
Fentanyl	0,89	0,77	0,73	1,05	0,91	0,59
Levomethadon	1,14		0,80	1,13	0,78	0,82
Morphin	0,19	0,24	0,28	0,83	0,40	0,25
Oxycodon	0,18		0,05	0,68	0,26	0,22
Pethidin	- **	0,41*	0,21*	1,14	0,53	0,26
Hydromorphon			0,08	0,72	0,45	0,21
M6G			#	0,91	0,68	0,22
Naloxon			0	0	0	0
Naltrexon			0	0	0	0
Piritramid			0,08	0,88	0,52	0,49
Remifentanyl			0,74	1,20	0,71	0,84
Sufentanyl			0,56	0,97	0,80	0,79
Tapentadol			0,74	1,2	0,40	0,07*
Tilidin			#	#	0	0
Tramadol			0	0,34	0	0

Tab. 2: Maximalwirkung der β -Arr2-Rekrutierung (E_{\max}) im Vergleich zu aktueller Literatur. Daten von McPherson in Relation zu Alfentanyl, von Molinari in Relation zu DADLE, alle anderen Daten in Relation zu DAMGO. * In der Anpassung der Konzentrations-Wirkungs-Kurve konnte

kein Plateau erzielt werden. ** Bestimmung nicht möglich, da entweder keine Maximalantwort oder keine signifikante Antwort erreicht werden konnte bei der höchst eingesetzten Liganden-Konzentration. # keine Daten aufgrund von Lieferengpässen der Liganden. Daten zitiert aus McPherson¹⁴¹, Molinari¹⁴⁸ und Dr. Benedikt Schmid¹⁴⁹.

Betrachtet man nun die Potenz gemessen am EC₅₀-Wert, so zeigt sich auch hier unter vergleichbaren Bedingungen eine gute Übereinstimmung der Daten. Wie in **Tab. 3** ersichtlich unterscheiden sich die EC₅₀ Werte nicht mehr als eine log Stufe.

	McPherson	Molinari	Schmid ohne GRK		Schmid mit GRK		Diese Arbeit	
	EC ₅₀	log EC ₅₀	EC ₅₀	logEC ₅₀	EC ₅₀	log EC ₅₀	EC ₅₀	logEC ₅₀
DAMGO	414	-6.7	749	-6.13	106	-6.98	3178	-5.74
Buprenorphin	-	-7.2	-	-	-	-	-	-
Fentanyl	210	-6.6	96.4	-7.02	42.0	-7.38	406	-6.39
Levomethadon	2110		886	-6.05	233	-6.63	5310	-5.27
Morphin	322	-6.4	632	-6.20	390	-6.41	2958	-5.52
Oxycodon	1469		3090	-5.51	1090	-5.96	19543	-4.71
Pethidin	-	-3.2	393000	-3.41	116000	-3.94	253513	-3.60
Hydromorphon			208	-6.68	32.8	-7.38	362	-6.44
M6G			#	#	313	-6.51	4295	-5.37
Naloxon			-	-	-	-	-	-
Naltrexon			-	-	-	-	-	-
Piritramid			338	-6.47	117	-6.93	3357	-5.47
Remifentanyl			191	-6.72	29.2	-7.53	838	-6.08
Sufentanyl			15.4	-7.81	6.75	-8.17	838	-7.40
Tapentadol			8000	-5.1	265	-6.58	39	-4.94
Tilidin			#	#	#	#	-	-
Tramadol			-	-	78800	-4.10	-	-

Tab. 3: Potenzen der β -Arr2-Rekrutierung (EC₅₀) im Vergleich zu aktueller Literatur. Liganden-Konzentrationen in nm. # keine Daten aufgrund von Lieferengpässen der Liganden. Daten zitiert aus McPherson¹⁴¹, Molinari¹⁴⁸ und Dr. Benedikt Schmid¹⁴⁹.

Auch die Kinetik mit einer maximalen Arrestinrekrutierung nach 2 Min. in der Konfokalmikroskopie korreliert gut mit den ergänzenden FRET Messungen von McPherson et al. (in denen GRK2 überexprimiert war). Auch wenn McPherson keine quantitative Angabe zur Kinetik gemacht hat, kann diese von den abgebildeten FRET Spuren entnommen werden und die E_{max} wird für DAMGO ebenfalls nach ca. 2 Min. und für Morphin nach etwa 3,5 Min. erreicht und bestätigen somit die in der Konfokalmikroskopie beobachtete langsamere Kinetik von Morphin. Für Oxycodon, dem zweiten Liganden mit einer deutlich

verzögerten Kinetik, sind nach dem Kenntnisstand der Autorin bislang keine vergleichbaren kinetischen Daten verfügbar. Im Vergleich mit vorangegangenen Experimenten am β -adrenergen Rezeptor ist der zeitliche Verlauf ebenfalls in Einklang.^{31,106} Die deutlich langsamere Kinetik in dem Luciferase-Assays bestätigt die Annahme, dass die Geschwindigkeit der β -Arrestin/Rezeptor-Interaktion durch die GRK-abhängige Phosphorylierung gesteigert werden kann.^{24,31}

Zusammenfassend ergibt sich ein differenziertes Bild der β -Arrestin2-Rekrutierung für die untersuchten Liganden. Die erhobenen Daten erscheinen sowohl in sich selbst als auch in Zusammenschau mit aktueller Literatur schlüssig.

4.2 Rezeptorinternalisierung

Lebendzell-Konfokalmikroskopie erlaubt im Vergleich zu biochemischen Assays eine räumliche und zeitliche Auflösung der zu untersuchenden Prozesse. Durch Untersuchung an vitalen Zellen erfolgt die Messung unter physiologischen Bedingungen des zellulären Proteoms. Dies erlaubt Beobachtungen, die einem klassischen biochemischen Assay vorenthalten sind.

Auffallend in den durchgeführten konfokalmikroskopischen Untersuchungen war der erneute zytosolische Anstieg des β -Arrestin2-YFP Signals nach Durchlaufen eines Minimums im Rahmen der Rekrutierung zum Rezeptor. Dies war bislang an Untersuchungen des β 2-adrenergen oder P2Y-Rezeptors mit vergleichbarem Versuchsaufbau nicht beschrieben, hier blieb das zytosolische Signal nach Erreichen des Minimums auf einem Plateau konstant.^{25,31} Dieser Anstieg war insbesondere bei Liganden zu beobachten, die im CFP Kanal nachfolgend an die Arrestinrekrutierung eine ausgeprägte punktförmige Verlagerung des initial membranständigen Rezeptors ins Zytosol zeigten, was vereinbar mit einer Rezeptorendozytose ist. Agonisten-induzierte Rezeptorinternalisierung durch Clathrin-beschichtete Vesikel ist abhängig von β -Arrestinen mit ihren Bindungsdomänen für Komponenten der Endozytosemaschinerie wie Adaptorprotein-2 und Clathrin.^{50,51} Oakley et al. konnte zwei Klassen von GPCR

unterscheiden: Klasse A GPCRs, zu denen der OPRM zählt, bei der β -Arrestine mit niedriger Affinität an den Rezeptor binden und nach Ubiquitinierung leicht vom Rezeptor dissoziieren.^{106,151} Im Gegensatz dazu formieren bei Klasse B GPCRs Rezeptor und β -Arrestin einen stark gebundenen Komplex mit überwiegender Degradierung im Lysosom. Diese Klassifikation ist nicht mit der gebräuchlichen strukturellen Einteilung von GPCRs zu verwechseln, welche ebenfalls die Terminologie Klasse A, B, C etc. verwendet.^{3,5} Somit ist bei Liganden mit ausgeprägter Rezeptorinternalisierung wie bei DAMGO, Sufentanil oder Fentanyl beobachtet, eine Rückverlagerung von β -Arrestin im Rahmen der Clathrin-vermittelten Endozytose ins Zytosol mit einhergehendem Signalanstieg naheliegend. Ob dabei β -Arrestin2 noch an den OPRM gebunden ist, lässt sich nicht abschließend beurteilen, hierfür wären weiterführende Ko-Lokalisationsstudien interessant. Dazu passend zeigte Morphin bei geringer Rezeptorinternalisierung keinen zytosolischen YFP-Signalanstieg, was in Einklang mit zahlreichen *in vitro* Studien ist, in denen Morphin keine oder nur geringe Rezeptorendozytose induzieren konnte.^{144,147,152} Diskrepanz zu bisher veröffentlichten Daten verhält sich die Situation für Levomethadon, dessen Kurve der maximalen β -Arrestin2-Translokation wie Morphin auf einem Plateau verblieb und visuell nur eine geringe Rezeptorendozytose zeigte. Sowohl McPherson et al. als auch Koch et al. wiesen für Levomethadon in direkter Messung der Rezeptorinternalisierung mittels ELISA eine deutliche Rezeptorendozytose in vergleichbarem Ausmaß mit Fentanyl oder DAMGO nach.^{141,147} Letztendlich erfolgte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch keine quantitative Bestimmung der Rezeptorendozytose, da die Assay-Bedingungen zur Quantifizierung der β -Arrestin2-Rekrutierung optimiert waren, sodass die erhobenen Daten zur Beurteilung der Rezeptorendozytose methodisch unterlegen sind. Schließlich ist auch nicht auszuschließen, dass im Vergleich zum Rezeptorwildtyp durch Klonierung des Fluoreszenzproteins an das C-terminale Ende des Rezeptors aufgrund sterischer Hinderung andere Konformationszustände durch den Liganden induziert werden. Dadurch könnten mögliche Phosphorylierungsstellen und weitere für die Endozytose relevante

Bindungsstellen verlegt sein, was Assay-bedingte Unterschiede im Endozytoseverhalten erklären könnte.

Dynasore ist ein zellpermeabler Inhibitor der GTPasen Dynamin I, Dynamin II und Drp I, die im Rahmen der Endozytose an der Abschnürung des Clathrin-beschichteten Vesikels von der Plasmamembran beteiligt sind.^{53,145} Durch Hemmung der Clathrin-vermittelten Rezeptorendozytose unter Verwendung von Dynasore konnte der Fluoreszenzanstieg für DAMGO und Sufentanil unterbunden werden, sodass der Zusammenhang zwischen zytosolischem YFP-Signalanstieg und Rezeptorinternalisierung wahrscheinlich ist. Das Ausmaß der β -Arrestin2-Rekrutierung blieb dabei unbeeinträchtigt. Erstaunlich war die fehlende Inhibition der zytosolischen YFP-Zunahme durch Dynasore bei Fentanyl, das ebenfalls eine starke Rezeptorinternalisierung zeigte. Eine mögliche Erklärung könnte eine weniger starke Komplexbildung von Fentanyl-OPRM/ β -Arrestin2 gegenüber DAMGO- bzw. Sufentanil-OPRM/ β -Arrestin2 sein. Liganden-abhängige Rezeptorinternalisierung ist durch eine konservierte zehn Aminosäuren lange Sequenz am C-terminalen Rezeptorende bestimmt. Multiphosphorylierung dieser Sequenz ist für die Endozytose nötig, wobei eine hierarchische Phosphorylierung mit Serin-375 als Schlüsselaminosäurerest erfolgt, gefolgt von nachrangigen Phosphorylierungsstellen.¹¹⁰ DAMGO phosphoryliert Serin-375 via GRK2 und GRK3,¹¹¹ während Fentanyl dies vorrangig via GRK3 tut.¹⁵³ Nachdem lediglich GRK2 überexprimiert wurde, kann es sein, dass die endogene GRK3 Konzentration der HEK293 Zellen der limitierende Faktor einer unzureichenden Rezeptorphosphorylierung unter Fentanyl war. Da die Anzahl der Phosphatreste entscheidend für die Rezeptor/Arrestin-Komplexaffinität ist,²⁹ könnte dies also Erklärung für eine schnellere Dissoziation von β -Arrestin2 vom Rezeptor sein, sodass β -Arrestin auch unabhängig von der Rezeptorendozytose - und somit auch unabhängig von der Hemmung dieser - wieder zytosolisch zur Verfügung steht. Schließlich ist denkbar, dass durch die Hemmung der Clathrin-vermittelten Endozytose möglicherweise Clathrin- und Dynamin-unabhängige Endozytosemechanismen kompensatorisch erhöht werden, wobei hierzu bislang für den μ -Opioidrezeptor nur unzureichend Daten veröffentlicht sind.¹⁵⁴

Um die Dynamin-Abhängigkeit weiter zu untersuchen, erfolgte die Ko-Transfektion der dominant-negativ Dynamin-Mutante DynK44A, welche die GTP-Bindung und -Hydrolyse von Dynamin verhindert und somit ebenfalls die Vesikelabschnürung verhindert ohne dabei die Invagination zu beeinträchtigen.¹⁵⁵ Hierbei zeigten sich jedoch ausgeprägte morphologische Veränderungen der transfizierten HEK293 Zellen, sowohl was die Zellform als auch die Verteilung der Fluorophor-markierten Proteine betraf. Damke et al. konnte ebenfalls bereits bei der Beschreibung von DynK44A Konsequenzen für die Zellform und Organisation des Zytoskeletts bei Überexpression der Mutante feststellen: Die Zellen waren vergrößert, abgeflacht sowie abgerundet und Aktinstressfasern zeigten eine zirkumferentielle Anordnung im Gegensatz zur longitudinalen Verteilung beim Dynamin-Wildtyp.¹⁵⁵ Dieser Phänotyp ist im Einklang mit den Beobachtungen der vorliegenden Arbeit. Als Ursache gehen Damke et al. dabei am ehesten von einem indirekten Effekt der Endozytosehemmung aus, da Dynamin in der indirekten Immunfluoreszenz keine Verbindung zu Aktin zeigte und auch Arbeiten mit einem Dynamin-unabhängigen Ansatz der Endozytosehemmung, namentlich Kaliumdepletion und zytosolische Ansäuerung, vergleichbare morphologische Veränderungen induzieren konnten.¹⁵⁶ Neuere Untersuchungen konnten jedoch darlegen, dass Dynamin an der Regulation des Aktin-Zytoskeletts beteiligt ist,^{157,158} sodass dies vermutlich doch der auslösende Mechanismus für die Veränderung der Zellform sein kann. Dynamin spielt neben der Beteiligung an der Clathrin-vermittelten Endozytose eine wichtige Rolle für den Transport von Vesikeln des Golgi-Apparats.¹⁵⁹ Überexpression der DynK44A-Mutante führt zur Retention von Proteinen und Akkumulation von Zisternen im Golgi Apparat.¹⁶⁰ Es ist daher wahrscheinlich, dass die beobachtete inhomogene Verteilung von β -Arrestin2-YFP mit zum Teil flächig starker Anreicherung im Zytosol und auch die vermehrte zytosolische Expression von OPRM-CFP unter Ko-Transfektion von DynK44A auf eine Störung der Struktur und der Funktion des Golgi-Apparats zurückzuführen ist. Durch die inhomogene Verteilung ließen sich letztendlich keine repräsentativen ROIs definieren und die Veränderung der zytosolischen YFP-Intensität über die Zeit war damit nicht messbar. Allerdings war nach

DAMGO-Applikation durchaus eine Rekrutierung β -Arrestin2-YFP zur Membran zu beobachten und auch eine nachfolgende punktförmige zytosolische CFP-Anreicherung blieb aus, sodass die Endozytosehemmung prinzipiell zu funktionieren scheint, auch wenn sie mit dieser Methodik nicht quantifizierbar ist. Die erhobenen Daten suggerieren allerdings auch, dass bei der Interpretation anderer Assays unter der Verwendung von DynK44A Auswirkungen auf das Protein-Targeting und den Proteintransport bedacht werden müssen. Interessanterweise trat der o.g. Phänotyp unter Dynasore nicht auf, sodass es hier mutmaßlich nur zu einer unvollständigen Dynamamin-Inhibition kommt und die verbleibende Restfunktion ausreichend ist zur Aufrechterhaltung einer intakten Zellmorphologie.

Auch in Experimenten ohne Überexpression von DynK44A traten Veränderungen der Zellmorphologie auf. Diese waren nach Applikation von Pethidin und Tramadol zu beobachten. Hier zeigte sich eine dynamische Formation von sphärischen Membranausstülpungen einhergehend mit einer vermehrter Zellbewegung. Diese Art der Blasenbildung wird auch als "blebbing" bezeichnet und tritt gewöhnlich am Zellkortex während der Zytokinese, der Zellausbreitung und Apoptose auf.¹⁶¹⁻¹⁶³ Die genauen Mechanismen dieser Blasenbildung sind bislang nicht abschließend geklärt, doch das Zusammenspiel von Zytoskelett mit seinem Aktomyosin-Netzwerk und der Zellmembran scheint eine entscheidende Rolle zu spielen, wie erst kürzlich anhand synthetischer Zellmodelle demonstriert werden konnte.¹⁶⁴ Zudem ist die Phosphorylierung der Myosin-Leichtkette entscheidend, ein Prozess in dem sowohl die Myosinleichtkettenkinase als auch kleine G-Proteine der Rho-Familie involviert sind.¹⁶¹ Da blebbing in dieser Arbeit nicht unter fehlender Ko-Transfektion von OPRM auftrat, lässt sich ein Rezeptor-vermitteltes Phänomen postulieren und eine zelltoxische oder osmotische Wirkung der im molaren Bereich hochkonzentriert eingesetzten Liganden ist eher unwahrscheinlich. Interessanterweise trat die Bläschenbildung bei Pethidin als Partialagonist der Arrestinrekrutierung und Tramadol ohne messbar Arrestinrekrutierung auf, sodass es sich um einen Arrestin-unabhängigen Effekt zu handeln scheint. Tatsächlich konnten Onoprihvili et al. eine direkte Interaktion zwischen dem C-

Terminus des OPRM und Filamin A nachweisen.¹⁶⁵ Filamin A ist ein Aktin- vernetzendes Protein im peripheren Zytoplasma, welches die dreidimensionale Struktur der Aktinfilamente stabilisiert und Membranproteine mit dem Aktinzytosklett verbindet.^{166,167} In ihrer Arbeit konnte weiter gezeigt werden, dass durch diese Interaktion die Rezeptorregulation und das Rezeptortrafficking beeinflusst werden. Letztendlich könnte es also sein, dass die beobachtete Bläschenbildung Ausdruck der Rezeptor-Zytoskelett-Interaktion ist und damit einen spannenden weiteren Ansatz zur Untersuchung der Rezeptorregulierung darstellt.

Zusammenfassend zeigt sich für die unterschiedlichen Liganden nicht nur eine differenzierte β -Arrestin2-Rekrutierung sondern auch ein sehr heterogenes Bild der Rezeptorregulierung, welche hier indirekt durch verschiedene Methoden der Endozytosehemmung untersucht wurde. Das Zytosklett könnte als bislang wenig untersuchter Mechanismus am Rezeptortrafficking beteiligt sein.

4.3 Limitationen und Ausblick

Die dargestellten Ausführungen über die Rezeptorinternalisierung und Zellmorphologie spiegeln den großen Nutzen der Konfokalmikroskopie wieder, denn hier ist die Beobachtung mehrerer, auch nicht erwarteter Prozesse gleichzeitig möglich. Sowohl die Konfokalmikroskopie als auch der Biolumineszenz-Assay bringen jedoch auch methodische Limitationen mit sich, die im Folgenden näher diskutiert werden.

Beide Methoden setzten eine Alteration der zu untersuchenden Proteine durch genetische Kopplung eines Fluorophors bzw. Luciferase-Fragments voraus. Solche Modifikationen können die Rezeptoreigenschaften einschließlich der Interaktion mit Proteinen der nachgeschalteten Signalkaskade verändern. Der in Abschnitt 4.1 beschriebene Literaturvergleich zeigt allerdings eine gute Übereinstimmung mit Ergebnissen, die mit anderen Methoden erzielt wurden, sodass dies in der vorliegenden Arbeit kein wesentliches Problem zu sein scheint.

Die Auswahl der zur β -Arrestin2-Quantifizierung herangezogenen Zellen in der Konfokalmikroskopie kann einen möglichen Untersucher Bias verursachen. Wie bereits in 3.1.1 erläutert, ist das Verhältnis von Rezeptor zu Arrestin zur exakten Bestimmung der Arrestinrekrutierung entscheidend. Da bei der transienten Transfektion die Transfektionseffizienz der beiden sichtbaren Plasmide unterschiedlich waren, mussten solche Zellen ausgewählt werden, die beide fluoreszierende Proteine exprimieren. Darunter sind Subpopulationen mit variierendem Arrestin/Rezeptor-Verhältnis enthalten. Um diesen Selektionseffekt zu minimieren wurde eine Vielzahl von Zellen ($n \geq 20$) untersucht. Zudem war die GRK2 nicht Fluorophor-markiert, sodass die Transfektionseffizienz und die Expression in den ausgewählten Zellen unklar bleiben. Da die Ergebnisse jedoch in Relation zu DAMGO berechnet wurden, ist dies ein Effekt, der sich in der Auswertung herausrechnet. Um diese methodischen Schwächen auszugleichen, wäre die Generierung stabiler Zelllinien mit Expression von drei Plasmiden theoretisch möglich, aber die Erhaltung solcher Zellen ist schwierig. Zudem erfolgt auch hier die Expression in einem nicht kontrollierbarem Verhältnis. Ein Lösungsansatz wäre die kodierenden Sequenzen in ein einziges Plasmid zu klonieren. Die Expression von drei individuellen Proteinen konnte so durch Ko-Transfektionsstrategien mit viralen 2A Peptid und einer „internal-ribosome-entry-site“ (IRES)-Sequenz bereits erfolgreich zur Generation eines Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET)-Sensors zur Messung der G-Protein-Aktivierung eingesetzt werden.¹⁶⁸ Dabei führt die 2A-Peptid-Strategie zu einer äquimolaren Ko-Expression, während die IRES-Sequenz dies in einem Verhältnis von 3:1 tut. Somit würde genaue Kontrolle über das Ausmaß des Expressionsverhältnisses bestehen und damit vergleichbaren Messbedingungen in jeder Zelle herrschen.

Bei Experimenten mit fluoreszierenden Proteinen muss dem photochemischen Phänomen des Photobleichen, also dem irreversiblen Verlust des Proteins zu fluoreszieren, Rechnung getragen werden. Photobleichen ist abhängig von der Stabilität des Fluorophors, der Zeit und dem Ausmaß der Lichtexposition. Durch Festlegung einer Kontrollregion um ganze Zellen sollte für mögliches Photobleichen korrigiert werden. Da die Zellen jedoch zum Teil eine erhebliche

Zellbewegung aufwies, änderte sich auch die Oberfläche des Zellanschnitts in der festgelegten Fokusebene und somit das Ausmaß der Fluoreszenzintensität. Dadurch lässt sich am ehesten auch die vermeintliche Fluoreszenzintensitätszunahme der Antagonisten erklären, sodass die Korrektur des Photobleichens zu einer gewissen Messungengenauigkeit beiträgt.

Bei guter zeitlicher Auflösung ist die räumliche Auflösung der Konfokalmikroskopie der konventionellen Lichtmikroskopie nur gering überlegen. So ist bei der Rezeptorendozytose nicht zu differenzieren, ob der Rezeptor noch an der Plasmamembran gebunden, in Invagination befindlich oder bereits oberflächennah internalisiert ist. Somit ist der Assay nicht geeignet um eine Rezeptorendozytose genau zu quantifizieren, auch wenn semiquantitative Beobachtungen durchaus möglich waren. Auch der Zeitpunkt, zu welchem Rezeptor und Arrestin im Rahmen der Internalisierung voneinander dissoziieren, lässt sich mit der vorliegende Methode nicht auflösen. Dies ist insbesondere von Bedeutung, wenn man die zunehmende Rolle der subzellulären Organisation der GPCR Signaltransduktion bedenkt. So konnte mittlerweile nachgewiesen werden, dass GPCR-Aktivierung nicht an die Plasmamembran gebunden ist sondern auch in Endosomen und am Golgi-Apparat erfolgt und β -Arrestine auch nach Dissoziation vom Rezeptor Signalkaskaden aktivieren können.¹⁶⁹ Daher wären hier bildgebende Verfahren in lebenden Zellen mit höherer räumlicher Auflösung wie FRET oder Einzelmolekülmikroskopie interessant.

Ein weiterer Nachteil ist der hohe zeitliche Aufwand, den Einzelzellmessungen wie im Falle der Konfokalmikroskopie mit sich bringen, die zudem nur die Messung einer Konzentration pro Versuchsaufbau erlauben. Damit steht die Erstellung von Konzentrations-Wirkungs-Kurven in keinem adäquaten Aufwand-Nutzen-Verhältnis. Hierin liegt der große Vorteil des Luciferase-Assays, der als Hochdurchsatz-Assay im Mikrotiterplattenformat eine rasche Generation großer Datensätze ermöglicht. Dies geschieht auf Kosten der zeitlichen Auflösung der zu untersuchenden Prozessen, da ein fixer Inkubationszeitpunkt im Vorherein festgelegt werden muss. Hier liegt eine Schwäche der Arbeit, da die Liganden-Inkubationszeit lediglich für DAMGO evaluiert wurde und somit eine Liganden-spezifische Kinetik nicht berücksichtigt ist. Zudem wurde zur Bestimmung der

Inkubationszeit nur eine geringe Anzahl an Experimenten durchgeführt. Auch die gesteigerten Kosten unter Verwendung eines kommerziellen Reagenzienkits im Luciferase-Assay sind zu Bedenken.

Die Stärke dieser Arbeit liegt in den verschiedenen Methoden die zur Untersuchung desselben Signalwegs eingesetzt wurden, um methodische Vorteile zu kombinieren und Schwächen zu reduzieren. Zudem wurden erstmals ein weites Spektrum klinisch eingesetzter Opioid-Analgetika untersucht. Zukünftige Forschungsprojekte müssen sich der Umsetzung dieser Ergebnisse in einen physiologischeren Versuchsaufbau widmen, da Schmerz und seine Therapie ein komplexes Phänomen ist, welches nicht umfassend in Zellkulturexperimenten erfasst werden kann. So können Zellkulturstudien die Pharmakokinetik von Arzneimitteln und die Entstehung aktiver Metabolite nicht oder nur unzureichend erfassen. Zudem veranschaulichte die Überexpression von GRK2 wie ein artifiziell verändertes Proteom die Wirkstärke und Dynamik von Messparametern verändern kann. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass das Rezeptorverhalten in verschiedene Gewebetypen unterschiedlich sein kann. Als Beispiel hierfür sei Morphin genannt, das *in vivo* in Rückenmark¹⁷⁰ und *in vitro* in Locus coeruleus Neuronen¹⁷¹ keine Endozytose induzieren konnte, während sich in Dendriten des Corpus striatum eine deutliche Rezeptorendozytose zeigte.¹⁷²⁻¹⁷⁴ Besonders interessant ist im klinischen Kontext dennoch die fehlende β -Arrestin2-Rekrutierung für Buprenorphin, Tilidin und Tramadol – Substanzen die keineswegs frei von Nebenwirkungen sind. Dies lässt die Hypothese der Korrelation von Nebenwirkungen mit Aktivierung des β -Arrestin2-Signalwegs kritisch hinterfragen und macht insbesondere diese Substanzen für weiterführende Untersuchungen in Tiermodellen oder am Menschen interessant. Die grundlegenden Erkenntnisse über die differenzierte Aktivierung des β -Arrestin2-Signalwegs dient als Basis für weitere Arbeiten auf dem Gebiet der Opioidrezeptorregulierung und Toleranzentstehung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

5.1 Deutsch

Opioide gehören zu den potentesten Analgetika für die Behandlung akuter und chronischer Schmerzen, werden jedoch in ihrer Anwendung durch analgetische Toleranz aber auch Nebenwirkungen wie Abhängigkeit, Atemdepression und Obstipation limitiert. Opioid-Analgetika vermitteln dabei nahezu alle klinisch relevanten Wirkungen durch Stimulation des μ -Opioidrezeptors, einem G-Protein-gekoppelten Rezeptor. Die „klassische“ Signaltransduktion durch Aktivierung inhibitorischer $G_{i/o}$ -Proteine kann durch G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) und β -Arrestine negativ reguliert werden. Zusätzlich können durch β -Arrestin-Bindung an den Rezeptor G-Protein-unabhängige Signalwege aktiviert werden. Die genauen Mechanismen wie β -Arrestin-assoziierte Rezeptordesensibilisierung, -internalisierung und G-Protein-unabhängige Signalwege an der physiologischen Antwort und insbesondere an Toleranzentwicklung und Abhängigkeit von Opioid-Analgetika beteiligt sind, können bislang nicht ausreichend erklärt werden.

In dieser Arbeit konnte in HEK293-Zellen mit Lebendzell-Konfokalmikroskopie und Luciferase-Komplementierung für 17 Opioide eine differenzierte β -Arrestin2-Rekrutierung zum μ -Opioidrezeptor gezeigt werden. Von den untersuchten Opioiden sind 13 häufig eingesetzte Opioid-Analgetika. Durch die Erstellung detaillierter pharmakologischer Profile ließen sich die Opioide bezüglich ihres β -Arrestin2-Rekrutierungsvermögens in Voll-, Partial und Antagonisten eingruppiieren. Bemerkenswert war die fehlende β -Arrestin2-Rekrutierung für Buprenorphin, Tramadol und Tilidin, sodass diese interessante Substanzen für weitere Untersuchungen in physiologischerem Kontext sind. Durch Überexpression von GRK2 konnte die β -Arrestin2-Rekrutierung insbesondere für Partialagonisten gesteigert werden, was die Abhängigkeit der β -Arrestin-Rekrutierung vom GRK-Expressionslevel, das in verschiedenen Assays und Gewebetypen variieren kann, zeigt. Außerdem konnte ein heterogenes Bild der

Rezeptorregulierung demonstriert werden, welches indirekt durch Endozytosehemmung unter Verwendung von Dynamin-Inhibitoren erfasst wurde. Die erhobenen Daten dienen als Anknüpfungspunkt für weiteren Arbeiten auf dem Gebiet der μ -Opioidrezeptorregulation. Ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen ist nötig, um sichere und nebenwirkungsärmere Opioid-Analgetika entwickeln zu können.

5.2 English

Opioids remain among the most effective analgesics for the treatment of acute and chronic pain, but their clinical use is limited by analgesic tolerance and other side effects including dependence, respiratory depression and obstipation. Opioid analgesics exert nearly all their clinically relevant actions through stimulation of μ -opioid receptors, which belong to the family of G Protein-coupled receptors. "Classical" signaling through activation of inhibitory $G_{i/o}$ Proteins can be negatively regulated via G Protein-coupled receptor kinases and β -Arrestins. Additionally, recruitment of β -Arrestins to the μ -opioid receptor can transduce G Protein independent signals. The detailed mechanisms how β -Arrestin-induced receptor desensitization, internalization and G Protein independent signaling mediate physiological effects including tolerance and dependence remains unclear.

In this study using confocal live-cell imaging and split luciferase complementation in HEK293 cells 17 opioids showed differential β -Arrestin2 recruitment to the μ -opioid receptor. Of the opioids under investigation, 13 are frequently administered opioid analgesics. Detailed pharmacologic profiles of these opioids allowed for grouping into full agonists, partial agonist and antagonists in regards to β -Arrestin2 recruitment. Surprisingly, β -Arrestin2 recruitment was not detected for Buprenorphin, Tramadol and Tilidin, making these substances interesting candidates for further investigations in a more physiological setting. Overexpression of GRK2 led to increased β -Arrestin2 recruitment especially for partial agonists. This demonstrates the dependence on GRK expression level for β -Arrestin recruitment, which can vary between assays or cell types. Furthermore

different opioids showed a heterogenous receptor regulation, assessed by inhibition of receptor endocytosis using dynamin inhibitors.

The collected data serve as basis for further research on μ -receptor regulation. Better understanding of the molecular mechanisms is necessary for the development of safer opioid analgesics with fewer side effects.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AP-2	Adaptorprotein-2
BRET	Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer
C-Terminus	Carboxy-Terminus
CaCl₂	Calciumchlorid
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (<i>engl. cyan fluorescent protein</i>)
CO₂	Kohlenstoffdioxid
DAMGO	[D-Ala ² ,N-Me-Phe ⁴ ,Gly ⁵ -ol]-enkephalin
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵]-enkephalin
DGK	Diacylglycerolkinase
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC₅₀	effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife (<i>engl. extracellular loop</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat,
ELuc	<i>Pyrearinus termitilluminans</i> Luciferase (<i>engl. Emerald Luciferase</i>)
E_{max}	Maximaleffekt
FCS	Fetales Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>engl. green fluorescent protein</i>)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
G418	Geneticinsulfat
H₂O	Wasser
HEK	humane embryonale Nierenzellen (<i>engl. human embryonic kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)piperazinyl-1)-ethansulfonsäure
ICL	intrazelluläre Schleife (<i>engl. intracellular loop</i>)

IRES	<i>engl. internal ribosome entry site</i>
KCl	Kaliumchlorid
KI	Konfidenzintervall
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> – Medium
MAPK	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
MgCl₂	Magnesiumchlorid
Min.	Minute
M/V	Masse pro Volumen
M6G	Morphin-6-glucuronat
NaCl	Natriumchlorid
NC-IUPHAR	International Union of Pharmacology, Committee on Receptor Nomenclature and Classification
N-Terminus	Amino-Terminus
OPRM	μ-Opioidrezeptor (Gen)
PBS	<i>engl. Phosphate buffered saline</i>
PDE	Phosphodiesterase
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMT	Photomultiplier
ROI	Region von Interesse (<i>engl. region of interest</i>)
rpm	Umdrehungen (<i>engl. revolutions per minute</i>)
SEM	Standardfehler (<i>engl. standard error of mean</i>)
Sek.	Sekunden
TM	Transmembrandomäne
V/V	Volumen pro Volumen
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (<i>engl. yellow fluorescent protein</i>)

REFERENZEN

- 1 Fredriksson, R., Lagerström, M. C., Lundin, L. G. & Schiöth, H. B. The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Molecular pharmacology* **63**, 1256-1272, doi:10.1124/mol.63.6.1256 (2003).
- 2 Sriram, K. & Insel, P. A. G Protein-Coupled Receptors as Targets for Approved Drugs: How Many Targets and How Many Drugs? *Molecular pharmacology* **93**, 251-258, doi:10.1124/mol.117.111062 (2018).
- 3 Bockaert, J. & Pin, J. P. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *Embo j* **18**, 1723-1729, doi:10.1093/emboj/18.7.1723 (1999).
- 4 Sharman, J. L. & Mpamhanga, C. P. IUPHAR-DB: an open-access, expert-curated resource for receptor and ion channel research. *ACS Chem Neurosci* **2**, 232-235, doi:10.1021/cn200025w (2011).
- 5 Venkatakrisnan, A. J. *et al.* Molecular signatures of G-protein-coupled receptors. *Nature* **494**, 185-194, doi:10.1038/nature11896 (2013).
- 6 Manglik, A. *et al.* Crystal structure of the μ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature* **485**, 321-326, doi:10.1038/nature10954 (2012).
- 7 Weis, W. I. & Kobilka, B. K. Structural insights into G-protein-coupled receptor activation. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 734-740, doi:10.1016/j.sbi.2008.09.010 (2008).
- 8 Shonberg, J., Kling, R. C., Gmeiner, P. & Löber, S. GPCR crystal structures: Medicinal chemistry in the pocket. *Bioorg Med Chem* **23**, 3880-3906, doi:10.1016/j.bmc.2014.12.034 (2015).
- 9 Hilger, D., Masureel, M. & Kobilka, B. K. Structure and dynamics of GPCR signaling complexes. *Nat Struct Mol Biol* **25**, 4-12, doi:10.1038/s41594-017-0011-7 (2018).
- 10 Kenakin, T. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci* **16**, 232-238, doi:10.1016/s0165-6147(00)89032-x (1995).
- 11 Kenakin, T. Biased Receptor Signaling in Drug Discovery. *Pharmacological reviews* **71**, 267-315, doi:10.1124/pr.118.016790 (2019).
- 12 Baltoumas, F. A., Theodoropoulou, M. C. & Hamodrakas, S. J. Interactions of the α -subunits of heterotrimeric G-proteins with GPCRs, effectors and RGS proteins: a critical review and analysis of interacting surfaces,

- conformational shifts, structural diversity and electrostatic potentials. *J Struct Biol* **182**, 209-218, doi:10.1016/j.jsb.2013.03.004 (2013).
- 13 Simon, M. I., Strathmann, M. P. & Gautam, N. Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* **252**, 802-808, doi:10.1126/science.1902986 (1991).
- 14 Milligan, G. & Kostenis, E. Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol* **147 Suppl 1**, S46-55, doi:10.1038/sj.bjp.0706405 (2006).
- 15 Smrcka, A. V. G protein $\beta\gamma$ subunits: central mediators of G protein-coupled receptor signaling. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2191-2214, doi:10.1007/s00018-008-8006-5 (2008).
- 16 Birnbaumer, L. Receptor-to-effector signaling through G proteins: Roles for $\beta\gamma$ dimers as well as α subunits. *Cell* **71**, 1069-1072, doi:10.1016/S0092-8674(05)80056-X (1992).
- 17 Zuckerman, R. & Cheasty, J. E. A 48 kDa protein arrests cGMP phosphodiesterase activation in retinal rod disk membranes. *FEBS Lett* **207**, 35-41, doi:10.1016/0014-5793(86)80008-4 (1986).
- 18 Lohse, M. J., Benovic, J. L., Codina, J., Caron, M. G. & Lefkowitz, R. J. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science* **248**, 1547-1550, doi:10.1126/science.2163110 (1990).
- 19 Attramadal, H. *et al.* Beta-arrestin2, a novel member of the arrestin/beta-arrestin gene family. *The Journal of biological chemistry* **267**, 17882-17890 (1992).
- 20 Srivastava, A., Gupta, B., Gupta, C. & Shukla, A. K. Emerging Functional Divergence of β -Arrestin Isoforms in GPCR Function. *Trends Endocrinol Metab* **26**, 628-642, doi:10.1016/j.tem.2015.09.001 (2015).
- 21 Premont, R. T. & Gainetdinov, R. R. Physiological roles of G protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Annu Rev Physiol* **69**, 511-534, doi:10.1146/annurev.physiol.69.022405.154731 (2007).
- 22 Ghosh, E. *et al.* Conformational Sensors and Domain Swapping Reveal Structural and Functional Differences between β -Arrestin Isoforms. *Cell Rep* **28**, 3287-3299.e3286, doi:10.1016/j.celrep.2019.08.053 (2019).
- 23 Lohse, M. J. & Hoffmann, C. Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. *Handb Exp Pharmacol* **219**, 15-56, doi:10.1007/978-3-642-41199-1_2 (2014).
- 24 Reiner, S., Ambrosio, M., Hoffmann, C. & Lohse, M. J. Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor. *The Journal of biological chemistry* **285**, 36188-36198, doi:10.1074/jbc.M110.175604 (2010).

-
- 25 Hoffmann, C., Ziegler, N., Reiner, S., Krasel, C. & Lohse, M. J. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30933-30941, doi:10.1074/jbc.M801472200 (2008).
- 26 Lefkowitz, R. J. & Shenoy, S. K. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* **308**, 512-517, doi:10.1126/science.1109237 (2005).
- 27 Hirsch, J. A., Schubert, C., Gurevich, V. V. & Sigler, P. B. The 2.8 Å crystal structure of visual arrestin: a model for arrestin's regulation. *Cell* **97**, 257-269, doi:10.1016/s0092-8674(00)80735-7 (1999).
- 28 Vishnivetskiy, S. A. *et al.* How Does Arrestin Respond to the Phosphorylated State of Rhodopsin?*. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11451-11454, doi:10.1074/jbc.274.17.11451 (1999).
- 29 Vishnivetskiy, S. A. *et al.* Few residues within an extensive binding interface drive receptor interaction and determine the specificity of arrestin proteins. *The Journal of biological chemistry* **286**, 24288-24299, doi:10.1074/jbc.M110.213835 (2011).
- 30 Xiao, K., Shenoy, S. K., Nobles, K. & Lefkowitz, R. J. Activation-dependent conformational changes in {beta}-arrestin 2. *The Journal of biological chemistry* **279**, 55744-55753, doi:10.1074/jbc.M409785200 (2004).
- 31 Krasel, C., Bünemann, M., Lorenz, K. & Lohse, M. J. Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation. *The Journal of biological chemistry* **280**, 9528-9535, doi:10.1074/jbc.M413078200 (2005).
- 32 Gurevich, V. V. & Benovic, J. L. Visual arrestin interaction with rhodopsin. Sequential multisite binding ensures strict selectivity toward light-activated phosphorylated rhodopsin. *The Journal of biological chemistry* **268**, 11628-11638 (1993).
- 33 Gurevich, V. V. & Gurevich, E. V. The molecular acrobatics of arrestin activation. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 105-111, doi:10.1016/j.tips.2003.12.008 (2004).
- 34 Reiter, E. & Lefkowitz, R. J. GRKs and beta-arrestins: roles in receptor silencing, trafficking and signaling. *Trends Endocrinol Metab* **17**, 159-165, doi:10.1016/j.tem.2006.03.008 (2006).
- 35 Weiss, E. R. *et al.* The cloning of GRK7, a candidate cone opsin kinase, from cone- and rod-dominant mammalian retinas. *Mol Vis* **4**, 27 (1998).
- 36 Zhao, X., Huang, J., Khani, S. C. & Palczewski, K. Molecular forms of human rhodopsin kinase (GRK1). *The Journal of biological chemistry* **273**, 5124-5131, doi:10.1074/jbc.273.9.5124 (1998).

-
- 37 Premont, R. T. *et al.* Characterization of the G protein-coupled receptor kinase GRK4. Identification of four splice variants. *The Journal of biological chemistry* **271**, 6403-6410, doi:10.1074/jbc.271.11.6403 (1996).
- 38 Salles, M. *et al.* G protein-coupled receptor kinase GRK4. Molecular analysis of the four isoforms and ultrastructural localization in spermatozoa and germinal cells. *The Journal of biological chemistry* **272**, 10188-10195, doi:10.1074/jbc.272.15.10188 (1997).
- 39 Ambrose, C. *et al.* A novel G protein-coupled receptor kinase gene cloned from 4p16.3. *Hum Mol Genet* **1**, 697-703, doi:10.1093/hmg/1.9.697 (1992).
- 40 Felder, R. A. *et al.* G protein-coupled receptor kinase 4 gene variants in human essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 3872-3877, doi:10.1073/pnas.062694599 (2002).
- 41 Zidar, D. A., Violin, J. D., Whalen, E. J. & Lefkowitz, R. J. Selective engagement of G protein coupled receptor kinases (GRKs) encodes distinct functions of biased ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 9649-9654, doi:10.1073/pnas.0904361106 (2009).
- 42 Doll, C. *et al.* Deciphering micro-opioid receptor phosphorylation and dephosphorylation in HEK293 cells. *Br J Pharmacol* **167**, 1259-1270, doi:10.1111/j.1476-5381.2012.02080.x (2012).
- 43 Palczewski, K., Buczyłko, J., Kaplan, M. W., Polans, A. S. & Crabb, J. W. Mechanism of rhodopsin kinase activation. *The Journal of biological chemistry* **266**, 12949-12955 (1991).
- 44 Pitcher, J. A. *et al.* Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. *Science* **257**, 1264-1267, doi:10.1126/science.1325672 (1992).
- 45 Tobin, A. B., Butcher, A. J. & Kong, K. C. Location, location, location...site-specific GPCR phosphorylation offers a mechanism for cell-type-specific signalling. *Trends Pharmacol Sci* **29**, 413-420, doi:10.1016/j.tips.2008.05.006 (2008).
- 46 Butcher, A. J. *et al.* Differential G-protein-coupled receptor phosphorylation provides evidence for a signaling bar code. *The Journal of biological chemistry* **286**, 11506-11518, doi:10.1074/jbc.M110.154526 (2011).
- 47 Nobles, K. N. *et al.* Distinct phosphorylation sites on the $\beta(2)$ -adrenergic receptor establish a barcode that encodes differential functions of β -arrestin. *Sci Signal* **4**, ra51, doi:10.1126/scisignal.2001707 (2011).

-
- 48 Shenoy, S. K. & Lefkowitz, R. J. β -Arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol Sci* **32**, 521-533, doi:10.1016/j.tips.2011.05.002 (2011).
- 49 Jean-Charles, P.-Y., Kaur, S. & Shenoy, S. K. G Protein-Coupled Receptor Signaling Through β -Arrestin-Dependent Mechanisms. *J Cardiovasc Pharmacol* **70**, 142-158, doi:10.1097/FJC.0000000000000482 (2017).
- 50 Goodman, O. B. *et al.* β -Arrestin acts as a clathrin adaptor in endocytosis of the β 2-adrenergic receptor. *Nature* **383**, 447-450, doi:10.1038/383447a0 (1996).
- 51 Laporte, S. A. *et al.* The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 3712-3717, doi:10.1073/pnas.96.7.3712 (1999).
- 52 Antony, B. *et al.* Membrane fission by dynamin: what we know and what we need to know. *Embo j* **35**, 2270-2284, doi:10.15252/embj.201694613 (2016).
- 53 Stowell, M. H. B., Marks, B., Wigge, P. & McMahon, H. T. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nature Cell Biology* **1**, 27-32, doi:10.1038/8997 (1999).
- 54 Tsao, P. & von Zastrow, M. Downregulation of G protein-coupled receptors. *Current opinion in neurobiology* **10**, 365-369, doi:10.1016/S0959-4388(00)00096-9 (2000).
- 55 Calebiro, D. *et al.* Persistent cAMP-signals triggered by internalized G-protein-coupled receptors. *PLoS Biol* **7**, e1000172, doi:10.1371/journal.pbio.1000172 (2009).
- 56 Ferrandon, S. *et al.* Sustained cyclic AMP production by parathyroid hormone receptor endocytosis. *Nat Chem Biol* **5**, 734-742, doi:10.1038/nchembio.206 (2009).
- 57 Mullershausen, F. *et al.* Persistent signaling induced by FTY720-phosphate is mediated by internalized S1P1 receptors. *Nat Chem Biol* **5**, 428-434, doi:10.1038/nchembio.173 (2009).
- 58 Lohse, M. J. & Calebiro, D. Cell biology: Receptor signals come in waves. *Nature* **495**, 457-458, doi:10.1038/nature12086 (2013).
- 59 Brownstein, M. J. A brief history of opiates, opioid peptides, and opioid receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 5391-5393, doi:10.1073/pnas.90.12.5391 (1993).

-
- 60 Benyamin, R. *et al.* Opioid complications and side effects. *Pain Physician* **11**, S105-120 (2008).
- 61 Williams, J. T. *et al.* Regulation of mu-opioid receptors: desensitization, phosphorylation, internalization, and tolerance. *Pharmacological reviews* **65**, 223-254, doi:10.1124/pr.112.005942 (2013).
- 62 Holzer, P. Opioid receptors in the gastrointestinal tract. *Regul Pept* **155**, 11-17, doi:10.1016/j.regpep.2009.03.012 (2009).
- 63 Borsodi, A. *et al.* Opioid receptors (version 2019.4) in the IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology Database. *IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology CITE* **2019**, doi:10.2218/gtopdb/f50/2019.4 (2019).
- 64 Law, P. Y., Wong, Y. H. & Loh, H. H. Molecular mechanisms and regulation of opioid receptor signaling. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **40**, 389-430, doi:10.1146/annurev.pharmtox.40.1.389 (2000).
- 65 Aktories, K., Förstermann, U., Starke, K., Hofmann, F. B. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 207-231 (Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, 2009).
- 66 Pasternak, G. W. Pharmacological mechanisms of opioid analgesics. *Clin Neuropharmacol* **16**, 1-18, doi:10.1097/00002826-199302000-00001 (1993).
- 67 Pasternak, G. W. & Pan, Y.-X. Mu opioids and their receptors: evolution of a concept. *Pharmacological reviews* **65**, 1257-1317, doi:10.1124/pr.112.007138 (2013).
- 68 Pan, Y. X. Diversity and complexity of the mu opioid receptor gene: alternative pre-mRNA splicing and promoters. *DNA Cell Biol* **24**, 736-750, doi:10.1089/dna.2005.24.736 (2005).
- 69 Huang, W. *et al.* Structural insights into μ -opioid receptor activation. *Nature* **524**, 315-321, doi:10.1038/nature14886 (2015).
- 70 Möller, J. *et al.* Single-molecule analysis reveals agonist-specific dimer formation of μ -opioid receptors. *Nat Chem Biol* **16**, 946-954, doi:10.1038/s41589-020-0566-1 (2020).
- 71 Costantino, C. M., Gomes, I., Stockton, S. D., Lim, M. P. & Devi, L. A. Opioid receptor heteromers in analgesia. *Expert Rev Mol Med* **14**, e9, doi:10.1017/erm.2012.5 (2012).
- 72 Mansour, A., Fox, C. A., Akil, H. & Watson, S. J. Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications. *Trends Neurosci* **18**, 22-29, doi:10.1016/0166-2236(95)93946-u (1995).

-
- 73 Kuhar, M. J., Pert, C. B. & Snyder, S. H. Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* **245**, 447-450, doi:10.1038/245447a0 (1973).
- 74 Hawkins, K. N. *et al.* Quantitative autoradiography of [3H]CTOP binding to mu opioid receptors in rat brain. *Life Sci* **42**, 2541-2551, doi:10.1016/0024-3205(88)90322-0 (1988).
- 75 Stein, C. & Zöllner, C. Opioids and sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol*, 495-518, doi:10.1007/978-3-540-79090-7_14 (2009).
- 76 Mambretti, E. M. *et al.* Functional and structural characterization of axonal opioid receptors as targets for analgesia. *Mol Pain* **12**, doi:10.1177/1744806916628734 (2016).
- 77 Jurna, I. Sertürner und Morphin –eine historische Vignette. *Der Schmerz* **17**, 280-283, doi:10.1007/s00482-003-0220-3 (2003).
- 78 Lord, J. A., Waterfield, A. A., Hughes, J. & Kosterlitz, H. W. Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* **267**, 495-499, doi:10.1038/267495a0 (1977).
- 79 Martin, W. R., Eades, C. G., Thompson, J. A., Huppler, R. E. & Gilbert, P. E. The effects of morphine- and nalorphine- like drugs in the nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* **197**, 517-532 (1976).
- 80 Lutfy, K. & Cowan, A. Buprenorphine: a unique drug with complex pharmacology. *Curr Neuropharmacol* **2**, 395-402, doi:10.2174/1570159043359477 (2004).
- 81 Brown, R., Kraus, C., Fleming, M. & Reddy, S. Methadone: applied pharmacology and use as adjunctive treatment in chronic pain. *Postgrad Med J* **80**, 654-659, doi:10.1136/pgmj.2004.022988 (2004).
- 82 Hinrichs, M., Weyland, A. & Bantel, C. [Piritramide : A critical review]. *Schmerz* **31**, 345-352, doi:10.1007/s00482-017-0197-y (2017).
- 83 Latta, K. S., Ginsberg, B. & Barkin, R. L. Meperidine: a critical review. *Am J Ther* **9**, 53-68, doi:10.1097/00045391-200201000-00010 (2002).
- 84 Schulz, R., Bläsing, J., Wüster, M. & Herz, A. The opiate-like action of tilidine is mediated by metabolites. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **304**, 89-93, doi:10.1007/bf00495543 (1978).
- 85 Radbruch, L. *et al.* Topical Review on the Abuse and Misuse Potential of Tramadol and Tilidine in Germany. *Substance Abuse* **34**, 313-320, doi:10.1080/08897077.2012.735216 (2013).

-
- 86 Grond, S. & Sablotzki, A. Clinical Pharmacology of Tramadol. *Clinical Pharmacokinetics* **43**, 879-923, doi:10.2165/00003088-200443130-00004 (2004).
- 87 Romualdi, P., Grilli, M., Canonico, P. L., Collino, M. & Dickenson, A. H. Pharmacological rationale for tapentadol therapy: a review of new evidence. *J Pain Res* **12**, 1513-1520, doi:10.2147/JPR.S190160 (2019).
- 88 Barnett, V., Twycross, R., Mihalyo, M. & Wilcock, A. Opioid antagonists. *Journal of pain and symptom management* **47**, 341-352, doi:10.1016/j.jpainsymman.2013.12.223 (2014).
- 89 Handa, B. K. *et al.* Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors. *European journal of pharmacology* **70**, 531-540, doi:10.1016/0014-2999(81)90364-2 (1981).
- 90 Raehal, K. M., Walker, J. K. & Bohn, L. M. Morphine side effects in beta-arrestin 2 knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1195-1201, doi:10.1124/jpet.105.087254 (2005).
- 91 Bohn, L. M., Lefkowitz, R. J. & Caron, M. G. Differential mechanisms of morphine antinociceptive tolerance revealed in (beta)arrestin-2 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 10494-10500 (2002).
- 92 Madariaga-Mazón, A. *et al.* Mu-Opioid receptor biased ligands: A safer and painless discovery of analgesics? *Drug Discov Today* **22**, 1719-1729, doi:10.1016/j.drudis.2017.07.002 (2017).
- 93 Siuda, E. R., Carr, R., 3rd, Rominger, D. H. & Violin, J. D. Biased mu-opioid receptor ligands: a promising new generation of pain therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* **32**, 77-84, doi:10.1016/j.coph.2016.11.007 (2017).
- 94 Raehal, K. M., Schmid, C. L., Groer, C. E. & Bohn, L. M. Functional selectivity at the μ -opioid receptor: implications for understanding opioid analgesia and tolerance. *Pharmacological reviews* **63**, 1001-1019, doi:10.1124/pr.111.004598 (2011).
- 95 Viscusi, E. R. *et al.* APOLLO-1: a randomized placebo and active-controlled phase III study investigating oliceridine (TRV130), a G protein-biased ligand at the μ -opioid receptor, for management of moderate-to-severe acute pain following bunionectomy. *J Pain Res* **12**, 927-943, doi:10.2147/jpr.S171013 (2019).
- 96 Montandon, G. *et al.* G-protein-gated Inwardly Rectifying Potassium Channels Modulate Respiratory Depression by Opioids. *Anesthesiology* **124**, 641-650, doi:10.1097/ALN.0000000000000984 (2016).

-
- 97 Gillis, A. *et al.* Critical Assessment of G Protein-Biased Agonism at the μ -Opioid Receptor. *Trends Pharmacol Sci* **41**, 947-959, doi:10.1016/j.tips.2020.09.009 (2020).
- 98 Kliewer, A. *et al.* Morphine-induced respiratory depression is independent of β -arrestin2 signalling. *Br J Pharmacol* **177**, 2923-2931, doi:10.1111/bph.15004 (2020).
- 99 Kliewer, A. *et al.* Phosphorylation-deficient G-protein-biased μ -opioid receptors improve analgesia and diminish tolerance but worsen opioid side effects. *Nature Communications* **10**, 367, doi:10.1038/s41467-018-08162-1 (2019).
- 100 Smith, J. S., Lefkowitz, R. J. & Rajagopal, S. Biased signalling: from simple switches to allosteric microprocessors. *Nat Rev Drug Discov* **17**, 243-260, doi:10.1038/nrd.2017.229 (2018).
- 101 Ferguson, S. S. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacological reviews* **53**, 1-24 (2001).
- 102 Koch, T. *et al.* Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry* **273**, 13652-13657, doi:10.1074/jbc.273.22.13652 (1998).
- 103 Whistler, J. L., Chuang, H. H., Chu, P., Jan, L. Y. & von Zastrow, M. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron* **23**, 737-746, doi:10.1016/s0896-6273(01)80032-5 (1999).
- 104 Koch, T. & Holtt, V. Role of receptor internalization in opioid tolerance and dependence. *Pharmacology & therapeutics* **117**, 199-206, doi:10.1016/j.pharmthera.2007.10.003 (2008).
- 105 Dang, V. C. & Christie, M. J. Mechanisms of rapid opioid receptor desensitization, resensitization and tolerance in brain neurons. *Br J Pharmacol* **165**, 1704-1716, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01482.x (2012).
- 106 Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Caron, M. G. & Barak, L. S. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *The Journal of biological chemistry* **275**, 17201-17210, doi:10.1074/jbc.M910348199 (2000).
- 107 Groer, C. E., Schmid, C. L., Jaeger, A. M. & Bohn, L. M. Agonist-directed interactions with specific beta-arrestins determine mu-opioid receptor

- trafficking, ubiquitination, and dephosphorylation. *The Journal of biological chemistry* **286**, 31731-31741, doi:10.1074/jbc.M111.248310 (2011).
- 108 Miess, E. *et al.* Multisite phosphorylation is required for sustained interaction with GRKs and arrestins during rapid μ -opioid receptor desensitization. *Sci Signal* **11**, doi:10.1126/scisignal.aas9609 (2018).
- 109 Schulz, S. *et al.* Morphine induces terminal micro-opioid receptor desensitization by sustained phosphorylation of serine-375. *EMBO J* **23**, 3282-3289, doi:10.1038/sj.emboj.7600334 (2004).
- 110 Just, S. *et al.* Differentiation of opioid drug effects by hierarchical multi-site phosphorylation. *Molecular pharmacology* **83**, 633-639, doi:10.1124/mol.112.082875 (2013).
- 111 Doll, C. *et al.* Agonist-selective patterns of micro-opioid receptor phosphorylation revealed by phosphosite-specific antibodies. *Br J Pharmacol* **164**, 298-307, doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01382.x (2011).
- 112 Zhang, J. *et al.* Role for G protein-coupled receptor kinase in agonist-specific regulation of mu-opioid receptor responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 7157-7162 (1998).
- 113 Nickolls, S. A., Humphreys, S., Clark, M. & McMurray, G. Co-expression of GRK2 reveals a novel conformational state of the micro-opioid receptor. *PloS one* **8**, e83691, doi:10.1371/journal.pone.0083691 (2013).
- 114 Birdsong, W. T., Arttamangkul, S., Bunzow, J. R. & Williams, J. T. Agonist Binding and Desensitization of the μ -Opioid Receptor Is Modulated by Phosphorylation of the C-Terminal Tail Domain. *Molecular pharmacology* **88**, 816-824, doi:10.1124/mol.114.097527 (2015).
- 115 Falbe, J. & Regitz, M. *Römpp Chemie Lexikon*. (Thieme Verlagsgruppe, 1999).
- 116 Wilson, T. & Hastings, J. W. Bioluminescence. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 197-230, doi:10.1146/annurev.cellbio.14.1.197 (1998).
- 117 Frommer, W. B., Davidson, M. W. & Campbell, R. E. Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins. *Chem Soc Rev* **38**, 2833-2841, doi:10.1039/b907749a (2009).
- 118 Shimomura, O., Johnson, F. H. & Saiga, Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* **59**, 223-239, doi:10.1002/jcp.1030590302 (1962).
- 119 Miyawaki, A. Green Fluorescent Protein Glows Gold. *Cell* **135**, 987-990, doi:10.1016/j.cell.2008.11.025 (2008).

-
- 120 Ormö, M. *et al.* Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395, doi:10.1126/science.273.5280.1392 (1996).
- 121 Heim, R., Prasher, D. C. & Tsien, R. Y. Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 12501-12504, doi:10.1073/pnas.91.26.12501 (1994).
- 122 Cody, C. W., Prasher, D. C., Westler, W. M., Prendergast, F. G. & Ward, W. W. Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein. *Biochemistry* **32**, 1212-1218, doi:10.1021/bi00056a003 (1993).
- 123 Chalfie, M. Green fluorescent protein. *Photochem Photobiol* **62**, 651-656, doi:10.1111/j.1751-1097.1995.tb08712.x (1995).
- 124 Patterson, G. H. A new harvest of fluorescent proteins. *Nat Biotechnol* **22**, 1524-1525, doi:10.1038/nbt1204-1524 (2004).
- 125 Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805, doi:10.1126/science.8303295 (1994).
- 126 Förster, T. Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. *Annalen der Physik* **437**, 55-75, doi:10.1002/andp.19484370105 (1948).
- 127 Lohse, M. J., Nuber, S. & Hoffmann, C. Fluorescence/bioluminescence resonance energy transfer techniques to study G-protein-coupled receptor activation and signaling. *Pharmacological reviews* **64**, 299-336, doi:10.1124/pr.110.004309 (2012).
- 128 McElroy, W. D., Seliger, H. H. & White, E. H. Mechanism of bioluminescence, chemiluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin. *Photochem Photobiol* **10**, 153-170, doi:10.1111/j.1751-1097.1969.tb05676.x (1969).
- 129 Greer, L. F., 3rd & Szalay, A. A. Imaging of light emission from the expression of luciferases in living cells and organisms: a review. *Luminescence* **17**, 43-74, doi:10.1002/bio.676 (2002).
- 130 Viviani, V. R. The origin, diversity, and structure function relationships of insect luciferases. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* **59**, 1833-1850, doi:10.1007/PL00012509 (2002).
- 131 Silva Neto, A. J., Scorsato, V., Arnoldi, F. G. & Viviani, V. R. Pyrearinus termitilluminans larval click beetle luciferase: active site properties, structure and function relationships and comparison with other beetle luciferases. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **8**, 1748-1754, doi:10.1039/b9pp00053d (2009).

-
- 132 Viviani, V. R. *et al.* Cloning and Molecular Characterization of the cDNA for the Brazilian Larval Click-beetle *Pyrearinus termitilluminans* Luciferase. *Photochemistry and Photobiology* **70**, 254-260, doi:10.1111/j.1751-1097.1999.tb07997.x (1999).
- 133 Viviani, V. R. *et al.* The structural origin and biological function of pH-sensitivity in firefly luciferases. *Photochemical & photobiological science: Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **7**, 159-169, doi:10.1039/b714392c (2008).
- 134 Nakajima, Y. *et al.* Enhanced beetle luciferase for high-resolution bioluminescence imaging. *PLoS one* **5**, e10011, doi:10.1371/journal.pone.0010011 (2010).
- 135 Welsh, D. K. & Noguchi, T. Cellular bioluminescence imaging. *Cold Spring Harbor protocols* **2012**, doi:10.1101/pdb.top070607 (2012).
- 136 Dacres, H., Dumancic, M. M., Horne, I. & Trowell, S. C. Direct comparison of fluorescence- and bioluminescence-based resonance energy transfer methods for real-time monitoring of thrombin-catalysed proteolytic cleavage. *Biosens Bioelectron* **24**, 1164-1170, doi:10.1016/j.bios.2008.07.021 (2009).
- 137 Troy, T., Jekic-McMullen, D., Sambucetti, L. & Rice, B. Quantitative comparison of the sensitivity of detection of fluorescent and bioluminescent reporters in animal models. *Mol Imaging* **3**, 9-23, doi:10.1162/153535004773861688 (2004).
- 138 Villalobos, V., Naik, S. & Piwnicka-Worms, D. Detection of protein-protein interactions in live cells and animals with split firefly luciferase protein fragment complementation. *Methods Mol Biol* **439**, 339-352, doi:10.1007/978-1-59745-188-8_23 (2008).
- 139 Misawa, N. *et al.* Rapid and high-sensitivity cell-based assays of protein-protein interactions using split click beetle luciferase complementation: an approach to the study of G-protein-coupled receptors. *Anal Chem* **82**, 2552-2560, doi:10.1021/ac100104q (2010).
- 140 Hattori, M. & Ozawa, T. Split luciferase complementation for analysis of intracellular signaling. *Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry* **30**, 539-544 (2014).
- 141 McPherson, J. *et al.* μ -opioid receptors: correlation of agonist efficacy for signalling with ability to activate internalization. *Molecular pharmacology* **78**, 756-766, doi:10.1124/mol.110.066613 (2010).

-
- 142 Volpe, D. A. *et al.* Uniform assessment and ranking of opioid mu receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **59**, 385-390, doi:10.1016/j.yrtph.2010.12.007 (2011).
- 143 Frölich, N. *et al.* Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at Gi-protein and β -arrestin signaling pathways activated by the human μ -opioid receptor. *Biochemical Pharmacology* **81**, 1248-1254, doi:10.1016/j.bcp.2011.03.001 (2011).
- 144 Whistler, J. L. & von Zastrow, M. Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by β -arrestin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 9914-9919 (1998).
- 145 Macia, E. *et al.* Dynasore, a cell-permeable inhibitor of dynamin. *Developmental cell* **10**, 839-850, doi:10.1016/j.devcel.2006.04.002 (2006).
- 146 Takakura, H., Hattori, M., Takeuchi, M. & Ozawa, T. Visualization and quantitative analysis of G protein-coupled receptor-beta-arrestin interaction in single cells and specific organs of living mice using split luciferase complementation. *ACS chemical biology* **7**, 901-910, doi:10.1021/cb200360z (2012).
- 147 Koch, T. *et al.* Receptor endocytosis counteracts the development of opioid tolerance. *Molecular pharmacology* **67**, 280-287, doi:10.1124/mol.104.004994 (2005).
- 148 Molinari, P. *et al.* Morphine-like opiates selectively antagonize receptor-arrestin interactions. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12522-12535, doi:10.1074/jbc.M109.059410 (2010).
- 149 Schmid, B. *Molecular Signaling Mechanisms at the μ -Opioid Receptor* Doctoral thesis, Universität Würzburg, Graduate School of Life Sciences, URN: urn:nbn:de:bvb:20-opus-176850, doi: 10.25972/OPUS-17685 (2020).
- 150 Winpenny, D., Clark, M. & Cawkill, D. Biased ligand quantification in drug discovery: from theory to high throughput screening to identify new biased mu opioid receptor agonists. *Br J Pharmacol* **173**, 1393-1403, doi:10.1111/bph.13441 (2016).
- 151 Oakley, R. H., Laporte, S. A., Holt, J. A., Barak, L. S. & Caron, M. G. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *The Journal of biological chemistry* **274**, 32248-32257, doi:10.1074/jbc.274.45.32248 (1999).

-
- 152 Keith, D. E. *et al.* Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *The Journal of biological chemistry* **271**, 19021-19024, doi:10.1074/jbc.271.32.19021 (1996).
- 153 Glück, L. *et al.* Loss of morphine reward and dependence in mice lacking G protein-coupled receptor kinase 5. *Biol Psychiatry* **76**, 767-774, doi:10.1016/j.biopsych.2014.01.021 (2014).
- 154 Sandvig, K., Kavaliauskiene, S. & Skotland, T. Clathrin-independent endocytosis: an increasing degree of complexity. *Histochem Cell Biol* **150**, 107-118, doi:10.1007/s00418-018-1678-5 (2018).
- 155 Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. & Schmid, S. L. Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J Cell Biol* **127**, 915-934 (1994).
- 156 Altankov, G. & Grinnell, F. Depletion of intracellular potassium disrupts coated pits and reversibly inhibits cell polarization during fibroblast spreading. *J Cell Biol* **120**, 1449-1459, doi:10.1083/jcb.120.6.1449 (1993).
- 157 Kessels, M. M., Engqvist-Goldstein, A. E., Drubin, D. G. & Qualmann, B. Mammalian Abp1, a signal-responsive F-actin-binding protein, links the actin cytoskeleton to endocytosis via the GTPase dynamin. *The Journal of cell biology* **153**, 351-366, doi:10.1083/jcb.153.2.351 (2001).
- 158 Merrifield, C. J., Feldman, M. E., Wan, L. & Almers, W. Imaging actin and dynamin recruitment during invagination of single clathrin-coated pits. *Nat Cell Biol* **4**, 691-698, doi:10.1038/ncb837 (2002).
- 159 Jones, S. M., Howell, K. E., Henley, J. R., Cao, H. & McNiven, M. A. Role of dynamin in the formation of transport vesicles from the trans-Golgi network. *Science* **279**, 573-577, doi:10.1126/science.279.5350.573 (1998).
- 160 Cao, H., Thompson, H. M., Krueger, E. W. & McNiven, M. A. Disruption of Golgi structure and function in mammalian cells expressing a mutant dynamin. *Journal of Cell Science* **113**, 1993-2002 (2000).
- 161 Mills, J. C., Stone, N. L., Erhardt, J. & Pittman, R. N. Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* **140**, 627-636, doi:10.1083/jcb.140.3.627 (1998).
- 162 Charras, G. & Paluch, E. Blebs lead the way: how to migrate without lamellipodia. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **9**, 730-736, doi:10.1038/nrm2453 (2008).
- 163 Bereiter-Hahn, J., Lück, M., Miebach, T., Stelzer, H. K. & Vöth, M. Spreading of trypsinized cells: cytoskeletal dynamics and energy requirements. *J Cell Sci* **96 (Pt 1)**, 171-188 (1990).

-
- 164 Loiseau, E. *et al.* Shape remodeling and blebbing of active cytoskeletal vesicles. *Science Advances* **2**, e1500465, doi:10.1126/sciadv.1500465 (2016).
- 165 Onoprishvili, I. *et al.* Interaction between the mu opioid receptor and filamin A is involved in receptor regulation and trafficking. *Molecular pharmacology* **64**, 1092-1100, doi:10.1124/mol.64.5.1092 (2003).
- 166 Gorlin, J. B. *et al.* Human endothelial actin-binding protein (ABP-280, nonmuscle filamin): a molecular leaf spring. *The Journal of cell biology* **111**, 1089-1105, doi:10.1083/jcb.111.3.1089 (1990).
- 167 Stossel, T. P. *et al.* Filamins as integrators of cell mechanics and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 138-145, doi:10.1038/35052082 (2001).
- 168 Goedhart, J. *et al.* Quantitative co-expression of proteins at the single cell level--application to a multimeric FRET sensor. *PloS one* **6**, e27321, doi:10.1371/journal.pone.0027321 (2011).
- 169 Eichel, K. & von Zastrow, M. Subcellular Organization of GPCR Signaling. *Trends Pharmacol Sci* **39**, 200-208, doi:10.1016/j.tips.2017.11.009 (2018).
- 170 Trafton, J. A. & Basbaum, A. I. [d-Ala²,N-MePhe⁴,Gly-ol⁵]enkephalin-induced internalization of the micro opioid receptor in the spinal cord of morphine tolerant rats. *Neuroscience* **125**, 541-543, doi:10.1016/j.neuroscience.2004.02.019 (2004).
- 171 Arttamangkul, S. *et al.* Differential activation and trafficking of micro-opioid receptors in brain slices. *Molecular pharmacology* **74**, 972-979, doi:10.1124/mol.108.048512 (2008).
- 172 Haberstock-Debic, H. *et al.* Morphine acutely regulates opioid receptor trafficking selectively in dendrites of nucleus accumbens neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**, 4324-4332, doi:10.1523/jneurosci.23-10-04324.2003 (2003).
- 173 Haberstock-Debic, H., Kim, K. A., Yu, Y. J. & von Zastrow, M. Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 7847-7857, doi:10.1523/jneurosci.5045-04.2005 (2005).
- 174 Yu, Y. J., Arttamangkul, S., Evans, C. J., Williams, J. T. & von Zastrow, M. Neurokinin 1 receptors regulate morphine-induced endocytosis and desensitization of mu-opioid receptors in CNS neurons. *The Journal of*

neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience **29**, 222-233, doi:10.1523/jneurosci.4315-08.2009 (2009).

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Differenzierte β -Arrestin2 Rekrutierung am μ -Opioid Rezeptor durch klinisch eingesetzte Opioiden“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine außer den von mir angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Promotionsverfahren vorgelegen hat.

AFFIDAVIT

I hereby confirm that my thesis entitled “Differential Opioid-induced β -Arrestin2 Recruitment at the μ -Opioid Receptor Using Clinically Relevant Opioids” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Würzburg, Januar 2021

Stefanie Mayer
