

**Analyse der μ -Opiatrezeptoraktivierung und Signaltransduktion
in lebenden Zellen mittels FRET-Mikroskopie**

**Analysis of μ -opioid receptor activation and signal transduction in
living cells using FRET microscopy**

Dissertation zur Erreichung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Nadine Frölich

aus Meiningen

Würzburg, 2012

Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Alexander Buchberger

1. Betreuer: Prof. Dr. Martin J. Lohse

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Müller

3. Betreuer: Prof. Dr. Jean Philippe Pin

4. Betreuer: Dr. Viacheslav O. Nikolaev

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

1. Einleitung	1
1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ihre Signaltransduktion	1
1.1.1 Opioidrezeptoren	6
1.2 Pathophysiologie des Schmerzes	9
1.3 Die Behandlung von Schmerzen	11
1.4 Morphin und dessen Metabolismus	12
1.5 Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers	15
1.6 Fluoreszierende Proteine	17
1.7 <i>Fluorescein arsenical hairpin binder</i>	19
1.8 Anwendung von FRET-basierten Methoden <i>in vivo</i>	21
1.9 Zielsetzung	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
2.1.2 Agonisten, Antagonisten, Metabolite	27
2.1.3 Enzyme	27
2.1.4 Oligonukleotide	28
2.1.5 Plasmide	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	30
2.2.1.1 Herstellung kompetenter <i>E.coli</i>	30
2.2.1.2 Transformation von <i>E.coli</i>	31
2.2.1.3 Mini-Plasmid-Präparation	31
2.2.1.4 Midi-Plasmid-Präparation und DNA-Konzentrationsbestimmung	32
2.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	33
2.2.1.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten	33
2.2.1.7 Klonierung von Plasmiden	34
2.2.2 Zellbiologische Methoden	36
2.2.2.1 Zellkultur und Aufbewahrung von Zellen	36
2.2.2.2 Bestimmen der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer	37
2.2.2.3 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen	37
	I

2.2.2.4	Transiente Transfektion	37
2.2.2.5	Markieren des Tetracysteinmotivs mit FLAsH	38
2.2.2.6	Radioligandenbindung	38
2.2.3	Biophysikalische Methoden	39
2.2.3.1	FRET-Mikroskopie <i>in vivo</i>	39
2.2.3.2	Konfokalmikroskopie	40
3.	Ergebnisse	41
3.1	Klonierung eines μ -Opioidrezeptor-Sensors	41
3.1.1	Markieren mit CFP am C-Terminus	41
3.1.2	Trunkierung des C-Terminus	42
3.1.3	Insertion von fluoreszierenden Proteinen in ICL3	43
3.1.4	Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL3	45
3.1.5	Anfügen eines Signalpeptids an den N-Terminus	48
3.1.6	Vergrößerung von ICL3	49
3.1.7	Insertion von ICL3 des α_{2A} -adrenergen Rezeptors	50
3.1.8	Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL2	52
3.1.9	Coexpression mit einem Chaperon	55
3.2	Pharmakologische Untersuchung von Morphin und seinen Metaboliten	57
3.2.1	Radioliganden-Bindungen	57
3.2.2	G _{i1} -Protein Aktivierung	58
3.2.3	β -Arrestin2-Rekrutierung	61
4.	Diskussion	65
4.1	Klonierung eines MOR-Rezeptor Sensors	65
4.2	Pharmakologische Untersuchung von Morphin und seinen Metaboliten	70
5.	Zusammenfassung/ Summary	77
5.1	Zusammenfassung	77
5.2	Summary	79
6.	Abkürzungsverzeichnis	80
7.	Referenzen	82
	Erklärung	90
	Danksagung	91
		II

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	92
Konferenzbeiträge	92

1. Einleitung

Integrale Membranproteine sind ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zell-Kommunikation in mehrzelligen Organismen. Bei der Signaltransduktion sorgen die Membranrezeptoren für die Umwandlung von extrazellulären in intrazelluläre Signale. Zu den Membranrezeptoren zählen Liganden-gesteuerte Ionenkanäle, Enzym-assoziierte Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Dabei bilden die GPCR mit ca. 800 Genen die größte Rezeptorfamilie im Genom der Mammalia [1]. Eine Vielzahl zellulärer Prozesse wird über die Signaltransduktion von GPCR gesteuert, dazu gehören u.a. Proliferation und Zelldifferenzierung. Als Rezeptoren für vielfältige Liganden wie Neurotransmitter und Hormone sind sie in die Prozesse der Erregungsleitung und Entzündung involviert. Auch an der Verarbeitung von Licht-, Geschmacks- und Geruchsreizen sind sie beteiligt. Demnach stellen GPCR wichtige pharmakologische Angriffspunkte dar. Ungefähr 36% aller derzeitigen Arzneimittel greifen an GPCR an [2]. Insbesondere bei der Behandlung von Schmerzen sind die entsprechenden Rezeptoren im Zentralen Nervensystem (ZNS) die Zielstruktur diverser Analgetika.

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und ihre Signaltransduktion

Der bekannteste und am meisten erforschte Vertreter der GPCR ist das Rhodopsin, welches in den Stäbchen der Wirbeltiere am Sehprozess beteiligt ist. Die dreidimensionale Struktur des bovinen Rhodopsins konnte bereits in den 90er Jahren aufgeklärt werden [3]. Später wurden die Strukturen des humanen β_2 -adrenergen Rezeptors, β_1 -adrenergen Rezeptors, A_{2A} -Adenosinrezeptors, CXCR4-Chemokinrezeptors, D_3 -Dopaminrezeptors und M_2 -Muskarinrezeptors veröffentlicht [4-10].

Alle GPCR haben eine gemeinsame Topologie, die auf sieben α -helikalen Transmembrandomänen (TMD) basiert. Dabei werden die TMD über extrazelluläre und intrazelluläre Schleifen (ECL und ICL) miteinander verbunden. Der Amino-Terminus (N-Terminus) befindet sich im extrazellulären Bereich, während der Carboxy-Terminus (C-Terminus) intrazellulär lokalisiert ist. Eine zwischen zwei konservierten Cysteinresten ausgebildete Disulfidbrücke verbindet die zweite und dritte extrazelluläre Domäne. Somit wird eine direkte Verbindung zwischen TMD3 und der dritten extrazellulären Domäne hergestellt. Die Kristallstruktur des β_2 -adrenergen Rezeptors besitzt eine zusätzliche Helix in ECL2, während ECL2 beim Chemokinrezeptor CXCR4 ein β -Faltblatt bildet [5, 8]. Am C-Terminus zeigt die Struktur des Rhodopsins eine achte α -Helix, die wiederum bei CXCR4

fehlt. Beim Vergleich der Röntgenkristallstrukturen sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die meisten Rezeptoren in ihrer inaktiven Form kristallisiert wurden und ICL3 durch die Insertion des T4-Lysozyms modifiziert wurde. Die Abb. 1 zeigt das Strukturmodell des humanen D₃-Dopaminrezeptors stellvertretend für die Familie der GPCR.

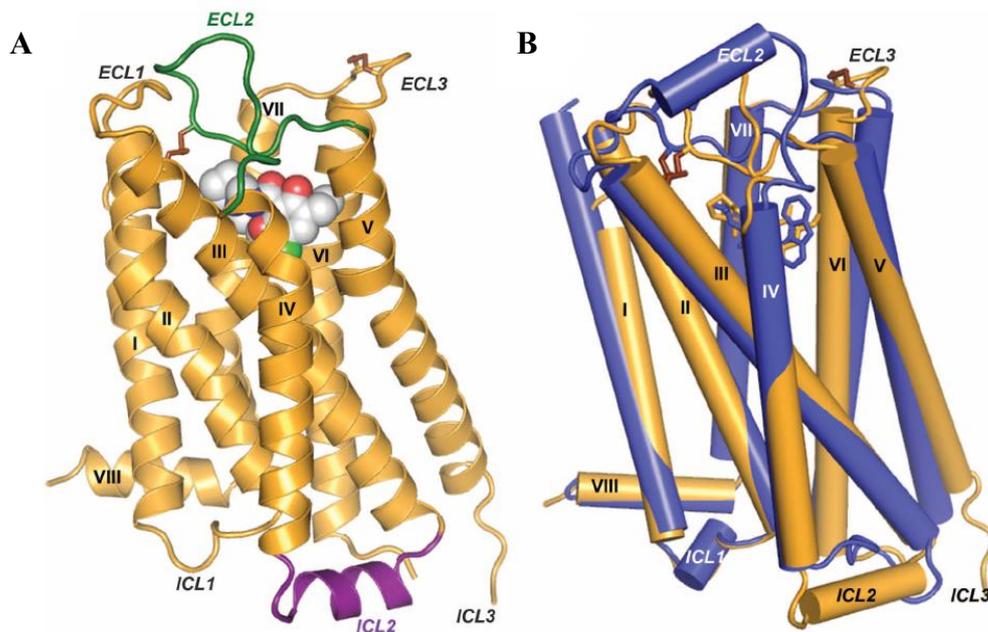


Abb. 1: Strukturmodelle von GPCR. (A) Die Tertiärstruktur zeigt den humanen D₃-Dopaminrezeptor, der zusammen mit dem D₂R/D₃R-selektiven Antagonist Eticlopride kristallisiert wurde. Die helikalen TMD sind in gelb dargestellt und nummeriert, farblich hervorgehoben sind ECL2 (grün), ICL2 (magenta) und zwei Disulfidbrücken (braun). Der Antagonist Eticlopride ist im Kalottenmodell in grau und rot dargestellt. (B) Der Vergleich der Struktur des D₃-Dopaminrezeptors (gelb) mit der Struktur des β₂-adrenergen Rezeptors (blau) zeigt die Ausrichtung der TMD, die sich nur geringfügig voneinander unterscheidet. Im D₃-Dopaminrezeptor ist ECL2 kleiner als beim β₂-adrenergen Rezeptor und nicht helikal (entnommen aus Chien *et al.*, 2010 [9]).

Humane GPCR werden nach phylogenetischen Analysen in fünf Unterfamilien eingeteilt [1]. Die Rhodopsin-Familie bildet die größte Unterfamilie, dazu gehören u.a. adrenerge Rezeptoren, Serotonin-, Dopamin- und Opioidrezeptoren. Das D[E]RY[F]-Motiv am Übergang von TMD3 zur zweiten intrazellulären Domäne ist kennzeichnend für Rezeptoren der Rhodopsin-Familie, ebenso wie das konservierte NSxxNPxxY-Motiv am Ende von TMD7. Ein weiteres Merkmal von Rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren ist ein C-terminaler Cysteinrest, der palmitoyliert wird und somit den C-Terminus in der Membran verankert. Außerdem sind den Rezeptoren der Rhodopsin-Familie einige hoch konservierte

Aminosäurereste in den TMD gemeinsam. Zur Sekretin-Familie gehören u.a. die Rezeptoren für Calcitonin, Glucagon und das Parathormon. Kennzeichnend ist für diese Rezeptoren ein aus 60-80 Aminosäureresten aufgebauter N-Terminus, der durch mehrere Disulfidbrücken stabilisiert wird und insbesondere wichtig für die Ligandenbindung ist. Die Glutamat-ähnlichen Rezeptoren stellen eine weitere Unterfamilie der GPCR dar, für die ein großer N-Terminus, bestehend aus 280 bis 580 Aminosäuren, charakteristisch ist. Hierzu gehören z.B. die Rezeptoren für metabotrope Neurotransmitter wie γ -Aminobuttersäure und Glutamat und ein Calciumrezeptor. In der Adhäsions-Familie sind Rezeptoren mit Adhäsions-ähnlichen Motiven am N-Terminus zusammengefasst. Dabei sind die N-Termini von sehr variabler Größe (200 bis 2800 Aminosäuren) und mit vielen Glykosylierungen und Prolinresten ausgestattet. Zur Familie der *Frizzled/Taste*-Rezeptoren gehören die Geschmacksrezeptoren und die *Frizzled*-Rezeptoren.

Bei der Rezeptoraktivierung kommt es zu einer Konformationsänderung, dabei ändern u.a. TMD3 und TMD6 ihre Position [11]. Wichtige molekulare Mechanismen bei der Rezeptoraktivierung sind der *rotamer toggle switch*, eine Rotationsbewegung von TMD6, welche das CWxPxF[H] Motiv von TMD6 involviert [12], und das Aufheben des *ionic lock*, an welchem das D[E]RY-Motiv von TMD3 mit einer intrahelikalen und einer interhelikalen Salzbrücke zu TMD6 beteiligt ist [3, 13]. Diese Aktivierungsmechanismen laufen unabhängig voneinander ab, so zeigen Studien am β_2 -adrenergen Rezeptor, dass Agonisten-abhängig nur einer von beiden oder beide Effekte ausgelöst werden [14]. Am Beispiel von Rhodopsin konnte gezeigt werden, dass sich inaktive und aktive Rezeptorkonformationen auf der cytoplasmatischen Seite unterscheiden [15, 16]. Diese Strukturdaten zeigen, dass sich durch Umlagerungen von TMD5 und TMD6 auf der cytoplasmatischen Seite des Rezeptors eine Spalte öffnet, in die der C-Terminus der G_α -Untereinheit bindet [17]. Durch die Konformationsänderung entfernen sich TMD3 und TMD6 voneinander und der *ionic lock* in Opsin wird zerstört. Die vorher an der interhelikalen Salzbrücke beteiligten Aminosäuren Arginin und Glutamat interagieren nun mit anderen Aminosäuren von TMD5 [18].

Der aktivierte Rezeptor besitzt eine höhere Affinität zum intrazellulären, heterotrimeren GTP-bindenden Protein (G-Protein), welches durch Interaktionen mit ICL2, ICL3 und dem C-Terminus des Rezeptors gebunden wird. Durch die Wechselwirkung mit dem Rezeptor wird an der α -Untereinheit des G-Proteins der Austausch von GDP gegen GTP ermöglicht, wodurch das G-Protein in seine aktive Konformation wechselt [19]. Es dissoziiert in seine Untereinheiten G_α und $G_{\beta\gamma}$, welche wiederum ihre intrazellulären Effektoren aktivieren. Die Regulation der G-Proteine erfolgt über die intrinsische GTPase Aktivität der G_α -Untereinheit,

wobei GTP unter Abspaltung eines Phosphatrestes zu GDP hydrolysiert wird. Dadurch wechselt die G_{α} -Untereinheit in ihren inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und daraufhin können die Untereinheiten des G-Proteins reassoziieren [20]. Für die Interaktion zwischen Rezeptoren und G-Proteinen existieren verschiedene Modelle. Dabei geht das *collision coupling model* von einer Agonisten-abhängigen Interaktion aus, während das *precoupling model* postuliert, dass der Rezeptor unabhängig von der Agonistenbindung mit dem G-Protein assoziiert ist [21].

Es existieren verschiedene Subtypen der G_{α} -Untereinheit, die nach ihrem jeweiligen Zielmolekül in Untergruppen eingeteilt werden [22]. Während die Mitglieder der G_s -Familie die Adenylylcyclasen stimulieren, werden diese durch die $G_{i/o}$ -Familie inhibiert und stattdessen werden Ionenkanäle aktiviert. Dagegen werden die Phospholipasen C β durch die $G_{q/11}$ -Familie aktiviert und die Mitglieder der $G_{12/13}$ -Familie aktivieren monomere GTP-asen. Auch von den G_{β} - und G_{γ} -Untereinheiten wurden mehrere Subtypen identifiziert, was insgesamt zu einer enormen G-Protein-Diversität in der Zelle führt [23].

GPCR leiten Signale nicht nur über G-Proteine in das Zellinnere, sie können extrazelluläre Reize auch über andere Mediatoren wie z.B. β -Arrestine vermitteln. Die β -Arrestine sind eine Familie von Proteinen, welche die Desensibilisierung und Internalisierung der GPCR hervorrufen (s.S. 8) [24]. Sie fungieren aber nicht nur als Regulatoren von GPCR, sondern übertragen auch Signale auf intrazelluläre Effektoren. Die über β -Arrestin vermittelte Aktivierung von ERK (*extracellular signal related kinase*) wurde bereits für einige Vertreter der GPCR-Familie wie den β_2 -adrenergen Rezeptor, Parathyroidhormon-Rezeptor und Vasopressinrezeptor gezeigt [25-27]. Dabei gibt es Agonisten, die gleichzeitig über G-Proteine und β -Arrestin signalisieren. Andere Liganden schalten dagegen jeweils nur einen der Signalwege an [28].

Nach dem klassischen pharmakologischen Modell der „Zwei Rezeptorzustände“ (*two state model*) befindet sich ein Rezeptor entweder in einem angeschalteten Zustand oder in einem abgeschalteten Zustand. Demnach beeinflusst ein Ligand das Gleichgewicht zwischen den beiden Zuständen, ein Agonist stabilisiert die aktive Rezeptorkonformation R^* und ein Antagonist unterstützt die inaktive Rezeptorkonformation R . Ein Agonist aktiviert dementsprechend alle Signaltransduktionswege eines Rezeptors und ein Antagonist blockiert alle Signalwege. Es gibt jedoch Anhaltspunkte, wonach verschiedene Liganden unterschiedliche Rezeptorkonformationen auslösen [29] und Liganden-abhängig verschiedenartige Aktivierungsmuster (*biased agonism*) angeschaltet werden (Abb. 2). Außerdem können einige GPCR zu verschiedenen G-Proteinen koppeln, so kann

Einleitung

beispielsweise der Rezeptor für das thyreotrope Hormon simultan alle vier Klassen von G-Proteinen aktivieren [30]. Weiterhin interagieren GPCR mit einer Vielzahl von cytosolischen und membranständigen Proteinen wie β -Arrestinen, Kinasen und Ionenkanälen [31]. Diese Effekte können nicht mit dem Konzept der „Zwei Rezeptorzustände“ erklärt werden und man geht heute vom komplexeren Modell der „Multiplen Rezeptorzustände“ aus, nach dem multiple, Liganden-abhängige Rezeptorkonformationen existieren [32]. Eine weitere Kategorie von Liganden sind die inversen Agonisten, sie vermindern die konstitutive Aktivität der GPCR [33].

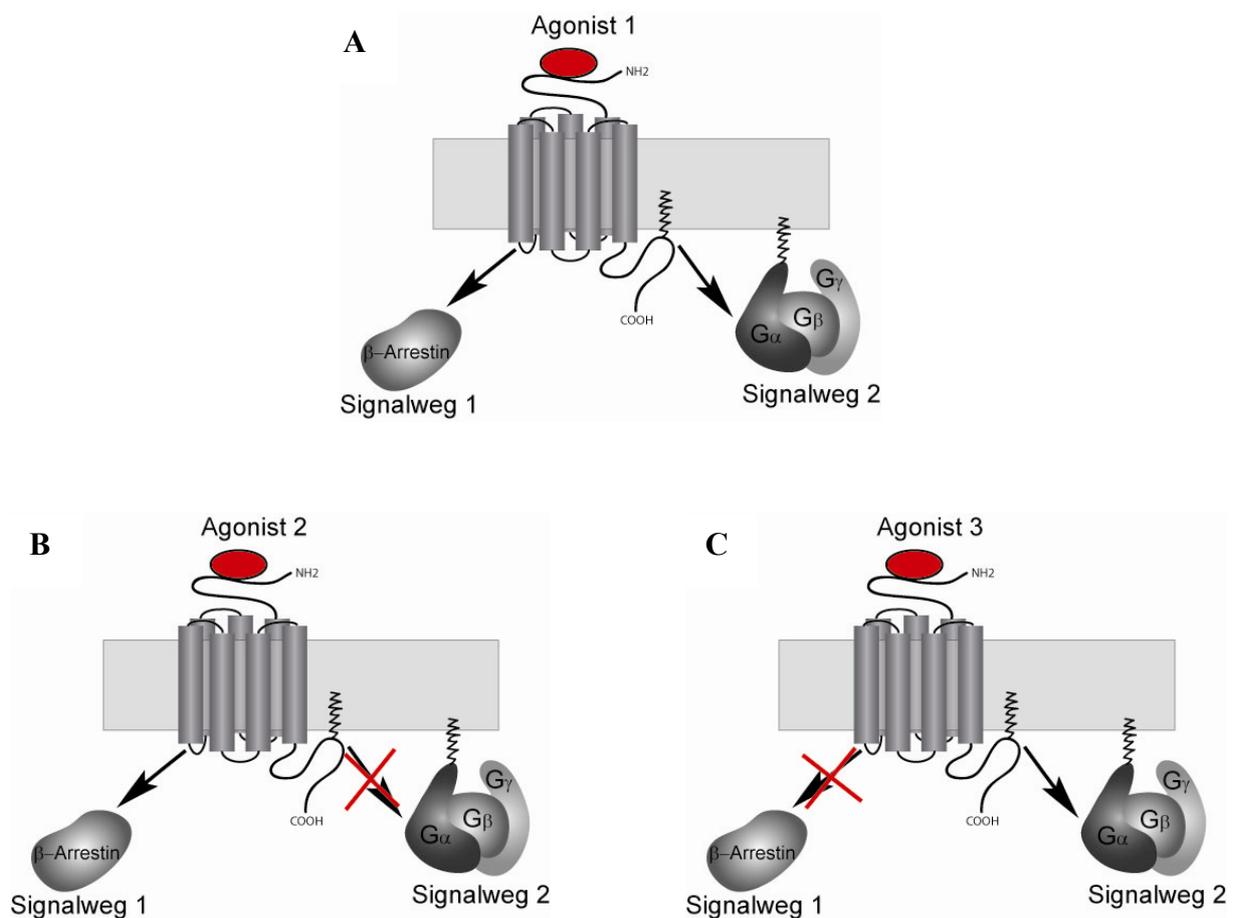


Abb. 2: Schematische Darstellung von Agonist-selektiven Signalwegen. (A) Ein Agonist schaltet nach dem klassischen Modell der „Zwei Rezeptorzustände“ alle mit dem Rezeptor verbundenen Signalwege in der Zelle an, dementsprechend müssten Antagonisten alle Signalwege blockieren. Dieses Modell ist nicht vereinbar mit der Beobachtung von selektiven Liganden, die nur bestimmte Signalwege aktivieren wie beispielsweise entweder (B) β -Arrestine oder (C) G-Proteine.

Die Regulation der Rezeptoraktivität erfolgt u.a. durch Desensibilisierung, dazu gehört die Entkopplung vom G-Protein, Internalisierung und Herabregulation der Rezeptoranzahl.

Eingeleitet wird die Desensibilisierung durch die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten, die vorwiegend an ICL3 und am C-Terminus des Rezeptors lokalisiert sind. Die Phosphorylierung erfolgt zum einen durch spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) und zum anderen durch die Proteinkinasen A und C. Dabei werden die Proteinkinasen A und C durch sekundäre Botenstoffe reguliert, die Proteinkinase A (PKA) durch cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und die Proteinkinase C (PKC) von Ca^{2+} und Diacylglycerol [34]. Durch die Phosphorylierung besitzt der Rezeptor eine höhere Affinität zur Familie der β -Arrestine, die mit den G-Proteinen um die Bindungsstellen am Rezeptor konkurrieren. Die Bindung des Rezeptor-Arrestin-Komplexes an Clathrin führt zur Internalisierung des phosphorylierten Rezeptors in Clathrin-Vesikeln und zum Transport zu frühen Endosomen. Der internalisierte Rezeptor wird entweder zurück zur Zelloberfläche gebracht (Rezeptor-Recycling) oder über späte Endosomen in Lysosomen dirigiert und so der proteasomalen Degradation zugeführt.

1.1.1 Opioidrezeptoren

Die Opioidrezeptoren gehören zur Familie der Rhodopsin-ähnlichen GPCR, sie sind wichtige Angriffspunkte für Analgetika und damit relevant für die klinische Forschung und Pharmakologie. Durch molekularbiologische Analysen wurden drei verschiedene Rezeptorsubtypen identifiziert, die man als μ -Opioidrezeptoren (MOR), δ -Opioidrezeptoren (DOR) oder κ -Opioidrezeptoren (KOR) bezeichnet [35-38]. Die Rezeptorsubtypen lassen sich noch in weitere Unterformen einteilen, beispielsweise gibt es zwei Isoformen vom MOR (MOR1 und MOR1B), die sich in der Länge der C-Termini und in deren Aminosäurekomposition unterscheiden [39]. Da jeweils nur ein Gen für MOR, DOR und KOR gefunden wurde, wird die Diversität der Rezeptor-Unterformen auf alternatives Spleißen der prä-mRNA zurückgeführt [39-41]. Wie der Sequenzvergleich auf Proteinebene zeigt, sind die Rezeptorsubtypen v.a. in den TMD (~70% Identität) und intrazellulären Schleifen (~90% Identität) hoch konserviert [42]. Die Rezeptoren werden in den Neuronen des peripheren und zentralen Nervensystems exprimiert, wo sie durch prä- und postsynaptische Hemmung für eine abgeschwächte Erregungsübertragung sorgen. Opioidpeptide sind die endogenen Liganden der Opioidrezeptoren, sie regulieren v.a. Appetit, Emotionen und Schmerzempfinden [43]. Zu den Opioidpeptiden gehören die Endorphine, Enkephaline und Dynorphine, die sowohl im Gehirn und Rückenmark als auch im Nebennierenmark hergestellt werden. Die analgetische Wirkung wird je nach Ligand über alle Rezeptortypen vermittelt, therapeutische Substanzen greifen aber vornehmlich am MOR an.

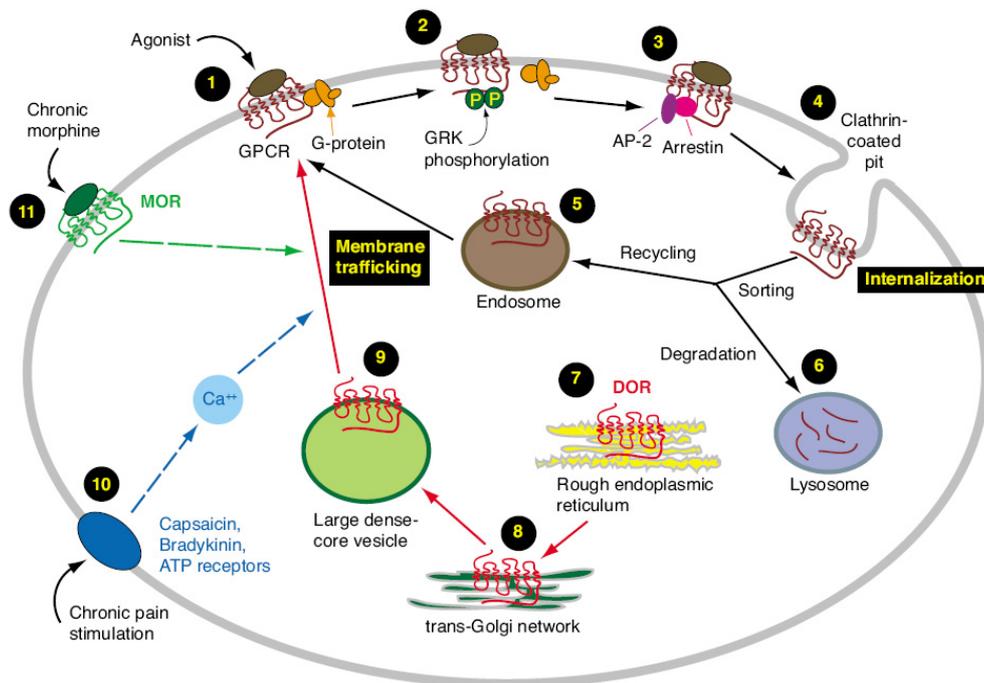


Abb. 3: Intrazelluläre Transportwege von Opioidrezeptoren. Die (1) Agonisten-induzierte Aktivierung eines GPCR führt zur G-Protein Aktivierung und (2) zur Rezeptorphosphorylierung durch Kinasen wie GRK. (3) Daraufhin können Adapterproteine wie AP-2 und andere Signalproteine wie β -Arrestin binden und (4) es kommt zur Internalisierung des Rezeptors in Clathrin-Vesikeln. Internalisierte Rezeptoren werden durch Sortierungsprozesse entweder (5) über Endosomen zurück zur Zelloberfläche gebracht oder (6) über Lysosomen der Degradation zugeführt. (7) DOR wird im rauen endoplasmatischen Reticulum synthetisiert, (8) zum trans-Golgi transportiert und (9) der reife Rezeptor wird in Vesikeln (LDCV) gespeichert. (10) Chronische Schmerzen führen zur Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren, die zugehörige Rezeptoren aktivieren und so zum Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führen. Der Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration kann ebenso wie (11) die chronische Stimulation von MOR durch Opiate zum Transport von DOR an die Zelloberfläche führen (entnommen aus Bie *et al.*, 2007 [44]).

Die Opioidrezeptor-Subtypen unterscheiden sich in ihren Liganden, der subzellulären Lokalisation und ihrem Internalisierungsverhalten (Abb. 3). Durch autoradiographische und immunohistochemische Experimente wurde die Lokalisation von endogenen Opioidrezeptoren untersucht [45]. Der MOR ist, unabhängig von der Hirnregion, überwiegend an der Plasmamembran von Ratten-Neuronen lokalisiert, hauptsächlich in der Region von Dendriten und präsynaptischen Endigungen [46, 47]. Elektronenmikroskopische Analysen von Immunogold-markiertem DOR zeigen die intrazelluläre Lokalisation in Neuronen

Einleitung

verschiedener Spezies, wobei der Rezeptor in Vesikeln (LDCV - *large dense core vesicles*) angereichert ist [48-50]. Besondere Umstände wie chronische Entzündungen oder die Behandlung mit Morphin resultieren in einer Anreicherung von DOR an der Zellmembran. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind weitgehend unbekannt [45]. Weitere immunohistochemische Studien an Ratten-Neuronen zeigen den überwiegenden Teil der KOR intrazellulär in Endosomen, sekretorischen Vesikeln oder ohne erkennbare Assoziation mit bestimmten Zellorganellen. Ein geringerer Teil an Rezeptoren ist an der Zellmembran zu finden [51].

Alle Rezeptortypen koppeln zu inhibitorischen $G_{i/o}$ -Proteinen, deren Aktivierung durch das aus dem Bakterium *Bordetella pertussis* stammende Pertussistoxin inhibiert wird [52]. Die Rezeptoraktivierung führt präsynaptisch zu einer reduzierten Freisetzung von Neurotransmitter. Dieser Effekt wird einerseits durch die Hemmung der Adenylylcyclase herbeigeführt, da die Aktivität der cAMP-abhängigen PKA aufgrund sinkender cAMP-Level reduziert wird, andererseits werden spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle blockiert, was zu vermindertem Ca^{2+} -Einstrom führt. An der postsynaptischen Membran kommt es durch aktivierte K^+ -Kanäle und dem folgenden Ausstrom von Ionen zur Hyperpolarisation.

Die Aktivierung von MOR durch Morphin oder (D-Ala², N-Me-Phe⁴, glycinol⁵)-Enkephalin (DAMGO) führt auch zur Aktivierung der MAP-Kinasen in transfizierten CHO Zellen [53]. Dieser stimulatorische Effekt wird durch die Behandlung mit Pertussistoxin inhibiert, was auf einen G_i -vermittelten Prozess hindeutet. Außerdem konnte die Morphin- bzw. DAMGO-induzierte ERK-Aktivierung anhand des PKC-Inhibitors Bisindolylmaleimid I in Astrozyten blockiert werden, was wiederum auf involvierte G-Proteine hindeutet [54]. Andererseits wurde bei der Blockade der Rezeptorinternalisierung in transfizierten Zellen eine abgeschwächte Aktivierung von ERK beobachtet [55]. Schließlich konnte in CHO Zellen gezeigt werden, dass sowohl β -Arrestine als auch G-Proteine zur Aktivierung von ERK führen [56]. Eine weitere Studie belegt, dass die MOR-vermittelte ERK-Aktivierung abhängig vom Liganden über die $G_{\beta\gamma}$ -Unterheiten oder β -Arrestin vermittelt wird und in unterschiedlicher zellulärer Lokalisation von ERK resultiert [57]. Diese Beobachtung wurde sowohl an heterolog exprimiertem MOR in transfizierten HEK Zellen als auch an endogenem Rezeptor in humanen Neuroblastom-Zellen bzw. Ratten-Neuronen nachgewiesen. Morphin und Methadon aktivieren ERK über PKC, wobei ERK im Cytoplasma verbleibt, während Etorphin und Fentanyl über einen β -Arrestin-abhängigen Signalweg ERK aktivieren, was zur Translokation von ERK in den Nucleus führt, wo der Transkriptionsfaktor Elk-1 aktiviert und die Transkription von GRK2 und β -Arrestin2 verstärkt wird [57]. Zusammenfassend nehmen

β -Arrestine eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion von MOR ein, indem sie als Schalter zwischen G-Protein-abhängiger und -unabhängiger Signalisierung fungieren [58]. Bei der Untersuchung des Internalisierungsverhaltens führten Enkephaline, Etorphin und DAMGO sowohl im Zellmodell [59, 60], als auch in Neuronen [46, 61] zur Internalisierung von MOR. Dagegen konnte bei der Behandlung mit Morphin zunächst keine Internalisierung von MOR in HEK293 Zellen beobachtet werden [60]. Wird aber zusammen mit MOR gleichzeitig β -Arrestin oder GRK überexprimiert, kommt es auch in HEK293 zur Internalisierung durch Morphin [62, 63]. Auch in Ratten-Neuronen konnte schließlich die durch Morphin induzierte Internalisierung von MOR beschrieben werden [64]. Interessanterweise kann die durch Morphin ausgelöste Internalisierung in Neuronen durch eine dominant negative Mutante von β -Arrestin2 inhibiert werden. Der internalisierte MOR gehört zu den recyclingfähigen Rezeptoren und kann dementsprechend zur Zelloberfläche zurück gebracht werden, wohingegen MOR lysosomal abgebaut wird.

1.2 Pathophysiologie des Schmerzes

Akute Schmerzen werden durch die Erregung von nozizeptiven, afferenten Neuronen ausgelöst und treten kurzfristig auf. Dagegen sind chronische Schmerzen eine langfristige Erscheinung, die durch kontinuierliche Reizung der Nozizeptoren oder Schädigungen im schmerzleitenden und -verarbeitenden neuronalen System verursacht wird [65].

Die Nozizeptoren (Schmerzrezeptoren) befinden sich an den peripheren Fortsätzen der bipolaren afferenten Neuronen, bei deren Erregung wird der Reiz über die nozizeptiven Afferenzen (A δ - und C-Fasern) zur zentralen Endigung des Neurons im Rückenmark geleitet. Über eine Synapse erfolgt die Erregungsübertragung auf Projektionsneurone, deren Axone den Reiz entweder über den Tractus spinothalamicus zum Nucleus ventralis posterolateralis des Thalamus und weiter zum somatosensorischen Kortex oder über den Tractus spinoreticularis zum Nucleus centralis lateralis und Nucleus parafascicularis des Thalamus weiter zum Hippocampus und Stirnhirn leiten. Dabei wird die synaptische Erregungsübertragung mittels der Neurotransmitter Substanz P, Glutamat und Adenosintriphosphat bewerkstelligt. Der somatosensorische Kortex gehört zur Großhirnrinde, dieser Bereich ist zusammen mit dem Thalamus für die bewusste Schmerzempfindung (Lokalisation, Stärke) verantwortlich. In Abb. 4 wird das nozizeptive System schematisch dargestellt.

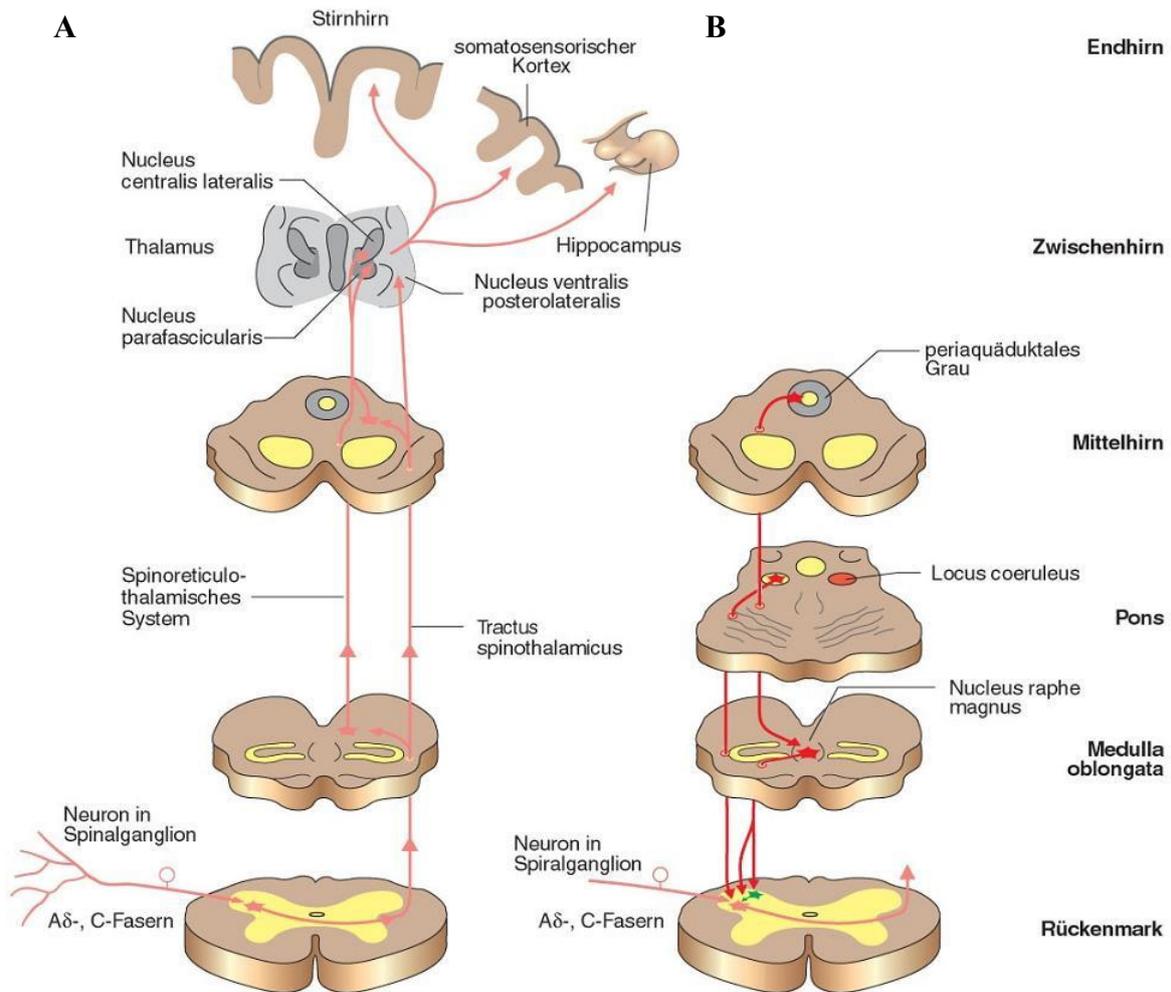


Abb. 4: Das nozizeptive System. (A) Über die aufsteigenden Bahnen werden die Reize vom Nozizeptor zum Gehirn geleitet. Durch mechanische, thermische oder chemische Reize werden zunächst die Nozizeptoren aktiviert, die ihre Aktionspotentiale über nozizeptive Afferenzen (A δ - und C-Fasern) über die Hinterwurzeln ins Rückenmark leiten. Hier erfolgt die synaptische Erregungsübertragung auf Projektionsneurone, deren Axone im Tractus spinothalamicus oder Tractus spinoreticularis zum Gehirn aufsteigen. Das direkte spinothalamische System endet im Nucleus ventralis posterolateralis des Thalamus, der weiter zum somatosensorischen Kortex projiziert. Das spinoreticulothalamische System wird in der Formatio reticularis umgeschaltet und endet im Nucleus centralis lateralis und Nucleus parafascicularis, von hier gibt es Verbindungen zum Hippocampus und Stirnhirn. (B) Die synaptische Übertragung von den primär-afferenten Neuronen auf die spinothalamischen Neuronen wird durch die absteigenden Bahnen aus dem Nucleus raphe magnus und dem Locus coeruleus direkt oder indirekt über Interneurone der Substantia gelatinosa (grün dargestellt) gehemmt. Die Raphe-magnus-Neurone werden vom periaquäduktalen Grau gesteuert (entnommen aus Aktories *et al.* 2005 [65]).

Im Hinterhorn des Rückenmarks befinden sich opioiderge (enkephalinerge, dynorphinerge) Interneurone, welche die Aktivität der spinothalamischen Neurone hemmen. Ausgehend vom periaquäduktalen Grau des Mittelhirn werden die opioidergen Interneurone indirekt über den serotonergen Nucleus raphe magnus in der Medulla oblongata weiter über descendierende Bahnen aktiviert. Die aktivierten Interneurone schütten Opioidpeptide aus, welche die Erregungsübertragung von den primär afferenten Neuronen auf die spinothalamischen Neurone inhibieren. Die descendierenden, serotonergen Neurone können auch direkt über Synapsen mit den spinothalamischen Neuronen verknüpft sein. Analog zu den endogenen Opioiden aus den spinalen Interneuronen, hemmen morphinähnliche Analgetika die Erregungsübertragung von nozizeptiven Afferenzen auf spinothalamische Neurone.

1.3 Die Behandlung von Schmerzen

Die Arzneimittel mit schmerzstillender Wirkung werden in Nicht-Opioidanalgetika und Opioidanalgetika eingeteilt [65]. Zu den Nicht-Opioidanalgetika gehören die sauren antipyretischen-antiphlogistischen Analgetika wie z.B. Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Diclofenac. Weiterhin gibt es nicht-saure antipyretische Analgetika wie Paracetamol und Metamizol. Die sauren Analgetika verhindern über die Hemmung der Cyclooxygenase die Prostaglandinsynthese und verhindern so die Sensibilisierung der Nozizeptoren gegenüber von Schmerzmediatoren wie Bradykinin, Histamin und Serotonin. Zwar sind die nicht sauren Analgetika schwache Inhibitoren der Cyclooxygenase, sie gelangen jedoch leicht ins ZNS, wo sie ihren analgetischen Effekt durch die Hemmung der Cyclooxygenase entfalten können. Weiterhin gibt es Analgetika ohne antipyretische-antiphlogistische Wirkung, dazu gehört Flupirtin, welches die Weiterleitung aufsteigender nozizeptiver Pulse durch die Aktivierung von K^+ -Kanälen hemmt. Durch den Ausstrom von Kaliumionen wird das Ruhepotential verstärkt und die Auslösung eines Aktionspotentials unterdrückt. Auch Nefopam gehört zu den Analgetika ohne antipyretische-antiphlogistische Wirkung, es hemmt die Aufnahme von Noradrenalin, Dopamin und Serotonin in den absteigenden schmerzmodulierenden Neuronen. Zu den Opioidanalgetika gehören neben den Opioidpeptiden auch die natürlichen und synthetischen Opiate. Eine Vielzahl an Opiaten wird therapeutisch eingesetzt, nach ihrer Wirkungsweise am jeweiligen Rezeptortyp werden die Opioid-Analgetika in reine (volle) Agonisten, partielle Agonisten und reine Antagonisten eingeteilt. Zu den Agonisten gehören neben Morphin z.B. Fentanyl und Pethidin. Dagegen ist Buprenorphin ein partieller Agonist am μ -Rezeptortyp, der jedoch durch seine hohe Affinität eine stärkere und länger anhaltende

analgetische Wirkung als Morphin zeigt. Wirkt ein Ligand antagonistisch auf den μ -Rezeptortyp und gleichzeitig agonistisch am κ -Rezeptortyp, so wird er als gemischter Agonist-Antagonist bezeichnet. Pentazocin gehört zu den gemischten Agonisten-Antagonisten, es zeigt eine schwache μ -antagonistische Wirkung. Bei Überdosierungen von Opiaten wird der reine Antagonist Naloxon eingesetzt. Naloxon hemmt alle Opioidrezeptoren kompetitiv, dabei ist seine Affinität zu den einzelnen Rezeptorsubtypen unterschiedlich.

Opioidanalgetika greifen an mehreren Punkten im ZNS an, was in den folgenden Ausführungen exemplarisch an Morphin erörtert werden soll [65]. Auf spinaler Ebene wird die synaptische Übertragung von den primär-afferenten Fasern zu den spinothalamischen Neuronen direkt gehemmt. Über die supraspinale Aktivierung von descendierenden inhibitorischen Bahnen wird die synaptische Übertragung von primär-afferenten Fasern zu den spinothalamischen Neuronen indirekt gehemmt. Ein weiterer supraspinaler Angriffspunkt ist die Hemmung der neuronalen Aktivität in thalamischen Kernen sowie die Hemmung der Verbindungen dieser Kerne mit kortikalen Arealen. Zusammenfassend wird über Opioidrezeptoren auf Rückenmarksebene die Intensität der dem Gehirn zufließenden Schmerzinformationen moduliert und die Schmerzverarbeitung wird durch Rezeptoren im Thalamus verändert [66].

Die Behandlung mit Morphin hat gravierende Nebenwirkungen wie Atemdepression, Bradykardie, Euphorie, Hypothermie, Miosis und Obstipation. Bei chronischer Verabreichung kommt es außerdem zur Entwicklung von Toleranz sowie psychischer und physischer Abhängigkeit, was der Missbrauch von 3,6-Diacetylmorphin (Heroin) zeigt. Aufgrund der Nebenwirkungen wurde intensiv nach besser verträglichen Opiaten mit analgetischer Wirkung gesucht, was bisher keinen Erfolg für die klinische Therapie brachte [67].

1.4 Morphin und dessen Metabolismus

Morphin ist das Hauptalkaloid des Opiums, es ist eines der stärksten, natürlich vorkommenden Schmerzmittel und spielt, wie bereits in Abschnitt 1.3 erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Therapie von akuten und chronischen Schmerzen. Außerdem dient Morphin als wichtige Grundlage für die Herstellung synthetischer Analoga wie Methadon und Diacetylmorphin. Morphin gehört zu den Opiaten und wurde erstmals 1805 von dem deutschen Apotheker Friedrich Wilhelm Sertürner aus Opium, dem getrockneten Milchsaft des Schlafmohns (*Papaver somniferum*), isoliert [68]. Er benannte das Alkaloid aufgrund seiner sinnesändernden Eigenschaften Morphinum, nach dem griechischen Gott der Träume

Morpheus. Später wurde der Name nach dem Vorschlag des französischen Chemikers und Physikers Gay-Lussac in den heute gebräuchlichen Namen Morphin geändert [69]. Neben Morphin enthält Opium noch weitere Alkaloide des Phenanthren-Typs wie Codein und Thebain, aber auch des Benzylisochinolin-Typs wie Papaverin und Noscapin.

Exogenes Morphin wird nach der Applikation in den humanen Organismus hauptsächlich in der Leber metabolisiert, daraus resultiert eine geringe Halbwertszeit von ca. 2 h [70]. Abb. 5 gibt einen Überblick über den Metabolismus von Morphin und zeigt die Strukturformeln der Metabolite. Bei den metabolischen Reaktionen unterscheidet man zwischen Modifikationsreaktionen (Phase 1) und Konjugationsreaktionen (Phase 2). Ungefähr 10% des verabreichten Morphins werden unverändert mit dem Urin ausgeschieden [69].

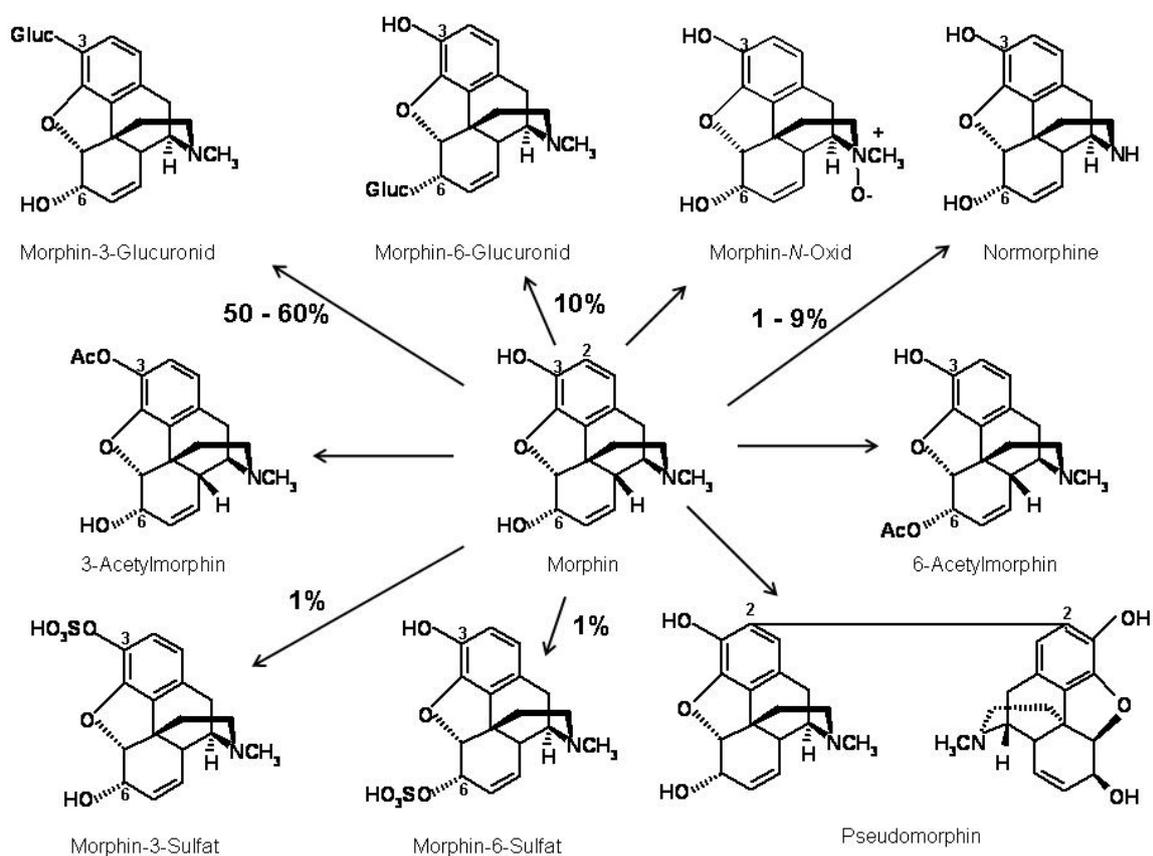


Abb. 5: Schematische Darstellung des Metabolismus von Morphin im humanen Organismus. Morphin wird in der Leber hauptsächlich zum aktiven Morphin-6-Glucuronid und inaktiven Morphin-3-Glucuronid umgewandelt. Durch die Konjugation mit Schwefelsäure wird Morphin-Sulfat hergestellt, bei der Acetylierung entsteht Acetylmorphin. Weitere Reaktionen sind die Oxidation zu Morphin-N-Oxid bzw. Pseudomorphin und die Demethylierung zu Normorphin.

Der überwiegende Teil von Morphin wird an der phenolischen C3-Hydroxygruppe bzw. der alkoholischen C6-Hydroxygruppe mit Glucuronsäure konjugiert. Diese Glucuronidierung wird von der UDP-Glucuronyltransferase UGT2B7 katalysiert. Unabhängig von der Applikationsart werden ungefähr 55% des Morphins in Morphin-3-Glucuronid und ca. 10% in Morphin-6-Glucuronid umgewandelt [69, 71]. Morphin-3-Glucuronid hat keine analgetischen Eigenschaften, dagegen trägt Morphin-6-Glucuronid wesentlich zur analgetischen Wirkung von Morphin bei [72]. Trotz seiner hydrophilen Eigenschaften kann Morphin-6-Glucuronid die Blut-Hirn-Schranke überwinden und an die Opioidrezeptoren im ZNS binden [73]. Morphin-6-Glucuronid wird selbst nicht weiter metabolisiert, deshalb übersteigt dessen Plasmakonzentration die von Morphin bereits kurz nach der Applikation. Weiterhin ist Morphin-6-Glucuronid länger im Blutplasma nachweisbar als Morphin selbst. Für die effektive analgetische Dosierung müssen daher die Konzentration von Morphin und Morphin-6-Glucuronid im Liquor berücksichtigt werden [66]. Eine weitere metabolische Reaktion ist die Konjugation mit Schwefelsäure, dabei wird Morphin-3- und Morphin-6-Sulfat produziert. Die Acetylierung von Morphin gehört ebenso zu den Konjugationsreaktionen, wobei 3- bzw. 6-Acetylmorphin entsteht. Bei der Metabolisierung von Morphin entstehen nur geringe Mengen 6-Acetylmorphin, aber als Hauptmetabolit von Heroin ist 6-Acetylmorphin ein wichtiger Indikator im Plasma [74]. 6-Acetylmorphin wird als aktiver Metabolit eingestuft, da er die von MOR aktivierte Signalkaskade auslöst [75]. Durch Demethylierung am Stickstoffatom wird aus Morphin Normorphin hergestellt, diese Reaktion wird von Oxidoreduktasen katalysiert. Auch Normorphin trägt zur analgetischen Wirkung von Morphin bei [74, 76]. Außerdem wird Morphin durch Oxidationsreaktionen sowohl in Morphin-N-Oxid als auch in Pseudomorphin umgewandelt.

In wässriger Lösung degradiert Morphin hauptsächlich zu Pseudomorphin und zu einem geringeren Anteil zu Morphin-N-Oxid [77]. Bei der Degradation sind Sauerstoffkonzentration und pH-Wert wichtige Faktoren, während Licht und Temperatur nur wenig Einfluss nehmen. Bei Pseudomorphin handelt es sich um das dimerisierte Oxidationsprodukt von Morphin, es entsteht durch Oxidation mit Luftsauerstoff, oder enzymatisch durch Cytochrom C oder Meerrettichperoxidase [78].

Interessanterweise konnte das Alkaloid Tetrahydropapaveroline, welches als eine Morphin-Vorstufe bekannt ist, im humanen Urin und Gehirn nachgewiesen werden. Diese Tatsache führte zu Spekulationen über eine endogene Morphinsynthese in Säugetieren. Schließlich konnte die Morphinsynthese in lebenden Mäusen gezeigt werden, indem nach der intra-peritonealen Applikation von Morphin-Vorstufen Morphin im Urin nachgewiesen wurde [79].

1.5 Grundlagen des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers

Das Jablonski-Diagramm (Abb. 6) beschreibt die Energieübergänge, welche bei der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung möglich sind. Bei der Absorption von elektromagnetischer Strahlung wird ein Molekül vom elektronischen Grundzustand S_0 in einen angeregten elektronischen Zustand S_n versetzt [80]. Dabei werden die Elektronen in höhere Schwingungszustände ν_n angehoben. Das Molekül kann die Energie auf verschiedene Weisen wieder abgeben. Durch Zusammenstöße mit anderen Teilchen wird das Molekül vom angeregten in den Schwingungsgrundzustand versetzt. Diese Form der Energieabgabe wird strahlungslose Deaktivierung genannt, dabei wird die elektronische Energie in Rotations-, Schwingungs- oder Translationsenergie und damit in thermische Energie der Umgebung umgewandelt. Die Elektronen fallen von höher angeregten elektrischen Zuständen S_n in den ersten angeregten Zustand S_1 zurück. Da die Umgebung nur begrenzt Energie aufnimmt, kann das Elektron vom ersten angeregten Zustand nur durch Emittieren von Strahlung in den elektronischen Grundzustand S_0 zurückfallen. Es kommt zur spontanen Emission von Photonen, dieses Phänomen nennt man Fluoreszenz. Die emittierte Strahlung ist im Vergleich zur absorbierten immer zu einer größeren Wellenlänge verschoben, diese Gegebenheit bezeichnet man als Rotverschiebung oder nach deren Entdecker als Stokes-Verschiebung.

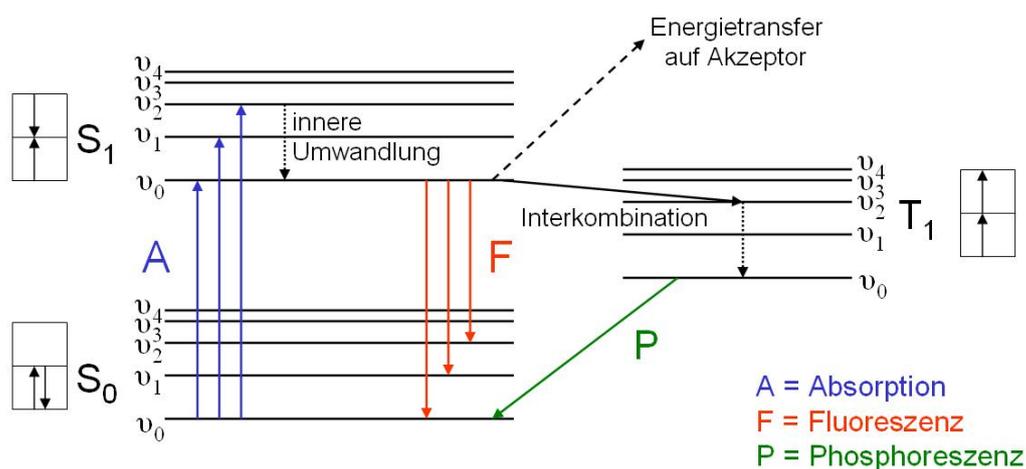


Abb. 6: Das Jablonski-Diagramm (auch Thermoschema genannt) beschreibt die energetischen Übergänge eines Moleküls bei der Absorption und Emission von elektromagnetischer Strahlung. Übergänge, die unter Absorption oder Emission von Photonen vonstatten gehen, sind farblich dargestellt, während strahlungslose Übergänge mit schwarzen Pfeilen angedeutet sind. Die Singulett- (S_0 , S_1) und Triplettzustände (T_1) teilen sich in Schwingungsniveaus (ν_0 , ν_1) auf, die sich weiter in Rotationsniveaus unterteilen (nicht graphisch dargestellt).

Einleitung

Befindet sich ein Fluorophor in räumlicher Nähe (1 - 10 nm) zum angeregten Molekül, kann es zum strahlungslosen Energietransfer kommen, der als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) bezeichnet wird [81]. Der strahlungslose Energietransfer beruht auf Dipol-Dipol-Wechselwirkungen zwischen Donor- und Akzeptorfluorophor, wobei das Emissionsspektrum des Donors mit dem Extinktionsspektrum des Akzeptors überlappen muss. Durch den Energietransfer kann die Emission des Akzeptors detektiert werden, obwohl nur das Donormolekül durch eine bestimmte Wellenlänge angeregt wurde. Handelt es sich um einen biolumineszierenden Donor, welcher Energie strahlungslos auf einen fluoreszierenden Akzeptor überträgt, spricht man von Biolumineszenz-Resonanz-Energie-Transfer (BRET) [82]. Die Effizienz des Energietransfers E_{FRET} ist nach Theodor Förster (1948) wesentlich vom räumlichen Abstand der Fluorophore r und dem Förster-Radius R_0 abhängig (Gl. 1). Mithilfe der Fluoreszenzintensität, der Fluoreszenz-Lebenszeit oder der Fluoreszenz-Anisotropie kann die FRET-Effizienz ermittelt werden [82].

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + \left(\frac{r}{R_0}\right)^6} \quad (\text{Gl. 1})$$

Der Förster-Radius gibt den Abstand zwischen den beteiligten Fluorophoren an, bei dem der Energietransfer halbmaximal ist. Nach der Förster-Gleichung führt die Verdopplung des Förster-Radius zur der 30-fachen Reduktion der Effizienz. Beispielsweise ist R_0 für das FRET-Paar CFP/ YFP 5 nm. Mathematisch ist R_0 nach Gl. 2 definiert:

$$R_0 [nm] = \sqrt[6]{8,8 \cdot 10^{-23} \cdot n^{-4} \cdot Q_D \cdot \kappa^2 \cdot J} \quad (\text{Gl. 2})$$

Dabei steht n für den Refraktionsindex des umgebenden Mediums. Q_D ist die Quantenausbeute des Donors, diese gibt an, wie viel Anregungsenergie als Fluoreszenz abgegeben wird. Der Orientierungsparameter κ^2 gibt die Anordnung der Übergangsdipolmomente der Fluorophore an, denn der Energietransfer hängt von der Orientierung der Fluorophore zueinander ab [83]. Sind die Dipolmomente parallel zueinander ausgerichtet, kommt es zum Energietransfer, dagegen ist bei senkrechter Ausrichtung der Dipolachsen kein FRET zu beobachten. Das Überlappungsintegral J beschreibt den spektralen Überlapp zwischen Donoremission und Absorption des Akzeptors. Weiterhin ist die Stärke der Fluoreszenz von

der Umgebung abhängig, sie variiert mit der Fähigkeit des Solvens, elektrische Energie und Schwingungsenergie aufzunehmen.

1.6 Fluoreszierende Proteine

Die Entdeckung von intrinsischen fluoreszierenden Proteinen hat die Zell- und Molekularbiologie fundamental beeinflusst. Dies wird auch durch den Chemie-Nobelpreis 2008 deutlich, der den Forschern Osamu Shimomura, Martin Chalfie und Roger Y. Tsien für grundlegende Arbeiten auf diesem Gebiet verliehen wurde.

Ursprünglich wurde das grün fluoreszierende Protein (GFP) in der Leuchtqualle *Aequorea victoria* entdeckt [84]. Das Protein wird aus 238 Aminosäureresten aufgebaut, daraus ergibt sich eine Molekülmasse von 27 kDa. Der intrinsische Chromophor entsteht nach der Proteinexpression autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 [85]. Das natürlich vorkommende GFP hat zwei Absorptionsbanden mit Maxima bei 395 nm und 475 nm. Das Emissionsmaximum liegt bei 508 nm im grünen Bereich. In der Qualle erfolgt der strahlungslose Energietransfer vom Photoprotein Aequorin auf GFP. Das von Aequorin erzeugte blaue Licht ist nicht sichtbar, weil die Energie strahlungslos auf das benachbarte GFP übertragen wird. Dieser Vorgang führt schließlich zur GFP-Emission. Wie die Auflösung der Kristallstruktur ergab, bilden 11 β -Faltblätter eine fassartige Struktur (*β -barrel*) um den Chromophor [86]. In Abb. 7 werden die Tertiärstruktur von GFP und die Bildung des Chromophors schematisch dargestellt.

Seit der Entdeckung des GFPs wurden durch kontinuierliche Forschungsarbeiten viele GFP-Varianten entwickelt. Diese unterscheiden sich in Exzitations- und Emissionswellenlängen, verbesserter Helligkeit und pH-Stabilität [87]. Die GFP-Derivate wurden entsprechend ihrer emittierten Wellenlänge benannt, wie z.B. blau- (BFP), cyan- (CFP) und gelb fluoreszierendes Protein (YFP). Eine signifikante Verbesserung brachte die Entwicklung des *enhanced* GFP (EGFP), welches sich aufgrund der Mutation Phe64Leu besser bei 37°C faltet und die Ionisation des Chromophors durch den Aminosäureaustausch Ser65Thr unterstützt [88]. Durch die Mutation Ala206Lys wurden GFP-Varianten entwickelt, die nicht oligomerisieren, was bei der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen besonders wichtig ist [87]. Die Entdeckung und Weiterentwicklung von rot fluoreszierenden Proteinen (RFP), die sich von der Koralle *Dicosoma* sp. ableiten, war ein weiterer Fortschritt, da nun der gesamte visuelle Bereich des elektromagnetischen Spektrums ausgeschöpft werden kann [89]. Mit der Vielfalt

Einleitung

der Fluoreszenzproteine erweiterten sich auch die Anwendungsmöglichkeiten, so konnten gleichzeitig mehrere Fluoreszenzproteine visualisiert werden.

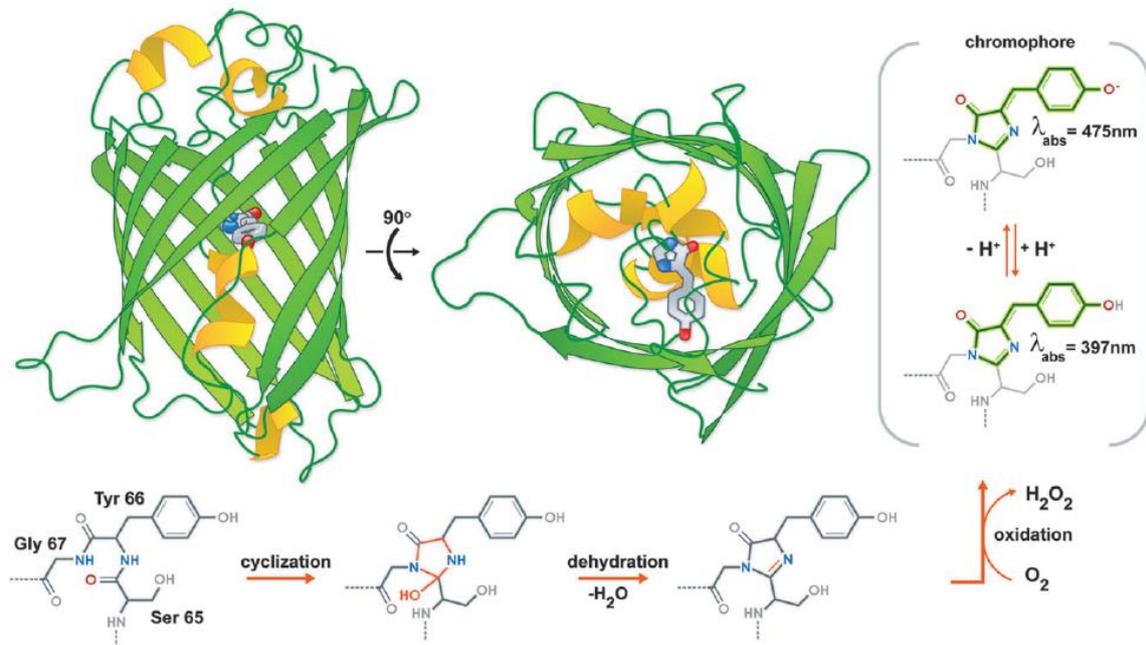


Abb. 7: Die Struktur von GFP ergibt sich aus β -Faltblättern, die sich zu einer zylindrischen Anordnung formieren. Innerhalb des Proteins entsteht der intrinsische Fluorophor autokatalytisch durch Zyklisierung, Dehydratisierung und Oxidation der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 (entnommen aus Frommer *et al.*, 2009 [90]).

GFP eignet sich für die heterologe Proteinexpression, weil das Protein seinen Chromophor auch in anderen Organismen ohne zusätzliche Cofaktoren bildet [88]. Demnach können Fluoreszenzproteine durch das Einbringen der zugehörigen cDNA in verschiedensten lebenden Zellen hergestellt werden. Durch die Fusion an Zielproteine können diese in lebenden Zellen visualisiert werden. Außerdem eignen sich Fluoreszenzproteine als Reporterproteine zur Untersuchung von Proteinfaltung, intrazellulärem Transport und Lokalisation. Durch Anfärben von Zellorganellen oder den Einsatz mehrerer Fluoreszenzproteine können Kollisionsstudien durchgeführt werden. Weitere Verwendung finden Fluoreszenzproteine bei der Konstruktion von Biosensoren (siehe Abschnitt 1.8).

Damit sich zwei Fluorophore als FRET-Paar eignen, müssen einige Bedingungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Exzitationsspektren ausreichend getrennt sein, um eine selektive Anregung des Donors zu gewährleisten. Außerdem muss das Anregungsspektrum des Akzeptors mit dem Emissionsspektrum des Donors überlappen. Schließlich ist ein

ausreichender Abstand zwischen den Emissionspektren wichtig, um die Fluoreszenz für jeden Fluorophor zuzuordnen. Eine weitere Limitierung stellt die Oligomerisierung von Fluoreszenzproteinen dar, da dies zur Aggregation von Zielproteinen und somit zu Artefakten führen kann. Das am häufigsten verwendete FRET-Paar sind CFP und YFP. Die zugehörigen Anregungs- und Emissionspektren werden in Abb. 8 gezeigt.

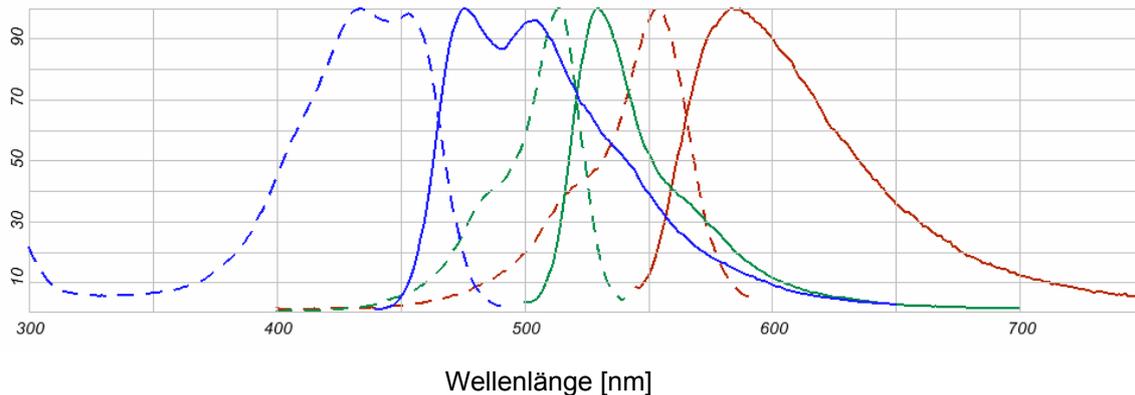


Abb. 8: Exzitations- und Emissionspektren von CFP (blau), YFP (grün) und RFP (rot) bei einem pH-Wert von 7,4, hierbei sind die Anregungsspektren mit unterbrochenen Linien und die Emissionen mit durchgehender Linie eingezeichnet. Das Emissionsspektrum von CFP überlappt mit dem Anregungsspektrum von YFP (Maximum bei 509 nm), was die Voraussetzung für einen strahlungslosen Energietransfer darstellt (entnommen aus <http://www.invitrogen.com>).

1.7 Fluorescein arsenical hairpin binder

Neben den fluoreszierenden Proteinen gibt es noch eine Vielzahl von nicht natürlich vorkommenden Fluorophoren, die an Zielproteine gekoppelt werden können wie z.B. die Xanthenfarbstoffe Fluorescein und Rhodamin. Solche Farbstoffe werden über Cysteinreste nachträglich in das Protein eingebaut, deshalb müssen für spezifische Markierungsverfahren alle anderen Cysteinreste mutiert werden. Für *in vitro* Experimente sind solche Techniken anwendbar, sie gestalten sich aber in *in vivo* Untersuchungen schwierig [91], da jegliche Cysteinreste anderer Proteine stören und der Farbstoff möglicherweise nicht zum Zielprotein gelangt.

Mit der Entwicklung von biarsenischen Fluorescein-Derivaten und deren spezifischer Bindung an Tetracysteinmotive wurde es möglich Proteine *in vitro* [92, 93] und *in vivo* [94] zu markieren. Dabei wird ein Tetracysteinmotiv (CCxxCC) in das Zielprotein eingeführt und

Einleitung

nach der Expression mit dem Fluorescein-Derivat 4',5'-bis-(1,3,2-dithioarsolan-2-yl)-Fluorescein (FIAsH, *fluorescein arsenical hairpin binder*) markiert [92]. Hierbei erfolgt die kovalente Bindung des Fluorescein-Derivates über Komplexbindung zwischen den Cysteinresten und Arsenatomen (Abb. 9). Die Aminosäurereste zwischen den Cysteinen nehmen Einfluss auf die Ausbildung der Sekundärstruktur und die Stabilität des tetraedrischen Komplexes, bei der Optimierung des Motivs wurde daher die Sequenz CCPGCC ermittelt [93]. Dabei bildet das Tetracysteinmotiv eine haarnadelähnliche Struktur aus, wobei die Cysteinpaare einen Abstand von 6Å haben, ebenso wie die beiden Arsenatome im FIAsH. Die Bindung von FIAsH an CCPGCC ist spezifisch, schon der Austausch von PG zu GP führt zu einer Reduktion der Affinität um ca. Faktor 20 [93]. Erst nach der Bindung an die 6er-Peptidsequenz ist FIAsH hoch fluoreszent, das Extinktionsmaximum befindet sich bei 508 nm und das Emissionsmaximum bei 528 nm im gelben Bereich [87]. Aufgrund der lipophilen Struktur kann FIAsH die Zellmembran passieren und somit können auch intrazelluläre Tetracysteinmotive markiert werden. Hinsichtlich der spezifischen Markierung erweist es sich als vorteilhaft, dass das CCxxCC-Motiv in natürlich vorkommenden Proteinen sehr selten auftritt [95]. Trotzdem kann eine Hintergrundfluoreszenz durch das unspezifische Markieren cysteinreicher endogener Proteine hervorgerufen werden [96, 97]. Weiterhin kommt es durch die hydrophoben Eigenschaften des Fluoresceins zur Adhäsion an lipophile Strukturen und somit zu unspezifischer Markierung. Auch unspezifisch gebundener Fluorophor trägt zur Hintergrundfluoreszenz bei, daher wird unspezifisch gebundenes und überschüssiges FIAsH durch Waschen mit einem Dithiol in mikromolarer Konzentration entfernt. In millimolaren Konzentrationen vermag das Dithiol FIAsH aus dem Komplex mit dem Tetracysteinmotiv zu verdrängen [93].

Um die Affinität des Tetracysteinmotivs zum biarsenischen Fluorophor zu verbessern, wurden die das Motiv umgebenden Aminosäuren optimiert. Dazu wurde das Motiv mit zufälligen Aminosäurekombinationen erweitert und an GFP fusioniert. Anschließend wurden diese Konstrukte retroviral in HEK Zellen eingebracht und mit dem biarsenischen Fluorophor ReAsH (*red arsenical hairpin binder*), einem Resofurinderivat mit einer Exzitation bei 593 nm und Emission von 608 nm, markiert. Dann wurde unter der Anregung von GFP die durch FRET erzeugte Emission von ReAsH mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dadurch wurden die erweiterten Motive HRWCCPGCCKTF und FLNCCPGCCMEP identifiziert, an welchen die biarsenischen Fluorophore eine erhöhte Fluoreszenzquantenausbeute und Dithiol-Resistenz aufzeigen [98].

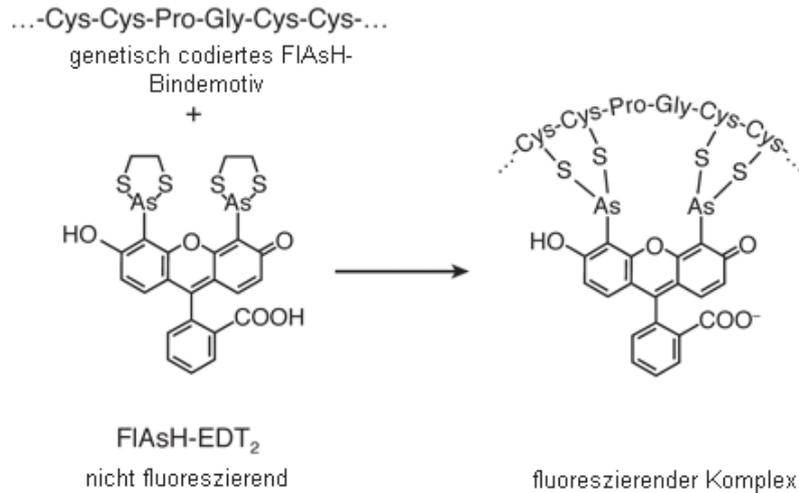


Abb. 9: Strukturformel von FIAsh im Komplex mit 1,2-Ethandithiol (EDT). Erst nach der Bindung an das im Zielprotein befindliche Tetracysteinmotiv zeigt sich der biarsenische Fluorophor intensiv fluoreszent. Der Abstand der Arsene im FIAsh ist vergleichbar mit dem Abstand der Cysteinpaare in der Haarnadelstruktur des Tetracysteinmotivs (modifiziert nach <http://www.invitrogen.com>).

Angesichts seiner spektralen Eigenschaften kann FIAsh statt YFP eingesetzt werden, es ist auch als Akzeptorfluorophor von CFP bei FRET-Messungen in lebenden Zellen geeignet. Als erster intramolekularer Biosensor wurde der A_{2A}-Adenosinrezeptor mit dem Tetracysteinmotiv in ICL3 und C-terminalem CFP publiziert [99]. Das Einfügen von Fluorophoren kann sich auf die Tertiärstruktur und Funktionalität des modifizierten Proteins auswirken. Mit nur 700 Da ist FIAsh um ein Vielfaches kleiner als YFP mit dem Molekulargewicht von 27 kDa und nimmt damit unter Umständen weniger Einfluss auf die Eigenschaften des markierten Proteins. Insbesondere kann bei GPCR die Signalweiterleitung beeinflusst werden, was der Vergleich des A_{2A}-FIAsh-CFP-Sensors mit dem A_{2A}-CFP-YFP-Sensor zeigt. Während der mit YFP markierte Rezeptor die Adenylylcyclase nur sehr schwach aktiviert, konnte der mit FIAsh markierte Rezeptor die Adenylylcyclase vergleichbar zum Wildtyp-A_{2A}-Rezeptor aktivieren [99].

1.8 Anwendung von FRET-basierten Methoden in vivo

FRET-Methoden werden häufig zur Erforschung von Protein-Protein-Interaktionen und intramolekularen Konformationsänderungen angewandt. Aufgrund der Abstandsabhängigkeit eignen sich FRET-Messungen außerdem zur Bestimmung von Abständen [100]. Dazu werden die zu betrachtenden Proteine durch molekularbiologische Techniken mit Fluorophoren

markiert oder so modifiziert, dass sie mit Fluorophoren z.B. FLAsH markiert werden können. Grundsätzlich können intramolekulare oder intermolekulare Sensoren konzipiert werden [87]. Die Fluorophore befinden sich bei intramolekularen Sensoren innerhalb eines Proteins und bei intermolekularen Sensoren an verschiedenen Proteinen oder Proteinuntereinheiten (Abb. 9). Alternativ können intramolekulare auch als monomolekulare Sensoren und intermolekulare als bimolekulare Sensoren bezeichnet werden. Biosensoren werden in Kombination mit verschiedensten Mikroskopietechniken zur Untersuchung von biologischen Ereignissen genutzt. Zu erwähnen sind u.a. Sensoren für sekundäre Botenstoffe wie cAMP, cGMP und Calcium [101-103].

Mit der Entwicklung von Fluorophoren und Fluoreszenzproteinen wurden auch vielfältige Mikroskopietechniken hervorgebracht, mit denen FRET-Messungen durchgeführt werden können. Dabei wird das FRET-Signal üblicherweise als Quotient von Akzeptor- und Donoremission angegeben. Eine häufig verwendete Methode ist die Weitfeldmikroskopie, die jedoch besonders bei dicken Proben an die Grenzen ihrer Anwendbarkeit stößt. Dagegen können bei der Konfokalmikroskopie FRET-Signale dreidimensional aufgelöst werden. Bei den intensitätsbasierten Techniken müssen die Falschanregung des Donors durch die Exzitation des Akzeptors und das Durchbluten der Donor-Emission in den Akzeptor-Kanal berücksichtigt werden [82]. Diese Effekte müssen für jede Messanordnung gesondert bestimmt werden, eine sorgfältige Auswahl der Filter hilft, diese Effekte zu minimieren. Bei dynamischen FRET-Messungen wird die Fluoreszenzintensität über die Zeit betrachtet, dabei werden Donor- und Akzeptoremission simultan aufgezeichnet und bei der Änderung des FRET-Signals verhalten sich die Emissionen reziprok zueinander. Eine weitere Herausforderung stellt die Hintergrundfluoreszenz dar, die vor allem in biologischen Proben störend sein kann. Diese Problematik wird beim zeitaufgelösten FRET (*time resolved FRET*; TR-FRET) umgangen, da die Fluoreszenz etwas verzögert nach der Anregung gemessen wird. Dafür werden Fluorophore mit einer langen Fluoreszenzlebensdauer, wie die Lanthanide, verwendet. Ein Vorteil beim TR-FRET ist die geringe Hintergrundfluoreszenz, die durch eine wesentlich kürzere Fluoreszenzlebensdauer ausgeblendet wird. FRET verkürzt die Fluoreszenzlebensdauer des Donors, dies wird bei der Messung des Donor-Photobleichens genutzt, da das Photobleichen proportional zur Fluoreszenzlebensdauer ist. Bei der Fluoreszenzlebensdauer-Mikroskopie (*fluorescence lifetime imaging microscopy*; FLIM) kann die FRET-Effizienz bestimmt werden, indem die Lebensdauer des Donors allein von der Lebensdauer unter Anwesenheit des Akzeptors abgezogen wird [104]. FLIM-Messungen sind

unabhängig von Änderungen der Anregung, Photobleichen, Lichtstreuung und der Probenkonzentration, aber aufwendiger.

Auch in Bezug auf die Erforschung von GPCR, deren Aktivierung, Signalkaskaden und Dimerisierung, sind FRET-Techniken unentbehrlich [105, 106]. Inzwischen existieren intramolekulare FRET-Sensoren für einige GPCR wie den α_{2A} -adrenergen Rezeptor (α_{2A} -AR), A_{2A} -Adenosinrezeptor, β_1 -adrenergen Rezeptor, β_2 -adrenergen Rezeptor und M_2 -Muskarinrezeptor [99, 107-110]. Alle der aufgeführten Sensoren wurden mit einem Fluorophor am C-Terminus und mit einem weiteren Fluorophor bzw. dem Tetracysteinmotiv innerhalb der dritten intrazellulären Schleife markiert (Abb. 10). Außerdem kann die Kopplung des heterotrimeren G-Proteins zum Rezeptor durch eine intermolekulare FRET-Messung untersucht werden, dies wurde beispielsweise für den α_{2A} -AR und das G_i -Protein gezeigt [111]. Hierfür wurde ein G_i -Protein-Sensor entwickelt, welcher an der $G_{\alpha i1}$ -Untereinheit zwischen den Aminosäureresten 91 und 92 mit YFP und an der G_{γ} -Untereinheit C-terminal mit CFP markiert wurde. Die Rezeptoraktivierung führt zur Aktivierung des G_i -Proteins, was zur Reorganisation der G_i -Protein-Untereinheiten führt und in einem abfallenden FRET-Signal resultiert (Abb. 10 E). Auch die Rekrutierung von β -Arrestin zu einem GPCR kann mittels intermolekularer FRET-Messung in Echtzeit visualisiert werden [112]. Der Vorteil von FRET-Messungen an lebenden Zellen gegenüber von biochemischen Methoden ist die hohe räumliche und zeitliche Auflösung [105].

Durch die Modifikation der Zielproteine können grundsätzlich Faktoren wie Expression, intrazelluläre Lokalisation und Funktionalität beeinträchtigt werden, daher müssen diese Eigenschaften überprüft und mit dem Wildtyp-Protein verglichen werden [82].

Einleitung

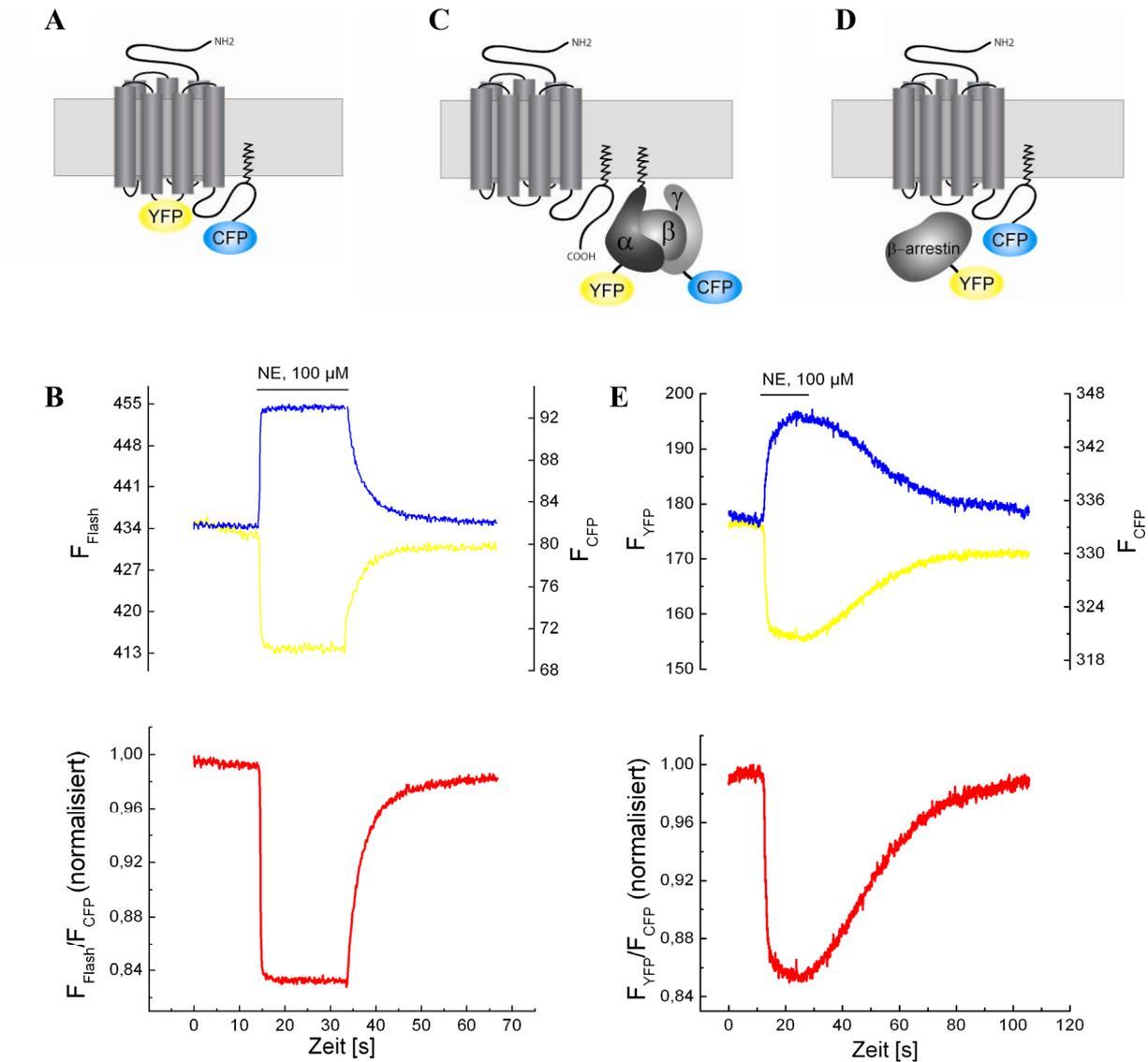


Abb. 10: Schematische Darstellung von GFP-basierten Biosensoren und deren Anwendung auf GPCR. (A) Intramolekularer FRET-Sensor am Beispiel eines GPCR, der in der dritten intrazellulären Schleife und am C-Terminus mit YFP bzw. CFP markiert ist. (B) Bei der Rezeptoraktivierung kommt es zur Konformationsänderung, die durch die Änderung des intramolekularen FRET-Signals angezeigt wird. Dies wird hier am Beispiel des α_{2A} -AR-Sensors präsentiert, der durch seinen Agonisten Norepinephrin (NE) aktiviert wird. Dabei kommt es zu einem Anstieg der CFP-Fluoreszenz (F_{CFP}) und dem Abfall der FRET-Emission (F_{FLASH}), was in einem schnell abfallenden Emissionsquotienten resultiert. (C) Bei der Aktivierung von G-Proteinen und (D) der Rekrutierung von β -Arrestin wird ein intermolekulares FRET-Signal von bimolekularen Sensoren erzeugt. Hierbei sind voneinander unabhängige Domänen oder Proteine mit Fluoreszenzproteinen markiert, deren Interaktion von der Ligandenbindung oder von Konformationsänderungen der unabhängigen Domänen abhängig ist. (E) Bei der Aktivierung des G_i -Proteins, welches an seinen Untereinheiten mit Fluoreszenzproteinen markiert ist, kommt es zum Abfall des intermolekularen FRET-Signals. Hierbei erfolgt die Aktivierung des G_{i1} -Proteins über den α_{2A} -AR, der wiederum durch seinen Agonisten NE aktiviert wird.

1.9 Zielsetzung

Opioidrezeptoren und ihre Liganden sind für die Behandlung von akuten und chronischen Schmerzen von großer Bedeutung. Viele klinisch relevante Substanzen, insbesondere Morphin und verwandte Opiate, greifen am μ -Opioidrezeptor an, der zur Familie der GPCR gehört. Auf dem Forschungsgebiet der GPCR konnten in den letzten Jahren durch die Kombination von Fluoreszenzproteinen und speziellen Mikroskopietechniken erhebliche Fortschritte und wichtige Einblicke erzielt werden. Im Gegensatz zu *in vitro* Methoden ermöglichen FRET-Messungen die Analyse von intramolekularen Konformationsänderungen und intermolekularen Wechselwirkungen in Echtzeit mit hoher zeitlicher Auflösung.

Die FRET-Technik sollte in dieser Arbeit zur Erforschung des μ -Opioidrezeptors und der zugehörigen Signalwege genutzt werden. Daher war die Entwicklung eines funktionellen μ -Opioidrezeptorsensors ein Ziel dieser Arbeit. Basierend auf diesem Sensor sollten dann die Eigenschaften verschiedener Liganden im Hinblick auf die Rezeptoraktivierung analysiert werden. Anhand der hohen zeitlichen Auflösung sollte auch die Kinetik der Rezeptoraktivierung untersucht werden.

Morphin ist hinsichtlich seiner analgetischen Wirkung gut erforscht, ebenso wie seine beiden Hauptmetabolite Morphin-3-Glucuronid und Morphin-6-Glucuronid. Weitaus weniger ist über die pharmakologischen Eigenschaften der anderen Metabolite und deren analgetische Wirkung bekannt. Damit lag ein weiteres Ziel dieser Arbeit darin, die Metabolite von Morphin pharmakologisch zu charakterisieren. Auf der Grundlage von FRET-Experimenten sollte die Affinität zum Rezeptor und die Aktivierung der beiden Hauptsignalwege erforscht werden. Der Vorteil der Messung an lebenden Zellen ist, dass hierbei pharmakokinetische Parameter keinen Einfluss nehmen.

Die Ergebnisse aus der Rezeptoraktivierung können zusammen mit den Erkenntnissen aus der Signalweiterleitung zur Aufklärung von Symptomen wie Abhängigkeit und Toleranz beitragen, die bei der Anwendung von Opiaten häufig entstehen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

AppliChem GmbH (Darmstadt)

- Agar, Ampicillin-Natriumsalz, Dimethylsulfoxid (DMSO), Dithiothreitol, EDTA, Hefeextrakt, HEPES, KCl, CaCl₂, MgCl₂, NaCl, Trypton, Wasserstoffperoxid, Pepton aus Casein, Glucose

Hartenstein Laborbedarf GmbH (Würzburg)

- Deckgläschen (24 mm), Reaktionsgefäße, Zentrifugenröhrchen, Zellkulturschalen

Invitrogen (Darmstadt)

- CellMask™ Deep Red

Merck (Darmstadt)

- 1,2-Ethandithiol, Bromphenolblau, Glycerin, Polyethylenglycol 3000

Pan Biotech GmbH

- DMEM 4,5 g/l Glucose, L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin, Trypsin-EDTA, Fötale Kälberserum, PBS

PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)

- Agarose

Quiagen GmbH (Hilden)

- Quiagen Gel Extraction Kit, Plasmid Plus Midi Kit, Effectene Transfection Reagent

Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München)

- Ethidiumbromidlösung 1%, Poly-D-Lysin, Isopropanol, Ethanol, Methanol

2.1.2 Agonisten, Antagonisten, Metabolite

Bachem (Weil am Rhein)

- (D-Ala², N-Me-Phe⁴, glycinol⁵)-Enkephalin (DAMGO)

Sigma Aldrich (München)

- Morphin, Morphin-3-glucuronid, Morphin-6-glucuronid, Naloxonhydrochlorid Dihydrat

Lipomed GmbH (Weil am Rhein)

- Normorphin, 3-Acetylmorphin, 6-Acetylmorphin

Dr. Christian Paetz (Max-Planck Institut für Chemische Ökologie, Jena)

- Morphin-6-sulfat, Morphin-N-Oxid, Pseudomorphin

Meinhart Zenk (St. Louis, MO, USA)

- Morphin-3-sulfat

American Radiolabeled Chemicals (St. Louis, USA)

- [³H]-Naloxon

2.1.3 Enzyme

New England Biolabs GmbH (Frankfurt am Main)

- Restriktionsenzyme und zugehörige Puffer, Vent Polymerase und Puffer, T4 DNA-Ligase und Puffer

Invitrogen (Darmstadt)

- Taq Polymerase und Puffer

Promega GmbH (Mannheim)

- Pfu Polymerase und Puffer

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Primer wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert. Vorwärtsprimer sind mit fw gekennzeichnet und Rückwärtsprimer mit bw oder rev. Meist sind auch die Enzyme angegeben, deren spezifische Schnittstellen durch das jeweilige Oligonukleotid in die DNA-Sequenz eingeführt werden.

MORHindIIIfw	5'-AAA AAA AAG CTT ATG GAC AGC ACC GGC CC-3'
MOR378Xbarev	5'-AAA AAA TCT AGA ATT AGC CGT GGA GGG ATG TT-3'
MOR368Xbarev	5'-AAA AAA TCT AGA CTG ACG GAC TCG AGT GGA GT-3'
MOR358Xbarev	5'-AAA AAA TCT AGA GAT CGT GGA CGA GGT TGG G-3'
MORFlagHA1	5'-GCC GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAG GAC AGC AGC ACC GGC CC-3'
FlagHA2	5'-GCC CTG AGC TAC ATC TTC TGC CTG GTA TTC GCC GAC TAC AAG GAC GAT-3'
FlagHA3	5'-AAA AAA AAG CTT ACC ATG AAG ACG ATC ATC GCC CTG AGC TAC ATC TTC-3'
HuMORXbarevoSt	5'-AAA TCT AGA GGG CAA CGG AGC AGT T-3'
HuMORXbarevSt	5'-AAA TCT AGA TTA GGG CAA CGG AGC AGT T-3'
HuMORBspEIrev	5'-AAA AAA TCC GGA GCC AGA GAG CAT GCG-3'
YFPBspEIfw	5'-AAA AAA TCC GGA GAA GGT GTG AGC AAG GGC GAG-3'
YFPNheIrev	5'-AAA AAA GCT AGC CTT GTA CAG CTC GTC CAT-3'
HuMORNheIfw	5'-AAA AAA GCT AGC GGC GCA GGT AAA GAA AAG GAC AGG-3'
HuMORFlagHA1	5'-GCC GAC TAC AAG GAC GAT GAT GAC AAG GAC AGC AGC GCT GCC C-3'
HuMOR380Xbarev	5'-AAA AAA TCT AGA ATT GGC CGT GGA GGG GTG-3'
HuMOR360Xbarev	5'-AAA AAA TCT AGA AAT GTT GGA AGA GGT TGG-3'
TurNheIrev	5'-AAA AAA GCT AGC GTC CAT GCC GAG AGT-3'
HuMOR2ndMifw	5'-TGT CTG GAT GCT GTG CTA GCC GTA CTC CCC GAA ATG CC-3'
HuMOR2ndMibw	5'-GCT AGC ACA GCA TCC AGG ACA GCA AGC TCC GAA ATC TAA GGC CTT GAC-3'
HuMOR2ndTM4fw	5'-TGT CCT GGA TGC TGT GCT AGC GTC TGC AAC TGG ATC CTC-3'

Material und Methoden

HuMOR2ndTM4bw	5'-GCT AGC ACA GCA TCC AGG ACA GCA AGC TCC ATT GAT AAT TTT GGC ATT-3'
HuMORClaIbw	5'-AAA AAA ATC GAT ACA TTG CAG TCT-3'
HuMOREcoRIbw	5'-AAA AAA GAA TTC GAG TGG AGT TTT-3'
HuMOR3rdfw	5'-GGC TCC AAA GAA AAG GAC-3'
HuMOR3rdbw	5'-AGA GAG CAT GCG GAC ACT CTT-3'
alpha2AUebfw	5'-GTC CGC ATG CTC TCT CAG ATC GCC AAG CGT-3'
alpha2AUebfw	5'-CTT TTC TTT GGA GCC GCG TTT CTC CCG GTT-3'
MORFIAsHLRRIfw	5'-TGT GCC CGG GGT GCT GCG CGG GAG CGC TTC GAA GGA TCA CCA GG-3'
MORFIAsHLRRIbw	5'-GCA GCA CCC CGG GCA ACA TCC AGC TCC ATT CCT GTC CTT TTC TTT-3'
MORalp2aLRRIfw	5'-CTT CGA AGG ATC ACC AGG-3'
MORalp2aLRRIbw	5'-ATT CCT GTC CTT TTC TTT-3'
alp2aUebLRRIfw	5'-AAA GAA AAG GAC AGG AAT CAG ATC GCC AAG CGT CGC-3'
alp2aUebLRRIbw	5'-CCT GGT GAT CCT TCG AAG GCG TTT CTC CCG GTT-3'

2.1.5 Plasmide

Eine Zusammenfassung aller MOR-Plasmidkonstrukte, die im Rahmen dieser Arbeit kloniert wurden, befindet sich auf Seite 54. Als Expressionssystem rekombinanter Proteine in eukaryotischen Zellen wurde der pcDNA3 Vektor von Invitrogen (Darmstadt) verwendet. Dieser Vektor enthält das Ampicillin-Resistenzgen für die bakterielle Selektion. Alle weiteren Plasmide sind im Folgenden aufgelistet.

pcDNA3-rMOR-FIAsH-CFP	Dr. Viacheslav Nikolaev, Würzburg/Göttingen
pCR4-TOPO-hMOR	Source BioScience LifeSciences, Nottingham, UK
pcDNA3-hMOR	vorliegende Arbeit
pcDNA3-rG _{α1} -YFP	Prof. Dr. Moritz Bünemann, Würzburg/Marburg
pcDNA3-hG _{β1}	Prof. Dr. Moritz Bünemann, Würzburg/Marburg
pcDNA3-hG _{γ2} -CFP	Prof. Dr. Moritz Bünemann, Würzburg/Marburg
pcDNA3-β-Arrestin2-YFP (bovin)	Dr. Cornelius Krasel, Würzburg/Marburg
pcDNA3-GRK2 (bovin)	Institut für Pharmakologie, Würzburg

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Herstellung kompetenter *E.coli*

Unter natürlicher Kompetenz versteht man bei Bakterien die Fähigkeit zur DNA-Aufnahme. Da *Escherichia coli* (*E.coli*) nicht natürlich kompetent ist, wurde durch die Behandlung mit Calciumionen eine künstliche Kompetenz hergestellt. Dazu wurden Bakterien des *E.coli*-Stammes DH5 α auf einer LB-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde eine Kolonie von der Agarplatte gepickt, damit wurden 50 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C im Rotationsschüttler (180 rpm) zu einer Vorkultur herangezogen. Am nächsten Morgen wurden 250 ml LB-Medium mit 4,5 ml der Vorkultur angeimpft und im Rotationsschüttler bis zu einer optischen Dichte von 0,5 - 0,6 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 4500 rpm (4°C) zentrifugiert und danach das Bakterienpellet in 25 ml TBS resuspendiert. Nach 90-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Bakterien aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

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

LB-Agarplatten: 1% (W/V) Agar in LB-Medium

TBS: 10% (M/V) Polyethylenglycol 3000
5% (V/V) DMSO
20 mM MgCl₂
in LB-Medium, pH 6,5

2.2.1.2 Transformation von *E.coli*

Die DNA-Aufnahme von kompetenten Bakterienzellen wird als Transformation bezeichnet, diese Methode ermöglicht die Vervielfältigung von Plasmid-DNA. Für die Transformation wurden kompetente Zellen des *E.coli*-Stammes DH5 α verwendet. Dazu wurden zunächst 100 μ l der Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut. Dann wurden die Bakterien mit 100 μ l KCM-Puffer und 15 μ l Ligationsansatz bzw. 0,5 μ g Plasmid-DNA versetzt. Anschließend wurde der Ansatz 20 min auf Eis und weitere 10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 900 μ l LB-Medium wurden die Bakterien bei 37°C zur Regeneration 50 min leicht geschüttelt. Zur Selektion wurde ein Teil oder der gesamte Ansatz auf Agarplatten mit Antibiotikum (z.B. 100 μ g/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C kultiviert.

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

2.2.1.3 Mini-Plasmid-Präparation

Für die Aufreinigung von kleinen Mengen Plasmid-DNA wurden 5 ml Selektivmedium mit Kolonien von einer Agarplatte angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Am folgenden Tag wurden 1,5 ml von der Bakterienkultur in Reaktionsgefäße überführt und 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde zum großen Teil verworfen und das Pellet in einem kleinen Rest Überstand resuspendiert. Dann wurden nacheinander je 250 μ l gekühlter Resuspendierungspuffer und Lysepuffer zugegeben, die Lösungen gemischt und 4 min bei RT inkubiert. Während der Lyse wurde die bakterielle RNA durch die im Resuspendierungspuffer vorhandene Ribonuklease (RNase A) abgebaut. Anschließend wurden die Ansätze mit 300 μ l Neutralisierungspuffer versetzt, kräftig geschüttelt und 20 min bei 14.000 rpm (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut bei 14.000 rpm zentrifugiert. In ein weiteres Reaktionsgefäß wurden 750 μ l Isopropanol vorgelegt, dies wurde mit dem Überstand aus dem Zentrifugationsschritt versetzt und bei 14.000 rpm (4°C) für 20 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand entfernt und die gefällte DNA mit 300 μ l 70% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde der Überstand entfernt und das DNA-Pellet bei RT getrocknet. Dann wurde das Pellet in 20 bis 30 μ l bidestilliertem Wasser gelöst und ein Teil davon wurde für die folgende Restriktionsanalyse eingesetzt.

Material und Methoden

Resuspendierungspuffer P1: 50 mM Tris
 10 mM EDTA
 100 µg/ml RNase A,
 H₂O, pH 8,0

Lysepuffer P2: 200 mM NaOH
 1% (M/V) SDS

Neutralisierungspuffer P3: 3 M Kaliumacetat, pH 5,0

2.2.1.4 Midi-Plasmid-Präparation und DNA-Konzentrationsbestimmung

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA wurde eine Kolonie von einer Agarplatte in 100 ml LB-Medium überimpft und bei 37°C über Nacht im Rotationsschüttler inkubiert. Die Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA erfolgte mit dem Plasmid Midi Kit oder Plasmid Plus Midi Kit von Quiagen. Der alkalischen Lyse der Bakterien folgte, den Angaben des Herstellers entsprechend, die chromatographische Aufreinigung der DNA durch Anionenaustausch.

Anschließend wurde die DNA-Konzentration photometrisch bei 260 nm bestimmt (Gl. 3). Der Absorptionswert (auch optische Dichte, OD) von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl. Die Absorptionsmessung wurde in Quarzglasküvetten durchgeführt, wobei die DNA 1:100 mit bidest. Wasser verdünnt wurde. Aus der gemessenen Absorption wurde die Konzentration doppelsträngiger DNA (c_{dsDNA}) unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors V über das Lambert-Beersche Gesetz berechnet:

$$c_{dsDNA} \left[\frac{ng}{\mu l} \right] = OD_{260} \cdot V \cdot 50 \quad (Gl. 3)$$

Die Reinheit der DNA wurde durch eine zusätzliche Absorptionsmessung bei 280 nm bestimmt. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm sollte bei $\geq 1,8$ liegen, um Verunreinigungen durch Proteine auszuschließen.

2.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente erfolgt mittels Polymerase-Kettenreaktion [113]. Dabei legen Oligonukleotide (Primer) diejenigen DNA-Abschnitte fest, die vervielfältigt werden, und die DNA-Polymerase verlängert Vorwärts- und Rückwärts-Primer durch Anheften weiterer Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs).

Eine Standard-PCR wurde im Mastercycler (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt und startete mit der thermischen Denaturierung der DNA für 5 min bei 94°C. Danach folgten dreißig zyklische Wiederholungen bestehend aus 30 s Denaturierung bei 94°C, 30 s Anlagern der Primer bei 55°C und Verlängern des DNA-Einzelstranges am 5'-Ende bei 72°C (2 min/kb). Die abschließende Polymerisationphase wurde 10 min bei 72°C durchgeführt.

PCR-Ansatz: 200 ng Matrizen-DNA
 4 µl dNTP-Mix (je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
 1 pM Vorwärtsprimer
 1 pM Rückwärtsprimer
 2 µl Pfu Polymerase
 10 µl Polymerasepuffer (10x)
 20 µM MgCl₂
 5 µl DMSO
 ad 100 µl H₂O

2.2.1.6 Aufreinigung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten

Bei der Agarose-Gelelektrophorese werden DNA-Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld nach der Größe aufgetrennt. Durch den Chromophor Ethidiumbromid wird die DNA im Gel nachgewiesen. Der Farbstoff interkaliert zwischen die Basen der DNA, wodurch sich seine Fluoreszenzintensität bei der Anregung mit ultraviolettem Licht stark erhöht.

Nachweis und Reinigung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten erfolgte in 1%igen (W/V) Agarosegelen. Dazu wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1 x Tris-Acetat-Puffer (TAE) in der Mikrowelle aufgeköcht und vollständig gelöst. Die Agaroselösung wurde auf ca. 60°C abgekühlt, in die Gelkammer gegossen und mit 6 µl 1%iger Ethidiumbromidlösung versetzt. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer überführt und mit 1 x TAE-

Puffer überschichtet. Die Proben wurden mit 5 x DNA-Ladepuffer versetzt, zusammen dem 1 kb Größenstandard aufgetragen und bei 90 V ca. 60 min elektrophoriert.

Anschließend wurden die DNA-Banden unter UV-Licht mithilfe des Größenstandards identifiziert und ausgeschnitten. Dann wurde die DNA mittels des Qiagen QIAquick Gel Extraktion Kits aus dem Gelstreifen extrahiert. Dazu wurde das Gelstück mit der 3-fachen Menge an QG-Puffer versetzt, 10 min bei 50°C verflüssigt und auf ein QIAquick-Säulchen gegeben. Dieses wurde 1 min bei 14.000 rpm zentrifugiert, einmal mit 750 µl PE-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Danach wurde noch einmal 1 min bei 14.000 rpm trocken zentrifugiert, um das Säulenbett von Lösungsmittelresten zu befreien. Abschließend wurden 38 µl Wasser auf die Säule gegeben und nach kurzer Inkubationszeit wurde die DNA durch 1-minütige Zentrifugation bei 14.000 rpm eluiert.

TAE-Puffer (50 x): 10 mM EDTA
 50 mM Natriumacetat
 400 mM Tris-HCl, pH 8,0
 H₂O

DNA-Ladepuffer (10 x): 0,25% (M/V) Bromphenolblau
 50% Glycerin
 100 mM EDTA
 H₂O

2.2.1.7 Klonierung von Plasmiden

Bei der Klonierung wird ein spezifisches DNA-Fragment in einen Vektor integriert. Als Vektor diente in dieser Arbeit das Plasmid pcDNA3, da sich dieses sehr gut für die rekombinante Proteinexpression in Säugerzellen eignet. Für die Herstellung der verschiedenen FRET-Sensoren diente sowohl der humane MOR als auch der aus der Ratte stammende Rezeptor. Die Klonierung wurde immer nach dem gleichen Schema durchgeführt, zunächst wurde das gewünschte DNA-Fragment unter Verwendung einer PCR (siehe Abschnitt 2.2.1.5) amplifiziert. Dabei dienten die jeweils eingesetzten Oligonukleotide zum Anfügen der spezifischen DNA-Erkennungssequenzen für Restriktionsendonukleasen. Dann wurden die DNA-Fragmente wie auch der Vektor mit den Restriktionsenzymen geschnitten, so dass komplementäre Enden entstehen. Dafür wurden die Reaktionsbedingungen wie Temperatur und Puffer spezifisch an die verwendeten Enzyme angepasst. Für die häufig

verwendeten Enzyme HindIII und XbaI wurde beispielsweise bei 37°C für 0,5 – 3 h mit Puffer 2 verdaut. Nach der Auftrennung im Agarosegel und der Aufreinigung mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit (siehe Abschnitt 2.2.1.6) wurden Einschub- (*insert*) und Vektor-DNA in einem Ligationsansatz miteinander kombiniert. Die zu ligierenden DNA-Fragmente wurden nach Gl. 4 in einem optimalen Verhältnis eingesetzt und einige Stunden bei RT oder über Nacht bei 16°C ligiert. Die Ligase katalysiert die Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen der 3'-Hydroxygruppe und dem 5'-Phosphatrest der komplementären DNA-Stücke.

$$ng_{Insert} = \frac{ng_{Vektor} \cdot kb_{Insert} \cdot 3}{kb_{Vektor}} \quad (\text{Gl. 4})$$

Damit wurde das durch die Restriktion linearisierte Plasmid wieder zyklisiert und anschließend in *E.coli* transformiert (siehe Abschnitt 2.2.1.2). Anschließend wurden einzelne Kolonien gepickt und mittels einer Mini-Präparation Plasmid-DNA aufgereinigt (siehe Abschnitt 2.2.1.3). Jeder Klon wurde zunächst anhand eines Restriktionsverdaus analysiert. Dann wurden selektierte, positive Klone durch eine Sequenzierung von Eurofins MWG Operon (Ebersberg) überprüft.

Restriktionsansatz: 3 µg DNA
 2 µl pro Restriktionsenzym
 5 µl Puffer
 5 µl BSA (1 µg/µl)
 ad 50 µl H₂O

Ligationsansatz: DNA-Fragmente aus dem Restriktionsverdau
 1 µl T4-Ligase
 1,5 µl Ligase-Puffer
 ad 15 µl H₂O

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Zellkultur und Aufbewahrung von Zellen

HEK293 Zellen und HEK293T wurden in Kompletmedium bei 37°C und 7% CO₂ in Zellkulturschalen gezogen. Zweimal pro Woche wurden die Zellen passagiert, dazu wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen vorsichtig mit PBS (ohne Mg²⁺ und Ca²⁺) gespült. Anschließend wurden die Zellen einige Minuten mit Trypsin-EDTA behandelt, mit Medium versetzt und 3 min bei 900 g zentrifugiert. Dann wurde das Zellpellet in Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:10 auf neue Zellkulturschalen verteilt oder auf Deckgläschen gesät (siehe 2.2.2.3).

Um Zellen langfristig aufzubewahren, wurden sie in einem mit DMSO- und FCS-angereicherten Medium eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Zellen geerntet, wie im vorherigen Absatz beschrieben. Nach der Zentrifugation wurde das Zellpellet in gekühltem Einfriermedium resuspendiert, die Suspension in Kryogefäße aliquotiert und zunächst 2 h bei -20°C aufbewahrt. Für die kurzzeitige Lagerung wurden die Zellen anschließend bei -80°C eingefroren oder für die langfristige Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt. Da das DMSO des Einfriermediums toxisch auf die Zellen wirkt, wurden die Zellen beim Auftauvorgang zügig mit Kompletmedium resuspendiert und in eine Zellkulturschale überführt. Abhängig vom Grad der Zelladhäsion wurde nach 2 bis 4 h das Medium gewechselt, um das darin enthaltene DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden ungefähr über 30 Passagen für transiente Transfektionen verwendet.

Kompletmedium: 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; 0,1 mg/ml Streptomycin)

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

2.2.2.2 Bestimmen der Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer

Zur Bestimmung der Zellzahl in einer Suspension wurde die Neubauer-Kammer verwendet. Dazu wurden einige Mikroliter der Zellsuspension seitlich auf die mit einem Deckgläschen abgedeckte Zählkammer pipettiert. Anschließend wurden mithilfe des Mikroskops vier Großquadrate, die jeweils in 16 kleinere Quadrate unterteilt sind, ausgezählt. Um die Zellzahl pro Milliliter zu errechnen, wurde das Ergebnis der Großquadrate gemittelt und mit 10000 multipliziert.

2.2.2.3 Passagieren von Zellen auf Deckgläschen

Die eukaryoten Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, um sie später mit dem FRET- oder Konfokal-Mikroskop zu untersuchen. Dazu wurden sterile runde Deckgläschen (Ø 24 mm) ca. 30 min mit Poly-D-Lysin (0,1 mg/ml) beschichtet und dann zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden HEK293 oder HEK293T Zellen wie unter 2.2.2.1 beschrieben geerntet und in der nötigen Dichte auf die vorbehandelten Deckgläschen ausgesät.

2.2.2.4 Transiente Transfektion

Mithilfe der transienten Transfektion wird Fremd-DNA in eukaryotische Zellen eingebracht. Da die eingeschleuste DNA nicht ins Genom integriert, wird sie bei der Zellteilung nicht auf alle Zellen weitergegeben.

Für die Transfektion von HEK293 und HEK293T Zellen wurde Effectene verwendet. Hierbei handelt es sich um eine nicht-liposomale Lipidformulierung, die mit der zu transfizierenden cDNA Komplexe bildet und diese anschließend durch Interaktion mit der Zellmembran in die Zelle einbringt. Bei einer Zelldichte von 60-80% wurden die Zellen nach den Angaben des Herstellers transfiziert, wobei die Konzentration an cDNA optimiert wurde. Entsprechend der Fragestellung wurden einzelne oder mehrere Plasmide transfiziert. Die folgenden Mengen an cDNA beziehen sich jeweils auf eine 6-Loch-Platte: Für die Rezeptorsensorkonstrukte wurden 1,2 - 4,2 µg cDNA verwendet. Bei den Experimenten zur G-Protein-Aktivierung wurden 1,4 µg hMORwt, 1,6 µg $G_{\alpha i}$ -YFP, 1,0 µg G_{β} und 0,4 µg G_{γ} -CFP pro 6-Lochplatte eingesetzt und für die Rekrutierung von β -Arrestin2 wurden 0,2 µg GRK2, 0,2 µg β -Arrestin2-YFP und 0,3 µg hMOR-CFP(400) transfiziert.

2.2.2.5 Markieren des Tetracysteinmotivs mit FLAsH

Zur Markierung wurde eine 1 mM FLAsH-Lösung in DMSO verwendet, welche aliquotiert bei -20°C gelagert wird. EDT-Lösungen mit 25 mM bzw. 500 mM in DMSO wurden für jedes Experiment frisch zubereitet.

Alle Schritte wurden bei RT im Laborabzug durchgeführt. Für jedes zu markierende Deckgläschen wurden 0,5 μl einer 1 mM FLAsH-Lösung mit 0,5 μl einer 25 mM EDT-Lösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde diese Mischung mit 1ml Markierungspuffer versetzt, auf die Zellen gegeben und 40 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgezogen, die Zellen wurden 1 x mit PBS und 1 x mit Waschpuffer gewaschen und 10 min in Waschpuffer inkubiert. Dann wurden die Zellen 4 x mit PBS gewaschen und bis zur Messung bei 37°C in Kompletmedium inkubiert.

Markierungspuffer: 150 mM NaCl
 25 mM KCl
 4 mM CaCl_2
 2 mM MgCl_2
 10 mM Glucose,
 10 mM HEPES, pH 7,4

2.2.2.6 Radioligandenbindung

Für die Membranpräparation wurden HEK293T Zellen in 9 cm Zellkulturschalen ausgesät und nach 24 h mit 1,9 μg hMORwt mit Effectene wie unter 2.2.2.4 beschrieben transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen vorsichtig abgeschabt und in Tris-Puffer (5 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 7,4) homogenisiert. Danach wurden die Zellen 2 x 15 s mittels Ultraturax bei maximaler Geschwindigkeit aufgeschlossen. Die Suspension wurde 10 min bei 1700 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und erneut 30 min bei 50.000 g zentrifugiert. Das resultierende Pellet wurde in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für jeden Ansatz wurden 20 μg Membranprotein in 50 mM Kaliumphosphatpuffer (Endkonzentration), in einem Volumen von 200 μl eingesetzt. Je nach Versuchsbedingung wurden dem Ansatz 10^{-3} bis 10^{-1} M Metabolitenlösung und 0,1 - 1 nM [^3H]-Naloxon zugesetzt. Außerdem enthielt jeder Ansatz 100 μM GTP, um hochaffine, GDP-abhängige Bindungszustände zu unterdrücken. Die Proben wurden 3 h bei RT inkubiert und mittels Vakuumfiltration über GF/F Glasfilter (Millipore) filtriert, mit 8 ml

Szintillationsflüssigkeit versetzt und 30 min inkubiert. Abschließend wurde die gebundene, auf den Filtern verbliebene Radioaktivität anhand des Flüssigszintillationszählers ausgemessen. Für jede Versuchsbedingung wurden Doppelwerte bestimmt. Die Bindungsdaten wurden mit Prism 4.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) ausgewertet und graphisch dargestellt. Unspezifische Bindungen wurden mithilfe von 10 μ M Naltrexon bestimmt.

2.2.3 Biophysikalische Methoden

2.2.3.1 FRET-Mikroskopie in vivo

Die FRET-Messungen wurden mit dem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop (Jena), ausgestattet mit einem Neofluar 100 x 1,3 Ölimmersionsobjektiv und einem dualen Emissionssystem (Till Photonics, Gräfelfing), durchgeführt. Die mit transfizierten Zellen bewachsenen Deckgläschen wurden in der Attofluor-Halterung (Invitrogen, Darmstadt) fixiert und mit 400 μ l FRET-Puffer überschichtet. Für jedes Experiment wurden manuell Einzelzellen oder Zellgruppen mit geeignetem Expressionsmuster ausgesucht. Mittels eines Perfussionssystems (ALA Scientific Instruments, Farmingdale) wurden die Zellen mit verschiedenen Lösungen überspült, um die Auswirkungen unterschiedlicher Liganden zu analysieren.

Die Fluoreszenzanregung erfolgte durch eine Polychrom IV Lampe (Till Photonics), welche durch die TillVision Software gesteuert wurde. Dabei wurde eine Belichtungszeit von 10 - 60 ms verwendet, um das Photobleichen zu minimieren. Als Frequenz wurde je nach Kinetik des jeweiligen Experiments 10 Hz oder 50 Hz ausgewählt. Bei allen FRET-Experimenten diente CFP als Donor. Dementsprechend erfolgte die Anregung bei einer Wellenlänge von 436 nm. Als Akzeptorfluorophore wurden entweder FAsH oder YFP verwendet. Das von der Probe emittierte Licht wurde über einen Strahlenteiler (DCLP 505 nm) geteilt und über Emissionsfilter (für CFP 480 ± 20 nm; für FAsH und YFP 535 ± 15 nm) weitergeleitet. Dementsprechend wurde die Donor-Fluoreszenz bei 480 nm und die Akzeptor-Fluoreszenz bei 535 nm gemessen. Die Signale wurden durch Photodioden (Till Photonics) detektiert und mittels des A/D-Wandlers Digidata 1322A (Axon Instruments, Union City, CA) digitalisiert. Anhand der Clampex 8.1 Software (Axon Instruments, Foster City, CA) wurden die Fluoreszenzintensitäten beider Kanäle und das daraus ermittelte FRET-Signal aufgezeichnet.

Zur Auswertung wurde die Akzeptoremission um das Durchbluten vom Donor- in den Akzeptorkanal und die Direktanregung korrigiert. Diese Kalkulationen wurden mit der

Origin 6.1 Software durchgeführt. Um die Direktanregung des Akzeptors durch die Donorexzitation zu bestimmen, wurde am Ende jedes Experimentes die Akzeptor-Emission bei 490 nm bestimmt. Anschließend wurde der Anteil der Direktanregung von der Akzeptorfluoreszenz abgezogen. Letztendlich ergibt sich das FRET-Signal als Quotient aus korrigierter Akzeptor- und Donorfluoreszenz.

FRET-Puffer: 140 mM NaCl
 5 mM KCl
 2 mM CaCl₂
 1 mM MgCl₂
 10 mM HEPES, pH 7,3

2.2.3.2 Konfokalmikroskopie

Um die Lokalisation fluoreszierender Proteine zu analysieren, wurden Aufnahmen mit dem Leica TCS SP5 Laser Scanning Mikroskop (Wetzlar) angefertigt. Direkt vor der Messung wurden die transfizierten Zellen mit dem Membranfarbstoff CellMaskTM Deep Red behandelt, dazu wurde der Farbstoff 1:1000 mit PBS verdünnt und die Zellen 5 min bei 37°C in der Lösung inkubiert. Nach drei kurzen Waschschritten in PBS wurden die Deckgläschen umgehend in die Attofluor-Halterung eingespannt, mit FRET-Puffer überschichtet und unter Verwendung eines 63 x 1,4 Ölimmersionsobjektivs analysiert. Die Steuerung von Mikroskop und Laser erfolgte ebenso wie die Auswertung der Bilddateien mit der Leica LAS AF-Software. Dabei wurde der Donor-Fluorophor CFP durch einen UV-Laser bei einer Wellenlänge von 405 nm angeregt, während die Emission bei 450 - 500 nm detektiert wurde. Die Exzitation von FLaSH bzw. YFP wurde mit einer Argon-Ionen-Laserlinie bei 514 nm durchgeführt, wobei die Emission im Bereich von 525 - 570 nm detektiert wurde. Unter Verwendung eines anderen Dioden-Lasers wurde der Membranfarbstoff DeepRed bei 633 nm angeregt und im Emissionsbereich von 650 - 700 nm detektiert. Die Aufnahmen wurden bei konstanten Einstellungen mit 1024 x 1024 Pixel, 400 Hz und 3-fach Zoom angefertigt, lediglich die Laserintensität wurde für jedes Experiment individuell eingestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung eines μ -Opioidrezeptor-Sensors

Ein Ziel dieser Arbeit war die Konstruktion eines intramolekularen FRET-Sensors für den MOR. Auf der Grundlage dieses Sensors könnten verschiedenste biologische Fragestellungen, wie Ligandenaffinität, Rezeptoraktivierung und Dimerisierung bearbeitet werden. Die wichtigsten Kriterien für einen funktionellen Rezeptorsensor sind ausreichende Membranexpression und Änderung des FRET-Signals bei Zugabe eines Agonisten.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurden FRET-Sensoren von anderen GPCR wie z.B. vom α_{2A} -adrenergen Rezeptor [99], M_2 -Muskarinrezeptor [110] oder β_2 -adrenergen Rezeptor [109] publiziert. Gemeinsam sind allen Sensoren die Modifikationen am C-Terminus und der dritten intrazellulären Schleife. Dabei dienten CFP als Donor- und YFP oder FIAsh als Akzeptorfluorophore.

3.1.1 Markieren mit CFP am C-Terminus

Zunächst wurde CFP am C-terminalen Ende des humanen bzw. Ratten-Rezeptors angefügt. Abb. 11 zeigt konfokale Aufnahmen von HEK293T Zellen, die transient mit der cDNA des C-terminal markierten humanen MOR (hMOR-CFP(400)) transfiziert wurden. Dabei zeigt die spektrale Überlagerung der CFP-Emission (Abb. 11 A, grün) und der Membranfärbung (Abb. 11 B, rot), dass der Rezeptor an der Zellmembran exprimiert wird (Abb. 11 C, gelb).

Bei der Benennung der Rezeptorkonstrukte gibt die dreistellige Zahl in der Klammer die letzte Aminosäure an. Konstrukte mit einer (400) oder (398) zeigen an, dass der Rezeptor hier in voller Länge vorliegt. Kleinere Zahlen bedeuten, dass der jeweilige Rezeptor nach dieser Aminosäure trunziert wurde. Wurde eine zusätzliche Sequenz in ein Konstrukt eingefügt, so erscheint die Insertionsposition im Namen des Rezeptorkonstrukts (z.B. hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400)). Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden in Tab. 1 auf Seite 54 alle Rezeptorkonstrukte zusammengefasst, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden. Auch die zugehörigen Modifikationen und die Membranlokalisation sind dabei detailliert angegeben.

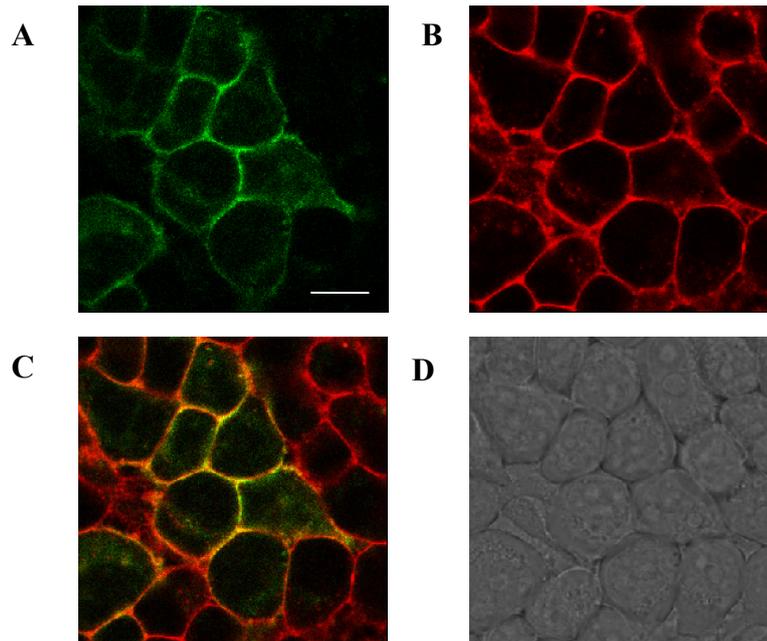


Abb. 11: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293T, welche transient mit hMOR-CFP(400) transfiziert wurden. Abgebildet sind 48 h nach Transfektion die (A) CFP-Emission, (B) Emission des Membranfarbstoffs CellMask™ DeepRed, (C) Überlagerung von A und B und (D) das Durchlicht. Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

3.1.2 Trunkierung des C-Terminus

Der humane MOR besitzt ebenso, wie der aus der Ratte stammende Rezeptor (rMOR) einen großen C-Terminus bestehend aus 70 Aminosäureresten. Da es sich bei FRET um ein stark abstandsabhängiges Phänomen handelt, wurde der C-Terminus verkürzt, um eine zu große Entfernung zwischen den Fluorophoren zu vermeiden. Dementsprechend wurde der rMOR stufenweise um 20, 30 bzw. 40 Aminosäuren trunkiert. Die daraus resultierenden mit CFP markierten Konstrukte rMOR-CFP(378), rMOR-CFP(368), rMOR-CFP(358) wurden in Zellen transfiziert und nach 48 h mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Wie Abb. 12 zeigt, ist ein Teil des Rezeptorproteins an der Membran lokalisiert, ein beträchtlicher Teil der CFP-Fluoreszenz ist allerdings im Cytosol der Zelle sichtbar, was auf eine intrazelluläre Rezeptoranreicherung hindeutet.

Beim humanen Rezeptor wurde der C-Terminus um 20 Aminosäurereste (hMOR-CFP(380)) bzw. 40 Aminosäurereste (hMOR-CFP(360)) gekürzt. Diese trunkierten Konstrukte enthielten außerdem YFP in ICL3 (siehe Abschnitt 3.1.3 und Tab. 1).

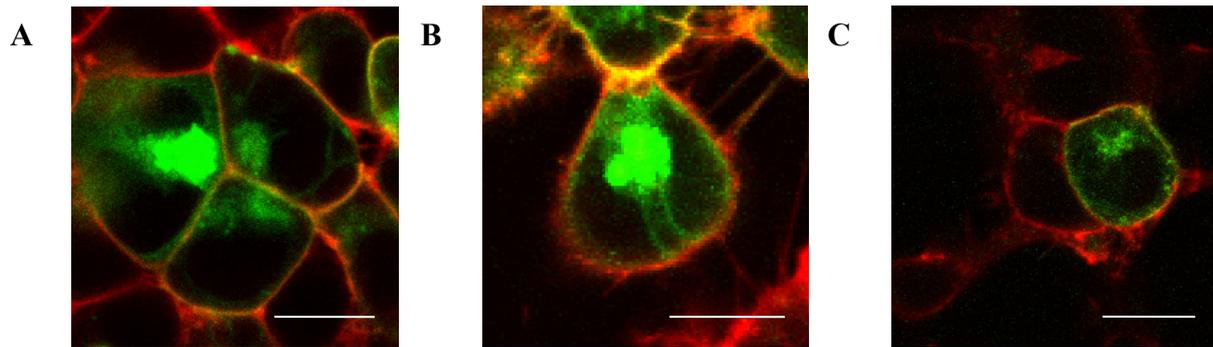


Abb. 12: Die Konfokalbilder zeigen die trunktierten mit CFP markierten Rezeptorkonstrukte, die in HEK293T Zellen transfiziert wurden. Abgebildet sind 48 h nach der Transfektion die Überlagerung von CFP-Fluoreszenz (grün) und Membranfärbung (rot) von (A) rMOR-CFP(358), (B) rMOR-CFP(368) und (C) rMOR-CFP(378). Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

Die Daten aus Abschnitt 3.1.1 zeigen, dass bei der Addition von CFP an den C-Terminus die Membranlokalisation der Rezeptoren nicht beeinträchtigt wird. Wird der Rezeptor zusätzlich am C-Terminus trunktiert, bleibt die Membranlokalisation nur teilweise erhalten. Ein Teil des Rezeptors ist intrazellulär angereichert, unabhängig davon ob 20, 30 oder 40 Aminosäurereste vom C-Terminus entfernt wurden.

3.1.3 Insertion von fluoreszierenden Proteinen in ICL3

Bei den meisten funktionellen Rezeptorsensoren wurde der zweite Fluorophor in ICL3 eingeführt. Diese intrazelluläre Domäne ist involviert in G-Protein-Kopplung, Desensibilisierung und Konformationsänderungen bei Rezeptoraktivierung. Bei dem MOR ist ICL3 von geringer Größe, die Domäne wird von 23 Aminosäuren gebildet und ist für den Ratten- und humanen Rezeptor identisch. Damit sind die Möglichkeiten für die Insertion von Fluorophoren begrenzt.

Zunächst wurde die für YFP codierende Sequenz zwischen die Aminosäurereste S277 und K278 des humanen Rezeptors eingefügt. Flankiert wurde der Einschub von Verbindungsaminosäuren, sogenannte *linker*, um ICL3 möglichst flexibel zu gestalten. Dazu wurde N-terminal die GEG-Sequenz und C-terminal die ASGAG-Sequenz eingefügt. Die Proteinexpression in HEK293T Zellen zeigte eine intrazelluläre Anreicherung des Rezeptorkonstrukts (Abb. 13 B).

Um die Position von YFP innerhalb von ICL3 zu optimieren, wurde dessen Sequenz in Richtung von TMD5 verschoben und zwischen die Aminosäurereste S268 und G269 kloniert.

Ergebnisse

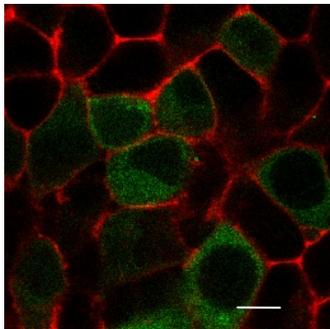
Bei diesem Konstrukt wurden keine zusätzlichen Aminosäuren als *linker* verwendet. Nach der Transfektion des DNA-Vektors in HEK Zellen wurde wiederum eine mangelnde Zellmembranlokalisation des zugehörigen Rezeptorproteins festgestellt (Abb. 13 C).

Als nächstes wurden beide Fluorophore gegen weitere GFP-Varianten ausgetauscht, um zu überprüfen, ob diese Modifikationen bei der Proteinexpression besser toleriert werden. Dafür wurde die für Turquoise (Tur) codierende Sequenz zwischen die Aminosäurereste S268 und G269 des humanen Rezeptors eingebaut. Außerdem wurde C-terminal die Sequenz für Venus angefügt. Auch hier zeigte die konfokalmikroskopische Analyse nach der Proteinexpression die intrazelluläre Anreicherung des Rezeptors (Abb. 13 D).

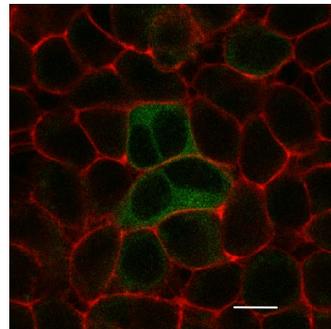
A

Konstrukt	Intrazelluläre Schleife 3	
	260	282
hMORwt :	RLKSVRMLSGS-----KEKDRNLRRITR	
hMOR-YFP-S277/K278-CFP :	RLKSVRMLSGSGEG [YFP] ASGAGKEKDRNLRRITR	
hMOR-YFP-S268/G269-CFP :	RLKSVRMLS [YFP] GS-----KEKDRNLRRITR	
hMOR-Turq-S268/G269-Venus :	RLKSVRMLSGSGEG [Tur] ASGAGKEKDRNLRRITR	

B



C



D

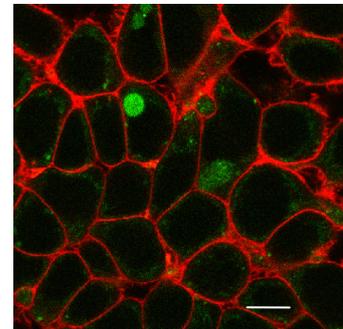


Abb. 13: Insertion von YFP in ICL3. (A) Die Aminosäuresequenz von ICL3 (grau) ist für den Ratten- und humanen Rezeptor identisch und mit 23 Aminosäuren im Vergleich zu anderen GPCR relativ klein. Durch Klonierungen wurde die cDNA für verschiedene MOR-Sensorkonstrukte hergestellt, die jeweils einen Fluorophor in ICL3 und am C-Terminus tragen. Die eingeführten Modifikationen sind hier schematisch angedeutet und farblich hervorgehoben (Verbindungsaminoaciden grün; Fluoreszenzproteine blau). 48 h nach der Transfektion von HEK293T Zellen mit (B) hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400), (C) hMOR-YFP-S268/G269-CFP(400) und (D) hMOR-Turq-S268/G269-Venus(400) wurden Konfokalbilder angefertigt. Die Überlagerungen von CFP-Fluoreszenz (grün) und Membranfärbung (rot) zeigen, dass die Rezeptorkonstrukte intrazellulär angereichert sind. Der Größenbalken in den Konfokalbildern entspricht 10 μ M.

Die Daten dieses Abschnitts zeigen, dass die Membranlokalisation von hMOR durch die Insertion von YFP bzw. Turquoise in ICL3 nachhaltig beeinträchtigt wird. Dieser Umstand verbessert sich auch nicht durch eine variierte Positionierung innerhalb der Schleife oder durch das Einfügen von flexiblen Aminosäuren.

3.1.4 Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL3

Da alle YFP markierten MOR-Konstrukte mangelnde Membranlokalisation aufwiesen, wurde stattdessen das Tetracysteinmotiv in ICL3 eingefügt. Zunächst wurde die für das Tetracysteinmotiv codierende Sequenz so in den Vektor kloniert, dass sie zwischen den Aminosäureresten D272 und R273 des Ratten-Rezeptors exprimiert wurde. Da dieses Konstrukt keine Membranlokalisation zeigte (Abb. 14 B), wurde im Folgenden versucht, die Position des Tetracysteinmotivs innerhalb der dritten intrazellulären Schleife zu optimieren. Dazu wurde das Tetracysteinmotiv von Verbindungsaminosäuren flankiert, um eine größere Flexibilität herzustellen. Als *linker* wurden N-terminal zwei Glycinreste und C-terminal zwei Glycinreste und ein Serinrest verwendet (GG-CCPGCC-GGS). Wie die Abb. 14 C zeigt, wurde auch dieses Rezeptorkonstrukt nicht an der Zellmembran exprimiert.

Eine weitere Möglichkeit zur Optimierung stellte das Verschieben des Tetracysteinmotivs dar. Daher wurde das Motiv innerhalb von ICL3 in Richtung der TMD5 verschoben und zwischen den Aminosäureresten S268 und G269 des humanen Rezeptors eingebaut. Das daraus resultierende Rezeptorprotein hMOR-FIAsH-S268/G269-CFP(400) zeigte eine partielle Membranlokalisation (Abb. 14 D). Außerdem wurden zwei weitere Rezeptorkonstrukte kloniert, bei welchen das FIAsH-Bindemotiv zwischen die Reste G269 und S270 eingefügt wurde. Eines dieser Konstrukte enthält zwei zusätzliche Aminosäurereste (GS) an der N-terminalen Seite des Tetracysteinmotivs. Beide Rezeptorkonstrukte hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400) und hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400) mit *linker* GS sind an der Zellmembran lokalisiert (Abb. 14 E und F).

Das Rezeptorkonstrukt mit dem Tetracysteinmotiv zwischen G269 und S270 wurde außerdem um 40 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt. Das daraus resultierende Konstrukt hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(360) wurde in HEK293T transfiziert. Wie Abb. 14 G zeigt, ist dieses Rezeptorkonstrukt hauptsächlich intrazellulär lokalisiert, an der Zellmembran befindet sich nur noch ein sehr geringer Teil des Rezeptorproteins.

A

Konstrukt (-CFP)	Intrazelluläre Schleife 3	
	258	280
rMOR-F1AsH-D272/R273:	RLKSVRMLSGSKEKDCCPGCC-----RNLRRITR	
rMOR-F1AsH-D272/R273:	RLKSVRMLSGSKEKDGCCPGCCGGSRNLRRITR	
	260	282
hMOR-F1AsH-S268/G269:	RLKSVRMLSCCPGCCGSKEKD-----RNLRRITR	
hMOR-F1AsH-G269/S270:	RLKSVRMLSGCCPGCCSKEKD-----RNLRRITR	
hMOR-F1AsH-G269/S270:	RLKSVRMLSGGSCCPGCCSKEKD---RNLRRITR	

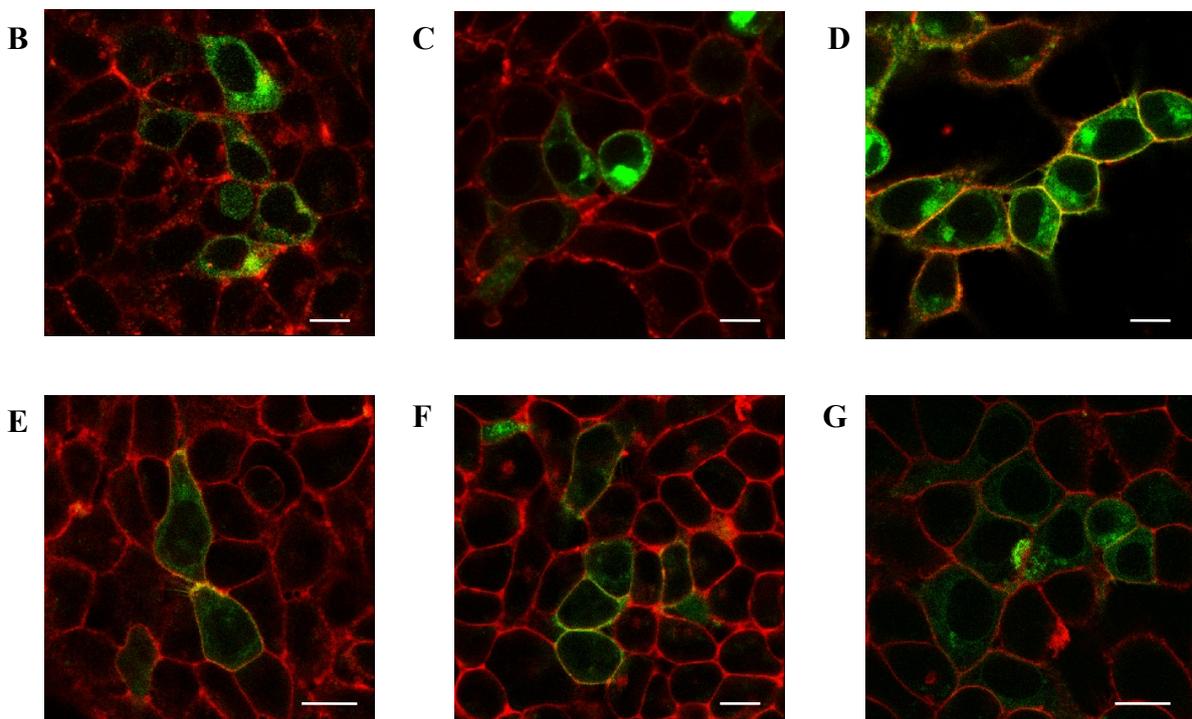


Abb. 14: Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL3. (A) Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der ICL3 aller Tetracysteinmotiv-Konstrukte, dabei sind ursprüngliche Aminosäurereste grau abgebildet und die durch Klonierungen eingeführten Modifikationen farblich hervorgehoben (Verbindungsaminosäuren grün; Fluoreszenzproteine blau). Aufgrund der Übersichtlichkeit sind die Konstruktnamen nicht vollständig angegeben, alle Konstrukte sind am C-Terminus mit CFP markiert. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293T 48 h nach Transfektion mit (B) rMOR-F1AsH-D272/R273-CFP(398), (C) rMOR-F1AsH-D272/R273-CFP(378) mit *linker* GG-CCPGCC-GGS, (D) hMOR-F1AsH-S268/G269-CFP(400), (E) hMOR-F1AsH-G269/S270-CFP(400), (F) hMOR-F1AsH-G269/S270-CFP(400) mit *linker* GS-CCPGCC und (G) hMOR-F1AsH-G269/S270-CFP(360). Hier wird die Überlagerung der Emissionen von CFP (grün) und Membranfarbstoff (rot) gezeigt. Der Größenbalken in den Konfokalbildern entspricht 10 μ M.

Anschließend wurden alle Rezeptorkonstrukte mithilfe des FRET-Mikroskops analysiert. Um eine Änderung des FRET-Signals herbeizuführen, wurden die transfizierten Zellen mit Agonist (10 μM Morphin; 1 μM bzw. 10 μM DAMGO) stimuliert. Bei keinem der MOR-Sensoren konnte eine Änderung des FRET-Signals detektiert werden (Abb. 15). Die Sensoren mit vorhandener Membranlokalisation wurden im Vergleich zu funktionellen GPCR-Sensoren verhältnismäßig schwach exprimiert. Demzufolge wurden Experimente zur Optimierung der eingesetzten DNA-Konzentration durchgeführt, doch auch hierbei blieb die Proteinexpression insgesamt schwach und eine FRET-Änderung konnte nicht detektiert werden.

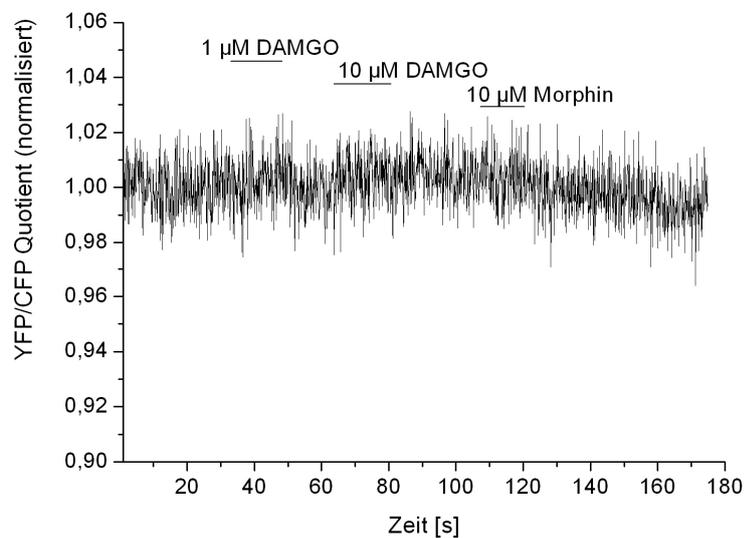


Abb. 15: Für diese repräsentative FRET-Messung des hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400) wurden HEK293T Zellen mit der für hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400) codierenden cDNA transfiziert und nach 48 h mit FIAsH markiert. Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop zunächst mit Pufferlösungen überspült und anschließend mit Agonisten superfundiert. Es konnte keine Agonisten-induzierte Änderung des FRET-Signals detektiert werden.

Die Position des Tetracysteinmotivs konnte innerhalb von ICL3 in Bezug auf die Membranexpression des humanen MOR optimiert werden. Innerhalb der Sequenz Ser268-Gly269-Ser270 führt das Einfügen des Motivs nicht zur Aufhebung der Membranlokalisation, dagegen resultiert das Einfügen des Tetracysteinmotivs, an den anderen ausgewählten Positionen innerhalb von ICL3, in einer intrazellulären Anreicherung des Rezeptors. Allerdings beeinflusst die Verkürzung des C-Terminus von hMOR-FIAsH-S269/G270-CFP die Membranlokalisation negativ. Diese Beobachtung ist konform mit den Daten aus

Abschnitt 3.1.2, wo die C-terminale Verkürzung zwar nicht zur Aufhebung der Membranlokalisation aber zu einer intrazellulären Anreicherung der Rezeptorkonstrukte führt. Insgesamt werden die Rezeptorkonstrukte schwach exprimiert und bei der Analyse mit dem FRET-Mikroskop konnte keine Änderung des FRET-Signals detektiert werden.

3.1.5 Anfügen eines Signalpeptids an den N-Terminus

Im Allgemeinen können Signalpeptide zu einer verstärkten Proteinexpression und einer besseren Membranlokalisation beitragen. Für diesen Zweck wird u.a. bei der heterologen Expression von GPCR das vom Virusprotein Hämagglutinin abstammende Signalpeptid verwendet [114].

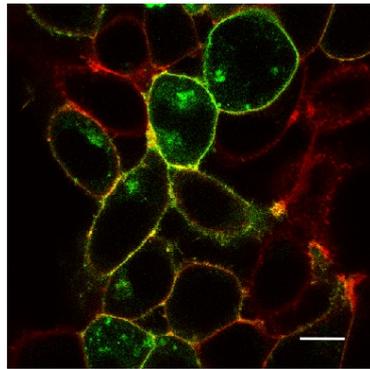
Um die Membranlokalisation der bereits entworfenen MOR-Sensor-Konstrukte zu verbessern, wurden deren N-Termini mit dem Hämagglutinin-Signalpeptid und dem Flag-Affinitäts-tag versehen (HF kennzeichnet beide zusammen). Sowohl die rMOR-Konstrukte mit dem Tetracysteinmotiv, als auch die humanen Sensorkonstrukte mit YFP in ICL3 wurden durch einen weiteren Klonierungsschritt mit den Sequenzen für Signalpeptid und Flag-tag erweitert. Die Sensorkonstrukte wurden in HEK293T Zellen transfiziert und nach 48 h wurden die Zellmembranen mit dem Membranfarbstoff markiert. Die anschließende Analyse mittels Konfokalmikroskop ließ keine Verbesserung der Membranexpression erkennen (keine Abb.).

Um den Einfluss des Signalpeptids auf die Rezeptorexpression weiter zu erforschen, wurde der humane MOR, welcher C-terminal mit CFP markiert ist (hMOR-CFP(400)), zusätzlich am N-Terminus mit dem Signalpeptid und dem Flag-tag versehen. Als nächstes wurden die beiden Rezeptorkonstrukte in HEK293T transfiziert, um deren Expression und Lokalisation direkt zu vergleichen. Nach dem Anfärben der Zellmembranen zeigte der nur mit CFP markierte Rezeptor eine deutliche Membranlokalisation (Abb. 16 B), während das Konstrukt mit dem Signalpeptid zwar eine stärkere Proteinexpression aber eine schlechtere Membranlokalisation aufwies (Abb. 16 C). Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass das Hämagglutinin-Signalpeptid beim hMOR zu einer verstärkten Proteinexpression beiträgt, dabei die Membranlokalisation aber nicht verbessert.

A

Konstrukt	Aminosäuresequenz		
	Signalpeptid	Flag	N-Terminus
HF-rMOR:	MKTIIALSYIFCLFA	DYKDDDK	DSSTGPGNTS
HF-hMOR:	MKTIIALSYIFCLFA	DYKDDDK	DSSAAPTNAS

B



C

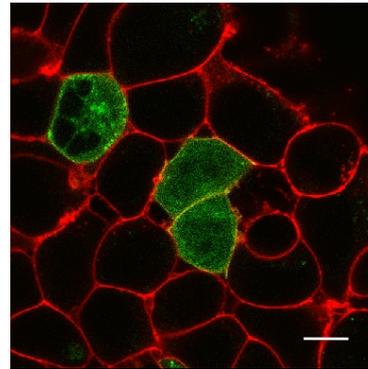


Abb. 16: (A) Die Aminosäuresequenzen des vom Hämagglutinin abstammenden Signalpeptids und des *Flag-tags* wurden an den N-Terminus von hMOR angefügt, um die Membranexpression zu verbessern. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen HEK293T Zellen, welche transient mit (B) hMOR-CFP(400) und (C) HF-hMOR-CFP(400) transfiziert wurden, zeigen zwar eine stärkere Proteinexpression im Vergleich zum Konstrukt ohne Signalpeptid aber keine verbesserte Membranlokalisierung (CFP-Emission in grün; CellMaskTM Deep Red-Emission in rot). Der Größenbalken in den Konfokalbildern entspricht 10 μ M.

3.1.6 Vergrößerung von ICL3

Im Vergleich zu den bereits veröffentlichten FRET-Sensoren [99, 109, 110] hat der MOR-Wildtyp mit nur 23 Aminosäuren die kleinste dritte intrazelluläre Schleife. Wie die vorherigen Experimente zeigen, hat die Modifikation dieser Domäne einen gravierenden Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation des Rezeptors. Eine Vergrößerung von ICL3 könnte dazu beitragen, dass die Modifikationen des Rezeptors weniger gravierende Auswirkungen haben, vor allem in Bezug auf die Membranexpression.

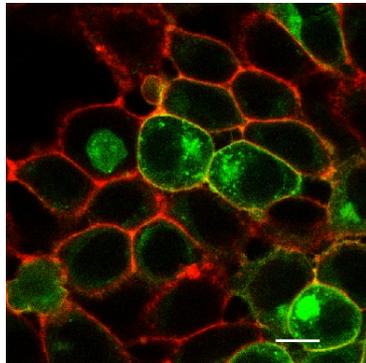
Für die Vergrößerung von ICL3 wurden das Tetracysteinmotiv und die Sequenz für die gesamte dritte Schleife nach dem Aminosäurerest S268 eingefügt, so dass die Domäne insgesamt um 15 Aminosäuren erweitert wurde und dabei die dritte Schleife intakt vorlag. Das gleiche Prinzip wurde für die Klonierung eines YFP-basierten Sensors angewandt. Dafür wurden die für YFP codierende Sequenz und die komplette intrazelluläre Schleife hinter dem

Aminosäurerest S268 eingeschoben. Nach der Transfektion in HEK293T zeigte sich das mit dem Tetracysteinmotiv-ICL3 erweiterte Konstrukt partiell an der Zellmembran, während das mit YFP-ICL3 erweiterte Rezeptorprotein ausschließlich intrazellulär lokalisiert war (Abb. 17).

A

Konstrukt (-CFP)	Intrazelluläre Schleife 3	
	258	280
hMOR-F1AsH-S268+ICL3:	RLKSVRMLS	CCPGCCRLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITR
hMOR-YFP-S268+ICL3:	RLKSVRMLS [YFP]	-RLKSVRMLSGSKEKDRNLRRITR

B



C

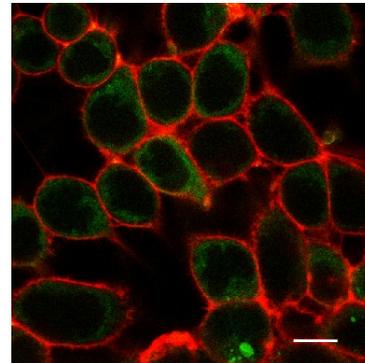


Abb. 17: Vergrößerung von ICL3. (A) Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der erweiterten ICL3, dabei sind ursprüngliche Aminosäurereste grau dargestellt, das Tetracysteinmotiv bzw. YFP in blau und der zusätzlich eingeführte Teil von ICL3 in grün. Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen HEK293T, welche transient mit (B) hMOR-F1AsH-S268+ICL3-CFP(400) und (C) hMOR-YFP-S268+ICL3-CFP(400) transfiziert wurden. Dargestellt sind die Überlagerung der CFP-Emission in grün und die Fluoreszenz des Membranfarbstoffs CellMask™ Deep Red in rot. Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

3.1.7 Insertion von ICL3 des α_{2A} -adrenergen Rezeptors

Da ICL3 beim MOR-Wildtyp mit 23 Aminosäuren Länge relativ klein ist, könnte eine künstliche Verlängerung der Domäne zu einer besseren Membranexpression beitragen. Für den Einschub wurde ein Teil des ICL3 vom α_{2A} -AR-FRET-Sensor ausgewählt, weil dieser sehr gut an der Zellmembran lokalisiert ist und beachtliche FRET-Signale zeigt [107].

Insgesamt wurden 40 aus dem α_{2A} -AR stammende Aminosäurereste, inklusive Tetracysteinmotiv, in ICL3 von hMOR integriert (Abb. 18 A). Es wurden zwei verschiedene

Rezeptorkonstrukte kloniert, dabei wurde der Einschub zum einen in die Domänenmitte zwischen die Aminosäurereste S268 und G269 eingefügt, zum anderen verschoben in Richtung der TMD4 zwischen die Aminosäurereste N276 und L277. Erneut wurden die Konstrukte in HEK293T Zellen exprimiert und deren Lokalisation untersucht. Wie die Überlagerung der Emissionen von CFP und rotem Membranfarbstoff in Abb. 18 B und C zeigen, sind beide Konstrukte teilweise an der Membran lokalisiert.

Anschließend wurden die hMOR- α_{2A} -Konstrukte mithilfe des FRET-Mikroskops auf eine Änderung des FRET-Signals untersucht. Dazu wurden die Konstrukte hMOR- α_{2A} -S268/G269-CFP(400) und hMOR- α_{2A} -N276/L277-CFP(400) in HEK293T transfiziert und nach 48 h mit FLAsH markiert. Es konnte ein FRET-Signal detektiert werden, die Perfusion mit den Agonisten Morphin (1 μ M, 10 μ M) und DAMGO (10 μ M) führte jedoch nicht zu einer Änderung des FRET-Signals. Somit sind die Voraussetzungen für einen funktionellen Rezeptorsensor nicht erfüllt.

A

Konstrukt (-CFP)	-Transferierte Aminosäuresequenz aus ICL3 des α_{2A} -AR-
hMOR- α_{2A} -	
S268/G269:	VRMLS-QIAKRRTRVPPSRRGPDACC PGCC GSKASRWRGRQ REKR -GSKEK
hMOR- α_{2A} -	
N276/L277:	EKDRN-QIAKRRTRVPPSRRGPDACC PGCC GSKASRWRGRQ REKR -LRRIT

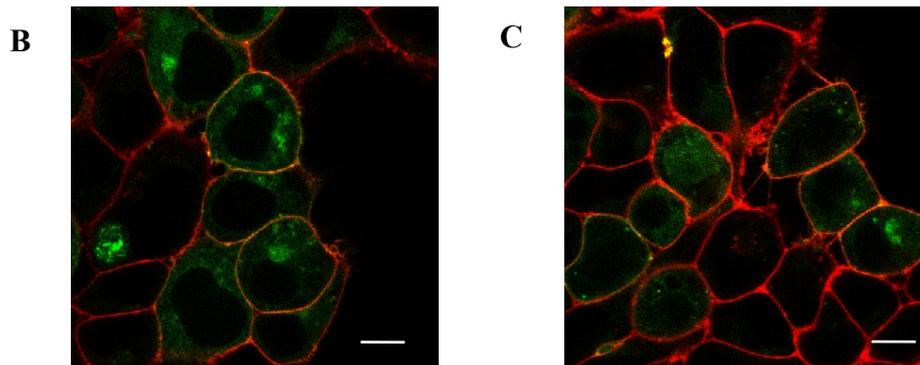


Abb. 18: Ein Teil der dritten intrazellulären Schleife vom α_{2A} -AR-FRET-Sensor wurde in ICL3 des hMOR eingefügt. (A) Die transferierte Aminosäuresequenz ist in schwarz/blau angezeigt und die flankierenden MOR-Sequenzen sind in grau dargestellt. Die konfokalmikroskopische Aufnahmen zeigen HEK293T Zellen, welche transient mit (B) hMOR- α_{2A} -S268/G269-CFP(400) und (C) hMOR- α_{2A} -N276/L277-CFP(400) transfiziert wurden. Die Aufnahmen zeigen die Überlagerung von CFP-Fluoreszenz und die CellMask™ Deep Red-Emission. Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

3.1.8 Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL2

Da die Insertion des zweiten Fluorophors in ICL3 bei einigen Rezeptorkonstrukten die Membranlokalisation beeinträchtigte, wurde alternativ eine andere Position innerhalb des Rezeptors zur Insertion ausgesucht. Die zweite intrazelluläre Schleife wird von 30 Aminosäureresten aufgebaut, somit ist diese Domäne etwas länger als die dritte intrazelluläre Schleife.

Um zu testen, ob das Tetracysteinmotiv in der zweiten intrazellulären Schleife besser toleriert wird, wurden zwei unterschiedliche Konstrukte kloniert. Das FAsH-Bindemotiv wurde einerseits mittig in ICL2 zwischen R180 und T181 eingeführt und N- und C-terminal von den Aminosäuren SA bzw. AG flankiert. Im zweiten Konstrukt wurde das Tetracysteinmotiv näher an TMD4 positioniert, zwischen die Aminosäuren N190 und V191 und wiederum flankiert von SA bzw. AG. Die cDNA der Sensoren wurde in HEK293T transfiziert und die Lokalisation mittels Konfokalmikroskop analysiert. Die Überlagerung von CFP-Fluoreszenz und der Emission des Membranfarbstoffs zeigt keine Colokalisation und damit nur die intrazelluläre Lokalisation der Rezeptorkonstrukte (Abb. 19).

A

Konstrukt (-CFP)	Intrazelluläre Schleife 2	
	166	195
hMOR-FIAsH-R180/T181:	DRYIAVCHPVKALDFR	SACCPGCCAGTPRNAKI INVCNWI
hMOR-FIAsH-N190/V191:	DRYIAVCHPVKALDFRTPRNAKI IN	SACCPGCCAGVCNWI

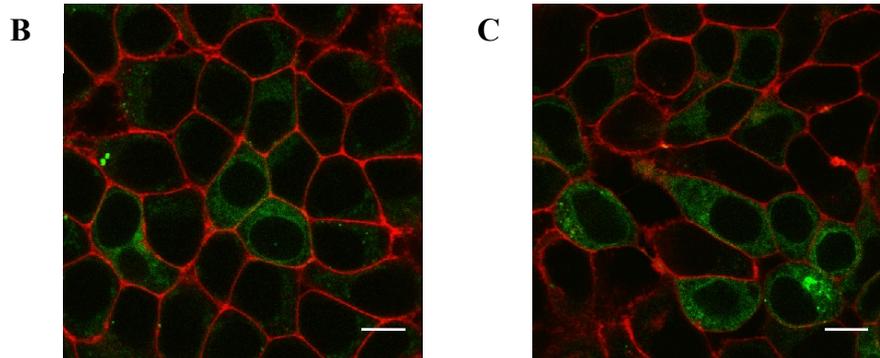


Abb. 19: Insertion des Tetracysteinmotivs in ICL2. (A) Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der ICL2 für die Tetracysteinmotiv-enthaltenden Konstrukte. Ursprünglich vorhandene Aminosäuren wurden grau abgebildet und die durch Klonierungen eingeführten Modifikationen farblich hervorgehoben (Verbindungsaminosäuren grün; Tetracysteinmotiv blau). Die konfokalmikroskopischen Aufnahmen zeigen HEK293T, die 48 h nach der transienten Transfektion mit (B) hMOR-FIAsH-R180/T181-CFP(400) bzw. (C) hMOR-FIAsH-N190/V191-CFP(400) angefertigt wurden. Gezeigt wird die Überlagerung von CFP-Fluoreszenz (grün) und CellMaskTM Deep Red-Emission (rot). Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

Tab. 1 fasst alle klonierten Rezeptorkonstrukte, inklusive der jeweilig eingeführten Modifikationen, zusammen. Insgesamt wurden 30 verschiedene Konstrukte des MOR kloniert, mittels Konfokalmikroskopie auf Membranlokalisierung und anhand von FRET-Mikroskopie auf eine Änderung des FRET-Signals analysiert. Trotzdem konnte bisher kein funktioneller FRET-Biosensor für den MOR entwickelt werden.

Tab. 1: Die Zusammenfassung der MOR-Sensor Konstrukte beinhaltet alle Ratten- (rMOR) und humane Rezeptoren (hMOR), angeführt sind die jeweiligen Modifikationen, wie Signalpeptid (+/-), Trunkierung und Insertionsposition für den Fluorophor bzw. das Tetracysteinmotiv. Die Rezeptorlokalisierung an der Zellmembran wurde mit einem einfachen Bewertungssystem als vorhanden (+) oder nicht vorhanden (-) eingestuft.

Konstrukt	Signal-peptid	Linker AS	Position YFP bzw. FIAsh	Trunkierung	Membran-lokalisierung
rMOR-CFP(378)	-	-	-	20 AS	+
rMOR-CFP(368)	-	-	-	30 AS	+
rMOR-CFP(358)	-	-	-	40 AS	+
rMOR-FIAsh-CFP(398)	-	-	D272/R273	-	-
rMOR-FIAsh-CFP(378)	-	-	D272/R273	20 AS	-
rMOR-FIAsh-CFP(368)	-	-	D272/R273	30 AS	-
rMOR-FIAsh-CFP(358)	-	-	D272/R273	40 AS	-
rMOR-FIAsh-CFP(378)	-	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	20 AS	-
rMOR-FIAsh-CFP(368)	-	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	30 AS	-
rMOR-FIAsh-CFP(358)	-	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	40 AS	-
rMORFIAsh-CFP(378)	+	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	20 AS	-
rMORFIAsh-CFP(368)	+	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	30 AS	-
rMORFIAsh-CFP(358)	+	GG-CCPGCC-GGS	D272/R273	40 AS	-
hMOR-CFP(400)	-	-	-	-	+
hMOR-CFP(400)	+	-	-	-	+
hMOR-FIAsh-CFP(400)	-	-	S268/G269	-	+
hMOR-FIAsh+ICL3-CFP(400)	-	-	S268	-	+
hMOR-FIAsh-CFP(400)	-	-	G269/S270	-	+
hMOR-FIAsh-CFP(360)	-	-	G269/S270	40 AS	-
hMOR-FIAsh-CFP(400)	-	GS-CCPGCC-	G269/S270	-	+
hMOR-FIAsh-CFP(400)	-	SA-CCPGCC-AG	R180/T181	-	-
hMOR-FIAsh-CFP(400)	-	SA-CCPGCC-AG	N190/V191	-	-
hMOR-YFP-CFP(400)	+	GEG-YFP-ASGAG	S277/K278	-	-
hMOR-YFP-CFP(380)	+	GEG-YFP-ASGAG	S277/K278	20 AS	-
hMOR-YFP-CFP(360)	+	GEG-YFP-ASGAG	S277/K278	40 AS	-
hMOR-YFP-CFP(400)	-	-	S268/G269	-	-
hMOR-YFP+ICL3-CFP(400)	-	-	S268/G269	-	-
hMOR-Turquoise-Venus(400)	+	GEG-YFP-ASGAG	S277/K278	-	-
hMOR- α_{2A} -CFP(400)	-	-	S268/G269	-	+
hMOR- α_{2A} -CFP(400)	-	-	N276/L277	-	+

3.1.9 Coexpression mit einem Chaperon

Die meisten Membranproteine werden an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums synthetisiert. Mithilfe von Chaperonen wird über hydrophobe Protein-Protein-Interaktionen zum einen die Proteinfaltung unterstützt und zum anderen die korrekte Proteinfaltung überprüft. Korrekt gefaltete Membranproteine werden über den Golgi-Apparat zur Zellmembran transportiert. Auf diese Weise können Chaperone die Synthese und Reifung von Membranproteinen unterstützen. In verschiedenen Zelllinien führt die Coexpression von MOR und DOR zu der Bildung von Rezeptorheterodimeren [115, 116]. Dabei wird ein Teil der Rezeptorheterodimere in intrazellulären Kompartimenten zurück gehalten [116]. Wird zusätzlich zu den Rezeptoren das Golgi-Chaperon RTP4 in die Zellen transfiziert, so erhöht sich die Anzahl der MOR/DOR-Heterodimere an der Zelloberfläche. Die Autoren konnten bei der Coimmunopräzipitation eine Interaktion zwischen RTP4 und MOR aber auch zwischen RTP4 und DOR zeigen. Dementsprechend könnte die Coexpression mit RTP4 zu einer besseren Membranlokalisation der MOR-Sensoren beitragen.

Um zu testen, ob die intrazelluläre Akkumulation des mit YFP/CFP-markierten Rezeptors durch die Coexpression mit RTP4 reduziert werden kann, wurde exemplarisch der Rezeptorsensor hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400) ausgewählt. Zudem wurde hMOR-FlAsH-G269/S270-CFP(400) selektiert, um herauszufinden, ob die Coexpression mit RTP4 die bereits vorhandene Membranlokalisation verbessert. Beide Konstrukte wurden jeweils einzeln und zusammen mit RTP4 in HEK293T Zellen transfiziert und mittels Konfokalmikroskopie untersucht. Wie Abb. 20 A zeigt, ist hMOR-FlAsH-G269/S270-CFP(400) zum Teil an der Membran lokalisiert, das restliche Rezeptorprotein verbleibt intrazellulär. Auch bei der Coexpression mit RTP4 wird ein Teil des Rezeptors intrazellulär exprimiert (Abb. 20 B). Wie bereits in Abschnitt 3.1.3 gezeigt wurde, konnte für das Konstrukt hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400) ausschließlich eine intrazelluläre Lokalisation nachgewiesen werden. Auch die Coexpression mit RTP4 führte, im Vergleich zur Expression des Rezeptorproteins allein, nicht zur verbesserten Membranlokalisation (Abb. 20 C und D).

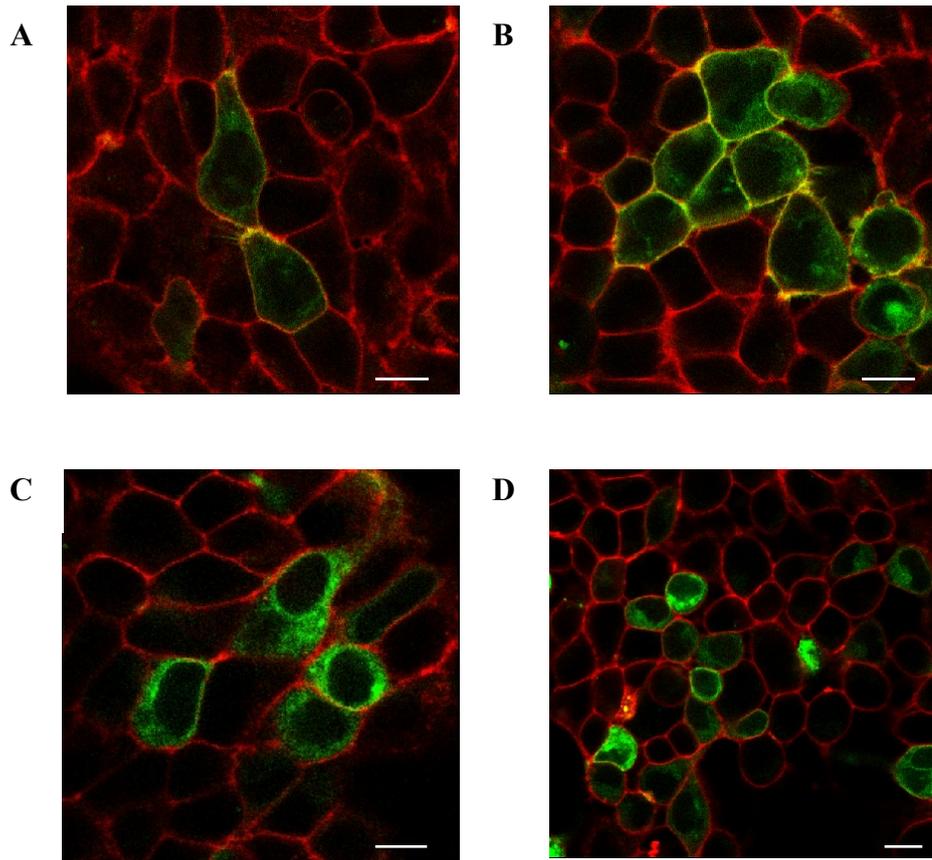


Abb. 20: Konfokalmikroskopische Aufnahmen von HEK293T, welche transient mit (A) hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400), (B) hMOR-FIAsH-G269/S270-CFP(400) und zusätzlich mit RTP4, (C) hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400), (D) hMOR-YFP-S277/K278-CFP(400) und RTP4 transfiziert wurden. Die Aufnahmen zeigen die Überlagerung der CFP-Emission (grün) und die Emission des Membranfarbstoffs CellMaskTM Deep Red (rot). Der Größenbalken entspricht 10 μ M.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Coexpression mit dem Golgi-Chaperon RTP4 die Membranlokalisation des YFP/CFP-Rezeptorkonstrukts nicht verbessert. Auch bei dem Rezeptorsensor mit FIAsH/CFP verbessert die Coexpression mit RTP4 dessen Membranlokalisation nicht signifikant.

3.2 Pharmakologische Untersuchung von Morphin und seinen Metaboliten

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der ausführlichen pharmakologischen Analyse von Morphin im Vergleich mit seinen Metaboliten am humanen MOR. Um eine systematische Untersuchung durchzuführen, wurden die Eigenschaften der Verbindungen auf mehreren Ebenen untersucht. Die Affinität zum humanen MOR wurde durch Verdrängungsstudien mit einem radioaktiven Liganden bestimmt. Weiterhin wurden die beiden Hauptsignalwege, die durch MOR in den Zellen angeschaltet werden, mittels FRET-basierten Techniken untersucht.

3.2.1 Radioliganden-Bindungen

Zunächst wurden die Affinitäten von Morphin und seinen Metaboliten zum humanen MOR bestimmt. Da es sich bei Morphin um einen partiellen Agonist handelt, wurde der Vollagonist DAMGO zusätzlich als Referenzsubstanz untersucht. Für die Bindungsstudien wurden Membranen von HEK293T Zellen präpariert, welche zuvor mit cDNA vom humanen MOR transfiziert wurden. Als radioaktiv markierter Ligand wurde [³H]-Naloxon verwendet. Das Diagramm in Abb. 21 zeigt die Verdrängungskurven für DAMGO, Morphin und die Metabolite. Die Verdrängungskurven für Morphin und DAMGO ergeben K_i -Werte, welche mit bereits veröffentlichten Daten vergleichbar sind. In Tab. 3 sind alle K_i -Werte aufgelistet, dabei fanden wir eine Affinität von $22,0 \pm 4,0$ nM für Morphin. Der Literaturvergleichswert gemessen an COS-Zellmembranen liegt bei $29,6 \pm 5,5$ nM für Morphin [117]. Für den Vollagonisten DAMGO fanden wir eine höhere Affinität mit $5,0 \pm 2,0$ nM, welche sich mit den Literaturwerten von $10,4 \pm 2,0$ nM oder $2,7 \pm 0,3$ nM deckt [117, 118]. Die Metabolite können anhand der K_i -Werte in zwei Gruppen eingeteilt werden, eine Gruppe mit höher affinen Verbindungen mit K_i -Werten im nanomolaren Bereich und eine Gruppe mit nieder affinen Metaboliten mit Affinitäten im mikromolaren Bereich (Tab. 3).

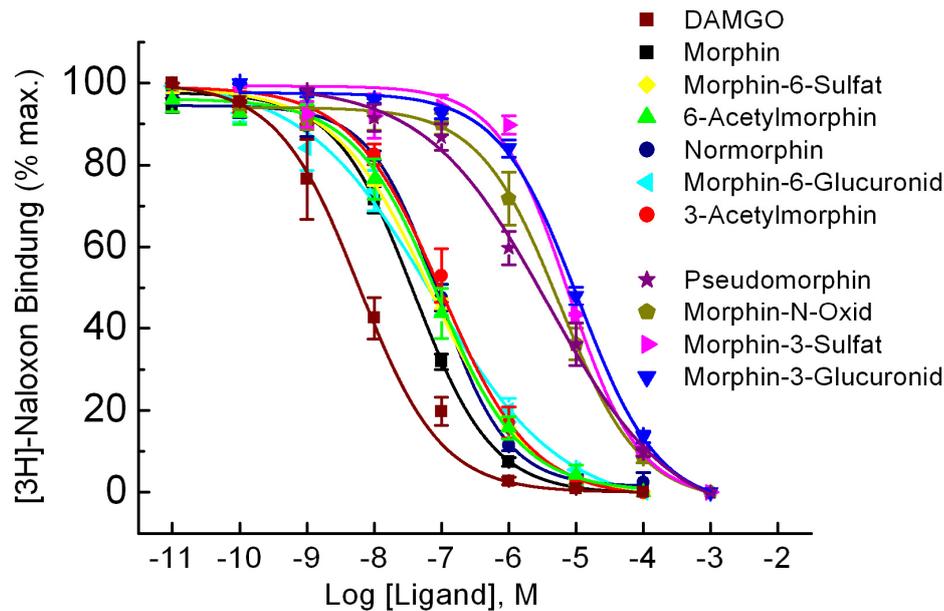


Abb. 21: Verdrängungskurven von [^3H]-Naloxon durch verschiedene Liganden, gemessen an hMOR exprimierenden HEK293T Zellmembranen. Die Daten sind angegeben als Mittelwerte ermittelt aus 4 bis 8 Experimenten. Dem Fitting wurde ein Bindungsmodell mit einer Bindungsstelle zugrunde gelegt.

3.2.2 G_{i1} -Protein Aktivierung

Die Liganden-induzierte Aktivierung von inhibitorischen G-Proteinen wurde anhand von FRET-basierten Experimenten analysiert. Dazu wurden HEK293T Zellen mit cDNA für den hMOR Wildtyp und den Untereinheiten des trimeren G_{i1} -Proteins transfiziert. Das FRET-Signal beruht auf dem Energietransfer zwischen YFP-markiertem $G_{\alpha i1}$ und CFP-markiertem $G_{\gamma 2}$ [111]. Bei diesem Versuchsaufbau führt die Rezeptoraktivierung zu einem schnell abfallenden, reversiblen FRET-Signal (Abb. 22), welches durch die strukturelle Reorganisation der G-Protein Untereinheiten ausgelöst wird.

Zunächst wurden die transfizierten Zellen mit gleichen Konzentrationen an Morphin und DAMGO behandelt, wobei die durch Morphin ausgelöste Änderung des FRET-Signals nur ca. 70% des DAMGO-Signals betrug (Abb. 22 A). Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass Morphin als Partialagonist und DAMGO als Vollagonist am MOR agiert. Durch die Gabe von Naloxon wurde das FRET-Signal inhibiert und relativ langsam auf sein ursprüngliches Niveau zurückgesetzt. Somit wurde das FRET-Experiment als geeignetes Mittel zur Beurteilung von Partialagonisten, Agonisten und Antagonisten identifiziert.

Ergebnisse

Anschließend wurden die FRET-Signale von Morphin und seinen Metaboliten miteinander verglichen. Einige Metabolite generierten eine starke Änderung des FRET-Signals mit ähnlicher Amplitude wie Morphin, dazu gehört z.B. Morphin-6-Glucuronid (Abb. 22 B). Andere Metabolite erzeugten im Vergleich zu Morphin nur partielle FRET-Signaländerungen, wie beispielsweise Morphin-N-Oxid, welches nur ca. 80% des Referenzsignals (10 μ M Morphin) erreichte (Abb. 22 C).

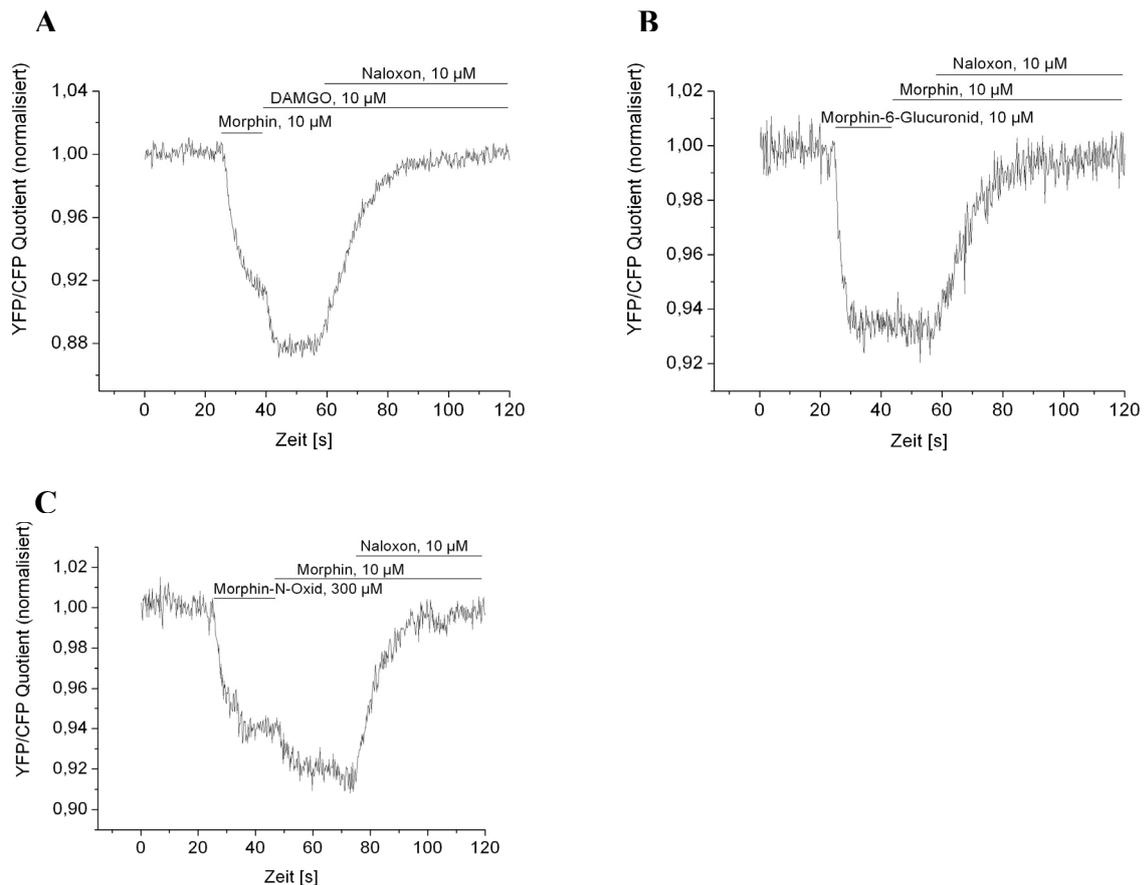


Abb. 22: Die Liganden-induzierte Aktivierung von G_{i1} -Proteinen wurde an lebenden HEK293T Zellen in Echtzeit mittels FRET gemessen. Der Energietransfer erfolgte vom CFP-markierten $G_{\gamma 2}$ auf das YFP-markierte $G_{\alpha i1}$. Bei der Rezeptoraktivierung nahm das FRET-Signal infolge verringerter YFP- und höherer CFP-Emission ab. (A) Bei der Behandlung mit gleichen Konzentrationen von Morphin und DAMGO (10 μ M) erwies sich Morphin als Partialagonist. Der Antagonist Naloxon inhibierte die von den Agonisten erzeugten FRET-Signale, die in Folge dessen auf ihr ursprüngliches Niveau zurückkehrten. (B) Morphin-6-Glucuronid (10 μ M) erzeugte ein FRET-Signal mit einer zu Morphin (10 μ M) vergleichbaren Amplitude. (C) Morphin-N-Oxid induzierte auch bei hohen Konzentrationen (300 μ M) im Vergleich zu Morphin (10 μ M) ein partielles FRET-Signal.

Ergebnisse

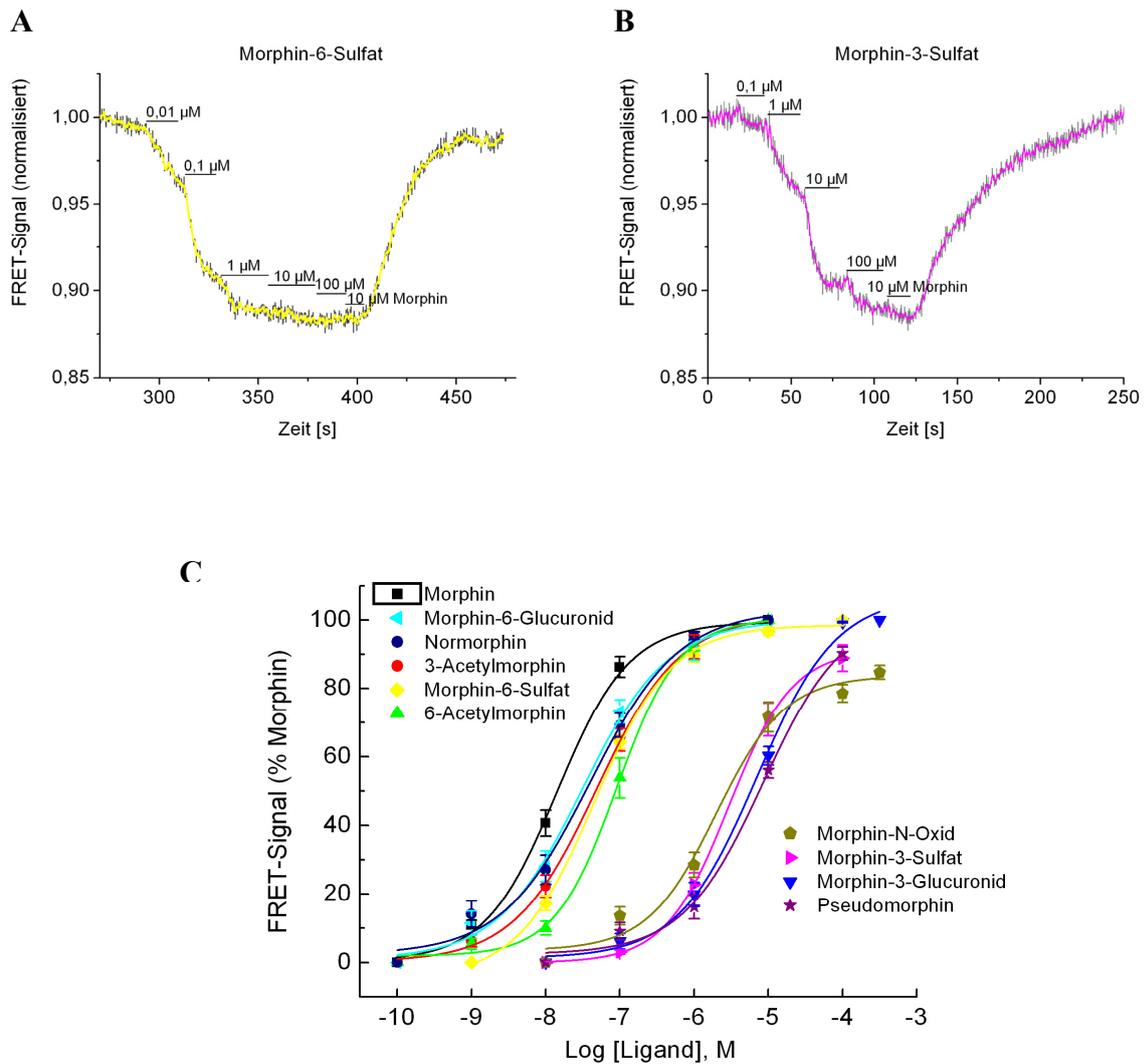


Abb. 23: Die Konzentrations-Wirkungskurven wurden basierend auf FRET-Experimenten bestimmt, indem die Konzentration des jeweiligen Liganden stufenweise erhöht wurde. Dabei wurde die Änderung des FRET-Signals prozentual ins Verhältnis zur maximalen Aktivierung durch 10 μM Morphin gesetzt. Repräsentative Messungen sind für die Metabolite (A) Morphin-6-Sulfat und (B) Morphin-3-Sulfat gezeigt. Der Vergleich der Substanzen zeigt, dass die G_{i1} -Proteine bei 1 μM Morphin-6-Sulfat nahezu vollständig aktiviert wurden, bei Morphin-3-Sulfat wurde dies erst bei einer Konzentration von 100 μM festgestellt. (C) Die Konzentrations-Wirkungskurven für die G_{i1} -Aktivierung durch Morphin und seine Hauptmetabolite wurden auf 10 μM Morphin normalisiert ($n = 3-7$).

Für die systematische Analyse der Effizienzen und Potenzen wurden Konzentrations-Wirkungskurven für alle Metabolite erstellt. Dazu wurde die Ligandenkonzentration bei jeder Messung schrittweise erhöht und abschließend wurde mit 10 μM Morphin stimuliert (Abb. 23 A, B). Partielle Aktivierungsstufen wurden prozentual zur maximalen Aktivierung bei 10 μM Morphin ins Verhältnis gesetzt und daraus die Konzentrations-Wirkungskurven kalkuliert. Das Diagramm in Abb. 23 C zeigt die ermittelten Konzentrations-Wirkungskurven, wobei wieder zwei Gruppen von Verbindungen erkennbar sind. Starke Metabolite zeigen eine Potenz und Effizienz vergleichbar zu Morphin, schwache Substanzen haben erheblich geringere Potenz und etwas geringere Effizienz. Die zugehörigen EC_{50} Werte sind in Tab. 3 aufgelistet.

3.2.3 β -Arrestin2-Rekrutierung

Die Liganden-induzierte Translokation von β -Arrestin zum MOR wurde durch eine bereits für andere Rezeptoren etablierte FRET-basierte Methode *in vivo* quantifiziert [112]. Dazu wurden HEK293T Zellen mit YFP-markiertem β -Arrestin2 und CFP-markiertem Rezeptor transfiziert. Um eine ausreichende Rezeptor-Phosphorylierung sicher zu stellen, wurde zusätzlich GRK2 in die Zellen transfiziert. Die Liganden-gesteuerte Aktivierung von MOR führt zur Rezeptorphosphorylierung und nachfolgender Rekrutierung von β -Arrestin2, was durch den langsamen Anstieg des FRET-Signals sichtbar wird.

Die Behandlung von transfizierten Zellen mit 10 μM Morphin erzeugte nur ca. 70% des DAMGO-Signals bei gleicher Konzentration (Abb. 24 A). Somit agiert Morphin auch bei der Rekrutierung von β -Arrestin2 als Partialagonist. Das FRET-Signal wurde wiederum durch die Gabe von Naloxon inhibiert, wodurch das Signal langsam auf seine ursprüngliche Höhe zurückkehrte. Dementsprechend eignet sich die FRET-basierte Rekrutierung von β -Arrestin zur Unterscheidung von Partialagonisten, Agonisten und Antagonisten.

Im nächsten Schritt wurden die FRET-Signale von Morphin mit denen der Metabolite verglichen, dazu wurden transfizierte Zellen mit gleichen Ligandenkonzentrationen behandelt. Interessanterweise führen einige Metabolite zu einer stärkeren Translokation von β -Arrestin2 als Morphin selbst, dieser Effekt wird in Abb. 24 B am Beispiel von Normorphin dargestellt. Andererseits erzeugten einige Metabolite ein viel schwächeres FRET-Signal als Morphin, z.B. erreichte das von Morphin-N-Oxid (10 μM) erzeugte Signal nur ca. 50% des Referenzsignals von 10 μM DAMGO (Abb. 24 C).

Ergebnisse

Der Vergleich der Zeitskalen zeigt, dass die Translokation von β -Arrestin2 wesentlich langsamer vonstatten geht als die G_{i1} -Aktivierung. Diese zeitliche Verzögerung ist auf die vorherige Rezeptor-Phosphorylierung durch die GRK2 zurückzuführen [112].

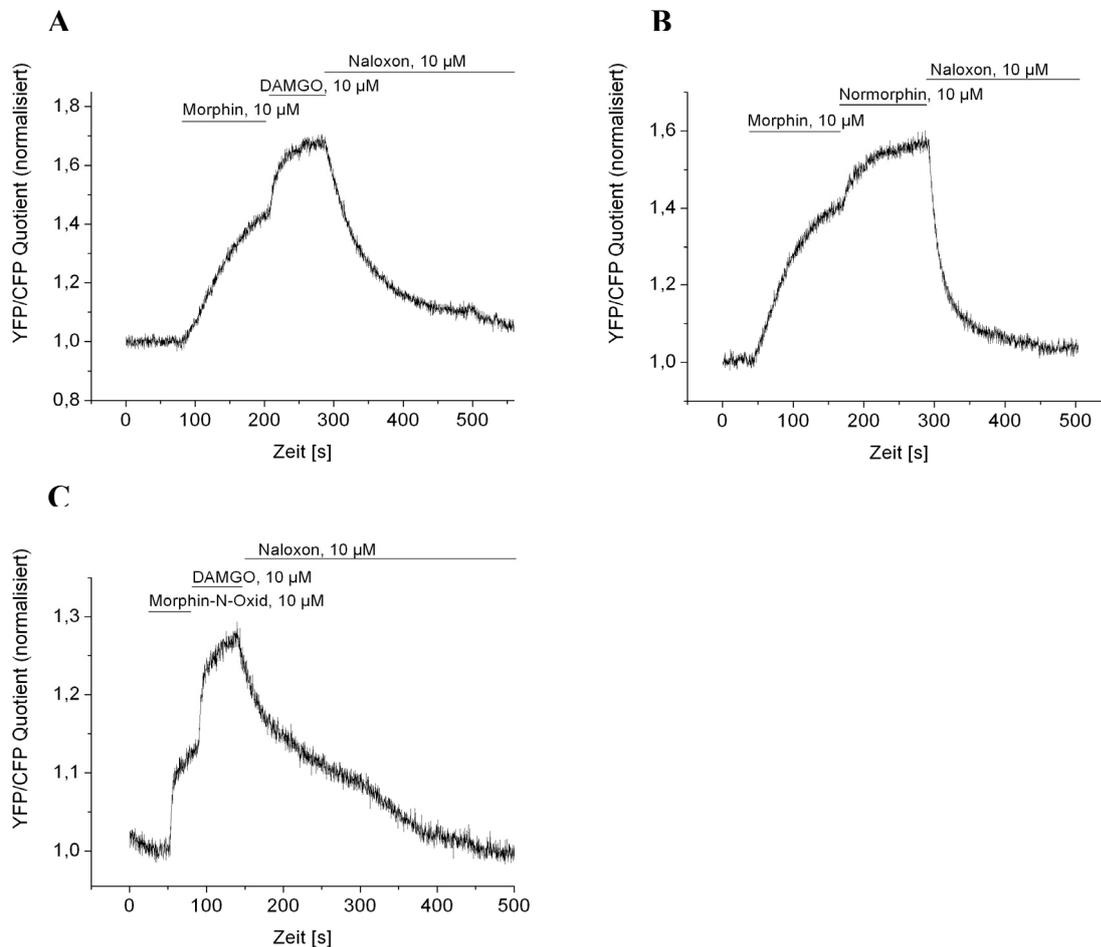


Abb. 24: Die Liganden-induzierte Rekrutierung von β -Arrestin2 wurde an lebenden HEK293T Zellen analysiert, dabei wurde die Änderung des FRET-Signals zwischen dem mit CFP markierten humanen MOR und β -Arrestin-YFP in Echtzeit gemessen. Infolge der Rezeptoraktivierung nahm das FRET-Signal aufgrund verringerter CFP-Emission und erhöhter YFP-Emission zu. Morphine löste im Vergleich zu (A) DAMGO und (B) Normorphin, bei gleichen Konzentrationen, ein partielles FRET-Signal aus. (C) Auch Morphine-N-Oxid verhielt sich im Vergleich zu DAMGO als Partialagonist. Durch die Gabe des Antagonisten Naloxon (10 μ M) wurden die FRET-Signale blockiert.

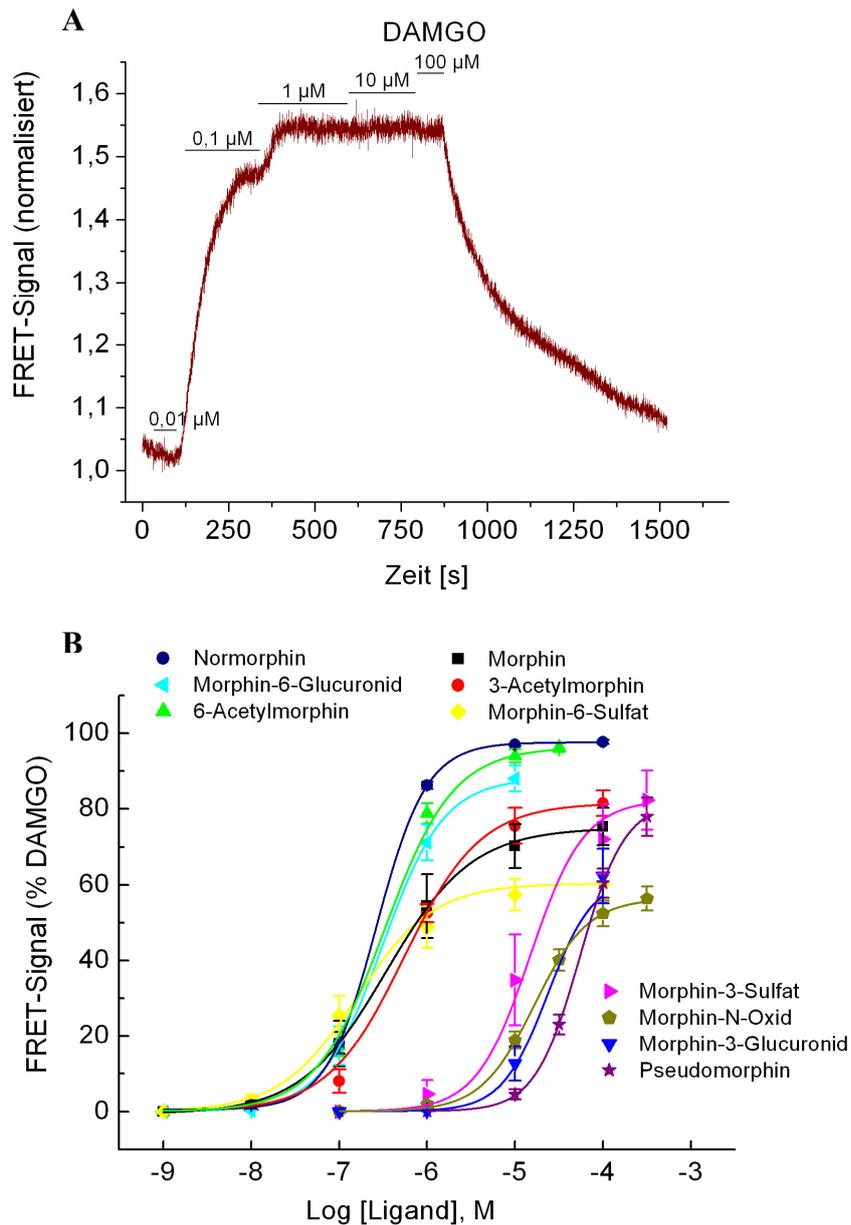


Abb. 25: Die Ermittlung der Konzentrations-Wirkungskurven für die β -Arrestin2-Rekrutierung *in vivo* erfolgte basierend auf FRET-Messungen. Dazu wurde die Konzentration der Metabolite schrittweise erhöht und die Änderung des FRET-Signals in Relation zum maximalen Signal bei 10 μ M DAMGO gesetzt. (A) Das repräsentative FRET-Experiment für die Behandlung mit DAMGO zeigt die Zunahme des FRET-Signals. (B) Die Konzentrations-Wirkungskurven für die Rekrutierung von β -Arrestin2 durch Morphin und seine Metabolite wurden auf 10 μ M DAMGO normalisiert (n = 4-7).

Um Konzentrations-Wirkungskurven für alle Substanzen zu erstellen, wurden die Ligandenkonzentrationen während des Experiments stufenweise erhöht. In Abb. 25 A ist ein exemplarisches Experiment mit dem Vollagonisten DAMGO dargestellt. Da einige Metabolite wie Normorphin, Morphin-6-Glucuronid und 6-Acetylmorphin zu einer stärkeren

Translokation von β -Arrestin2 als Morphin selbst führten, wurden alle Messungen auf die maximale FRET-Änderung bei 10 μ M DAMGO normalisiert. Die entsprechenden Konzentrations-Wirkungskurven wurden in Abb. 25 B zusammengefasst. Ebenso wie bei der G_{i1} -Aktivierung konnten die getesteten Liganden in eine Gruppe mit stärker aktiven und eine Gruppe mit geringer aktiven Substanzen unterteilt werden. Die stärker aktiven Metabolite wiesen EC_{50} -Werte im nanomolaren Bereich auf. Morphin-N-Oxid und Morphin-3-Glucuronid zeigten eine geringere Effizienz und wesentlich geringere Potenz als Morphin. Zu den geringer aktiven Metaboliten zählten auch Morphin-3-Sulfat und Pseudomorphin, wobei diese eine geringe Effizienz aber eine zu Morphin vergleichbare Potenz zeigten, d.h. sie rekrutierten β -Arrestin2 im gleichen Ausmaß, wie Morphin selbst, jedoch bei wesentlich höheren Konzentrationen.

In Tab. 3 wurden alle aus dieser Studie ermittelten pharmakologischen Daten zusammengefasst, für die FRET-basierten Methoden wurden die aus den Konzentrations-Wirkungskurven ermittelten EC_{50} -Werte und für die Verdrängungsstudien die K_i -Werte aufgelistet.

Tab. 3: Zusammenfassung der pharmakologischen Eigenschaften von Morphin und seinen verschiedenen Metaboliten am humanen MOR. Für die FRET-basierten Methoden der G_{i1} -Aktivierung und β -Arrestin2-Rekrutierung sind EC_{50} -Werte angeführt, welche die halbmaximale Wirkung für jede Substanz angeben. Aus den Bindungsstudien ermittelte Daten sind als K_i -Werte angegeben. Alle Daten stellen Mittelwerte berechnet auf der Grundlage von 3 bis 7 unabhängigen Experimenten dar.

Substanz	Methode		
	G_{i1} Aktivierung EC_{50} (μ M), MW \pm SE	β -Arrestin2-Rekrutierung EC_{50} (μ M), MW \pm SE	Bindungen K_i (μ M), MW \pm SE
DAMGO	0,046 \pm 0,0004	0,060 \pm 0,002	0,005 \pm 0,002
Morphin	0,015 \pm 0,0002	0,457 \pm 0,157	0,022 \pm 0,004
Morphin-6-Glucuronid	0,037 \pm 0,008	0,338 \pm 0,062	0,063 \pm 0,014
Normorphin	0,040 \pm 0,007	0,267 \pm 0,015	0,061 \pm 0,013
3-Acetylmorphin	0,057 \pm 0,010	0,594 \pm 0,019	0,098 \pm 0,029
Morphin-6-Sulfat	0,053 \pm 0,005	0,196 \pm 0,036	0,047 \pm 0,004
6-Acetylmorphin	0,100 \pm 0,021	0,339 \pm 0,023	0,054 \pm 0,022
Morphin-N-Oxid	2,2 \pm 0,4	16,7 \pm 1,3	3,4 \pm 1,0
Morphin-3-Sulfat	3,2 \pm 0,5	20,1 \pm 6,8	4,7 \pm 1,1
Morphin-3-Glucuronid	8,2 \pm 1,4	23,7 \pm 4,8	6,1 \pm 0,4
Pseudomorphin	9,5 \pm 0,6	53,6 \pm 4,3	3,6 \pm 1,8

4. Diskussion

4.1 Klonierung eines MOR-Rezeptor Sensors

In der letzten Dekade wurden einige FRET-Sensoren für GPCR entwickelt, dabei waren vor allem klinisch relevante Proteine wie adrenerge Rezeptoren oder Muskarinrezeptoren im Fokus der Forschung [107, 109, 110, 119]. Bisher fehlt jedoch ein funktioneller Sensor für Opioidrezeptoren, insbesondere für den μ -Opioidrezeptor, der aufgrund seiner therapeutischen Relevanz bei der Behandlung von Schmerzen eine wichtige pharmakologische Zielstruktur darstellt.

Die Klonierung eines funktionellen MOR-Biosensors war ein Ziel der vorliegenden Arbeit. Auf der Grundlage eines funktionellen Sensors könnten Konformationsänderungen des Rezeptors, die Kinetik der Rezeptoraktivierung und Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen für verschiedene Liganden untersucht werden. Zur Generierung eines solchen Sensors wurde der MOR an der zweiten und dritten intrazellulären Schleife sowie am C-Terminus mit fluoreszierenden Proteinen oder Fluorophor-Bindemotiven versehen.

Während der MOR Wildtyp hauptsächlich an der Zellmembran exprimiert wird, zeigte sich bei fast allen MOR-Sensoren die mangelnde Membranlokalisation als kritischer Punkt. Die Voraussetzung, um FRET-Signale an einem Rezeptorsensor zu messen, besteht darin, dass dieser zur Zelloberfläche gelangt, wo er extrazellulär seinen Liganden bindet und seine Konformation ändert. Dadurch ändert sich intrazellulär die Position der Fluorophore zueinander, was in der Änderung des FRET-Signals resultiert. Im Folgenden werden die einzelnen Rezeptormodifikationen und deren Einfluss auf die Lokalisation detailliert diskutiert.

Der C-Terminus des MOR wird aus 70 Aminosäuren aufgebaut, im Vergleich zum humanen M_2 -Muskarinrezeptor mit 22 Aminosäuren ist dieser somit relativ lang. Daher wurden neben dem Rezeptorkonstrukt mit voller Länge des C-Terminus auch Konstrukte mit schrittweise verkürztem C-Terminus konstruiert, um einen zu großen Abstand der Fluorophore voneinander zu vermeiden. Außerdem hat der humane MOR eine potentielle Palmitoylierungsstelle an C353 (entspricht beim rMOR C351), die den C-Terminus des Rezeptors in der Membran verankern würde. Für den Rattenrezeptor wurde zwar eine Palmitoylierungsstelle nachgewiesen, diese ist gemäß den Autoren jedoch nicht am C-Terminus lokalisiert [120]. Bei den in dieser Arbeit vorgenommenen Trunkierungen blieben diese Cysteinreste erhalten, da der hMOR nach 360 Aminosäuren und rMOR nach 358 Aminosäuren gekürzt wurde.

Der nur mit CFP markierte humane MOR zeigte bei der konfokalmikroskopischen Analyse eine ausgeprägte Membranlokalisation. Auch die am C-Terminus um 20, 30 oder 40 Aminosäurereste trunkierten Rezeptorkonstrukte wurden an der Zellmembran exprimiert, es konnte jedoch bereits eine intrazelluläre Anreicherung des Rezeptorproteins beobachtet werden.

Die C-terminale Markierung mit CFP kann ebenso wie die Trunkierung des C-Terminus die Desensibilisierung beeinflussen. Das Fluoreszenzprotein kann die Zugänglichkeit der Kinasen zum C-Terminus behindern, infolge dessen können Serin- und Threoninreste nicht phosphoryliert werden, was allerdings Voraussetzung für die β -Arrestin-Bindung und Rezeptorinternalisierung ist. Entsprechend kann es bei trunkierten Rezeptorversionen aufgrund von fehlenden Phosphorylierungsstellen zur Beeinträchtigung der Desensibilisierung kommen.

Die Identifizierung von intrazellulären Phosphorylierungsstellen erfolgte über gerichtete Mutagenese, Trunkierung von Rezeptoren und anhand von natürlich vorkommenden Rezeptorvarianten (Polymorphismen). Die Mutation von T394A zeigte, dass dieser Rest wichtig für die Phosphorylierung und Desensibilisierung ist [121]. Auch die Mutation von T383A reduziert die Desensibilisierung um 30%. Weiterhin wurde ein Serin-Threonin-Cluster (T354-S355-S356-T357) identifiziert, das von der GRK2 erkannt wird und für die Desensibilisierung notwendig ist [122]. Außerdem modulieren die Glutamatreste 388, 391 und 393 die Zugänglichkeit der Kinase, da deren Mutation zu Glutamin die Rezeptor Desensibilisierung vollständig blockiert [123].

Neben dem C-Terminus wurde auch die dritte intrazelluläre Schleife modifiziert, indem ein Fluoreszenzprotein oder das Tetracysteinmotiv eingefügt wurden. Für die G-Protein-Kopplung und die weiterführende Signaltransduktion ist ICL3 essentiell [124], daher ist diese Domäne bei allen Opioidrezeptoren hoch konserviert und enthält eine Konsensussequenz SxRxxS/T mit zwei CaMK II Phosphorylierungsstellen [125]. Unabhängig von der Position innerhalb von ICL3 wurde keines der mit Fluoreszenzproteinen markierten Konstrukte an der Zellmembran exprimiert. Auch einige mit dem Tetracysteinmotiv versehene Rezeptorkonstrukte zeigten keine Membranlokalisation. Die Ausnahme stellten die Konstrukte mit dem Motiv zwischen S268/G269 bzw. G269/S270 dar, bei denen eine partielle Zellmembranlokalisation zu erkennen war. Trotzdem konnte bei FRET-Experimenten keine Agonisten-induzierte Änderung des FRET-Signals festgestellt werden. Diese Beobachtung könnte auf verschiedenen Ursachen beruhen. Möglicherweise ist die Positionierung des Tetracysteinmotivs innerhalb Sequenz Ser268-Gly269-Ser270 in Bezug auf die

Rezeptorlokalisierung optimal, bezogen auf die Funktionalität des Proteins jedoch hinderlich. Wenn bei diesem Rezeptorkonstrukt die Ligandenbindung gestört ist, kommt es evtl. nicht zur Konformationsänderung. Es wäre auch denkbar, dass der Ligand zwar bindet, der Rezeptor aber in diesem Bereich seine Konformation nicht ändert. Andererseits könnte es zu einer Liganden-induzierten Konformationsänderung des Rezeptors kommen, bei der sich die Position der Fluorophore nicht ändert. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die Entfernung zwischen den beiden Fluorophoren zu groß ist, um eine Liganden-abhängige Konformationsänderung detektieren zu können. Die teilweise an der Plasmamembran lokalisierten S268/G269- bzw. G269/S270-Konstrukte enthielten den gesamten C-Terminus, was tatsächlich in einer zu großen Distanz zwischen FLaSH und CFP resultieren kann. Daher wurde das G269/S270 Konstrukt um 40 Aminosäuren am C-Terminus verkürzt. Dieses verkürzte Konstrukt wurde gering exprimiert und zeigte eine schwache Membranlokalisierung. Auch dieses Rezeptorkonstrukt zeigte keine Agonisten-induzierte Änderung des FRET-Signals, was an der schwach ausgeprägten Membranlokalisierung liegen könnte. Denkbar wäre aber auch, dass die Fluorophore auch mit verkürztem C-Terminus noch zu weit voneinander entfernt sind und daraus eine geringe FRET-Effizienz resultiert.

Für den humanen MOR existiert eine Allelvariation, bei welcher der zweite Serinrest der Konsensussequenz $SxRxxS/T$ gegen ein Prolin ausgetauscht ist (S268P). Diese Rezeptorvariante zeigte in *Xenopus laevis* Oozyten und HEK293 Zellen den Verlust der CaMK II-induzierten Rezeptor-Desensibilisierung und eine reduzierte G-Protein-Kopplung. Diese Beobachtungen bestätigten sich bei der Analyse des Rattenrezeptors, bei dem durch gerichtete Mutagenese der entsprechende Serinrest gegen ein Prolin (S266P) ausgetauscht wurde [117, 125]. Hingegen beeinträchtigte die Doppelmutation S261A/S266A im Rattenrezeptor die Inhibierung der Adenylylcyclase in HEK Zellen nicht [126]. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen der Mutation dieses Serins zu Prolin oder Alanin (S268P; S266A) ist, dass Alanin die Struktur der dritten Schleife intakt belässt, während Prolin die Tertiärstruktur zerstört und damit die Kopplung zu G-Proteinen und die Signalweiterleitung unterbricht [117]. Die Alaninmutanten können dementsprechend noch zu G_i -Proteinen koppeln aber die Rezeptor-Desensibilisierung ist beeinträchtigt.

In Anlehnung an diese Ergebnisse ist es durchaus vorstellbar, dass die Insertion des Tetracysteinmotivs zwischen S268 und G269 durch seine rigide haarnadelähnliche Struktur die Tertiärstruktur von ICL3 maßgeblich verändert und damit sowohl G-Protein-Kopplung als auch Desensibilisierung verhindert. Dies bedeutet jedoch nicht zwangsläufig, dass auch die Ligandenbindung und Konformationsänderungen des Rezeptors beeinträchtigt werden.

Folglich könnte trotz der Behinderung der nachfolgenden Signaltransduktion ein funktioneller FRET-Sensor entstehen.

Da die dritte intrazelluläre Schleife kritisch für G-Protein-Kopplung und Rezeptor-Desensibilisierung ist und deren Modifizierung die Rezeptorlokalisierung beeinflusst, wurde auch die zweite intrazelluläre Schleife für die Insertion des Tetracysteinmotivs ausgewählt. Das Tetracysteinmotiv wurde an zwei unterschiedlichen Positionen in ICL2 eingefügt, aber beide Rezeptorkonstrukte zeigten eine intrazelluläre Anreicherung.

Die Modifikation eines GPCR durch Einfügen von zusätzlichen Aminosäuren bzw. Proteindomänen kann verschiedene Aspekte beeinflussen, wie den intrazellulären Transport nach der Proteinbiosynthese und damit verbunden die Lokalisation. Beispielsweise ist der endogene DOR überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, assoziiert mit den Membranen der LDCV. Wird der DOR mit GFP N- oder C-terminal markiert und in PC12 Zellen exprimiert, befindet sich der Rezeptor an der Zellmembran. Somit beeinflusst die Modifikation des Rezeptors dessen intrazelluläre Lokalisation, möglicherweise ändert GFP die Konformation des Rezeptors oder es blockiert die Zugänglichkeit des Sortiersignals [127]. Zusätzlich können Insertionen die Proteinfaltung negativ beeinflussen, missgefaltete Proteine werden bei der „Qualitätskontrolle“ im endoplasmatischen Retikulum aussortiert und dem proteasomalen Abbau zugeführt. Durch die Modifikation eines Rezeptors können ebenfalls Prozesse wie Ligandenbindung, Signalweiterleitung und Desensibilisierung nachhaltig beeinflusst werden. Wenn verschiedene Positionen am Protein modifiziert werden, können diese getrennt voneinander oder in Kombination für die Änderung von bestimmten Rezeptoreigenschaften verantwortlich sein.

Der Vorteil von fluoreszierenden Proteinen wie CFP und YFP ist, dass sie direkt bei der Proteinbiosynthese in das Zielprotein eingebaut werden. Dagegen werden Fluorophore wie FAsH durch einen zusätzlichen Arbeitsschritt nachträglich an das Protein gebunden. Für die Markierung mit FAsH müssen die Cysteine in ihrer reduzierten Form vorliegen, dies stellt eine der Einschränkungen dieser Methode dar. Außerdem limitiert die Hintergrundfärbung durch FAsH die Empfindlichkeit und Nachweisgrenze, was eine weitere Einschränkung dieser Methode ist [87]. Nachteilig ist bei Fluoreszenzproteinen die Größe, die mit ca. 27 kDa im Vergleich zu FAsH mit 700 Da recht groß ist und somit die Zielstruktur strukturell beeinflussen oder Probleme bei der Zugänglichkeit bestimmter Regionen schaffen kann. Der Fluorophor FAsH ist zwar sehr klein und das zugehörige Tetracysteinmotiv lässt sich bei ebenso geringer Größe einfach in die Zielproteine einbauen, ungünstig ist aber die rigide haarnadelähnliche Struktur des FAsH-Bindemotivs. Hierdurch kann die Tertiärstruktur von

Proteindomänen nachhaltig beeinträchtigt und deren funktionelle Eigenschaften gestört werden. Im Vergleich zu YFP bleicht FLAsH schneller, was sich besonders bei langen FRET-Experimenten nachteilig auswirkt. Ein Vorteil von GPCR-Biosensoren mit FLAsH in der dritten intrazellulären Schleife besteht darin, dass deren Fähigkeit zur G-Protein-Kopplung erhalten bleibt, während dies bei Rezeptoren mit YFP beeinträchtigt sein kann [99]. Außerdem zeigten die FRET-Sensoren des A_{2A} -Rezeptors und α_{2A} -adrenergem Rezeptor mit FLAsH/CFP höhere Änderungen des FRET-Signals als die entsprechenden Sensoren mit YFP/CFP [99].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit zeigte sich der Versuch einen funktionellen MOR Biosensor zu konstruieren als nicht realisierbar. Das Rezeptorprotein reagierte empfindlich auf sämtliche Modifikationen innerhalb der intrazellulären Schleifen. Nach einigen Klonierungen konnte die Position des FLAsH-Bindemotivs soweit optimiert werden, dass der Rezeptor partiell an der Zellmembran exprimiert wurde. Bei der Durchführung von FRET-Experimenten konnte bei diesen Konstrukten jedoch keine Änderung des FRET-Signals detektiert werden. Während bei den Konstrukten mit dem Tetracysteinmotiv eine ausreichende Membranlokalisation erreicht werden konnte, zeigten sich alle YFP-enthaltenden Konstrukte, unabhängig von der Position in der dritten intrazellulären Schleife, ausschließlich intrazellulär.

4.2 Pharmakologische Untersuchung von Morphin und seinen Metaboliten

Die detaillierte Untersuchung der pharmakologischen Eigenschaften von Morphin und seinen Metaboliten war das zweite Anliegen der vorliegenden Arbeit. Da die Konstruktion eines MOR FRET-Sensors nicht zum gewünschten Erfolg führte, wurde die Affinität der Metabolite durch Radioligandenbindungen an Zellmembranen untersucht. Weiterhin wurden die durch MOR aktivierten Hauptsignalwege, zu denen die G_i -Aktivierung und die Rekrutierung von β -Arrestin2 gehören, mittels FRET-basierter Methoden an lebenden Zellen analysiert.

FRET-Messungen ermöglichen im Gegensatz zu biochemischen Methoden eine räumliche und zeitliche Auflösung der untersuchten Prozesse [105]. Außerdem erfolgen die Messungen an lebenden Zellen und somit in der physiologischen Umgebung der Proteine. Bei klassischen *in vivo* Experimenten nehmen weitere Aspekte der Metabolite wie chemische Struktur und Wasserlöslichkeit Einfluss, weil diese Eigenschaften die Pharmakokinetik und die Bioverfügbarkeit beeinflussen. Beispielsweise passieren Morphin-Glucuronide die Blut-Hirn-Schranke in Ratten viel langsamer als Morphin selbst [128]. Im FRET-Experiment werden diese Effekte nicht berücksichtigt, da die Substanzen direkt an ihrem Wirkungsort eingesetzt werden. *In vivo* vermittelt Morphin-6-Glucuronid seine Wirkung wesentlich langsamer als Morphin [129].

Die Methode der FRET-basierten G_{i1} -Aktivierung wurde in einer früheren Studie validiert, indem Konzentrations-Wirkungskurven mittels Bindungen von [35 S]-GTP γ S und FRET-Experimenten für den Vollagonisten DAMGO und den Partialagonisten Morphin erstellt wurden. Der Vergleich der EC_{50} -Werte erbrachte übereinstimmende Ergebnisse für DAMGO (beide Methoden $1 \pm 0,2$ nM) und Morphin (Bindung: $7,0 \pm 0,2$ nM; FRET: $6,4 \pm 0,8$ nM) [130]. Der bei der vorliegenden Studie ermittelte EC_{50} -Wert liegt für DAMGO mit 46 ± 4 nM etwas höher als der Referenzwert. Der für Morphin ermittelte EC_{50} -Wert ist mit 15 ± 2 nM vergleichbar mit dem Literaturwert für Morphin. Auch der K_i -Wert aus dem Verdrängungsexperiment mit [3 H]-Naloxon ist mit 22 ± 4 nM gut vereinbar mit dem Literaturwert von 4 ± 1 nM [130].

Humane Zellen synthetisieren endogenes Morphin über entsprechende Vorstufen, dabei entstehen Morphinkonzentrationen im nanomolaren Bereich [131-133]. Bei der Gabe von exogenem Morphin oder anderen Opioidanalgetika erreichen die Konzentrationen im Blutplasma den mikromolaren Bereich [129, 134]. Der überwiegende Anteil (60 - 70%) von exogenem Morphin wird nach der Applikation mit Glucuronsäure konjugiert, dabei entstehen

Morphin-3-Glucuronid (55%) und Morphin-6-Glucuronid (10%). Nach oraler oder parenteraler Gabe misst man vergleichbare Konzentrationen an Morphin und Morphin-6-Glucuronid und 10-fach höhere Konzentrationen an Morphin-3-Glucuronid [134]. Die Morphin-Glucuronide sind ausgiebig erforscht und beide Glucuronide agieren als Partialagonisten am MOR [135]. Das Morphin-6-Glucuronid wird als aktiver Metabolit eingestuft, da es sowohl im Tiermodell als auch im humanen Organismus analgetisch wirkt [136, 137]. Weitere Studien belegen, dass Morphin im Vergleich zu Morphin-6-Glucuronid eine geringfügig höhere Affinität zum MOR hat [138, 139]. Hingegen ist Morphin-3-Glucuronid ein wesentlich schwächerer Metabolit. In einer klinischen Studie wurden bei der direkten intravenösen Applikation keine analgetische Wirkung bzw. Nebenwirkungen festgestellt und es gab keinen Einfluss auf die analgetische Wirkung von Morphin oder Morphin-6-Glucuronid [72, 140]. Die hier vorliegenden Daten bestätigen die Unterschiede zwischen den Glucuroniden, Morphin-3-Glucuronid zeigte eine wesentlich schwächere G_{i1} -Aktivierung und eine geringere Rekrutierung von β -Arrestin2 als Morphin-6-Glucuronid. Weiterhin zeigte Morphin-3-Glucuronid bei der Rezeptorbindung einen K_i -Wert von $6,1 \pm 0,4 \mu\text{M}$ und damit eine 100-fach geringere Potenz als Morphin-6-Glucuronid mit einem K_i von $0,063 \pm 0,014 \mu\text{M}$. Für Morphin-6-Glucuronid beträgt der K_i -Wert aus der Literatur $14,2 \pm 2,6 \text{ nM}$. Dieser Wert wurde an Membranen von CHO Zellen bestimmt, welche stabil mit MOR transfiziert waren [141]. Im Vergleich zu diesem Wert liegt der hier bestimmte K_i -Wert um ca. Faktor drei höher.

Über die anderen Metabolite und deren pharmakologische Eigenschaften ist weit weniger bekannt. Ein weiterer wichtiger Metabolit ist Normorphin, es wird neben den Glucuroniden mengenmäßig am meisten gebildet und entsteht durch die N-Demethylierung von Morphin. Bei Studien an Ratten wurde Normorphin als geringfügig schwächerer Ligand als Morphin oder Morphin-6-Glucuronid beschrieben [142]. Bei einer Studie in den 60er Jahren wurde an Patienten mit postoperativen Schmerzen berichtet, dass Normorphin ein Viertel der analgetischen Wirkung von Morphin zeigte [143]. Diese Ergebnisse werden durch meine FRET-basierten Experimente bestärkt, denn Normorphin aktivierte G_{i1} -Proteine bei geringfügig höheren Konzentrationen als Morphin. Bei der Rekrutierung von β -Arrestin2 zeigte Normorphin eine höhere Effizienz und Potenz als Morphin selbst, d.h. es rekrutierte bei gleicher Konzentration mehr β -Arrestin2. In den Bindungsstudien ist die Affinität von Normorphin zum MOR vergleichbar mit der Affinität von Morphin-6-Glucuronid, was um Faktor drei niedriger ist als der entsprechende Wert von Morphin. Aufgrund der hier vorliegenden Daten dürfte Normorphin eindeutig als aktiver Metabolit von Morphin

bezeichnet werden, was der Angabe eines Übersichtsartikels widerspricht [144]. Pharmakokinetische Faktoren haben bei den FRET-Experimenten im Gegensatz zu *in vivo* Studien keinen Einfluss, dies begründet den Vorteil der FRET-Methode und mögliche widersprüchliche Ergebnisse im Vergleich zu *in vivo* Experimenten. Insbesondere bei Patienten mit beeinträchtigter Nierenfunktion könnte Normorphin eine Rolle spielen, da im Vergleich zu Patienten mit normaler Nierenfunktion erhöhte Konzentrationen an Normorphin im Plasma bestimmt wurden [145].

Durch weitere Konjugationsreaktionen entstehen Morphin-3-Sulfat und Morphin-6-Sulfat. Morphin-3-Sulfat ist ein schwacher Metabolit mit einer wesentlich geringeren Affinität und analgetischer Potenz als Morphin-6-Sulfat [146, 147]. Auch die der vorliegenden Studie ermittelten Daten bestätigen, dass Morphin-3-Sulfat der Gruppe der schwachen Metabolite zugeteilt werden kann. Bei der G_i -Aktivierung und β -Arrestin-Rekrutierung wurden für Morphin-3-Sulfat EC_{50} -Werte im mikromolaren Bereich bestimmt. Bei der Untersuchung im Mausmodell wurde Morphin-6-Sulfat als analgetische Substanz mit der 30-fachen Potenz von Morphin identifiziert [70]. Anstelle von Morphinhydrochlorid wird auch Morphin-6-Sulfat in Form von Tabletten, Tropfen oder Injektionslösung als schmerzstillendes Medikament verabreicht. Morphin-6-Sulfat zeigte in der vorliegenden Studie ähnliche Ergebnisse bei der Rezeptorbindung und für die G_{i1} -Aktivierung wie Morphin und sollte damit vergleichbare analgetische Potenz aufweisen. Der Unterschied zwischen dem Zellmodell und der *in vivo* Situation liegt jedoch in den pharmakokinetischen Faktoren, die höchstwahrscheinlich eine höhere *in vivo* Potenz von Morphin-6-Sulfat erklären können. In den hier vorliegenden Bindungsexperimenten wurde für Morphin-6-Sulfat ein K_i -Wert von $0,047 \pm 0,004 \mu\text{M}$ bestimmt, was ungefähr dem 50-fachen Literaturwert von $0,8 \pm 0,01 \text{ nM}$ entspricht [70]. Diese Bindungsstudien wurden an Membranen von HEK293T Zellen durchgeführt, welche zuvor mit der cDNA des humanen MOR transfiziert wurden. Dagegen wurde der Literaturwert an Membranen bestimmt, die aus Rinderhirn präpariert wurden. Folglich sind die Versuchsbedingungen nicht identisch und die ermittelten K_i -Werte nicht exakt vergleichbar.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse ist auffällig, dass alle C6-substituierten Substanzen stärker aktiv sind als die vergleichbaren C3-Metabolite, somit sind Morphin-6-Glucuronid und Morphin-6-Sulfat stärker aktiv als Morphin-3-Glucuronid und Morphin-3-Sulfat. Dieses Resultat stimmt mit Veröffentlichungen überein, wonach die C3-phenolische Hydroxygruppe von Morphin essentiell für die Interaktion mit Opioidrezeptoren ist [147, 148]. Dementsprechend führt die Substitution der phenolischen Hydroxygruppe zur reduzierten

Bindung an Opioidrezeptoren, im Vergleich zu Morphin hat Morphin-3-Glucuronid eine 1000-fach geringere Potenz [135].

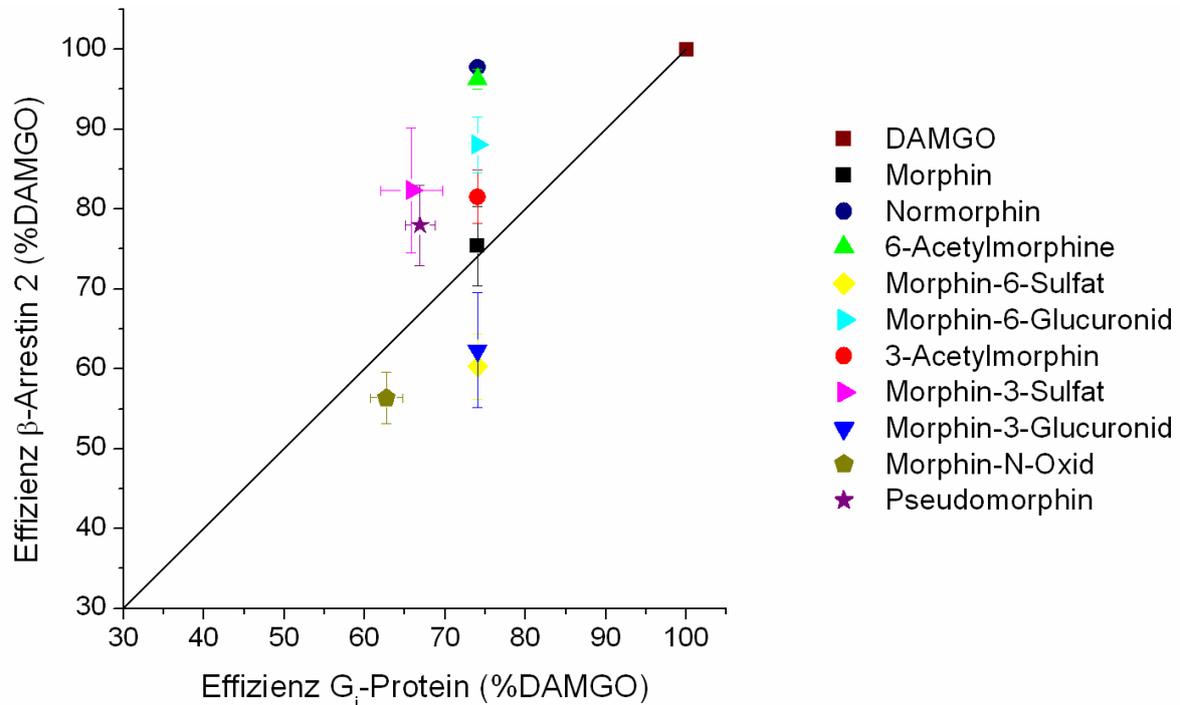


Abb. 26: Das Diagramm korreliert die Effizienz jedes Metaboliten bei der G_i-Protein-Aktivierung und der Rekrutierung von β-Arrestin2. Zur Ermittlung der Werte wurde die maximale Aktivierung aus der jeweiligen Konzentrations-Wirkungskurve auf den maximalen Effekt von 10 μM DAMGO normalisiert. Einige Liganden zeigen vergleichbare Effekte auf beide Signalwege, dazu gehören beispielsweise DAMGO, Morphin und Morphin-N-Oxid. Andere Metabolite beeinflussen die Rekrutierung von β-Arrestin2 stärker, wie z.B. Normorphin, 6-Acetylmorphin und Morphin-6-Glucuronid.

Die einzige Ausnahme bilden 3- und 6-Acetylmorphin, beide Substanzen haben eine vergleichbare Potenz und Effizienz für die G_i-Aktivierung ($0,057 \pm 0,010 \mu\text{M}$ vs. $0,100 \pm 0,021 \mu\text{M}$) und β-Arrestin2-Rekrutierung ($0,594 \pm 0,019 \mu\text{M}$ vs. $0,339 \pm 0,023 \mu\text{M}$). Auch die Rezeptorbindung am MOR ist mit $0,098 \pm 0,029 \mu\text{M}$ vs. $0,054 \pm 0,022 \mu\text{M}$ in der gleichen Größenordnung. Bei einer Studie an Mäusen wurden 3- und 6-Acetylmorphin nach intracerebroventrikulärer Applikation pharmakologische Eigenschaften zugesprochen, die denen von Morphin entsprechen [146]. Weiterhin wurde 6-Acetylmorphin als aktiver Metabolit eingestuft, da er die von MOR aktivierte Signalkaskade auslöst [75]. Bei der

Metabolisierung von Morphin entsteht nur wenig 6-Acetylmorphin. Aber aus 3,6-Diacetylmorphin (Heroin) wird im humanen Organismus enzymatisch Morphin und daraus 6-Acetylmorphin hergestellt. Da diese Umwandlung sehr schnell vonstatten geht, ist Heroin selbst nicht nachweisbar [149]. Daher ist 6-Acetylmorphin ein wichtiger Indikator für Heroinmissbrauch und wird als solcher in Plasma, Urin und Haaren nachgewiesen. Auch die analgetische Wirkung von Heroin wird über seine Metabolite 6-Acetylmorphin und Morphin vermittelt [150].

Morphin-N-Oxid wurde bei einer Studie in Ratten und Mäusen mit Morphin verglichen. Bei subkutaner und intraperitonealer Gabe wurde Morphin-N-Oxid als 10- bis 90-fach schwächer als Morphin bezeichnet [151]. In meinen FRET-Experimenten zeigte sich die Potenz um Faktor 36 (β -Arrestin2-Rekrutierung) bzw. 150 (G_{i1} -Aktivierung) niedriger als Morphin. Auch die Affinität von Morphin-N-Oxid am MOR ist um den Faktor 150 niedriger als die von Morphin. Wiederum sind die Unterschiede zwischen meinen Ergebnissen und den *in vivo* Daten auf die Pharmakokinetik zurückzuführen. Trotzdem kann Morphin-N-Oxid eindeutig als schwacher MOR-Agonist eingestuft werden.

Aufgrund der vorliegenden Daten ist Pseudomorphin der schwächste MOR-Agonist von allen untersuchten Metaboliten. Bei der G_{i1} -Aktivierung wurde der EC_{50} -Wert mit $9,5 \pm 0,6 \mu\text{M}$ und bei der β -Arrestin2-Rekrutierung mit $53,6 \pm 4,3 \mu\text{M}$ bestimmt. Auch bei der Affinität wurde ein K_i -Wert im mikromolaren Bereich ($3,5 \pm 1,8 \mu\text{M}$) ermittelt. Zur analgetischen Wirkung von Pseudomorphin gibt es nur wenige Daten. Bei einer Studie an Ratten wurde festgestellt, dass Pseudomorphin die Blut-Hirnschranke nicht überwindet und demnach keine größeren Mengen der Substanz im ZNS vorliegen [152]. Die Autoren folgerten, dass Pseudomorphin nicht zu den agonistischen Eigenschaften von Morphin beiträgt.

Bei der GPCR vermittelten Signaltransduktion weisen verschiedene Schritte unterschiedliche Kinetiken auf [106]. So liegt die Aktivierung von Rezeptoren im Millisekundenbereich, die G-Protein Aktivierung und die Arrestin-Rekrutierung im Sekundenbereich. Dagegen findet die Internalisierung von Rezeptoren im Zeitraum von Minuten statt, da dieser Prozess die Rezeptorphosphorylierung und anschließende β -Arrestin-Bindung voraussetzt. Diese Zeitverläufe sind auch bei den vorliegenden FRET-Messungen sichtbar, die G_i -Aktivierung und -Deaktivierung findet im Bereich von Sekunden statt, während die Rekrutierung von β -Arrestin2 wesentlich langsamer verläuft und mehrere Minuten andauert.

Meine Experimente identifizierten zwei Gruppen von Metaboliten, eine Gruppe mit stark und eine mit schwach agonistischen Eigenschaften am MOR. Um den Einfluss der Metabolite auf die Signalweiterleitung in einer Grafik zusammenzustellen, wurden die Effizienzen für die

G_{11} -Aktivierung und die β -Arrestin2-Rekrutierung für alle Metabolite in einem Diagramm korreliert. Für die in Abb. 26 dargestellte Korrelation wurden alle Daten auf 10 μ M DAMGO normalisiert. Interessanterweise waren Normorphin, 6-Acetylmorphin und Morphin-6-Glucuronid bei der G_{11} -Aktivierung weniger effizient als Morphin, sie zeigten aber eine höhere Effizienz bei der Rekrutierung von β -Arrestin. Diese Beobachtung ist interessant in Bezug auf Liganden-spezifische Rezeptorkonformationen und Agonisten-selektive Signalwege. Demnach würden Normorphin, 6-Acetylmorphin und Morphin-6-Glucuronid den β -Arrestin2-Signalweg bevorzugen, was bisher für Fentanyl und Etorphin nachgewiesen wurde [57]. Andere Metabolite wie Morphin, 3-Acetylmorphin, Morphin-N-Oxid und Pseudomorphin waren gleichermaßen effizient bei G_{11} -Protein Aktivierung und β -Arrestin2-Rekrutierung.

Die Beobachtung, dass Liganden selektiv nur bestimmte Signalwege eines Rezeptors aktivieren, wurde bereits für verschiedene GPCR beschrieben. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wird dieses Phänomen in der Literatur als *biased agonism* bezeichnet. Für den β_1 -adrenergen Rezeptor wurden Isoproterenol, Bucindolol und Propranolol als Agonisten für die Aktivierung von ERK identifiziert. Aber bei der Aktivierung der Adenylylcyclase agieren diese Liganden als Vollagonist (Isoproterenol), Partialagonist (Bucindolol) bzw. inverser Agonist (Propranolol) [153]. Dabei aktivieren Bucindolol und Propranolol die ERK-Signalkaskade G_i -Protein abhängig, während Isoproterenol ERK sowohl G_i -Protein-abhängig als auch -unabhängig aktiviert. Ähnliche Erkenntnisse liegen auch für den β_2 -adrenergen Rezeptor vor, bei dem Isoproterenol, Labetalol, Bucindolol und Carvedilol Agonisten für die ERK-Aktivierung sind. Dagegen wirken nur Isoproterenol und Labetalol agonistisch bei der Aktivierung der Adenylatcyclase [154]. Diese Daten deuten auf diskrete Konformationsänderungen von Rezeptoren hin, durch die bestimmte Signalproteine rekrutiert und somit verschiedenartige Signalmuster ausgelöst werden [153]. Die Bedeutung von Liganden-selektiven Rezeptorkonformationen ergibt sich aus der physiologischen Funktion eines Signalweges. Mit einem selektiven Liganden könnte z.B. spezifisch die G-Protein Aktivierung ausgeschaltet werden, während eine Interaktion mit β -Arrestin und evtl. die Desensibilisierung und Internalisierung ausgelöst werden. Je nachdem, wie ausgeprägt der Effekt ist, kann ausschließlich ein einziger Signalweg von einem Agonisten aktiviert werden, dann spricht man von *perfect bias*. Werden hingegen mehrere Signalwege aktiviert, wobei einer bevorzugt aktiviert wird, handelt es sich um *imperfect bias*.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Studie kann prognostiziert werden, welche Metabolite pharmakologische Effekte *in vivo* aufweisen. In der physiologischen Umgebung erreichen die

Diskussion

Metabolite keine mikromolaren Konzentrationen, somit nehmen schwache Metabolite keinen Einfluss auf den MOR. Starke Metabolite wie Normorphin, 3-Acetylmorphin und 6-Acetylmorphin sind wesentlich relevanter für die Rezeptor-Aktivierung, da sie schon bei nanomolaren Konzentrationen wirksam sind. Insbesondere verstärken Normorphin, Morphin-6-Glucuronid und 6-Acetylmorphin die über MOR vermittelte Rekrutierung von β -Arrestin2. Es wäre spannend darüber zu spekulieren, ob diese Eigenschaft von Normorphin oder 6-Acetylmorphin eine Rolle für mögliche neue therapeutische Ansätze bei der Morphinabhängigkeit haben könnte. Dazu sollte untersucht werden, ob eine höhere β -Arrestin2-Aktivierung in einer Verstärkung der Rezeptorinternalisierung resultiert. Auf der Grundlage dieser Daten kann überlegt werden, ob einige Morphinmetabolite zur Therapie bzw. Modulation der Opiattoleranzentwicklung eingesetzt werden könnten.

5. Zusammenfassung/ Summary

5.1 Zusammenfassung

Der Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer ist ein Phänomen, welches erstmals 1948 von Theodor Förster beschrieben wurde. Mit der Entwicklung von Fluoreszenzproteinen konnten in Kombination mit Mikroskopietechniken Einblicke in zellbiologische Vorgänge gewonnen werden, die durch biochemische oder physiologische Experimente nicht möglich sind. Dabei spielt die hohe zeitliche und räumliche Auflösung eine wichtige Rolle. Auf dem Forschungsgebiet der GPCR, welche die größte Gruppe von Membranproteinen bei den Säugetieren darstellen, wurden insbesondere Erkenntnisse über Konformationsänderungen der Rezeptoren, die Kinetik der Rezeptoraktivierung und die Interaktion mit intrazellulären Signalproteinen gewonnen.

Der μ -Opioidrezeptor gehört zur Familie der GPCR und stellt aufgrund seiner analgetischen Wirkungen eine wichtige pharmakologische Zielstruktur dar. Das Ziel dieser Arbeit war sowohl den Rezeptor als auch seine Signalwege mittels FRET-Mikroskopie zu untersuchen. Zunächst sollte ein intramolekularer FRET-Sensor des μ -Opioidrezeptors entwickelt werden, dazu wurden basierend auf den Kenntnissen über die Tertiärstruktur und dem Aufbau bereits bekannter GPCR-Sensoren verschiedene Rezeptorkonstrukte kloniert. Bei den Konstrukten wurden entweder zwei Fluoreszenzproteine oder ein Fluoreszenzprotein und ein Fluorophorbindendes Tetracysteinmotiv kombiniert. Auch die Positionen der eingefügten Sequenzen wurden in den intrazellulären Domänen variiert, da der Rezeptor auf die Modifikationen mit beeinträchtigter Membranlokalisation reagierte. Durch die Optimierung wurden Rezeptoren konstruiert, die an der Zellmembran lokalisiert waren. Jedoch zeigte keines der Rezeptorkonstrukte Funktionalität im Hinblick auf die Rezeptoraktivierung.

Im zweiten Teil wurden die pharmakologischen Effekte der Metabolite von Morphin am humanen μ -Opioidrezeptor systematisch analysiert. Dazu wurde die Fähigkeit der Metabolite, G_i -Proteine zu aktivieren und β -Arrestin2 zu rekrutieren, mittels FRET-basierter Messungen an lebenden Zellen untersucht. Außerdem wurde die Affinität der Metabolite zum humanen μ -Opioidrezeptor anhand der Verdrängung eines radioaktiven Liganden analysiert. Meine Experimente identifizierten eine Gruppe mit stark agonistischen und eine mit schwach agonistischen Eigenschaften. Die starken Partialagonisten aktivieren den Rezeptor bereits bei nanomolaren Konzentrationen, während die schwachen Metabolite den Rezeptor erst bei Konzentrationen im mikromolaren Bereich aktivieren. Die Metabolite Normorphin, Morphin-6-Glucuronid und 6-Acetylmorphin zeigen geringere Potenz als Morphin bei der G_i -

Zusammenfassung

Aktivierung aber überraschenderweise höhere Potenz und Effizienz für die β -Arrestin-Rekrutierung. Dies deutet auf eine bevorzugte Aktivierung von β -Arrestin2 hin. Die aus diesen Studien gewonnenen Ergebnisse liefern Hinweise darauf, welche Metabolite bei der Signalverarbeitung am μ -Opioidrezeptor *in vivo* beteiligt sind.

5.2 Summary

Fluorescence resonance energy transfer was first described by Theodor Förster in 1948. The discovery and development of intrinsic fluorescent proteins revolutionized cell and molecular biology. The FRET-technique allows the analysis of protein-protein interactions and intramolecular conformational changes. In this method, its high temporal and spatial resolution plays a crucial role. Especially in the research field of GPCR, which are the largest family of membrane proteins in mammals, insights into receptor conformational changes, kinetics of receptor activation and the interaction with intracellular proteins were obtained.

The μ -opioid receptor belongs to the GPCR family and is involved in analgesia. Therefore, the receptor is an important pharmacological target. Its pharmacological properties were extensively analyzed in the current thesis by FRET. Engineering of an intramolecular MOR-biosensor was initially planned. Based on the knowledge about the tertiary receptor structure and earlier GPCR-sensors, different receptor constructs were cloned. For each receptor construct either two fluorescent proteins or one fluorescent protein and one fluorophore binding tetracysteine motif were combined. The insertion of the additional amino acid sequences prevented the membrane localization for some constructs. Hence, the insertion site of the amino acid sequences was varied in the intracellular loops. Ultimately, the optimization resulted in some membrane localized receptor constructs with the tetracysteine motif in the third intracellular loop. Nevertheless, none of the receptor constructs was functional in terms of measurable conformational change upon receptor activation.

In the second part of this thesis, the pharmacological effects of morphine and its metabolites were studied. The analgesic effects of morphine are mainly mediated via the activation of the μ -opioid receptor. This receptor activates inhibitory G-proteins and induces the recruitment of β -arrestin2. Therefore I analyzed activation of these two pathways induced by morphine metabolites using FRET-microscopy in living cells. Furthermore, radioligand binding studies were used to determine the affinity of each compound to the human μ -opioid receptor. This approach identified two groups of metabolites, which were classified into strong and weak ligands. Strong partial agonists showed efficacies in the nanomolar range. In contrast, weak metabolites activated μ -opioid receptor pathways in the micromolar range. Normorphine, morphine-6-glucuronide and 6-acetylmorphine had lower potencies regarding G_i -protein activation but higher potencies and efficacies for β -arrestin2 recruitment than morphine. These findings indicate that these metabolites are biased towards β -arrestin2 pathways.

6. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
CaMK	Ca^{2+} / <i>calmodulin-dependent protein kinase</i>
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CFP	cyan fluoreszierendes Protein (engl. <i>cyan fluorescent protein</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
DAMGO	(D-Ala ² , N-Me-Phe ⁴ , glycinol ⁵)-Enkephalin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DOR	δ -Opioidrezeptor
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC ₅₀	effektive Konzentration
ECL	extrazelluläre Schleife (engl. <i>extracellular loop</i>)
EDT	1,2-Ethandithiol
Epac	<i>Exchange protein directly activated by cAMP</i>
ERK	<i>Extracellular signal related kinase</i>
FCS	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FlAsH	Biarsenischer Fluorophor (engl. <i>fluorescein arsenical hairpin binder</i>)
FRET	Fluoreszenz (Förster)-Resonanz-Energie-Transfer
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
GPCR	G-Protein-gekoppelte(r) Rezeptor(en)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
HEK	Humane embryonale Nierenzellen (engl. <i>human Embryonic Kidney</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HF	N-terminale Aminosäuresequenz bestehend aus Hämagglutinin-Signalpeptid und Flag- <i>tag</i>

Abkürzungsverzeichnis

hMOR	humaner μ -Opioidrezeptor
ICL	intrazelluläre Schleife (engl. <i>intracellular loop</i>)
kDa	Kilodalton
KOR	κ -Opioidrezeptor
LB-Medium	<i>Lysogeny broth</i> -Medium
LDCV	<i>Large dense core vesicles</i>
M/V	Masse pro Volumen
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MOR	μ -Opioidrezeptor
NE	Norepinephrin
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
R ₀	Förster-Radius
ReAsH	roter biarsenischer Fluorophor (engl. <i>red arsenical hairpin binder</i>)
RFP	rot fluoreszierendes Protein (engl. <i>red fluorescent protein</i>)
rMOR	μ -Opioidrezeptor aus der Ratte
RT	Raumtemperatur
TMD	Transmembrandomäne(n)
Tur	Turquoise
V/V	Volumen pro Volumen
YFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>yellow fluorescent protein</i>)
ZNS	Zentrales Nervensystem
α_{2A} -AR	α_{2A} -adrenerger Rezeptor

7. Referenzen

1. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Mol Pharmacol, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
2. Rask-Andersen, M., M.S. Almen, and H.B. Schiøth, *Trends in the exploitation of novel drug targets*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(8): p. 579-90.
3. Palczewski, K., et al., *Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor*. Science, 2000. **289**(5480): p. 739-45.
4. Rasmussen, S.G., et al., *Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2007. **450**(7168): p. 383-7.
5. Cherezov, V., et al., *High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor*. Science, 2007. **318**(5854): p. 1258-65.
6. Warne, T., et al., *Structure of a beta1-adrenergic G-protein-coupled receptor*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 486-91.
7. Jaakola, V.P., et al., *The 2.6 angstrom crystal structure of a human A2A adenosine receptor bound to an antagonist*. Science, 2008. **322**(5905): p. 1211-7.
8. Wu, B., et al., *Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1066-71.
9. Chien, E.Y., et al., *Structure of the human dopamine D3 receptor in complex with a D2/D3 selective antagonist*. Science, 2010. **330**(6007): p. 1091-5.
10. Haga, K., et al., *Structure of the human M2 muscarinic acetylcholine receptor bound to an antagonist*. Nature, 2012.
11. Gether, U., *Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors*. Endocr Rev, 2000. **21**(1): p. 90-113.
12. Shi, L., et al., *Beta2 adrenergic receptor activation. Modulation of the proline kink in transmembrane 6 by a rotamer toggle switch*. J Biol Chem, 2002. **277**(43): p. 40989-96.
13. Vogel, R., et al., *Functional role of the "ionic lock"--an interhelical hydrogen-bond network in family A heptahelical receptors*. J Mol Biol, 2008. **380**(4): p. 648-55.
14. Yao, X., et al., *Coupling ligand structure to specific conformational switches in the beta2-adrenoceptor*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(8): p. 417-22.
15. Scheerer, P., et al., *Crystal structure of opsin in its G-protein-interacting conformation*. Nature, 2008. **455**(7212): p. 497-502.
16. Park, J.H., et al., *Crystal structure of the ligand-free G-protein-coupled receptor opsin*. Nature, 2008. **454**(7201): p. 183-7.
17. Hofmann, K.P., et al., *A G protein-coupled receptor at work: the rhodopsin model*. Trends Biochem Sci, 2009. **34**(11): p. 540-52.
18. Weis, W.I. and B.K. Kobilka, *Structural insights into G-protein-coupled receptor activation*. Curr Opin Struct Biol, 2008. **18**(6): p. 734-40.
19. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
20. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. J Biol Chem, 1998. **273**(2): p. 669-72.
21. Hein, P. and M. Bunemann, *Coupling mode of receptors and G proteins*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2009. **379**(5): p. 435-43.
22. Wong, S.K., *G protein selectivity is regulated by multiple intracellular regions of GPCRs*. Neurosignals, 2003. **12**(1): p. 1-12.
23. Birnbaumer, L., *Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits*. Cell, 1992. **71**(7): p. 1069-72.

24. Luttrell, L.M. and R.J. Lefkowitz, *The role of beta-arrestins in the termination and transduction of G-protein-coupled receptor signals*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 3): p. 455-65.
25. Azzi, M., et al., *Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(20): p. 11406-11.
26. Gesty-Palmer, D., et al., *Distinct beta-arrestin- and G protein-dependent pathways for parathyroid hormone receptor-stimulated ERK1/2 activation*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10856-64.
27. Ren, X.R., et al., *Different G protein-coupled receptor kinases govern G protein and beta-arrestin-mediated signaling of V2 vasopressin receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(5): p. 1448-53.
28. DeWire, S.M., et al., *Beta-arrestins and cell signaling*. Annu Rev Physiol, 2007. **69**: p. 483-510.
29. Kenakin, T., *Agonist-specific receptor conformations*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(11): p. 416-7.
30. Laugwitz, K.L., et al., *The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(1): p. 116-20.
31. Brady, A.E. and L.E. Limbird, *G protein-coupled receptor interacting proteins: emerging roles in localization and signal transduction*. Cell Signal, 2002. **14**(4): p. 297-309.
32. Schwartz, T.W., et al., *Molecular mechanism of 7TM receptor activation--a global toggle switch model*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2006. **46**: p. 481-519.
33. Chidiac, P., et al., *Inverse agonist activity of beta-adrenergic antagonists*. Mol Pharmacol, 1994. **45**(3): p. 490-9.
34. Marie, N., B. Aguila, and S. Allouche, *Tracking the opioid receptors on the way of desensitization*. Cell Signal, 2006. **18**(11): p. 1815-33.
35. Chen, Y., et al., *Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain*. Mol Pharmacol, 1993. **44**(1): p. 8-12.
36. Evans, C.J., et al., *Cloning of a delta opioid receptor by functional expression*. Science, 1992. **258**(5090): p. 1952-5.
37. Yasuda, K., et al., *Cloning and functional comparison of kappa and delta opioid receptors from mouse brain*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(14): p. 6736-40.
38. Kieffer, B.L., et al., *The delta-opioid receptor: isolation of a cDNA by expression cloning and pharmacological characterization*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(3): p. 1193.
39. Koch, T., et al., *Carboxyl-terminal splicing of the rat mu opioid receptor modulates agonist-mediated internalization and receptor resensitization*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13652-7.
40. Gaveriaux-Ruff, C., et al., *Detection of opioid receptor mRNA by RT-PCR reveals alternative splicing for the delta- and kappa-opioid receptors*. Brain Res Mol Brain Res, 1997. **48**(2): p. 298-304.
41. Pan, Y.X., et al., *Identification and characterization of three new alternatively spliced mu-opioid receptor isoforms*. Mol Pharmacol, 1999. **56**(2): p. 396-403.
42. Kane, B.E., B. Svensson, and D.M. Ferguson, *Molecular recognition of opioid receptor ligands*. AAPS J, 2006. **8**(1): p. E126-37.
43. Kieffer, B.L., *Opioids: first lessons from knockout mice*. Trends Pharmacol Sci, 1999. **20**(1): p. 19-26.
44. Bie, B. and Z.Z. Pan, *Trafficking of central opioid receptors and descending pain inhibition*. Mol Pain, 2007. **3**: p. 37.

45. Wang, Y., E.J. Van Bockstaele, and L.Y. Liu-Chen, *In vivo trafficking of endogenous opioid receptors*. Life Sci, 2008. **83**(21-22): p. 693-9.
46. Keith, D.E., et al., *mu-Opioid receptor internalization: opiate drugs have differential effects on a conserved endocytic mechanism in vitro and in the mammalian brain*. Mol Pharmacol, 1998. **53**(3): p. 377-84.
47. Van Bockstaele, E.J. and K.G. Commons, *Internalization of mu-opioid receptors produced by etorphine in the rat locus coeruleus*. Neuroscience, 2001. **108**(3): p. 467-77.
48. Cahill, C.M., et al., *Immunohistochemical distribution of delta opioid receptors in the rat central nervous system: evidence for somatodendritic labeling and antigen-specific cellular compartmentalization*. J Comp Neurol, 2001. **440**(1): p. 65-84.
49. Zhang, X., et al., *Localization and regulation of the delta-opioid receptor in dorsal root ganglia and spinal cord of the rat and monkey: evidence for association with the membrane of large dense-core vesicles*. Neuroscience, 1998. **82**(4): p. 1225-42.
50. Alvira-Botero, M.X. and M. Garzon, *Cellular and subcellular distributions of delta opioid receptor activation sites in the ventral oral pontine tegmentum of the cat*. Brain Res, 2006. **1123**(1): p. 101-11.
51. Harris, J.A., P.C. Chang, and C.T. Drake, *Kappa opioid receptors in rat spinal cord: sex-linked distribution differences*. Neuroscience, 2004. **124**(4): p. 879-90.
52. Standifer, K.M. and G.W. Pasternak, *G proteins and opioid receptor-mediated signalling*. Cell Signal, 1997. **9**(3-4): p. 237-48.
53. Li, L.Y. and K.J. Chang, *The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in Chinese hamster ovary cells transfected to express mu-opioid receptors*. Mol Pharmacol, 1996. **50**(3): p. 599-602.
54. Belcheva, M.M., et al., *Mu and kappa opioid receptors activate ERK/MAPK via different protein kinase C isoforms and secondary messengers in astrocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(30): p. 27662-9.
55. Ignatova, E.G., et al., *Requirement of receptor internalization for opioid stimulation of mitogen-activated protein kinase: biochemical and immunofluorescence confocal microscopic evidence*. J Neurosci, 1999. **19**(1): p. 56-63.
56. Rozenfeld, R. and L.A. Devi, *Receptor heterodimerization leads to a switch in signaling: beta-arrestin2-mediated ERK activation by mu-delta opioid receptor heterodimers*. FASEB J, 2007. **21**(10): p. 2455-65.
57. Zheng, H., H.H. Loh, and P.Y. Law, *Beta-arrestin-dependent mu-opioid receptor-activated extracellular signal-regulated kinases (ERKs) Translocate to Nucleus in Contrast to G protein-dependent ERK activation*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(1): p. 178-90.
58. Alfaras-Melainis, K., et al., *Modulation of opioid receptor function by protein-protein interactions*. Front Biosci, 2009. **14**: p. 3594-607.
59. Arden, J.R., et al., *Phosphorylation and agonist-specific intracellular trafficking of an epitope-tagged mu-opioid receptor expressed in HEK 293 cells*. J Neurochem, 1995. **65**(4): p. 1636-45.
60. Keith, D.E., et al., *Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization*. J Biol Chem, 1996. **271**(32): p. 19021-4.
61. Trafton, J.A., et al., *Postsynaptic signaling via the [mu]-opioid receptor: responses of dorsal horn neurons to exogenous opioids and noxious stimulation*. J Neurosci, 2000. **20**(23): p. 8578-84.
62. 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, 1998. **95**(12): p. 7157-62.

63. Whistler, J.L. and M. von Zastrow, *Morphine-activated opioid receptors elude desensitization by beta-arrestin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(17): p. 9914-9.
64. Haberstock-Debic, H., et al., *Morphine promotes rapid, arrestin-dependent endocytosis of mu-opioid receptors in striatal neurons*. J Neurosci, 2005. **25**(34): p. 7847-57.
65. Aktories, K., et al., *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 9. Auflage. 2005: Elsevier.
66. Prokopek, M. and A. Ziegler, [*The role of morphine-6-glucuronide during longterm administration of morphine.*]. Schmerz, 1992. **6**(1): p. 8-12.
67. Woolf, C.J., *Mu and delta opioid receptors diverge*. Cell, 2009. **137**(6): p. 987-8.
68. Jurna, I., *Sertürner und Morphin - eine historische Vignette*. Schmerz, 2003. **17**(4): p. 280-3.
69. Andersen, G., L. Christrup, and P. Sjogren, *Relationships among morphine metabolism, pain and side effects during long-term treatment: an update*. J Pain Symptom Manage, 2003. **25**(1): p. 74-91.
70. Zuckerman, A., et al., *Pharmacological characterization of morphine-6-sulfate and codeine-6-sulfate*. Brain Res, 1999. **842**(1): p. 1-5.
71. Lotsch, J., et al., *Pharmacokinetics of morphine and its glucuronides after intravenous infusion of morphine and morphine-6-glucuronide in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 1996. **60**(3): p. 316-25.
72. Penson, R.T., et al., *Randomized placebo-controlled trial of the activity of the morphine glucuronides*. Clin Pharmacol Ther, 2000. **68**(6): p. 667-76.
73. Yoshimura, H., et al., *Biochemical basis for analgesic activity of morphine-6-glucuronide. I. Penetration of morphine-6-glucuronide in the brain of rats*. Biochem Pharmacol, 1973. **22**(12): p. 1423-30.
74. Collier, J.K., L.L. Christrup, and A.A. Somogyi, *Role of active metabolites in the use of opioids*. Eur J Clin Pharmacol, 2009. **65**(2): p. 121-39.
75. Selley, D.E., et al., *mu Opioid receptor-mediated G-protein activation by heroin metabolites: evidence for greater efficacy of 6-monoacetylmorphine compared with morphine*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(4): p. 447-55.
76. Miller, J.W. and H.H. Anderson, *The effect of N-demethylation on certain pharmacologic actions of morphine, codeine, and meperidine in the mouse*. J Pharmacol Exp Ther, 1954. **112**(2): p. 191-6.
77. Vermeire, A. and J.P. Remon, *Stability and compatibility of morphine*. Int J Pharm, 1999. **187**(1): p. 17-51.
78. Roerig, D.L., C.J. Reak, and R.I. Wang, *Enzymatic conversion of morphine to pseudomorphine*. Biochem Pharmacol, 1976. **25**(9): p. 1075-80.
79. Grobe, N., et al., *Urinary excretion of morphine and biosynthetic precursors in mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(18): p. 8147-52.
80. Lottspeich, F. and H. Zorbas, *Bioanalytik*. Vol. 1. Auflage. 1998: Spektrum, Akad. Verlag.
81. Förster, T., *Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz*. Ann Physik, 1948: p. 55-75.
82. Pfleger, K.D. and K.A. Eidne, *New technologies: bioluminescence resonance energy transfer (BRET) for the detection of real time interactions involving G-protein coupled receptors*. Pituitary, 2003. **6**(3): p. 141-51.
83. Piston, D.W. and G.J. Kremers, *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*. Trends Biochem Sci, 2007. **32**(9): p. 407-14.
84. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, *Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, Aequorea*. J Cell Comp Physiol, 1962. **59**: p. 223-39.

85. Chalfie, M., et al., *Green fluorescent protein as a marker for gene expression*. Science, 1994. **263**(5148): p. 802-5.
86. Ormo, M., et al., *Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein*. Science, 1996. **273**(5280): p. 1392-5.
87. Zhang, J., et al., *Creating new fluorescent probes for cell biology*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(12): p. 906-18.
88. Tsien, R.Y., *The green fluorescent protein*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 509-44.
89. Shaner, N.C., et al., *Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(12): p. 1567-72.
90. Frommer, W.B., M.W. Davidson, and R.E. Campbell, *Genetically encoded biosensors based on engineered fluorescent proteins*. Chem Soc Rev, 2009. **38**(10): p. 2833-41.
91. Griffin, B.A., et al., *Fluorescent labeling of recombinant proteins in living cells with FLAsH*. Methods Enzymol, 2000. **327**: p. 565-78.
92. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281**(5374): p. 269-72.
93. Adams, S.R., et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications*. J Am Chem Soc, 2002. **124**(21): p. 6063-76.
94. Gaietta, G., et al., *Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking*. Science, 2002. **296**(5567): p. 503-7.
95. Pomorski, A. and A. Krezel, *Exploration of biarsenical chemistry--challenges in protein research*. Chembiochem, 2011. **12**(8): p. 1152-67.
96. Stroffekova, K., C. Proenza, and K.G. Beam, *The protein-labeling reagent FLASH-EDT2 binds not only to CCXXCC motifs but also non-specifically to endogenous cysteine-rich proteins*. Pflugers Arch, 2001. **442**(6): p. 859-66.
97. Navaroli, D.M. and H.E. Melikian, *Insertion of tetracysteine motifs into dopamine transporter extracellular domains*. PLoS One, 2010. **5**(2): p. e9113.
98. Martin, B.R., et al., *Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(10): p. 1308-14.
99. Hoffmann, C., et al., *A FLAsH-based FRET approach to determine G protein-coupled receptor activation in living cells*. Nat Methods, 2005. **2**(3): p. 171-6.
100. Stryer, L., *Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler*. Annu Rev Biochem, 1978. **47**: p. 819-46.
101. Nikolaev, V.O., et al., *Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37215-8.
102. Nikolaev, V.O. and M.J. Lohse, *Novel techniques for real-time monitoring of cGMP in living cells*. Handb Exp Pharmacol, 2009(191): p. 229-43.
103. Miyawaki, A., et al., *Dynamic and quantitative Ca²⁺ measurements using improved cameleons*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2135-40.
104. Elangovan, M., R.N. Day, and A. Periasamy, *Nanosecond fluorescence resonance energy transfer-fluorescence lifetime imaging microscopy to localize the protein interactions in a single living cell*. J Microsc, 2002. **205**(Pt 1): p. 3-14.
105. Lohse, M.J., et al., *Monitoring receptor signaling by intramolecular FRET*. Curr Opin Pharmacol, 2007. **7**(5): p. 547-53.
106. Lohse, M.J., et al., *Optical techniques to analyze real-time activation and signaling of G-protein-coupled receptors*. Trends Pharmacol Sci, 2008. **29**(3): p. 159-65.
107. Vilardaga, J.P., et al., *Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(7): p. 807-12.

108. Rochais, F., et al., *Real-time optical recording of beta1-adrenergic receptor activation reveals supersensitivity of the Arg389 variant to carvedilol*. J Clin Invest, 2007. **117**(1): p. 229-35.
109. Reiner, S., et al., *Differential signaling of the endogenous agonists at the beta2-adrenergic receptor*. J Biol Chem, 2010. **285**(46): p. 36188-98.
110. Maier-Peuschel, M., et al., *A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 8793-800.
111. Bunemann, M., M. Frank, and M.J. Lohse, *Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(26): p. 16077-82.
112. Krasel, C., et al., *Beta-arrestin binding to the beta2-adrenergic receptor requires both receptor phosphorylation and receptor activation*. J Biol Chem, 2005. **280**(10): p. 9528-35.
113. Saiki, R.K., et al., *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. Science, 1988. **239**(4839): p. 487-91.
114. Guan, X.M., T.S. Kobilka, and B.K. Kobilka, *Enhancement of membrane insertion and function in a type IIIb membrane protein following introduction of a cleavable signal peptide*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 21995-8.
115. George, S.R., et al., *Oligomerization of mu- and delta-opioid receptors. Generation of novel functional properties*. J Biol Chem, 2000. **275**(34): p. 26128-35.
116. Decaillot, F.M., et al., *Cell surface targeting of mu-delta opioid receptor heterodimers by RTP4*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(41): p. 16045-50.
117. Befort, K., et al., *A single nucleotide polymorphic mutation in the human mu-opioid receptor severely impairs receptor signaling*. J Biol Chem, 2001. **276**(5): p. 3130-7.
118. Spivak, C.E., et al., *Naloxone activation of mu-opioid receptors mutated at a histidine residue lining the opioid binding cavity*. Mol Pharmacol, 1997. **52**(6): p. 983-92.
119. Ziegler, N., et al., *FRET-based sensors for the human M1-, M3-, and M5-acetylcholine receptors*. Bioorg Med Chem, 2011. **19**(3): p. 1048-54.
120. Chen, C., et al., *Palmitoylation of the rat mu opioid receptor*. FEBS Lett, 1998. **441**(1): p. 148-52.
121. Deng, H.B., et al., *Role for the C-terminus in agonist-induced mu opioid receptor phosphorylation and desensitization*. Biochemistry, 2000. **39**(18): p. 5492-9.
122. Wang, H.L., *A cluster of Ser/Thr residues at the C-terminus of mu-opioid receptor is required for G protein-coupled receptor kinase 2-mediated desensitization*. Neuropharmacology, 2000. **39**(3): p. 353-63.
123. Pak, Y., B.F. O'Dowd, and S.R. George, *Agonist-induced desensitization of the mu opioid receptor is determined by threonine 394 preceded by acidic amino acids in the COOH-terminal tail*. J Biol Chem, 1997. **272**(40): p. 24961-5.
124. Georgoussi, Z., et al., *Selective interactions of mu-opioid receptors with pertussis toxin-sensitive G proteins: involvement of the third intracellular loop and the c-terminal tail in coupling*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1359**(3): p. 263-74.
125. Koch, T., et al., *Allelic variation S268P of the human mu-opioid receptor affects both desensitization and G protein coupling*. Mol Pharmacol, 2000. **58**(2): p. 328-34.
126. Koch, T., et al., *Site mutation in the rat mu-opioid receptor demonstrates the involvement of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II in agonist-mediated desensitization*. J Neurochem, 1997. **69**(4): p. 1767-70.
127. Wang, H.B., et al., *Distinct subcellular distribution of delta-opioid receptor fused with various tags in PC12 cells*. Neurochem Res, 2008. **33**(10): p. 2028-34.

128. Bickel, U., et al., *Poor permeability of morphine 3-glucuronide and morphine 6-glucuronide through the blood-brain barrier in the rat*. J Pharmacol Exp Ther, 1996. **278**(1): p. 107-13.
129. Handal, M., et al., *Pharmacokinetic differences of morphine and morphine-glucuronides are reflected in locomotor activity*. Pharmacol Biochem Behav, 2002. **73**(4): p. 883-92.
130. Nikolaev, V.O., et al., *Live cell monitoring of mu-opioid receptor-mediated G-protein activation reveals strong biological activity of close morphine biosynthetic precursors*. J Biol Chem, 2007. **282**(37): p. 27126-32.
131. Poeaknapo, C., et al., *Endogenous formation of morphine in human cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(39): p. 14091-6.
132. Boettcher, C., et al., *How human neuroblastoma cells make morphine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(24): p. 8495-500.
133. Zhu, W., et al., *Human white blood cells synthesize morphine: CYP2D6 modulation*. J Immunol, 2005. **175**(11): p. 7357-62.
134. Sawe, J., et al., *Oral morphine in cancer patients: in vivo kinetics and in vitro hepatic glucuronidation*. Br J Clin Pharmacol, 1985. **19**(4): p. 495-501.
135. Ulens, C., et al., *Morphine-6beta-glucuronide and morphine-3-glucuronide, opioid receptor agonists with different potencies*. Biochem Pharmacol, 2001. **62**(9): p. 1273-82.
136. Paul, D., et al., *Pharmacological characterization of morphine-6 beta-glucuronide, a very potent morphine metabolite*. J Pharmacol Exp Ther, 1989. **251**(2): p. 477-83.
137. Hanna, M.H., et al., *Analgesic efficacy and CSF pharmacokinetics of intrathecal morphine-6-glucuronide: comparison with morphine*. Br J Anaesth, 1990. **64**(5): p. 547-50.
138. Christensen, C.B. and L.N. Jorgensen, *Morphine-6-glucuronide has high affinity for the opioid receptor*. Pharmacol Toxicol, 1987. **60**(1): p. 75-6.
139. Frances, B., et al., *Morphine-6-glucuronide is more mu-selective and potent in analgesic tests than morphine*. Prog Clin Biol Res, 1990. **328**: p. 477-80.
140. Penson, R.T., et al., *Limited phase I study of morphine-3-glucuronide*. J Pharm Sci, 2001. **90**(11): p. 1810-6.
141. Brown, G.P., et al., *3H-morphine-6beta-glucuronide binding in brain membranes and an MOR-1-transfected cell line*. J Pharmacol Exp Ther, 1997. **282**(3): p. 1291-7.
142. Sullivan, A.F., et al., *The spinal antinociceptive actions of morphine metabolites morphine-6-glucuronide and normorphine in the rat*. Brain Res, 1989. **482**(2): p. 219-24.
143. Lasagna, L. and T.J. De Kornfeld, *Analgesic potency of normorphine in patients with postoperative pain*. J Pharmacol Exp Ther, 1958. **124**(3): p. 260-3.
144. Smith, H.S., *Opioid metabolism*. Mayo Clin Proc, 2009. **84**(7): p. 613-24.
145. Glare, P.A., T.D. Walsh, and C.E. Pippenger, *Normorphine, a neurotoxic metabolite?* Lancet, 1990. **335**(8691): p. 725-6.
146. Brown, C.E., et al., *Analgesic potencies of morphine 3- and 6-sulfates after intracerebroventricular administration in mice: relationship to structural characteristics defined by mass spectrometry and nuclear magnetic resonance*. J Pharm Sci, 1985. **74**(8): p. 821-4.
147. Chen, Z.R., et al., *Mu receptor binding of some commonly used opioids and their metabolites*. Life Sci, 1991. **48**(22): p. 2165-71.
148. Oguri, K., et al., *Enhanced binding of morphine and nalorphine to opioid delta receptor by glucuronate and sulfate conjugations at the 6-position*. Life Sci, 1987. **41**(12): p. 1457-64.

Referenzen

149. Halbsguth, U., et al., *Oral diacetylmorphine (heroin) yields greater morphine bioavailability than oral morphine: bioavailability related to dosage and prior opioid exposure*. Br J Clin Pharmacol, 2008. **66**(6): p. 781-91.
150. Hutchinson, M.R. and A.A. Somogyi, *Diacetylmorphine degradation to 6-monoacetylmorphine and morphine in cell culture: implications for in vitro studies*. Eur J Pharmacol, 2002. **453**(1): p. 27-32.
151. Fennessy, M.R., *The analgesic action of morphine-n-oxide*. Br J Pharmacol, 1968. **34**(2): p. 337-44.
152. Misra, A.L. and S.J. Mule, *Disposition and metabolism of (3 H)pseudomorphine in the rat*. Biochem Pharmacol, 1972. **21**(1): p. 103-7.
153. Galandrin, S., et al., *Conformational rearrangements and signaling cascades involved in ligand-biased mitogen-activated protein kinase signaling through the beta1-adrenergic receptor*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(1): p. 162-72.
154. Galandrin, S. and M. Bouvier, *Distinct signaling profiles of beta1 and beta2 adrenergic receptor ligands toward adenylyl cyclase and mitogen-activated protein kinase reveals the pluridimensionality of efficacy*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(5): p. 1575-84.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse der μ -Opiatrezeptoraktivierung und Signaltransduktion in lebenden Zellen mittels FRET-Mikroskopie“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Analysis of μ -opioid receptor activation and signal transduction in living cells using FRET microscopy“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants or others. 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, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Dr. V.O. Nikolaev für die engagierte Betreuung meiner Dissertation. Vielen Dank für den thematischen Beitrag zu dieser Arbeit, die hilfreiche und sehr freundliche Unterstützung, das stets offene Ohr und die Möglichkeit, meine eigenen Ideen umzusetzen.

Bei Herrn Prof. M.J. Lohse bedanke ich mich für die Möglichkeit am Institut für Pharmakologie zu promovieren. Außerdem möchte ich mich für die Gelegenheit zum Forschungsaufenthalt an der Mount Sinai School of Medicine in New York bedanken.

Als Mitglied meines Promotionskomitees möchte ich mich bei Herrn Prof. T. Müller für seine Unterstützung bedanken.

Großer Dank gebührt meiner Kollegin Dr. Ulrike Zabel, die mich aktiv bei der Klonierung einiger Opioidrezeptoren (im Laborjargon auch als HuMOR oder MO(o)R-Leichen bekannt) unterstützt hat. Außerdem danke ich ihr für die nette Atmosphäre in unserem Büro und die anregenden Diskussionen! Bei Christian Dees bedanke ich mich für die Durchführung diverser Bindungsversuche. Danke Anni und Julia für die hilfreichen Kommentare bezüglich meiner Dissertation!

Ich bedanke mich herzlich bei den Doktoranden und allen Kollegen für die Einarbeitung, die nette Zusammenarbeit und die Lösung von Problemen. Danke für die Freundschaften und die schönen (auch außer-universitären) Aktivitäten.

Besonderer Dank geht an meine Familie und meine Freunde, die mir ein wichtige Stütze sind. Ich möchte mich besonders bei meiner Mutter bedanken, die mich bei allen meinen Entwicklungsstufen stets voll unterstützt hat. Danke Mutti!

Publikationen

Frölich, N., Dees, C., Paetz, C., Ren, X., Lohse M.J., Nikolaev, V.O., Zenk, M.H. *Distinct pharmacological properties of morphine metabolites at Gi-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor.* **Biochem Pharmacol**, 2011. 81 (10):p. 1248-54

Maier-Peuschel, M., Frölich, N., Dees, C., Hommers, L.G., Hoffmann, C., Nikolaev, V.O., Lohse, M.J. *A fluorescence resonance energy transfer-based M2 muscarinic receptor sensor reveals rapid kinetics of allosteric modulation.* **J Biol Chem**, 2010. 285(12): p. 8793-800

Konferenzbeiträge

N. Frölich, V.O. Nikolaev, M.J. Lohse (2009) *FRET-based studies of opioid receptor pharmacology and dimerization in living cells.*
GPCR Dimer Symposium, Würzburg

N. Frölich, C. Dees, C. Paetz, X. Ren, M.J. Lohse, V.O. Nikolaev, M.H. Zenk (2011) *Distinct pharmacological properties of various morphine metabolites at Gi-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor.*
77. DPTG-Jahrestagung, Frankfurt a. Main

N. Frölich, C. Dees, C. Paetz, X. Ren, M.J. Lohse, V.O. Nikolaev, M.H. Zenk (2011) *Distinct pharmacological properties of various morphine metabolites at Gi-protein and beta-arrestin signaling pathways activated by the human mu-opioid receptor.*
6th International Symposium, Würzburg