

## Zusammenfassung

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

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

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

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

## Summary

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

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

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