

Master Daifei Wu

Thema der Arbeit:

**The membrane glycoprotein M6a influences
□-opioid receptor trafficking and desensitization**

**(Das Glykoprotein M6a beeinflusst Endozytose und
Rezyklisierung, sowie die Desensibilisierung
des μ -Opioidrezeptors)**

Summary

Opiates such as morphine are still the best analgesic choice in the treatment of chronic and serious pain. The clinical utility of opiates is limited by adaptive changes in the nervous system occurring after prolonged or repeated drug administration. These adaptations are believed to contribute to physiological tolerance and dependence to opiates. All of these adaptive changes are initiated by the binding of opiate drugs to opioid receptors that are also activated by endogenous opioid neuropeptides. The μ -opioid receptor (MOR1) is of primary importance for mediating analgesic and addictive effects of clinically important opiate drugs. Understanding the mechanisms of MOR1 regulation is a key step to develop drugs and/or therapy, which result in effective analgesia without the detrimental adaptive responses.

There is increasing evidence that receptor-associated proteins modulate the signal transduction of MOR1. Several proteins which interact with MOR1 including the membrane glycoprotein M6a (M6a) were previously identified by our group using a yeast two-hybrid assay. To confirm the protein-protein interactions in mammalian cells, the proteins were tagged with bioluminescent/fluorescent epitopes and their interactions were assayed by a bioluminescence resonance energy transfer (BRET) technique. Of all proteins investigated, M6a showed the strongest interaction with MOR1. This interaction was also confirmed by co-immunoprecipitation experiments. Furthermore, the transmembrane domains of MOR1 and M6a that are important for the interaction were characterized. In addition, we demonstrated the interaction of M6a with a number of GPCRs, suggesting that M6a might play a general role in the regulation of GPCRs.

M6a is a member of the proteolipid protein (PLP)/DM20 family of unclear function. Double in situ hybridization showed a widespread co-expression between MOR1 and M6a in many regions of rat brain. In addition, in transfected HEK293 cells, MOR1 co-internalizes with M6a, and then co-recycles to cell surface by recycling endosomes. This is associated with an augmented internalization and recycling of the μ -opioid receptor. In HEK293 cells, a physiological role of endogenous M6a in MOR1 internalization was revealed since over-expression of M6a dominant negative mutants prevents agonist-mediated endocytosis of MOR1. In addition, by enhancing receptor recycling M6a decreases receptor degradation in lysosomes, consistent with the observed decrease in down-regulation of MOR1. M6a also binds to and co-internalizes with the δ -opioid receptor (DOR1). The interaction between DOR1 and M6a directs receptor post-endocytotic sorting into recycling pathway, which further provides support for a role of M6a in receptor recycling.

M6a-augmented MOR1 trafficking results in decreased receptor desensitization. Importantly, while the functional property of M6a on the trafficking and signal regulation of the μ -opioid receptor has been established in HEK293 cells, our studies in primary cultured neurons suggest a similar function also in native neurons.

Taken together, M6a might function as an adaptor protein in receptor trafficking, and be involved in reducing the development of opiate tolerance. Therefore, our work revealed a new function of the PLP/DM20 glycoprotein family other than its structural role in myelination.

Zusammenfassung

Opiate wie Morphin sind nach wie vor das Mittel der Wahl bei der Behandlung von starken und chronischen Schmerzen. Der klinische Einsatz der Opiate wird jedoch durch adaptative Veränderungen des Nervensystems eingeschränkt, die nach langer oder wiederholter Opiatgabe auftreten können und zur physiologischen Toleranz und Abhängigkeit gegenüber Opiaten beitragen. Diese adaptiven Veränderungen werden durch die Bindung von endogenen wie auch exogenen Opiaten an den Opiatrezeptor ausgelöst. Der μ -Opioidrezeptor (MOR1) ist von besonderer Bedeutung für die Vermittlung der analgetischen und adaptiven Effekte von klinisch relevanten Opiaten. Die Aufklärung der Mechanismen, welche an der Regulation der μ -Opioidrezeptoraktivität beteiligt sind, ist möglicherweise der Schlüsselschritt zur Entwicklung neuer Drogen oder veränderter analgetischer Therapien.

In der letzten Zeit mehren sich die Hinweise, dass die Signaltransduktion des μ -Opioidrezeptors durch verschiedene rezeptor-assoziierte Proteine moduliert werden kann. In Vorarbeiten wurden mit Hilfe der Yeast-Two-Hybrid Technik bereits verschiedene μ -opioidrezeptor-interagierende Proteine von unserer Arbeitsgruppe identifiziert, zu denen auch das membranständige Glykoprotein M6a (M6a) gehört. Um die Interaktion dieser Proteine mit dem MOR1 in Säugerzellen zu bestätigen, wurden die zu untersuchenden Proteine mit Biolumineszens/Fluoreszens-Epitopen markiert und mittels Biolumineszens-Resonanz-Energie-Transfer Technik (BRET) untersucht. Von allen untersuchten Proteinen zeigte das M6a die stärkste Interaktion mit dem μ -Opioidrezeptor. Diese Interaktion konnte auch mit Hilfe der Koimmunopräzipitations-Technik immunocytochemisch nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Transmembrandomänen des MOR1 und des M6a für die Protein-Protein-Interaktion wichtig sind. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das M6a mit einer Reihe weiterer G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs) interagieren kann, was auf eine möglicherweise wichtige Funktion des M6a bei der Regulation dieser Rezeptoren hindeutet.

Das M6a-Protein, dessen Funktion bei Beginn dieser Studie noch unklar war, gehört zur Familie der Proteolipid-Protein (PLP)/DM20 Familie. Doppel-*in situ* Hybridisierungen zeigten eine Koexpression von MOR1 und M6a in vielen Hirnregionen, was eine Interaktion dieser Proteine auch unter *in vivo* Bedingungen möglich macht. Im Weiteren konnte gezeigt werden, dass MOR1 und M6a in transfizierten HEK293 Zellen kointernalisieren und mittels Recycling-Endosomen gemeinsam zur Zellmembran zurücktransportiert werden. Zusätzlich führt die Interaktion mit dem M6a Protein zu einer Verstärkung der Internalisierung und

Rezyklisierung des μ -Opioidrezeptors. In HEK293 Zellen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass das endogen exprimierte M6a Protein eine wichtige physiologische Funktion bei der MOR1 Internalisierung besitzt, da die Überexpression einer dominant-negativen M6a Mutante die agonisten-vermittelte Internalisierung des MOR1 verhinderte. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass das M6a die Herunterregulation des MOR1 vermindert, was auf die M6a-induzierte verstärkte Rezeptorrezyklisierung zurückgeführt werden kann. M6a bindet und kointernalisiert auch mit dem δ -Opioidrezeptor (DOR1). Die Interaktion des DOR1 mit M6a führt, ähnlich wie beim MOR1, zu einer Verstärkung der Rezeptorrezyklisierung, was ebenfalls für eine Rolle des M6a bei der Rezeptorrezyklisierung spricht.

Der verstärkte intrazelluläre Transport des MOR1 führt nachweislich zu einer verzögerten Rezeptordesensibilisierung. Die genannten funktionellen Eigenschaften des M6a Proteins auf den intrazellulären Transport und die Signaltransduktion des μ -Opioidrezeptors wurden in überexprimierenden HEK293 Zellen, aber auch in primären kultivierten Neuronen nachgewiesen.

Zusammengefasst konnten wir zeigen, dass das M6a eine wichtige Funktion als Adapterprotein bei dem intrazellulären μ -Opioidrezeptortransport übernimmt und an der Verminderung der Entwicklung einer Opiattoleranz beteiligt ist. Somit zeigt unsere Arbeit, dass die Familie der PLP/DM20 Glycoproteine neben ihrer strukturellen Rolle bei der Myelinisierung auch eine neue Funktion bei der Regulation der Aktivität von GPCRs übernehmen kann.