

Dipl.-Bioch. Rankovic Marija

Abstract of the Dissertation

Theme of the Dissertation - Modulation of μ -opioid receptor signal transduction and endocytosis by ADP-ribosylation factor proteins

Summary

Physiological effects of opioids are mediated through binding to specific G protein-coupled opioid receptors. The μ -opioid receptor (MOPr) is of particular importance for the mediation of both the analgesic and the adaptive effects of clinically relevant opioid drugs. After opioid binding, the ligand-receptor complex is endocytosed via clathrin coated vesicles. Internalized receptors are then either recycled back to the plasma membrane or degraded in the lysosome.

Previous studies have shown that endocytosis of MOPr plays a protective role in the development of tolerance to opioid drugs by facilitating receptor reactivation and recycling. It has been further demonstrated, that the opioid-mediated activation of phospholipase D2 (PLD2) is a prerequisite for MOPr endocytosis and is dependent on small GTPases of ADP-ribosylation factor (ARF) family. However, precise identity of ARF protein (ARF1 or ARF6) as well as the mechanisms involved in opioid-mediated PLD2 activation by ARF proteins are still not clear.

By coexpressing the MOPr and different ARF mutants in human embryonic kidney (HEK) 293 cells and cultured primary cortical neurons, we have identified the ARF6 protein to be involved in the regulation of MOPr endocytosis. This conclusion was based on the two facts: 1) overexpression of dominant negative ARF6 mutant blocked receptor internalization after treatment with potent endocytotic drug DAMGO and 2) receptor endocytosis was increased in the presence of an active, “fast cycling” ARF6 mutant after treatment with morphine, an agonist that is unable to induce MOPr endocytosis by itself. Moreover, siRNA-mediated knock down of endogenous ARF6 protein expression significantly decreased receptor internalization. Presented study also documents that expression of an effector domain mutant of ARF6 which is incapable of activating PLD2 (“PLD-defective” mutant) blocked agonist-induced receptor endocytosis showing that ARF6 function in MOPr trafficking is PLD2-mediated. Analogously, opioid-mediated activation of PLD2 is blocked in the presence of dominant negative ARF6 mutants. Furthermore, we have also shown that ARF6 protein influences the recycling/reactivation of internalized MOPr and thus modulates agonist-induced MOPr desensitization. And finally, we demonstrated the importance of GTP hydrolysis of activated ARF6 protein and full GDP/GTP cycle for the trafficking of internalized MOPr back to the plasma membrane since locking ARF6 in its GTP-bound, active state blocked the recycling of the receptor.

Taken together, these results provide evidence that ARF6 protein regulates MOPr trafficking and signaling via PLD2 activation and hence affects the development of opioid receptor desensitization and tolerance to opioid drugs.

Dipl.-Bioch. Rankovic Marija

Zusammenfassung der Dissertation

Thema der Dissertation - Modulation of μ -opioid receptor signal transduction and endocytosis by ADP-ribosylation factor proteins

Zusammenfassung

Die physiologischen Effekte von Opioiden werden über die Interaktion mit spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren vermittelt. Für die analgetischen und adaptiven Effekte klinisch relevanter Opioide ist der μ -Opioidrezeptor (MOPr) von besonderer Bedeutung. Nach Opioidbindung wird der Ligand-Rezeptor-Komplex in Clathrin-ummantelten Vesikeln endozytiert. Internalisierte Rezeptoren können nun entweder in reaktiviertem Zustand wieder zur Plasmamembran zurücktransportiert oder in Lysosomen degradiert werden.

Frühere Studien zeigten, dass die Endozytose des MOPr aufgrund einer erleichterten Reaktivierung/Rezyklisierung von Rezeptoren eine protektive Funktion bei der Entwicklung einer Opioidtoleranz besitzt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die opioid-vermittelte Aktivierung der Phospholipase D2 (PLD2) eine Voraussetzung für die MOPr Endozytose darstellt und dass diese Aktivierung über kleine GTPasen aus der Familie der ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF) vermittelt wird. Allerdings ist die Identität des an der Aktivierung der PLD2 beteiligten ARF Proteins (ARF1 oder ARF6) wie auch der Mechanismus der opioid-vermittelten PLD2 Aktivierung durch ARF-Proteine noch nicht geklärt.

Durch die Koexpression des MOPr mit verschiedenen ARF Mutanten in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293) und primären kortikalen Neuronen konnten wir zeigen, dass das ARF6 an der Regulation der MOPr Endozytose beteiligt ist. Diese Schlussfolgerung beruht auf zwei Fakten: 1) die Überexpression einer dominant negativen ARF6 Mutante führt zu einer vollständigen Blockade der MOPr Internalisierung nach Behandlung mit dem rezeptor-internalisierenden Agonisten DAMGO; 2) die Rezeptorendozytose nach Behandlung mit dem nicht rezeptor-internalisierenden Agonisten Morphin war in Gegenwart einer aktiven "fast cycling" ARF6 Mutante deutlich erhöht. Zusätzlich führte die Verminderung der endogenen ARF6 Expression mittels siRNA zu einer signifikanten Abnahme der Rezeptorinternalisierung. Die vorliegende Studie zeigt auch, dass die Expression einer ARF6-Mutante, die keine PLD2 Aktivierung auslösen kann ("PLD2-defekte" ARF Mutante), zu einer Blockade der agonisten-induzierten Rezeptorendozytose führt. Dies Ergebnis zeigt, dass die Funktion von ARF6 bei der Regulation des intrazellulären MOPr Transportes über die Aktivierung der PLD2 vermittelt wird. Analog dazu ist die opioid-vermittelte Aktivierung der PLD2 in Gegenwart einer dominant negativen ARF6 Mutante blockiert. Darüberhinaus konnten wir zeigen, dass das ARF6 Protein die Rezyklisierung/Reaktivierung von internalisierten MOPr beeinflusst und somit die die agonisten-

induzierte Desensibilisierung moduliert. Abschliessend konnte gezeigt werden, dass die GTP-Hydrolyse des aktivierten ARF6 und somit ein kompletter GDP/GTP Zyklus für den Rücktransport des internalisierten MOPr an die Plasmamembran notwendig ist. So führt die Expression einer GTPase defizienten ARF6 Mutante, die das ARF6 in der GTP-gebundenen aktiven Form hält, zu einem Verlust der MOPr Rezyklisierung.

Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass das ARF6 Protein den intrazellulären Transport und die Signaltransduktion des MOPr über die Aktivierung der PLD2 reguliert und dadurch die Entwicklung einer Opioidrezeptor Desensibilisierung und Opioidtoleranz beeinflusst.