

Yingjian Liang

Titel: Master of Medicin

Thema der Dissertation:

“Identifizierung und Charakterisierung von  $\mu$ -opioidrezeptor-interagierenden Proteinen.“

### **Zusammenfassung:**

Die Desensibilisierung und Endozytose von Opioidrezeptoren sind wichtige Schritte bei der Entstehung der Opioidtoleranz. Nach Agonistenbindung wird der Opioidrezeptor zunächst durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) oder “second-messenger“ Kinasen phosphoryliert. An den phosphorylierten Rezeptor binden  $\beta$ -Arrestine, die zu einer G-Protein-Entkopplung und damit zur Desensibilisierung des Rezeptors führen. Der Liganden-Rezeptor-Komplex wird in clathrin-ummantelten, endozytotischen Vesikeln internalisiert. Die internalisierten Rezeptoren können entweder in reaktiviertem Zustand wieder zur Membran zurücktransportiert, oder in Lysosomen degradiert werden.

Um neue regulatorische Proteine zu identifizieren die in die endozytotische Maschinerie des  $\mu$ -Opioidrezeptors (MOR1) eingebunden sind, sollte nach  $\mu$ -opioidrezeptor-interagierenden Proteinen gesucht werden, die den Transport und die Signaltransduktion des Rezeptors modulieren können. Hierfür wurde mittels Yeast-Two-Hybrid-Technik eine Ratten-cDNA-Bibliothek mit verschiedenen Teilen des  $\mu$ -Opioidrezeptorproteins auf mögliche Protein-Protein-Interaktionen getestet. Es konnten eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, die möglicherweise an der Regulation des Rezeptortransportes beteiligt sein könnten. Zu ihnen gehören das Hitzeschockprotein 70 (hsc70), Synaptophysin, das Glykoprotein M6a und die Phospholipase D2. Es konnte mittels Yeast-Two-Hybrid-Technik gezeigt werden, dass das Hsc70-Protein mit dem C-Terminus des MOR1 interagiert, Synaptophysin an die 3.

intrazelluläre Schleife des MOR1 bindet, M6a mit dem C-Terminus der  $\mu$ -Opioidrezeptorspleißvariante MOR1B assoziiert ist und die Phospholipase D2 (PLD2) an die C-Termini von MOR1 und MOR1B binden kann. Von den vier genannten Proteinen konnte die Interaktion dreier Proteine (PLD2, M6a und Synaptophysin) mit dem  $\mu$ -Opioidrezeptor mittels Koimmunopräzipitation und Bioluminescence Resonance Energy Transfer (BRET)-Technik in transfizierten menschlichen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen) bestätigt werden. Die bestätigten Protein-Protein Interaktionen waren nachweislich agonisten-unabhängig.

Im weiteren wurde die mögliche Funktion der interagierenden Proteine in Bezug auf den Rezeptortransport näher untersucht. Von dem Synaptophysin, dem größten membran-integrierten Glykoprotein in präsynaptischen Vesikeln von Neuronen, ist bekannt, dass es mit Dynamin interagieren kann. Die Koexpression des MOR1 mit Synaptophysin in HEK293-Zellen führte zu einer verstärkten konstitutiven Rezeptorinternalisierung. Dieses Ergebnis stimmt mit dem Modell überein, dass die Assoziation des MOR1 mit dem Synaptophysin eine wichtige Rolle beim Transport des Dynamins in präsynaptische Membranen spielen könnte. Das membranständige Glykoprotein M6a findet man in hoher Expression im zentralen Nervensystem, seine Funktion ist jedoch unklar. Nach Koexpression in HEK293 Zellen, zeigt MOR1 eine strikte Kolokalisation mit M6a in der Plasmamembran und in endosomen-ähnlichen Strukturen. Es konnte gezeigt werden, dass in Gegenwart von M6a die basale endozytotische Rate des MOR1 erhöht war. Darüberhinaus kointernalisierte das Glykoprotein M6a mit MOR1 nach Agonisteninkubation (DAMGO).

Der  $\mu$ -Opioidrezeptoragonist DAMGO, der zu einer Induktion der Rezeptorendozytose führt, aktivierte die PLD2 in PLD2/MOR1-koexprimierenden HEK293 Zellen. Im Gegensatz dazu führte Morphin, das keine Rezeptorendozytose auszulösen vermag, zu keiner PLD2-Aktivierung. Dies führte zu der Hypothese, dass die Fähigkeit des Agonisten Rezeptorendozytose auszulösen mit der Fähigkeit zur PLD2-Aktivierung gekoppelt ist. Es konnte im weiteren gezeigt werden, dass die PLD2-Aktivierung durch den MOR1 nach

Agonistengabe ARF-abhängig erfolgt. Die aus der PLD2-Aktivierung resultierende Anreicherung der Membran mit sauren Phospholipiden erleichtert die Bildung und das Abschnüren von endozytotischen Vesikeln.

Abschließend kann man sagen, dass die in dieser Arbeit identifizierten Proteine helfen sollten, die molekularen Mechanismen der Opioidtoleranz weiter aufzuklären.