

MODULATION DES TRANSIENT RECEPTOR POTENTIAL
VANILLOID 1 (TRPV1) IONENKANALS
DURCH μ -REZEPTOR-AGONISTEN

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des Doktors der
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

JEANNETTE ENDRES-BECKER

aus Bonn

Berlin, 2007

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. Monika Schäfer-Korting
Institut für Pharmazie, Pharmakologie und Toxikologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Str. 2-4
14195 Berlin

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Christian Zöllner
Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
Hindenburgdamm 30
12200 Berlin

Disputation am 18.7.2007

Die vorliegende Arbeit wurde in der Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin unter der Leitung von Prof. Dr. C. Zöllner angefertigt und wurde im Rahmen des Graduiertenkollegs 276/3 „Signalerkennung und -umsetzung“ von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt.

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	1
1 Einleitung	5
1.1 Schmerz.....	5
1.1.1 Nozizeption im peripheren Nervensystem	5
1.1.2 Entzündungsschmerz.....	7
1.2 Der G-Protein gekoppelte μ -Rezeptor	10
1.2.1 Grundlagen	10
1.2.2 Molekulare Mechanismen der μ -Rezeptor-Aktivierung	14
1.2.3 Periphere Opioidanalgesie insbesondere im Entzündungsschmerz.....	18
1.3 Der Ionenkanal transient receptor potential vanilloid 1	20
1.3.1 Struktur und Funktion von TRPV1	20
1.3.2 TRPV1 und pathophysiologische Entzündungsprozesse	25
2 Zielsetzung	27
3 Material und Methoden	29
3.1 Material	29
3.1.1 Zelllinien und Bakterien.....	29
3.1.2 Tiere.....	29
3.1.3 Chemikalien und Radiochemikalien.....	29
3.1.4 Enzyme	31
3.1.5 Antikörper und Antiseren	31
3.1.6 Reaktionssysteme	31
3.1.7 Medien, Puffer, Lösungen	32
3.1.8 Verbrauchsmaterialien.....	33
3.1.9 Geräte	33

3.2	Methoden	35
3.2.1	Tierexperimentelle Untersuchungen	35
3.2.2	Zellbiologische Techniken	38
3.2.3	Die Bestimmung des cAMP-Gehalts in Zellkulturen	41
3.2.4	cAMP-Messungen in DRG-Neuronen	42
3.2.5	Real-time-PCR	44
3.2.6	Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien	49
3.2.7	Die Patch-Clamp-Technik.....	53
3.2.8	Statistische Auswertungen	56
4	Ergebnisse	58
4.1	TRPV1-Inhibition durch μ -Rezeptor-Liganden	58
4.1.1	DRG-Neurone	58
4.1.2	μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen	74
4.1.3	Thermale Hyperalgesie nach Capsaicin-Injektion	79
4.2	Die μ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion im Opioidenzug.....	80
4.2.1	cAMP-Akkumulation	80
4.2.2	mRNA-Expression verschiedener Adenylylcyclasen-Isoformen.....	82
4.2.3	TRPV1-Sensibilisierung im Opioidenzug.....	84
5	Diskussion	88
5.1	Hypothese 1: Opioidinduzierte TRPV1-Inhibition	90
5.1.1	Expression von μ -Rezeptoren und TRPV1 in DRG-Neuronen	90
5.1.2	Hemmung der TRPV1-Aktivität	91
5.1.3	Die CFA-induzierte Entzündung.....	97
5.2	Hypothese 2: TRPV1-Sensibilisierung im Opioidenzug	103
5.2.1	cAMP-Akkumulation	104
5.2.2	Zunahme der Adenylylcyclasen-mRNA	105
5.2.3	TRPV1-Sensibilisierung.....	107

5.3	Ausblick und klinische Relevanz	109
6	Zusammenfassung/ Summary	112
7	Literatur	114
	Publikationsverzeichnis	135
	Danksagung	

ABKÜRZUNGEN

Die Arbeit wurde auf der Grundlage der neuen amtlichen Rechtschreibregeln vom 1. August 2006 verfasst. Fremdsprachliche Fachtermini sind in der Regel kursiv gedruckt.

Ø	Durchmesser
[³ H]	Tritium
μ-Rezeptor	mu-Opioid-Rezeptor
A	Ampere
AC	Adenylylcyclase (-en)
AgCl	Silberchlorid
AKAP	<i>A Kinase Anchoring Protein</i>
AMV	Avian Myeloblastosis-Virus
ANOVA	Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CB	Cannabinoid-Rezeptor
cDNA	copy Desoxyribonukleinsäure
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CGRP	<i>Calcitonin gene-related peptide</i>
CL	contralateral
CMV	Cytomegalie-Virus
COX	Cyclooxygenase
CP	<i>crossing point</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CTOP	D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH ₂
DAMGO	D-Ala ² , N-MePhe ⁴ , Gly ⁵ -ol-enkephalin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECS	extrazellulärer Puffer
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-Tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
f	femto (10^{-15})
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FEN	Fentanyl
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSK	Forskolin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK	<i>G-protein-gated inwardly rectifying</i> Kaliumkanal
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GRK	G-Protein Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
H-89	N-[2-p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HPETE	Hydroperoxy-5Z,8Z,10E,14Z-Eicosatetraensäure
IBMX	Isobutylmethylxanthin
ICS	intrazellulärer Puffer (<i>intracellular solution</i>)
K_D	Dissoziationsgleichgewichtskonstante
LB	Luria-Bertani
LC	Locus coeruleus
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
Me	Methyl
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
Mo	Morphin
mRNA	messenger RNA

n	nano (10^{-9})
n.s.	nicht signifikant
NEAS	nicht essentielle Aminosäuren
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NLX	Naloxon
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSAID	nicht-steroidale Antirheumatika (<i>non-steroidal anti-inflammatory drugs</i>)
p	pico (10^{-12})
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCA	<i>patient-controlled analgesia</i>
PCEA	<i>patient-controlled epidural analgesia</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PIP ₂	Phosphatidyl-inositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
POMC	Proopiomelanocortin
PTX	Pertussistoxin
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
RNAse	Ribonuklease
RPL19	<i>ribosomal protein L19</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
RTX	Resiniferatoxin
sec	Sekunde
TM	Transmembrandomänen
T _m	Schmelzpunkt
TMB	Tetramethylbenzidin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

TRP	Transient receptor potential
TRPV1	transient receptor potential vanilloid 1
TTX	Tetrodotoxin
V	Volt
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>