

# 1 EINLEITUNG

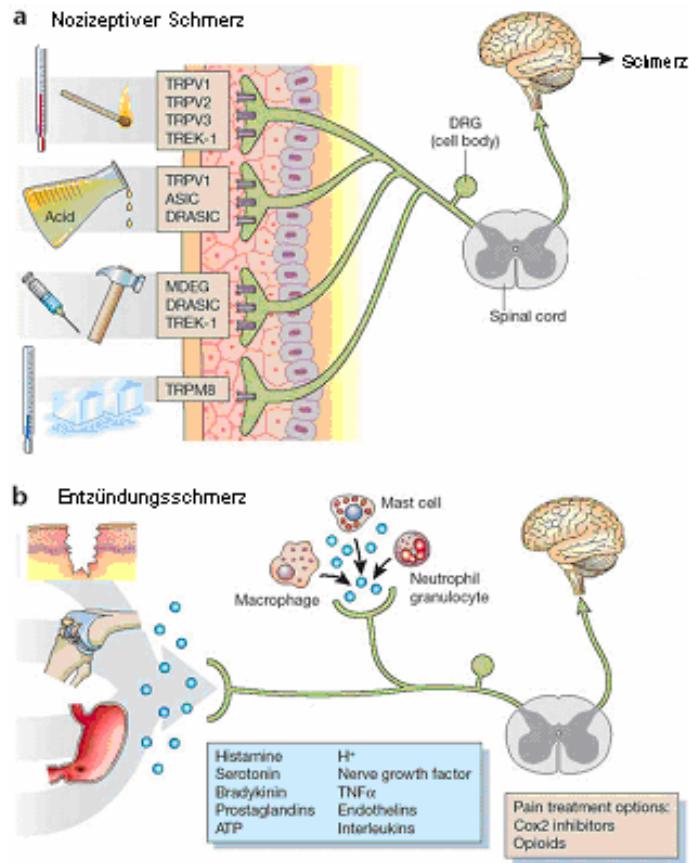
Im Rahmen dieser Arbeit werden die Auswirkungen einer  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung auf die Aktivität des Ionenkanals *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1) analysiert. Opioide, die über G-Protein gekoppelte  $\mu$ -Rezeptoren ihre analgetische Wirkung erzielen, und der Ionenkanal TRPV1 sind entscheidend an der Entstehung, der Verarbeitung und der Weiterleitung von Schmerzen im peripheren Nervensystem beteiligt. Im Folgenden wird einleitend die Physiologie des Schmerzes und insbesondere des Entzündungsschmerzes erläutert. Darauf aufbauend werden der  $\mu$ -Rezeptor, die peripher wirksamen Opioide und der TRPV1-Ionenkanal hinsichtlich ihrer molekularen Wirkungsmechanismen vorgestellt.

## 1.1 Schmerz

### 1.1.1 Nozizeption im peripheren Nervensystem

Schmerz weist den Organismus auf gewebeschädigende oder potenziell gewebeschädigende Reize hin und übernimmt dadurch eine protektive und lebenserhaltende Funktion. Neben der sensorischen Schmerzaufnahme, Schmerzweiterleitung und -verarbeitung (Nozizeption) hat der Schmerz eine emotionale und verhaltensbestimmte Komponente. Daher wird Schmerz von der Internationalen Gesellschaft zum Studium des Schmerzes (IASP) als ein „unangenehmes Sinnes- oder Gefühlserlebnis, das mit aktueller oder potenzieller Gewebeschädigung verknüpft ist oder mit den Begriffen einer solchen Schädigung beschrieben wird“ definiert (Merskey und Bogduk, 1994).

Schmerz kann durch verschiedene physikalische (thermische, mechanische, elektrische) Reize und chemische Noxen ausgelöst werden (siehe Abbildung 1.1a). Spezialisierte sensorische Nervenendigungen, so genannte Nozizeptoren, erkennen und verarbeiten die Informationen. Nozizeptoren sind zum großen Teil polymodal. Das bedeutet, dass sie in der Lage sind, auf verschiedenste Reize aus der Umwelt anzusprechen (Julius and Basbaum, 2001). Nozizeptoren exprimieren eine Vielzahl von Ionenkanälen und G-Protein



**Abbildung 1.1: Darstellung des nozizeptiven Schmerzes (a) und des Entzündungsschmerzes (b).**  
**a)** Physikalische (thermische, mechanische, elektrische) und chemische Stimuli führen zur Aktivierung von Ionenkanälen, die auf den Nozizeptoren lokalisiert sind. Der Schmerzimpuls wird in Richtung Rückenmark weitergeleitet, dort umgeschaltet und anschließend im zentralen Nervensystem verarbeitet. **b)** Gewebeerletzungen und entzündliche Erkrankungen führen zur Ausschüttung von Entzündungsmediatoren und zur Rekrutierung von Immunzellen in das betroffene Gewebe (Abbildung aus Scholz und Woolf, 2002).

gekoppelten Rezeptoren, deren Aktivierung bei ausreichend hohem Stimulus Ionenströme erzeugen sowie diverse Signaltransduktionsmechanismen anregen und daraufhin zur Generierung von Aktionspotentialen beitragen. Die Aktionspotentiale werden über primär afferente sensorische Neurone in Richtung Hinterhorn des Rückenmarks (Laminae I, II, V, X) geleitet. Dort werden die elektrischen Impulse auf ein zweites sensorisches Neuron übertragen (Transmission) und erreichen danach über aufsteigende Schmerzbahnen (spinothalamischer Trakt, spinoreticulärer Trakt, spinomesencephalischer Trakt) zuerst den Thalamus und darauf folgend den Cortex. Erst bei Ankunft des Schmerzimpulses im

zentralen Nervensystem (ZNS) im Bereich der somatosensorischen Cortex wird die Schmerzinformation vom Organismus bewusst wahrgenommen (Schmerzperzeption) und verarbeitet (Brune et al., 2001).

Nozizeptoren werden in A $\delta$ - und C-Fasern unterteilt, die elektrische Impulse unterschiedlich schnell weiterleiten (Julius und Basbaum, 2001). Die myelinisierten A $\delta$ -Fasern ( $\varnothing$  1 - 5  $\mu$ m) vermitteln das „initiale schnell einsetzende“ Schmerzempfinden mit einer Leitgeschwindigkeit von 2 – 30 m/sec. Nicht myelinisierte C-Fasern ( $\varnothing$  0,5 - 2  $\mu$ m) vermitteln den langsamer einsetzenden Sekundärschmerz mit einer Leitgeschwindigkeit von 1 m/sec.

Die Zellkörper der peripheren Nozizeptoren werden in den dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG) im Bereich der Foramina intervertebralia der Wirbelsäule, den trigeminalen Ganglien und den nodosen Ganglien exprimiert (Caterina und Julius, 2001). DRG-Neurone sind Orte der *de-novo*-Synthese von zahlreichen Membranproteinen, unter anderem den Opioidrezeptoren  $\mu$ -,  $\delta$ - und  $\kappa$ , Tetrodotoxin-resistenten Natriumkanälen, GABA-, Bradykinin- und Neurokinin-1-Rezeptoren. Neu gebildete Proteine werden von den DRG-Neuronen entlang von Mikrotubuli in afferente Nervenendigungen transportiert. Da periphere Nervenfasern aufgrund des geringen Axondurchmessers für konventionelle Untersuchungsmethoden wie der Patch-Clamp-Technik nicht genutzt werden können, stellen die Zellkörper der peripheren Nozizeptoren eine in der Schmerzforschung etablierte Alternative dar, um an der Nozizeption und Antinozizeption beteiligte Mechanismen aufzuklären (Burkey et al., 2004).

### 1.1.2 Entzündungsschmerz

Akuter nozizeptiver Schmerz warnt den Körper vor potenziell gewebeschädigenden Einflüssen. Er zeichnet sich durch eine begrenzte Dauer aus und klingt nach Beendigung des Reizes meist wieder ab (Abbildung 1.1a). Allerdings kann es nach wiederholter Sensibilisierung auch zur Ausbildung eines „Schmerzgedächtnisses“ kommen. Der Schmerz chronifiziert; er ist damit von der eigentlichen ursächlichen Noxe entkoppelt. Physiologische und biochemische Mechanismen führen dabei zu Veränderungen der Struktur und Funktion des peripheren und zentralen Nervensystems, der so genannten *neuronalen Plastizität* (Woolf und Salter, 2000).

---

Nozizeptoren können insbesondere durch Gewebeschädigungen, Reizungen und Entzündungen sensibilisiert werden. Ausgelöst durch periphere Gewebeschädigungen werden Protonen, Adenosintriphosphat (ATP), Prostaglandine, Zytokine (Tumornekrosefaktor TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 und -6, Chemokine), *nerve growth factor* (NGF) und eine Vielzahl weiterer proinflammatorischer Entzündungsmediatoren aus angrenzenden Gefäßzellen, Nervenzellen und Immunzellen freigesetzt, die die Reizschwelle der Nozizeptoren herabsetzen. Zuvor nicht-noxische Reize sind nun in der Lage, Nozizeptoren zu erregen (siehe Abbildung 1.1b). Dieser Mechanismus wird als periphere Sensibilisierung bezeichnet. Afferente Nervenendigungen sezernieren unter Einfluss von Entzündungen, Reizungen und Gewebeschädigungen die Neurotransmitter *Calcitonin gene-related peptide* (CGRP) und Substanz P, die eine Gefäßerweiterung und den Plasmaaustritt in die umliegenden Gewebe bewirken, das wiederum zur Rötung und Schwellung führt (Stein et al., 2001). Das Phänomen, dass die nozizeptiven Fasern selbst die Entzündungsreaktion verstärken, wird in diesem Zusammenhang als *neurogene Entzündung* bezeichnet. Zudem wandern Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten in das entzündete Gewebe ein, die ihrerseits wiederum Entzündungsmediatoren freisetzen und dadurch das Entzündungsgeschehen unterhalten (Abbildung 1.1b). Neben der Rötung (*rubor*) und Schwellung (*tumor*) ist eine typische Entzündung zusätzlich durch Schmerz (*dolor*), Überwärmung (*calor*) und gestörte Funktion (*functio laesa*) gekennzeichnet (Brune et al., 2001).

Typisches Zeichen des Entzündungsschmerzes ist das Auftreten der Hyperalgesie und der Allodynie. Die Hyperalgesie zeichnet sich durch ein gesteigertes Schmerzempfinden auf noxische Reize aus. Die Allodynie charakterisiert Schmerzempfindungen, die durch Reize ausgelöst werden, die unter physiologischen Bedingungen nicht schmerzhaft sind, nun aber als schmerzhaft empfunden werden. Die Allodynie ist eher typisch für den neuropathischen Schmerz, kommt jedoch auch im Rahmen von Entzündungen bei zentralen Sensibilisierungsvorgängen - meist auf spinaler Ebene - vor. Die entzündungsbedingte Hypersensitivität lässt normalerweise wieder nach, sobald der Entzündungsstimulus eliminiert ist.

Zur *in-vivo*-Untersuchung von peripheren Entzündungen haben sich in der medizinischen Grundlagenforschung einige Tiermodelle etabliert. Methoden zur Induktion einer lokalen peripheren Entzündung stellen die subkutane Applikation von *Complete Freund's Adjuvant* (CFA), Formalin und Carrageenan, einem Polysaccharid aus dem irländischen

Moos, dar (Ji et al., 1995). Im Rahmen dieser Arbeit wird das Modell der CFA-induzierten Entzündung der rechten Rattenhinterpfote verwendet, um eine lokale einseitige auf die Pfote begrenzte Entzündung auszulösen, die ein bis zwei Stunden nach subkutaner Injektion beginnt und bis zu sechs Tage anhält (Stein et al., 1988). Die Ratte entwickelt eine auf die rechte Pfote begrenzte ausgeprägte Rötung, Schwellung und Hyperalgesie. CFA enthält eine Suspension hitzeinaktivierter Mycobakterien (*Mycobacterium butyricum*), die eine subkutane Entzündung hervorruft (Machelska et al., 2003).

---

## 1.2 Der G-Protein gekoppelte $\mu$ -Rezeptor

### 1.2.1 Grundlagen

Opioide gehören zu den wirksamsten Arzneimitteln zur Bekämpfung von Schmerzen. Sie werden zur Behandlung akuter, chronischer und entzündlicher Schmerzen<sup>1</sup> eingesetzt. Opioide hemmen die Schmerzentstehung, -weiterleitung und -verarbeitung im peripheren und zentralen Nervensystem und verändern zudem die Schmerzwahrnehmung. Ihr Gebrauch ist jedoch in vielen Fällen aufgrund der Nebenwirkungen limitiert. Hohe Opioidkonzentrationen können Bradykardien und Atemdepressionen auslösen. Zudem stellen Obstipation und Nausea ein Problem dar. Bei lang andauernder Behandlung können Suchtverhalten und Abhängigkeit einsetzen.

Morphin ist der bekannteste Vertreter der Opioide. Der Name „Morphin“ leitet sich vom griechischen Gott der Träume „Morpheus“ ab. Das Alkaloid wurde von dem Apotheker Friedrich Wilhelm A. Sertürner (1783 - 1841) aus Opium, dem Milchsaft der Mohnpflanze *Papaver somniferum* (Papaveraceae) isoliert (Sertürner, 1806). Opium wurde schon

---

<sup>1</sup> Opioide kommen in der Schmerztherapie vor allen Dingen dann zum Einsatz, wenn die analgetische Wirkung anderer Schmerztherapeutika nicht ausreicht oder deren Verwendung aufgrund von Nebenwirkungen nicht möglich ist. Die zahlenmäßig am häufigsten verwendeten Schmerztherapeutika zur Behandlung von akuten entzündlichen Schmerzen gehören zu der Klasse der nicht-steroidalen anti-entzündlichen Antirheumatika (*NSAID*) wie Acetylsalicylsäure, Ibuprofen und Diclophenac mit analgetischer und antipyretischer Wirkung. Sie werden zur Behandlung leichter Schmerzen zum Beispiel im Zusammenhang mit rheumatoider Arthritis eingesetzt. Sie inhibieren die Produktion des Entzündungsmediators Prostaglandin durch Hemmung der Enzyme Cyclooxygenase COX-1 und COX-2 (Hinz und Brune, 2007). Der therapeutische Einsatz der *NSAIDs* ist allerdings durch die bei starken Schmerzen zu geringe analgetische Potenz und die Nebenwirkungen begrenzt. Vor einigen Jahren wurden spezifische COX-2 Hemmer entwickelt. Die COX-2 wird im Gegensatz zur konstitutiv aktiven COX-1 nur unter Entzündungsbedingungen exprimiert. COX-2 Hemmer (Celecoxib, Parecoxib, Etoricoxib) sollen ein günstigeres Nebenwirkungsprofil aufweisen, da sie Nebenwirkungen, die auf eine COX-1 Inhibition zurückzuführen sind, unter anderem die Schädigung der Magenschleimhaut, verhindern sollen. Das Konzept scheint allerdings nur bedingt aufzugehen; einige COX-2 Hemmer wurden bereits aufgrund einer Häufung von kardiovaskulären Nebenwirkungen (Rofecoxib) und schwerer Hautreaktionen (Valdecoxib) wieder vom Markt genommen (Bombardier et al., 2000; Hinz und Brune, 2007).

frühzeitig von den Ägyptern und anderen Völkern aufgrund seiner berauschenden und heilsamen Wirkung verwendet. Erstmals schriftlich dokumentiert wurde der Gebrauch von Opium rund 4000 Jahre v. Chr. von dem Volk der Sumerer. Der Milchsaft - das „Rohopium“ - wird durch Anritzen der Samenkapsel der Mohnpflanze gewonnen. Opium enthält neben Morphin die ebenfalls analgetisch wirksamen Alkaloide Codein, Noscapin, Papaverin und Thebain (Friderichs und Straßburger, 2002).

Morphin vermittelt seine pharmakologische Wirkung über G-Protein gekoppelte Opioidrezeptoren. 1976 wurde der  $\mu$ -Rezeptor von Martin et al. charakterisiert und dessen humane cDNA 1994 erstmals von Wang et al. kloniert (Martin et al., 1976; Wang et al., 1994). Neben dem  $\mu$ -Rezeptor konnten die Opioidrezeptoren  $\delta$  und  $\kappa$  identifiziert und kloniert werden (Evans et al., 1992; Kieffer et al., 1992; Simonin et al., 1994; Simonin et al., 1995). Die Opioidrezeptoren werden durch die Gene *mor*, *dor* und *kor* kodiert, die auf den Chromosomen 6q24-25 ( $\mu$ ), 1p34.3-p36.1 ( $\delta$ ) und 8q11-12 ( $\kappa$ ) lokalisiert sind. Die Opioidgene besitzen jeweils drei hochkonservierte Exons, die von zwei Introns durchspannt werden. Die Rezeptorproteine bestehen aus 370 - 400 Aminosäuren und weisen untereinander eine große Homologie auf (60 - 70 %).

$\mu$ -Rezeptoren werden im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert. Sie befinden sich auf allen Ebenen schmerzleitender Nervenbahnen: den peripheren sensorischen Nervenendigungen, den Spinalganglien, dem Hinterhorn des Rückenmarks, den Kerngebieten des Stammhirns, dem Hypothalamus, dem limbischen System und dem Cortex. In den Zellkörpern der DRG-Neurone werden die Rezeptoren für das periphere Nervensystem synthetisiert und von dort aus durch intraaxonale Mikrotubuli zu den zentralen und peripheren Afferenzen transportiert (Stein et al., 2003).  $\mu$ -Rezeptoren finden sich zudem in hoher Konzentration im Magen-Darm-Trakt und in der Blase. Dort vermitteln die Rezeptoren die opioidbedingte Abnahme der Darmmotilität und Miktionsstörungen.

Viele klinisch relevante Opioide, die therapeutisch zur Schmerztherapie eingesetzt werden (zum Beispiel Morphin, Fentanyl und Buprenorphin, siehe auch Tabelle 1), weisen eine Selektivität für den  $\mu$ -Rezeptor auf. Der funktionelle Beweis, dass  $\mu$ -Rezeptoren maßgeblich an der morphinvermittelten Analgesie beteiligt sind, gelang mit der Etablierung einer  $\mu$ -Rezeptor-Knockout-Maus. In  $\mu$ -Rezeptor-Knockout-Mäusen ist die morphininduzierte Analgesie aufgehoben (Kieffer, 1999; Sora et al., 1997). Auch die Nebenwirkungen wie Atemdepression, Konstipation sowie Abhängigkeits- und

Entzugssymptome nach chronischer Morphinapplikation blieben in den Knockout-Mäusen aus (Matthes et al., 1996). Obwohl Morphin in Bindungsexperimenten neben der nanomolaren Affinität am  $\mu$ -Opioidrezeptor auch mikromolare Affinität zu den Opioidrezeptoren  $\delta$  und  $\kappa$  aufweist, wird die analgetische Wirkung von Morphin hauptsächlich über den  $\mu$ -Rezeptor vermittelt (Corbett et al., 1993).

Opioide werden aufgrund ihrer Fähigkeit, Opioidrezeptoren zu aktivieren, als Agonisten, partielle Agonisten oder Antagonisten definiert. Der synthetisch hergestellte  $\mu$ -Rezeptor-Agonist Fentanyl gehört zu den am stärksten wirksamen Opioiden. Buprenorphin verhält sich partialagonistisch am  $\mu$ -Rezeptor und antagonistisch am  $\kappa$ -Rezeptor (Tabelle 1). Das synthetisch hergestellte Peptid D-Ala<sup>2</sup>-N-MePhe<sup>4</sup>-Gly<sup>5</sup>-ol-enkephalin (DAMGO) besitzt ebenfalls hohe Affinität zum  $\mu$ -Rezeptor. DAMGO bindet selektiv an  $\mu$  und wird daher bevorzugt für pharmakologische Studien eingesetzt, um  $\mu$ -vermittelte Wirkungen nachzuweisen. Unter klinischen Bedingungen kann DAMGO aufgrund seiner Peptidstruktur und dem damit einhergehenden schnellen Abbau durch Proteasen nicht

Rezeptor	Endogene Liganden	Agonisten	Antagonisten	Wirkung
$\mu$	$\beta$ -Endorphin Endomorphin 1, -2	<i>Morphin</i> DAMGO <i>Fentanyl</i> <i>Buprenorphin</i> <i>Tramadol</i> <i>Methadon</i>	<i>Naloxon</i> <i>Nalbuphin</i> Nalorphin CTOP	Analgesie Abhängigkeit Atemdepression Miosis
$\delta$	Met-Enkephalin Leu-Enkephalin $\beta$ -Endorphin	DPDPE	Naltrindol <i>Naloxon</i>	Analgesie Atemdepression
$\kappa$	Dynorphin A Dynorphin B	Ketazocin <i>Pentazocin</i> <i>Butorphanol</i> <i>Nalbuphin</i> Nalorphin U-50,488H	nor-BNI <i>Buprenorphin</i> <i>Naloxon</i>	Analgesie Dysphorie Sedierung Diurese

**Tabelle 1: Opioidrezeptor-Typen mit Darstellung ihrer endogenen sowie exogenen Liganden und deren pharmakologischer Wirkungen.** Klinisch relevante Opioide sind *kursiv* gedruckt. Manche Opioide verhalten sich als gemischte Agonisten/Antagonisten an Opioidrezeptoren (Buprenorphin, Nalbuphin und Nalorphin).

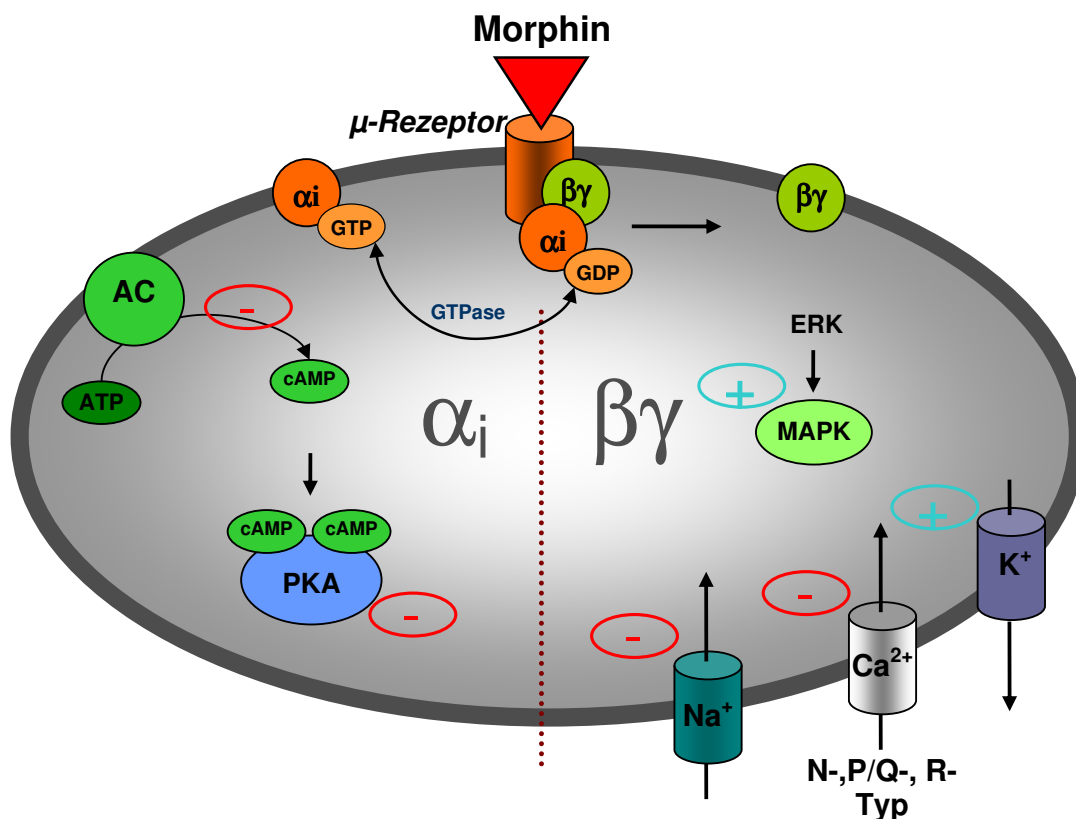


verwendet werden. Antagonistisch binden Naloxon und das Peptid CTOP (D-Phe-Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH<sub>2</sub>) am  $\mu$ -Rezeptor (Tabelle 1). CTOP hat keine klinische Relevanz, stellt allerdings ebenfalls ein wichtiges Werkzeug zur pharmakologischen Charakterisierung von  $\mu$ -Rezeptoren dar (Zadina et al., 1993).

Die pharmakologische Charakterisierung der Opioidrezeptoren warf die Frage nach endogenen Liganden auf. Die Enkephaline Met- und Leu-Enkephalin wurden als erste endogene Opioidpeptide entdeckt (Hughes et al., 1975). Es folgten  $\beta$ -Endorphin und die Dynorphine (Goldstein et al., 1979; Li und Chung, 1976; Li et al., 1976). Das aus 31 Aminosäuren aufgebaute  $\beta$ -Endorphin wird aus dem Vorläuferprotein Proopiomelanocortin (POMC) gebildet und bindet außer am  $\mu$ - auch am  $\delta$ -Rezeptor. Die erst später erforschten Opioidpeptide Endomorphin 1 (Tyr-Pro-Trp-Phe-NH<sub>2</sub>) und Endomorphin 2 (Tyr-Pro-Phe-Phe-NH<sub>2</sub>) haben dagegen eine selektive Affinität für den  $\mu$ -Rezeptor (Zadina et al., 1997). Sie haben keinerlei strukturelle Ähnlichkeit mit  $\beta$ -Endorphin. Ihr Vorläuferprotein ist bisher nicht aufgeklärt worden. Die  $\kappa$ -Rezeptor Liganden Dynorphin A und B sowie die  $\delta$ -Agonisten Met- und Leu-Enkephalin werden posttranslational aus den Precursoren Prodynorphin und Proenkephalin generiert. Endogene Opioidpeptide werden hauptsächlich im Gehirn, im Hinterhorn des Rückenmarks sowie von Immunzellen, insbesondere Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, exprimiert.

## 1.2.2 Molekulare Mechanismen der $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung

Der  $\mu$ -Rezeptor gehört zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vom Rhodopsin-Typ (Review in Hollmann et al., 2005; Offermanns, 2003). G-Protein gekoppelte Rezeptoren sind membranständig und besitzen sieben Transmembrandomänen (TM) mit einem extrazellulären N-terminalen und einem zytosolischen C-terminalen Ende. Eine Disulfidbrücke verbindet die zweite extrazelluläre Schleife mit der TM3. Aufgrund ihrer Eigenschaft, guaninnucleotidbindende Proteine (G-Proteine) zu aktivieren, werden



**Abbildung 1.2: Darstellung der molekularen Mechanismen einer  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung.** Die  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung führt zur Dissoziation des korrespondierenden inhibitorischen G-Proteins in die  $G_{\beta\gamma}$  und  $G_{\alpha_i}$ -Einheit. Während  $G_{\beta\gamma}$  für die Modulation des MAPKinase-Signalwegs und der Modulation spannungsabhängiger Ionenkanäle verantwortlich ist, führt die Freisetzung von  $G_{\alpha_i}$  zur Modulation der Adenylcyclasen-Aktivität. Nach kurzzeitiger Opioidexposition wird die Adenylcyclasen-Aktivität gehemmt. Daraus resultiert eine Abnahme der cAMP-Konzentration sowie eine PKA-Inhibition.

GPCRs nach dem mit ihnen interagierenden G-Protein in vier Subklassen unterteilt:  $G_s$  („*stimulatory*“),  $G_{i/o}$  („*inhibitory*“, „*other*“),  $G_{12/13}$  und  $G_{q/11}$ . Heterotrimere G-Proteine bestehen aus einer  $\alpha$ -Untereinheit ( $G_\alpha$ ), die GDP/GTP bindet, und einer  $\beta$ - sowie  $\gamma$ -Untereinheit, die einen nicht-dissoziierbaren Komplex bilden ( $G_{\beta\gamma}$ ). Unter basalen Bedingungen sind  $G_\alpha$  und  $G_{\beta\gamma}$  assoziiert. Durch Aktivierung des zugehörigen Rezeptors wird GDP durch GTP an  $G_\alpha$  ausgetauscht, was wiederum zu einer Konformationsänderung und einer damit verbundenen Dissoziation des  $G_\alpha$ - $G_{\beta\gamma}$ -Komplexes führt (Bourne et al., 1991). Durch GTPasen wird GTP wieder zu GDP hydrolysiert und  $G_\alpha$  inaktiviert. Nach der Reassoziation mit  $G_{\beta\gamma}$  kann das G-Protein erneut aktiviert werden (siehe Abbildung 1.2).

Die  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung führt zur Freisetzung von inhibitorischen G-Proteinen ( $G_{i/o}$ ), der daraus resultierenden Dissoziation von  $G_{\alpha i}$  und  $G_{\beta\gamma}$  und einer Rezeptor-Konformationsänderung. Die aktivierten  $G_{\alpha i}$ - und  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine können zahlreiche Effektormoleküle beeinflussen (Review in Marinissen und Gutkind, 2001). Mit Hilfe von Pertussistoxin (PTX), produziert vom Bakterium *Bordetella pertussis*, können inhibitorische G-Proteine blockiert werden und folglich deren Beteiligung an Signalkaskaden nachgewiesen werden. PTX hemmt selektiv  $G_{\alpha i}$ -Einheiten inhibitorischer G-Proteine, die nach  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung freigesetzt werden. PTX ribosyliert bestimmte Aminosäuren an  $G_{\alpha i}$  und verhindert den Austausch von GDP und GTP. Das G-Protein verbleibt in seinem inaktiven Zustand (Hildebrandt et al., 1983).

Vermittelt durch  $G_{\alpha i/o}$  hemmen Opioide die Aktivität von Adenylylcyclasen<sup>2</sup> (AC), die

---

<sup>2</sup> Adenylylcyclasen sind membranständig und weisen 12 Transmembransegmente auf. Jeweils 6 Transmembrandomänen bilden 2 Tandemproteine, die durch eine große zytoplasmatische katalytische Schleife miteinander verbunden sind (Cooper, 2003). Es sind 9 membranständige Isoformen und eine wasserlösliche Isoform der Adenylylcyclasen bekannt, die unterschiedlich reguliert werden (Sunahara and Taussig, 2002). Sämtliche Adenylylcyclasen werden durch  $G_{\alpha s}$ -Proteine aktiviert. Calcium und Calmodulin aktivieren zusätzlich die Cyclasen AC1, AC3 und AC8. Durch  $G_{\beta\gamma}$  werden bei gleichzeitiger  $G_{\alpha s}$ -Stimulation AC2, AC4 und AC7 stimuliert. AC5 und AC6 werden dagegen durch Calcium und  $G_{\alpha i}$  inhibiert. Das Diterpen Forskolin (isoliert aus der Wurzel von *Coleus forskohlii*, Lamiaceae) aktiviert mit Ausnahme der AC9 alle Isoformen. Adenylylcyclasen werden nicht nur durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren und deren Downstream-Effekte reguliert, sondern auch durch Rezeptor Tyrosinkinase (RTK)-vermittelte Informationen. Die Serin-/Threonin-Kinase Raf (*rapidly growing fibrosarcoma*), die durch RTK-Aktivierung an die Zelloberfläche rekrutiert wird, kann bestimmte AC-Isoformen (AC2, AC5, AC6) phosphorylieren und damit sensibilisieren (Ding et al., 2004; Yue et al., 2006).

---

Adenosintriphosphat (ATP) in zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) und Pyrophosphat hydrolysieren (Sharma et al., 1975b). Aufgrund der opioidbedingten Hemmung der Adenylylcyclasen nimmt die cAMP-Konzentration und daraus resultierend die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) ab (Abbildung 1.2; Law et al., 2000). Die cAMP-abhängige PKA besteht aus zwei regulatorischen Einheiten (R), die jeweils eine katalytische Einheit (C) binden. Jede regulatorische Einheit weist zwei Bindungstaschen für cAMP-Moleküle auf. Nach Bindung derselben dissoziiert der R-C-Komplex. Die freigesetzte katalytische Einheit ist dann in der Lage, Phosphogruppen auf die Aminosäuren Serin und Threonin zu übertragen (Serin/Threonin-Kinase). *A-Kinase anchoring* Proteine (AKAP) tragen dazu bei, dass die PKA zu den Zielproteinen gelenkt wird (Dell'Acqua und Scott, 1997).

Die Aktivierung des  $\mu$ -Rezeptors führt durch eine direkte Interaktion mit  $G_{\beta\gamma}$  zur Modulation verschiedener spannungsabhängiger Ionenkanäle (Abbildung 1.2; Clapham und Neer, 1997). Opioide hemmen präsynaptisch die Aktivität der Calciumkanäle vom N- („*neuron*“), P/Q- („*Purkinje Zellen*“) sowie R-Typ („*remaining*“), resultierend in einer Inhibition der Erregungsbildung und -ausbreitung in peripheren nozizeptiven und ZNS-Neuronen (Akins und McCleskey, 1993; Borgland et al., 2001; Irnaten et al., 2003; Schroeder und McCleskey, 1993). Strittig ist die Frage, inwieweit L-Typ („*longlasting*“) Calciumkanäle durch Opioide moduliert werden. Es gibt Hinweise, dass Opioide die Aktivität von L-Typ Calcium-Kanälen in heterologen Zellsystemen und ZNS-Neuronen steigern und dadurch die intrazelluläre Calciumkonzentration erhöhen können (Przewlocki et al., 1999; Smart et al., 1997; Smart et al., 1995).

Inhibierend wirken Opioide auch auf purinerge  $P_2X$  Rezeptoren und Tetrodotoxin-resistente (TTX-R) Natriumkanäle, die hauptsächlich in Nozizeptoren exprimiert werden und eine wichtige Aufgabe bei der Impulsweiterleitung und der Schmerzwahrnehmung übernehmen (Chizhnikov et al., 2005; Gold und Levine, 1996; Lai et al., 2004). Indessen werden in ZNS-Neuronen spannungsabhängige und *G-protein-gated inwardly rectifying* (GIRK) Kaliumkanäle, ebenfalls durch direkte Interaktion mit  $G_{\beta\gamma}$ , aktiviert, wodurch eine Hyperpolarisation der Postsynapsen hervorgerufen wird (North et al., 1987; Torrecilla et al., 2002). Eine Aktivierung von peripheren Kaliumkanälen wurde bisher nicht nachgewiesen. Die  $\mu$ -Rezeptor-Stimulation induziert, initiiert durch  $G_{\beta\gamma}$ , die Aktivierung des *extracellular signal-regulated kinase* (ERK)-/ *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Systems (Belcheva et al., 1998; Li und Chang, 1996). ERK/MAPK wirken unter

anderem regulierend auf die Genexpression und modulierend auf die synaptische Plastizität im ZNS.

Wird ein Opioid nach lang andauernder Applikation entweder durch Zugabe eines Antagonisten oder durch gründliches Auswaschen entzogen, tritt Opioidentzug ein. Der zelluläre Mechanismus des Opioidentzugs ist nicht vollständig geklärt. Bisher ist bekannt, dass, ausgelöst durch den Opioidentzug, die Adenylylcyclasen-Aktivität und daraus resultierend die cAMP-Konzentration ansteigt (Avidor-Reiss et al., 1997). Der schnelle Anstieg des cAMP-Spiegels wird als cAMP-Supersensibilisierung bezeichnet. G $\beta\gamma$ -Proteine können stimulatorische G $\alpha_s$ -Proteine sensibilisieren und dadurch eine kompensatorische Hochregulation der Adenylylcyclasen-Aktivität bewirken (Ammer und Schulz, 1997; Watts, 2002).

Die erhöhte cAMP-Konzentration kann vermehrt die cAMP-abhängige PKA aktivieren (Avidor-Reiss et al., 1997; Bie et al., 2005). Die Expression der katalytischen Einheit der PKA ist zudem nach Opioidentzug gesteigert (Lane-Ladd et al., 1997). Die cAMP-abhängige PKA phosphoryliert daraufhin Rezeptorproteine, die somit gegenüber einer Aktivierung sensibilisiert werden. In Neuronen des Locus coeruleus (LC) im ZNS wird nach akuter Opioidapplikation die Aktionspotentialrate (*firing rate*) gesenkt, während nach längerer Opioidgabe wieder das Normalniveau erreicht wird. Wird das Opioid entzogen oder durch einen Antagonisten ersetzt, erreicht die „*firing rate*“ in LC-Neuronen, ausgelöst durch die cAMP-Hochregulation, ein vielfach höheres Niveau als unter Kontrollbedingungen (Kogan et al., 1992).

Ausgelöst durch den Opioidentzug werden bestimmte Transkriptionsfaktoren hochreguliert, insbesondere die Expression von CREB (*cAMP response element binding protein*) und  $\Delta$ FosB (Review in Nestler, 2004). Die chronische Morphinexposition und Morphinentzug beeinflussen in vielfältiger Weise die Aktivität des MAPK-/ERK-Signaltransduktionswegs (Asensio et al., 2006; Ferrer-Alcon et al., 2004). Die ERK1-/ERK2-Aktivität nimmt nach chronischer Opioidapplikation ab (Muller und Unterwald, 2004), nach Morphinentzug jedoch wieder drastisch zu (Schulz und Holtt, 1998).

---

### 1.2.3 Periphere Opioidanalgesie insbesondere im Entzündungsschmerz

Opioidrezeptoren und Opioidpeptide werden im peripheren Nervensystem, insbesondere in afferenten sensorischen Neuronen und in DRG-Neuronen, exprimiert (Review in Stein, 2003). Die periphere Opioidanalgesie hat in der Schmerzforschung an Beachtung gewonnen, da viele opioidbedingte Nebenwirkungen, die hauptsächlich über das zentrale Nervensystem vermittelt werden, durch die lokale periphere Applikation umgangen und vermieden werden können. In Studien an Patienten nach erfolgter Kniegelenksoperation und an Patienten mit chronischer Arthritis konnte gezeigt werden, dass eine lokale intraartikuläre Morphinapplikation analgetisch wirkt (Stein et al., 1991). In einem weiteren Experiment wurde der Opioidrezeptorantagonist Naloxon lokal nach einer Kniegelenksoperation verabreicht. Die Patienten brauchten daraufhin deutlich mehr Analgetika zur Schmerztherapie als Patienten ohne Naloxonapplikation. Dieses Ergebnis lieferte den entscheidenden Hinweis, dass endogene Opiode, deren Wirkung am Opioidrezeptor in diesem Fall durch Naloxon blockiert wird, lokal analgetisch wirken können (Stein et al., 1993).

Klinische Studien konnten zeigen, dass Opiode insbesondere unter Entzündungsbedingungen, lokal am Entzündungsherd appliziert, antiinflammatorisch und analgetisch wirken. Die analgetischen Effekte von Opioiden sind zudem unter dem Einfluss einer peripheren Entzündung ausgeprägter als unter physiologischen Bedingungen. Die Abnahme von Immunzellen im Synovialgewebe nach lokaler Opioidexposition gilt als wichtiges Indiz einer antiinflammatorischen peripheren Wirkung von Opioiden (Stein et al., 1999). Entzündungsbedingter Schmerz in Folge von Zahnoperationen kann signifikant durch lokale Applikation von Morphin verbessert werden (Likar et al., 1998). Die verbesserte analgetische Opioidwirkung liegt teilweise an einer durch die Entzündung initiierten *de-novo*-Synthese und einer Hochregulation der Anzahl an peripheren membranständigen  $\mu$ -Rezeptoren (Ji et al., 1995; Zoellner et al., 2003). Die G-Protein-Kopplung des  $\mu$ -Rezeptors ist zudem unter Entzündungsbedingungen gesteigert (Shaqura et al., 2004). Opioidrezeptoren werden im Entzündungsfall vermehrt axonal zu den peripheren Nervenendigungen transportiert und deren Verfügbarkeit wird ausgedehnt (Hassan et al., 1993). Entzündungen schädigen die perineurale Scheide der peripheren Nervenfasern. Opiode können dadurch leichter an deren Rezeptoren auf den sensorischen Neuronen gelangen (Antonijevic et al., 1995). Opiode hemmen unter

pathophysiologischen Bedingungen die Ausschüttung der Botenstoffe Substanz P und CGRP aus intrazellulären Speichern und wirken damit der Entstehung einer neurogenen Entzündung entgegen (Yaksh, 1988). Unter Entzündungsbedingungen wandern Immunzellen, hauptsächlich Granulozyten und Makrophagen, in das entzündete Gewebe ein und setzen proinflammatorische Botenstoffe wie Zytokine und TNF- $\alpha$  frei (Machelska et al., 2002). Granulozyten und Makrophagen synthetisieren endogene Opioidpeptide wie  $\beta$ -Endorphin, Endomorphin 1 und Endomorphin 2, die daraufhin am Ort der Entzündung freigesetzt werden, an periphere Opioidrezeptoren binden und dadurch ihre analgetische Wirkung entfalten (Labuz et al., 2006; Mousa et al., 2001; Przewlocki et al., 1992; Rittner et al., 2005). Die Freisetzung der endogenen Opioidpeptide wird durch Stress, aber auch durch Zytokine, Chemokine, Katecholamine oder den *Corticotropin-releasing factor* CRF ausgelöst (Binder et al., 2004; Cabot et al., 1997; Rittner und Stein, 2005; Schafer et al., 1996).

---

## 1.3 Der Ionenkanal *transient receptor potential vanilloid 1*

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob peripher wirksame Opioide mit Ionenkanälen vom Typ *transient receptor potential* (TRP) interagieren können. Hierzu wurde der *transient receptor potential vanilloid 1* (TRPV1)-Ionenkanal, der insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen einer Entzündung eine herausragende Rolle spielt, untersucht.

### 1.3.1 Struktur und Funktion von TRPV1

1997 klonierten Caterina et al. den nicht selektiven Ionenkanal TRPV1, auch Capsaicinrezeptor oder Vanilloidrezeptor (VR1) genannt (Caterina et al., 1997). TRPV1 ist entscheidend an der Schmerzentstehung sowie der Schmerz- und Temperaturwahrnehmung im peripheren Nervensystem beteiligt. TRPV1 wird durch Capsaicin und Temperaturen ab 43°C aktiviert und unter Entzündungsbedingungen durch Protonen und Entzündungsmediatoren sensibilisiert.

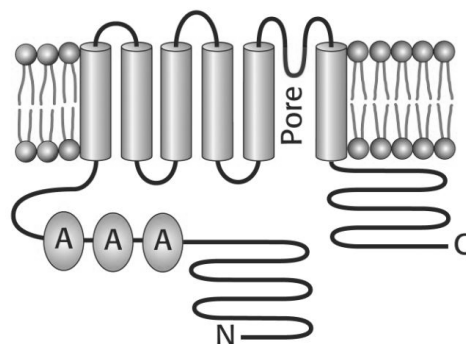
TRPV1 gehört zu der Familie der TRP-Ionenkanäle. TRP-Kanäle, erstmals charakterisiert im Facettenauge der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, werden in sieben Subfamilien unterteilt: TRPC (*classical*), TRPV (*vanilloid*), TRPM (*melastatin*), TRPA (*ankyrin*) und TRPN (*Drosophila NOMPC*) sowie TRPP (*polycystic kidney disease protein*) und TRPML (*mucolipids*) (Review in Montell, 2005). Eine Vielzahl der TRP-Kanäle sind temperatursensibel (Review in Jordt et al., 2003). Beispielshalber reagiert TRPV2 auf Temperaturen ab 53°C, TRPV3 auf Wärmereize um die 39°C. TRPM8 und TRPA1 stellen dagegen kälteempfindliche Ionenkanäle dar.

Alle TRP-Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen (TM), einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6 und einem zytosolischen N- und C-terminalen Ende (Abbildung 1.3). Nahe der TM6 befindet sich die so genannte TRP-Domäne (Tominaga und Tominaga, 2005). Sowohl TRPV als auch TRPC weisen am N-terminalen Ende Ankyrinproteine auf, die eine Rolle in der Proteinerkennung spielen, deren genaue Funktion in TRP-Kanälen aber nicht abschließend geklärt ist (siehe Abbildung 1.3).

Analog zu Kalium-Kanälen bilden Vertreter der TRP-Ionenkanäle homomere Tetramere



(Garcia-Sanz et al., 2004), aber auch die Bildung von Heteromultimeren zwischen TRP-Proteinen, unter anderem von TRPV1 mit TRPV2 und TRPV3 ist beschrieben (Hellwig et al., 2005; Liapi und Wood, 2005; Smith et al., 2002). TRP-Proteine liegen in der Zelle in so genannten *Transducisomen* vor: Sie bilden mit weiteren Proteinen, Rezeptoren und Signalmolekülen eine räumlich begrenzte funktionelle Einheit (Vennekens et al., 2002). Neben der funktionellen cDNA für TRPV1, kloniert aus DRG-Neuronen der Ratte (rVR1, GenBank AY445519; Caterina et al., 1997) sind mittlerweile auch die TRPV1-Sequenzen des Menschen (AJ277028) mit einer Homologie von 86%, des Meerschweins (85%), der Maus (95%), des Kaninchens (86%), des Huhns (65%), des Hundes (88%) und des Hausschweins (84%) aufgeklärt (Correll et al., 2004; Gavva et al., 2004; Hayes et al., 2000; Jordt und Julius, 2002; Ohta et al., 2005; Phelps et al., 2005; Savidge et al., 2002). Zudem sind einige Splicevarianten von TRPV1 bekannt. Der Splicevariante VR.5'sv (AF158248) der Ratte fehlt das N-terminale Ende (Schumacher et al., 2000b). Aufgrund des Verlustes der Sensitivität gegenüber Capsaicin und Hitze wird dem N-terminalen Ende von TRPV1 eine essentielle Rolle in der Porenbildung zugeschrieben. Die TRPV1-Splicevariante SIC (*stretch inhibitable channel*) wird durch mechanische Stimuli aktiviert und wurde hauptsächlich in Nozizeptoren, aber auch in der Niere der Ratte nachgewiesen (Schumacher et al., 2000a).



**Abbildung 1.3: Membrantopologie des TRPV1-Ionenkanals.** TRPV1 wird aus sechs Transmembrandomänen mit einem intrazellulärem N- und C-terminalen Ende und einer Porenschleife zwischen TM5 und TM6 gebildet. Am N-terminalen Ende sind Ankyrinproteine (A) lokalisiert. (Abbildung modifiziert aus Szallasi et al., 1999)

---

TRPV1 wird hauptsächlich in DRG-Neuronen und *trigeminal ganglion* (TG)-Neuronen exprimiert, aber auch in weiteren neuronalen und nicht-neuronalen Geweben wie den peripheren Nervenendigungen im Gastrointestinaltrakt, der Niere sowie der Harnblase, den Keratinozyten der Epidermis, der Leber, den polymorphonuklearen Granulozyten und Makrophagen (Nagy et al., 2004). Im zentralen Nervensystem finden sich unter anderem im Cortex, im Hippocampus, in der Amygdala, im Striatum, im Hypothalamus sowie Thalamus, in der Substantia nigra, im Cerebellum und im Locus coeruleus TRPV1-positive Zellen (Toth et al., 2005). Die Funktion von TRPV1 im ZNS ist allerdings weitgehend ungeklärt.

TRPV1 ist sowohl in der Plasmamembran als auch in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und in cytoplasmatischen Vesikeln lokalisiert (Guo et al., 1999; Morenilla-Palao et al., 2004). In cytoplasmatischen Vesikeln dient TRPV1 als „stille Reserve“, um bei Bedarf schnell zur Plasmamembran rekrutiert zu werden. Die Funktion von TRPV1 im endoplasmatischen Retikulum ist nicht bekannt. Doch gibt es die Vermutung, dass durch die TRPV1-Aktivierung Calcium mobilisiert wird und TRPV1 auf diesem Weg zur Calciumhomeostase beiträgt (Karai et al., 2004).

Der bekannteste TRPV1-Aktivator ist Capsaicin (8-Methyl-N-vanillyl-6-nonen-amid), das in den scharf schmeckenden Chilischoten (Cayennepfeffer, *Capsicum frutescens*, Solanaceae) und den Schoten der Paprika (*Capsicum annuum*, Solanaceae) vorkommt und hieraus isoliert werden kann (Tominaga et al., 1998). Die Affinität zu TRPV1 liegt im nanomolaren Bereich. In hoher Dosierung hat Capsaicin eine neurotoxische Wirkung. Es bewirkt eine selektive Zerstörung polymodaler bzw. hitzesensitiver C-Fasern. Gelegentlich wird Capsaicin, lokal als Salbe oder Pflaster verabreicht, als schmerzhemmender Wirkstoff für die Behandlung von chronischen Schmerzen und der diabetischen Neuropathie eingesetzt (Review in Nagy et al., 2004). Nach einer initialen Erregung der Nozizeptoren kommt der analgetische Effekt durch die nachfolgende refraktäre Phase zustande, während später die Nozizeptoren gegenüber weiteren Stimuli wie Hitze, Protonen und Entzündungsmediatoren unempfindlich werden und die Nervenleitung über nozizeptive C-Fasern vollständig blockiert wird.

Mehrere Arbeitsgruppen versuchten, die genaue Bindungsstelle für Capsaicin zu analysieren: Welch et al. identifizierten sowohl extrazellulär als auch intrazellulär gelegene Aminosäuren nahe der putativen Pore zwischen TM5 und TM6, die für die TRPV1-Aktivierung durch Capsaicin notwendig sind (Welch et al., 2000). Interessanterweise sind

sowohl Kaninchen als auch Hühner insensitiv gegenüber Capsaicin, was dazu veranlasste, in beiden Spezies nach den Aminosäuren zu suchen, die für die Capsaicin-Sensitivität verantwortlich sind. Jordt und Julius lokalisierten auf diese Weise mit Hilfe von TRPV1-Mutanten des Huhns die Bindung von Capsaicin intrazellulär in der Nähe der TM3 (Jordt und Julius, 2002); Gavva et al. postulierten eine besondere Bedeutung zweier Aminosäuren ebenfalls in TM3-TM4 (Gavva et al., 2004). Allerdings konnten Vyklicky et al. eine alleinige intrazelluläre Bindungsstelle nicht bestätigen. Sie gingen von einer zur Capsaicinaktivierung des Kanals zusätzlichen notwendigen extrazellulären Bindungstasche aus (Vyklicky et al., 2003).

Neben Capsaicin gibt es weitere TRPV1-Aktivatoren: Weitaus höhere Affinität als Capsaicin hat Resiniferatoxin (RTX), ein Phorbolesterderivat aus dem Wolfsmilchgewächs *Euphorbia resinifera* mit einer  $EC_{50}$  von 40 nM. Toxine bestimmter Spinnengattungen sind ebenfalls in der Lage, TRPV1 zu aktivieren (Siemens et al., 2006). Campher verhält sich dagegen nur in sehr hoher Konzentration agonistisch an TRPV1 (Xu et al., 2005).

Die pharmakologische Charakterisierung von TRPV1 warf die Frage nach endogenen Liganden auf. In den letzten Jahren wurden einige endogene Aktivatoren charakterisiert: Insbesondere Lipoxygenase-Produkte wie 12- und 15-Hydroperoxyeicosatetraensäure (HPETE), 5- und 15-Hydroxyeicosatetraensäure (HETE), Leukotriene sowie endogene Cannabinoide<sup>3</sup> wie N-Arachidonoyl-Ethanolamin (Anandamid), N-Arachidonoyl-Dopamin (NADA) und N-Oleooyl-Dopamin können TRPV1, allerdings meist in sehr hohen Konzentrationen, aktivieren (Huang et al., 2002; Smart et al., 2000; Winter et al., 1990).

Eine Sensibilisierung und Aktivierung von TRPV1 ist zusätzlich zu einer direkten Interaktion mit zuvor aufgeführten Agonisten auf posttranslationale Phosphorylierungen durch die Proteinkinasen A (PKA), Proteinkinasen C (PKC), der  $Ca^{2+}$ /CaM-abhängigen Kinase II, der Tyrosinkinase Src, der cyclinabhängigen Kinase 5 (CdK5), aber auch durch Protonen zurückzuführen (Bhave et al., 2002; Jin et al., 2004; Jung et al., 2004; Lee et al.,

---

<sup>3</sup> Cannabinoide vermitteln ihre Wirkung hauptsächlich über die G-Protein gekoppelten Cannabinoidezeptoren CB1 und CB2, aber auch durch direkte Interaktion mit Ionenkanälen der TRP-Familie. Der Hauptwirkstoff aus der Pflanze *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae), Dronabinol ( $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol), wirkt analgetisch und ist in Deutschland verschreibungsfähig. Zudem wirken mehrere CB1- und CB2-Agonisten im Tiermodell schmerzhemmend. Bisher gibt es allerdings keine Substanz, die als Arzneimittel zugelassen ist (Sagar et al., 2005).

---

2005; Numazaki et al., 2002; Olah et al., 2002; Pareek et al., 2007; Premkumar und Ahern, 2000) . Die kinasevermittelten Phosphorylierungen regulieren entscheidend die Funktion von TRPV1, indem sie eine Sensibilisierung des Kanals gegenüber Agonisten, Hitze und pH-Wert-Änderungen bewirken (Mandadi et al., 2006; Numazaki et al., 2002). Zudem können Ethanol, Nicotin, Serotonin und Insulin die TRPV1-Aktivität gegenüber einer Capsaicin- oder Hitzeaktivierung potenzieren (Liu et al., 2004; Sugiura et al., 2004; Trevisani et al., 2002; Van Buren et al., 2005). Auch das Hormon Prolactin, dessen Expression durch 17- $\beta$ -Estradiol initialisiert wird, sensibilisiert TRPV1 in TG-Neuronen von weiblichen Ratten (Diogenes et al., 2006).

Die Aktivierung von TRPV1 führt zu einem Einstrom von hauptsächlich  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen, aber auch weiteren monovalenten ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ) und divalenten ( $\text{Mg}^{2+}$ ) Kationen in nozizeptive Neurone. Die Permeabilität liegt dabei für  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen um das 10-Fache höher als für  $\text{Na}^+$ -Ionen. Der Ionenstrom bewirkt die Membrandepolarisation, die Freisetzung von inflammatorischen Neuropeptiden, vor allem von Substanz P und *Calcitonin gene related peptide* (CGRP), die daraufhin zur Entstehung einer neurogenen Entzündung und zur Generierung von elektrischen Impulsen beitragen (Tominaga, 2007).

Die Empfindlichkeit von TRPV1 gegenüber Aktivatoren nimmt nach lang andauernder oder wiederholter Stimulation sukzessive ab. Die Desensibilisierung von TRPV1 zeigt sich durch eine Abnahme der TRPV1-Aktivität nach lang andauernder Stimulation. Tachyphylaxie zeichnet sich durch eine Abnahme der TRPV1-Aktivität nach wiederholter Stimulation aus. Die Desensibilisierung und die Tachyphylaxie von TRPV1 sind calcium- und spannungsabhängig: Extrazellulär sowie intrazellulär erhöhte Calciumkonzentrationen und Membrandepolarisationen fördern die Abnahme der TRPV1-Empfindlichkeit (Cholewinski et al., 1993; Piper et al., 1999). Die Desensibilisierung von TRPV1 kann sowohl durch die cAMP-abhängige PKA als auch durch PKC $\epsilon$  gehemmt werden (Mandadi et al., 2004; Mandadi et al., 2006; Mohapatra und Nau, 2003). Mohapatra et al. zeigten, dass die nach repetitiver Capsaicinexposition auftretende Tachyphylaxie durch Stimulation mit dem Adenylcyclasen-Aktivator Forskolin (FSK) signifikant verringert wird (Mohapatra et al., 2003). Der PKA-Inhibitor H-89 hob die FSK-induzierte Abnahme der Tachyphylaxie wieder auf. Die Desensibilisierung von TRPV1 wird darüber hinaus von der Dephosphorylierung des Kanals durch Calcineurin, einer calciumabhängigen Phosphatase, beeinflusst (Mohapatra und Nau, 2005).

TRPV1 wird durch die kompetitiven Antagonisten Capsazepin und Ruthenium-Red blockiert. Der intrazelluläre *second messenger* Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) hat ebenso einen inhibierenden Effekt auf TRPV1 (Chuang et al., 2001). Zudem führt die Aktivierung von Somatostatin-Rezeptoren zu einer Hemmung der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität (Carlton et al., 2004). Hemmend auf die TRPV1-Funktion wirkt auch das Cannabinoid WIN55,212-2, das die Dephosphorylierung des Kanals durch die calciumabhängige Phosphatase Calcineurin fördert (Patwardhan et al., 2006). Zugleich bewirkt das Cannabinoid WIN55,212-2 die Aktivierung des Ionenkanals TRPA1, die wiederum die calcineurinabhängige TRPV1-Dephosphorylierung begünstigt (Jeske et al., 2006). Mehrere TRPV1-Antagonisten haben sich im Tiermodell als analgetisch wirksame Substanzen herausgestellt (Cui et al., 2006). TRPV1-Antagonisten gelten daher als mögliche Substanzen für die Entwicklung von potenten Schmerzmitteln, insbesondere für den Entzündungsschmerz, den neuropathischen Schmerz und den Tumorschmerz. TRPV1-Antagonisten sollen die sensibilisierende Wirkung von Protonen, Hitze, Entzündungsmediatoren und Endovanilloiden an TRPV1 unterbinden und dadurch die Schmerzentstehung und -weiterleitung hemmen (Nagy et al., 2004).

### **1.3.2 TRPV1 und pathophysiologische Entzündungsprozesse**

Funktionelle Studien an TRPV1-defizienten Mäusen zeigten, dass TRPV1 eine bedeutende Aufgabe in der Temperatur- und Schmerzempfindung übernimmt (Caterina et al., 2000; Davis et al., 2000). Der Ionenkanal ist jedoch nicht ausschließlich für die Empfindung normaler Temperaturreize verantwortlich, sondern weitere Proteine, zum Beispiel temperatursensible Ionenkanäle der TRP-Familie, sind an der sensorischen Reizaufnahme unter physiologischen Bedingungen beteiligt. TRPV1 spielt jedoch eine exklusive Rolle bei der Empfindung thermischer Reize im Kontext einer entzündungsbedingten thermalen Hyperalgesie (Davis et al., 2000).

Die Rolle von TRPV1 in der Entwicklung der Hyperalgesie ist auf die Sensibilisierung durch Entzündungsmediatoren und die Hochregulation der TRPV1-Proteinexpression unter Entzündungsbedingungen zurückzuführen. Ausgelöst durch *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) und/oder Entzündungsmediatoren wie NGF nimmt die Anzahl der TRPV1-

---

positiven Zellen in DRG-Neuronen insbesondere in kleinen bis mittelgroßen Neuronen (A $\delta$ -/C-Fasern) deutlich zu (Amaya et al., 2003; Breese et al., 2005; Ji et al., 2002).

Zahlreiche Neurotransmitter und Mediatoren, die unter Entzündungsbedingungen freigesetzt werden und die Erregbarkeit von Nozizeptoren erhöhen, interagieren mit TRPV1. So zeigten Chuang et al. eine Potenzierung der TRPV1-abhängigen thermalen Hyperalgesie durch Bradykinin, vermittelt durch die Proteinkinase C (Chuang et al., 2001). NGF steigert ebenso die Aktivität von TRPV1: Zhang et al. wiesen nach, dass insbesondere eine Phosphorylierung der Aminosäure Y200 für die NGF-vermittelte TRPV1-Sensibilisierung verantwortlich ist (Zhang et al., 2005b). Die Entzündungsmediatoren Prostaglandin E<sub>2</sub> und I<sub>2</sub>, Glutamat, Chemokine und Endothelin-1 können ebenfalls capsaicininduzierte TRPV1-Ströme, vermittelt über die korrespondierenden G-Protein gekoppelten Rezeptoren, potenzieren und damit zur Nozizeption beitragen (Hu et al., 2002; Moriyama et al., 2005; Plant et al., 2006; Zhang et al., 2005b). Die stark hyperalgetisch wirkende Substanz Bv8, aus Froschhaut isoliert, sensibilisiert TRPV1 durch Interaktion mit dem Prokineticin-Rezeptor (PKR) (Vellani et al., 2006). Die Aktivierung des *proteinase-activated* (PAR2)-Rezeptors führt ebenfalls PKC-vermittelt zur Sensibilisierung von TRPV1 (Dai et al., 2004).