

---

## 5 DISKUSSION

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 unter physiologischen und unter pathophysiologischen entzündlichen Bedingungen detailliert untersucht. Wir konnten dabei folgende Ergebnisse erzielen:

### **Hypothese 1: Opioide hemmen die Aktivität des Ionenkanals TRPV1**

1.  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 sind in kleinzelligen sensorischen DRG-Neuronen der Ratte co-lokalisiert.
2. Opioide hemmen die capsaicin- und hitzeinduzierte Aktivität des Ionenkanals TRPV1 in nativen DRG-Neuronen und im heterologen Expressionssystem der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen. Die TRPV1-Inhibition ist  $\mu$ -Rezeptor-spezifisch und durch  $G_{i/o}$ -Proteine vermittelt.  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine sind an der opioidbedingten TRPV1-Hemmung nicht beteiligt. Die opioidbedingte Reduktion der TRPV1-Funktion ist auf eine Inhibition des cAMP-Signaltransduktionswegs zurückzuführen.
3. 96 h nach *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)-induzierter Entzündung der Rattenhinterpfote wird die TRPV1-Proteinexpression in korrespondierenden DRG-Neuronen hochreguliert. Die Anzahl der TRPV1-mRNA-Transkripte verändert sich indessen, auch zu wesentlich früheren Zeitpunkten der Entzündung, nicht.
4. Die funktionelle TRPV1-Modulation durch Opioide ist unter den pathophysiologischen Bedingungen der CFA-induzierten Entzündung ebenso ausgeprägt wie unter physiologischen Bedingungen.
5. *In vivo* hemmt lokal appliziertes Morphin die capsaicininduzierte thermale Hyperalgesie.

### **Hypothese 2: Opioide steigern die Aktivität des Ionenkanals TRPV1 im Opioidentzug.**

6. Nach chronischer Opioidexposition für 6 h und darauf folgendem Opioidentzug wird die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration im heterologen Expressionssystem der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen hochreguliert. Während des

Opioidentzugs nach chronischer Opioidexposition steigen die mRNA-Transkripte für die Adenylylcyclasen AC3 und AC5 an.

7. Ausgelöst durch den Opioidentzug wird TRPV1 gegenüber einer Capsaicinstimulation sensibilisiert. Die Potenzierung der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität durch Opioide ist  $\mu$ -Rezeptor-vermittelt und resultiert aus einer Sensibilisierung des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs.

---

## 5.1 Hypothese 1: Opioidinduzierte TRPV1-Inhibition

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern kurzzeitig applizierte  $\mu$ -Rezeptor-Agonisten die Aktivität des Ionenkanals TRPV1 beeinflussen.

DRG-Neurone der Ratte eignen sich besonders zur Untersuchung der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion, da sowohl  $\mu$ -Rezeptoren als auch TRPV1-Ionenkanäle in DRG-Neuronen exprimiert werden (Caterina et al., 1997; Lamotte et al., 1976; Schafer et al., 1995). DRG-Neurone stellen die Zellkörper der peripheren afferenten Nervenfasern dar, sind Ort der *de-novo*-Synthese von zahlreichen Rezeptorproteinen und wichtiger Bestandteil des nozizeptiven Systems. Da nicht alle Fragestellungen adäquat im Modell der DRG-Neurone beantwortet werden konnten, wurden zudem einige Experimente im heterologen Expressionssystem der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-transfizierten HEK293-Zellen durchgeführt.

### 5.1.1 Expression von $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 in DRG-Neuronen

Mit Hilfe der Fluoreszenzimmunhistochemie konnten wir in 20 % aller DRG-Neurone TRPV1-Ionenkanäle nachweisen. Die Literaturangaben zur TRPV1-Immunreaktivität in DRG-Neuronen schwanken zwischen 11 % und >50 %. Es gibt Differenzen in der TRPV1-Expression zwischen unterschiedlichen Species: Breese et al. wiesen in DRG-Neuronen von Mäusen eine TRPV1-Immunreaktivität von 11 % nach (Breese et al., 2005). Ji et al. zeigten übereinstimmend mit unseren Daten 23 % TRPV1-positive Neurone in Ratten, Amaya et al. 27 % TRPV1-Immunreaktivität ebenfalls in DRG-Neuronen von Ratten (Amaya et al., 2003; Ji et al., 2002). Die wesentlich höhere TRPV1-Expression von >50 % in einer Publikation von Guo et al. lässt sich möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Antikörper und durch eine andere Vorgehensweise in der Quantifizierung erklären (Guo et al., 1999).

Grundvoraussetzung für die Untersuchung der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion in DRG-Neuronen ist die Co-Expression beider Proteine in derselben Zellpopulation, insbesondere in den klein- bis mittelzelligen Neuronen, den Nozizeptoren. Mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzlasermikroskopie konnten wir sowohl eine Expression von  $\mu$ -Rezeptoren in 21

% und von TRPV1 in 20 % der DRG-Neuronen belegen, als auch die Colokalisation von  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 in 14 % der DRG-Neuronen zeigen. Das Ergebnis stimmt mit parallel erhobenen Daten von Vetter et al. sowie von Chen und Pan überein, die ebenfalls die Colokalisation von  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 in DRG-Neuronen nachwiesen (Chen und Pan, 2006; Vetter et al., 2006). Der Durchmesser der  $\mu$ -Rezeptor- und/oder TRPV1-exprimierenden Neurone lag bei 31  $\mu\text{m}$ . Ein Großteil der Neurone gehörte mit einem Durchmesser von weniger als 30  $\mu\text{m}$  zur Population der schmerzleitenden A $\delta$ - oder C-Fasern.

### 5.1.2 Hemmung der TRPV1-Aktivität

Die Wirkung von  $\mu$ -Rezeptor-Agonisten auf die capsaicin- und hitzeinduzierte TRPV1-Aktivität wurde in DRG-Neuronen der Ratte und im heterologen Expressionssystem der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen mit der *whole-cell* Patch-Clamp-Technik untersucht. Die *whole-cell* Patch-Clamp-Technik eignet sich hervorragend, um TRPV1-spezifische Ionenströme zu messen und somit konkrete Aussagen über die TRPV1-Aktivität zu machen. Capsaicin ist ein spezifischer Agonist für TRPV1 und wurde daher überwiegend für die TRPV1-Stimulation ausgewählt. Um die Aktivierung weiterer Ionenkanäle dennoch auszuschließen, wurde in DRG-Neuronen und in  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen die Spezifität der Capsaicinaktivierung mit Hilfe des kompetitiven TRPV1-Antagonisten Capsazepin überprüft, der den capsaicininduzierten Strom vollständig unterdrückte.

80 % der klein- bis mittelzelligen DRG-Neurone waren in den Patch-Clamp-Untersuchungen sensitiv gegenüber einer Capsaicinstimulation. Der Anteil der capsaicinsensitiven Neurone entspricht Untersuchungen von Oh et al., die eine Capsaicinsensitivität in 77 % der Neurone zeigten (Oh et al., 1996). Für die Patch-Clamp-Untersuchungen wurde nominell calciumfreier Puffer verwendet, um die nach repetitiver Capsaicin- und Hitze-Stimulation auftretende Tachyphylaxie zu vermeiden (Koplas et al., 1997). Durch Elimination der Calciumionen aus der extra- und intrazellulären Pufferlösung konnte die Tachyphylaxie in DRG-Neuronen und in  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen auf ein Minimum reduziert werden.

Morphin bewirkte in 79 % der capsaicinsensitiven DRG-Neuronen eine starke Abnahme

---

der TRPV1-Aktivität. Die Inhibition der capsaicininduzierten TRPV1-Ionenströme durch Morphin war nicht auf das Zellsystem der kultivierten DRG-Neurone begrenzt, sondern war ebenfalls in den  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen stark ausgeprägt. 21 % der DRG-Neurone zeigten nach Morphinexposition keine Veränderung der TRPV1-Stromantwort. In den immunhistochemischen Untersuchungen konnten wir zuvor bereits zeigen, dass ein Teil der Neurone zwar TRPV1-, nicht aber  $\mu$ -Rezeptor-positiv waren. Rund 33 % der TRPV1-positiven Neurone zeigten keine  $\mu$ -Rezeptor-Immunreaktivität. Dieses Ergebnis bestätigt unsere Annahme, dass es sich bei den morphinresistenten Neuronen wahrscheinlich um Neurone handelt, die zwar TRPV1, nicht aber  $\mu$ -Rezeptoren exprimieren.

Die Abnahme der TRPV1-Aktivität nach Opioidexposition trat nach sehr kurzer Zeit ein: Schon nach 60 sec Opioidapplikation nahm der capsaicin- und auch der hitzeinduzierte TRPV1-Ionenstrom signifikant ab. Unsere Ergebnisse sind durchaus nachvollziehbar, wenn man berücksichtigt, dass Opioide bereits nach 30 sec deutlich den intrazellulären cAMP-Gehalt reduzieren, die  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung also auch schon nach wenigen Sekunden zu einer Modulation intrazellulärer Botenstoffe führt (Smart et al., 1995). Die Abnahme der TRPV1-Aktivität war in DRG-Neuronen auch nach insgesamt 16 min kontinuierlicher Morphinbehandlung stark ausgeprägt. Nach Abbruch der Morphinexposition stieg die TRPV1-Aktivität innerhalb von 15 min zu 70 % wieder an, erreichte jedoch nicht das Ausgangsniveau, so dass wir daraus schließen, dass die TRPV1-Inhibition durch Morphin in DRG-Neuronen lang anhaltend, aber reversibel ist.

Nicht nur das Alkaloid Morphin, sondern auch der peptiderge  $\mu$ -Rezeptor-Agonist DAMGO war in der Lage, capsaicininduzierte TRPV1-Einströme zu modulieren. In 73 % der klein- bis mittelzelligen DRG-Neuronen nahm die TRPV1-Aktivität nach DAMGO-Exposition ab. Der Anteil DAMGO-sensitiver Neurone entsprach in etwa dem Anteil der morphinempfindlichen Neurone. Bei äquimolaren Konzentrationen war die inhibierende Wirkung von DAMGO auf die TRPV1-Funktion ähnlich stark ausgeprägt wie mit Morphin. Berücksichtigt man, dass DAMGO eine wesentlich höhere Affinität zum  $\mu$ -Rezeptor aufweist als Morphin (Raynor et al., 1995), so lässt sich daraus ableiten, dass DAMGO eine insgesamt geringere Effektivität in Bezug auf die TRPV1-Inhibition besitzt. Die höhere Affinität von DAMGO muss allerdings nicht zwangsläufig mit einer besseren Fähigkeit, intrazelluläre Mechanismen zu modulieren, einhergehen. Gharagozlou et al. zeigten, dass DAMGO, trotz höherer  $\mu$ -Rezeptor-Affinität, weniger effektiv intrazelluläre

cAMP-Konzentrationen zu senken vermag (Gharagozlou et al., 2003).

Die nahezu vollständige Aufhebung der morphininduzierten Abnahme der TRPV1-Aktivität durch Naloxon beweist, dass die morphinbedingte TRPV1-Inhibition opioidrezeptorvermittelt ist. Eine direkte Interaktion der Opiode Morphin und DAMGO mit dem TRPV1-Ionenkanal kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. Die opioidinduzierte TRPV1-Modulation beruht demzufolge auf einem anderen Mechanismus als zum Beispiel dem der Cannabinoide. Cannabinoide sind in der Lage, die Aktivität von TRPV1 zu beeinflussen. Deren Wirkung wird allerdings nicht über die korrespondierenden G-Protein gekoppelten Cannabinoidrezeptoren vermittelt, sondern ist auf eine direkte Bindung der Cannabinoide an den Ionenkanal TRPV1 zurückzuführen (Patwardhan et al., 2006; Smart et al., 2000). Die Abnahme der TRPV1-Aktivität nach Morphinapplikation ließ sich zudem durch Pertussistoxin blockieren. Da Pertussistoxin spezifisch inhibitorische G-Proteine ( $G_{i/o}$ ) inhibiert, ist dadurch gezeigt, dass  $G_{i/o}$ -Proteine an der TRPV1-Modulation beteiligt sind.

TRPV1 wird nicht nur durch Capsaicin aktiviert, sondern auch durch Temperaturstimuli oberhalb von 43°C. Daher untersuchten wir, ob Morphin ebenfalls hitzeinduzierte TRPV1-Ströme modulieren kann. Die hitzeinduzierte TRPV1-Aktivität nahm nach Morphinexposition im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen in 86 % der DRG-Neurone ab. In der Literatur gibt es Beispiele dafür, dass die TRPV1-Aktivierungsschwelle von >43°C moduliert werden kann. Dai et al. zeigten, dass *proteinase-activated* Rezeptor-Agonisten die Temperaturschwelle von TRPV1 deutlich herabsetzen (Dai et al., 2004). Auch Ethanol ist in der Lage, die Aktivierungsschwelle auf 34°C zu senken (Trevisani et al., 2002). Die TRPV1-Aktivierungsschwelle von >43°C änderte sich in unserem Fall durch die Applikation von Morphin dagegen nicht. Der TRPV1-Ionenkanal wird demnach zwar durch Morphin gegenüber einer Hitzeaktivierung desensibilisiert. Die Aktivierungsschwelle verschiebt sich jedoch nicht in Richtung höherer Temperaturwerte. TRPV1 wird folglich trotz Opioidexposition ab Temperaturen von >43°C aktiviert, jedoch in deutlich geringerem Umfang.

Die Betrachtung von  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen erlaubt es, Fragestellungen zu analysieren, deren Beantwortung im nativen System der DRG-Neurone nicht möglich ist. Opiode hemmen spannungsabhängige Calciumkanäle vom N-, P/Q- und R-Typ in peripheren Neuronen und aktivieren spannungsabhängige Kaliumkanäle sowie GIRK-Kanäle in ZNS-Neuronen (Borgland et al., 2001; North et al., 1987; Torrecilla et al.,

---

2002). Die Wirkung von Opioiden auf diese spannungsabhängigen Ionenkanäle wird auf eine direkte Interaktion zwischen dem aktivierten  $G_{\beta\gamma}$ -Protein nach  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung und den Ionenkanälen zurückgeführt (Akins und McCleskey, 1993; Herlitze et al., 1996; Ikeda, 1996; Torrecilla et al., 2002). Die morphininduzierte Inhibition der TRPV1-Aktivität konnte durch einen spezifischen scavenger für  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine nicht inhibiert werden. Dies wurde von uns als Hinweis gewertet, dass die inhibierenden Eigenschaften der Opiode am TRPV1 im wesentlichen durch andere zelluläre Mechanismen vermittelt werden.

Um den intrazellulären Mechanismus der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion weiter aufzuklären, wurde die Bedeutung des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs untersucht. Morphin hemmt die Adenylylcyclasen-Aktivität und damit die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) (Sharma et al., 1975b). Folge der verminderten cAMP-Bildung ist eine Reduktion der Proteinkinase A (PKA)-Aktivität. Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen stellen einen der wichtigsten Mechanismen dar, um die Aktivität von Proteinen zu regulieren. Auch die TRPV1-Funktion unterliegt einer ständigen Kontrolle durch Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsvorgänge. Mit Hilfe von Phosphorylierungsassays konnte gezeigt werden, dass TRPV1 unter Kontrollbedingungen im phosphorylierten Zustand vorliegt (Autophosphorylierung) (Bhave et al., 2002). Der TRPV1-Agonist Capsaicin sowie das calcium- und calmodulinabhängige Enzym Calcineurin bewirken die Dephosphorylierung des Kanals (Lee et al., 2005; Rosenbaum et al., 2003). Durch die Proteinkinasen A, C und die  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-abhängige Kinase II (CaMKII) kann TRPV1 anschließend wieder rephosphoryliert und damit gegenüber noxischen Stimuli sensibilisiert werden (Lee et al., 2005). Die cAMP-abhängige Proteinkinase A phosphoryliert TRPV1 an den Aminosäuren Threonin-144 sowie Serin-116 und sensibilisiert den Ionenkanal damit gegenüber Capsaicin und Hitze (De Petrocellis et al., 2001; Rathee et al., 2002). Die PKA-vermittelte Phosphorylierung verhindert zudem die TRPV1-Desensibilisierung (Bhave et al., 2002). TRPV1 sowie die regulatorischen und katalytischen Einheiten der PKA sind in DRG-Neuronen co-exprimiert (Rathee et al., 2002).

Nicht nur TRPV1, sondern auch weitere Mitglieder der TRP-Familie werden durch den cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg moduliert: Untersuchungen von Takezawa et al. zeigten, dass sich die Funktion von TRPM7 nach Aktivierung bestimmter G-Protein gekoppelter Rezeptoren verändert (Takezawa et al., 2004): Der auf die cAMP-

Konzentration inhibitorisch wirkende Muskarin-Rezeptor hemmt die TRPM7-Aktivität; dagegen aktiviert der auf die cAMP-Konzentration stimulatorisch wirkende G<sub>s</sub>-gekoppelte  $\beta$ -adrenerge Rezeptor den TRPV1-Ionenkanal (Takezawa et al., 2004).

Entsprechend unserer Hypothese führt eine Abnahme der cAMP-Konzentration durch Opioide und die dadurch bedingte Reduktion der PKA-Aktivität nach  $\mu$ -Rezeptor-Aktivierung zu einer verminderten TRPV1-Phosphorylierung und TRPV1-Sensibilisierung. DRG-Neurone eignen sich zur Untersuchung dieser These, da wir belegen konnten, dass in unserem Modell der kultivierten DRG-Neurone 1) der cAMP Gehalt maßgeblich durch Aktivatoren der Adenylylcyclasen gesteigert werden kann und 2) Morphin in der von uns eingesetzten Konzentration in der Lage ist, die cAMP-Konzentration adäquat zu reduzieren. Ziel der weiterführenden Untersuchungen war es, die Reversibilität der Morphinwirkung an TRPV1 durch Aktivatoren des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs darzustellen. Die morphinbedingte TRPV1-Inhibition konnte sowohl durch den unspezifischen Adenylylcyclasen-Aktivator Forskolin als auch durch das phosphodiesterasestabile cAMP-Analogon 8-Br-cAMP vollständig aufgehoben werden - ein wichtiger Hinweis dafür, dass die opioidbedingte Inhibition der TRPV1-Funktion die Konsequenz einer abnehmenden cAMP-Konzentration ist. Um letztlich zu überprüfen, ob die Proteinkinase A in die  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion involviert ist, müssten Phosphorylierungsstudien durchgeführt werden.

Unsere Daten stimmen mit Daten einer kürzlich publizierten Studie von Vetter et al. überein, die ebenfalls eine morphinvermittelte Hemmung der TRPV1-Aktivität darlegen konnten (Vetter et al., 2006). Sie nutzten die Calcium-Imaging-Technik, um TRPV1-vermittelte Calciumströme zu messen, im Gegensatz zu unserer Arbeit, in der wir die Patch-Clamp-Technik unter hauptsächlich calciumfreien Versuchsbedingungen anwendeten. Die Auswirkung einer Morphinexposition auf TRPV1 wurde von Vetter et al. ausschließlich im heterologen Zellsystem der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen untersucht. Vetter et al. zeigten, dass Morphin capsaicininduzierte Calciumsignale inhibiert. Aufgrund der Aufhebung des Effektes durch Forskolin schlossen Vetter et al. daraus, dass der cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg für die  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion verantwortlich ist. Eine mögliche Beteiligung von G $\beta\gamma$ -Proteinen an der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion wurde von Vetter et al. nicht untersucht.

Um zu analysieren, ob Aktivatoren des cAMP-PKA-Signalwegs die Aktivität des Ionenkanals TRPV1 beeinflussen, untersuchten wir ergänzend die alleinige Auswirkung



---

einer Forskolin- und 8-Br-cAMP-Stimulation auf capsaicininduzierte TRPV1-Ionenströme. Durch die Stimulation mit Forskolin stiegen die initialen capsaicininduzierten Ionenströme von  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen im Vergleich zu Zellen ohne Forskolin/IBMX-Behandlung stark an. Forskolin konnte demgemäß unter unseren experimentellen Bedingungen initiale TRPV1-Ionenströme potenzieren. Dieses Ergebnis wird durch Untersuchungen von Rathee et al. untermauert, die erstmals beobachteten, dass hitzeinduzierte TRPV1-Ströme nach Exposition mit dem Adenylylcyclasen-Aktivator FSK sowohl in DRG-Neuronen als auch in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen potenziert werden können (Rathee et al., 2002). Die Potenzierung kann durch den spezifischen PKA-Inhibitor PKI<sub>14-22</sub> aufgehoben werden und ist weniger stark ausgeprägt, wenn die TRPV1-spezifischen PKA-Phosphorylierungsseiten T144, T370 und S502 mutiert sind. Die FSK-induzierte Potenzierung der TRPV1-Aktivität wurde von Rathee et al. auf eine direkte PKA-vermittelte TRPV1-Phosphorylierung zurückgeführt. Auch Untersuchungen von Lopshire und Nicol zeigten, dass Forskolin und 8-Br-cAMP TRPV1 gegenüber Capsaicin sensibilisieren (Lopshire und Nicol, 1998).

### 5.1.3 Die CFA-induzierte Entzündung

Peripher wirksame Opioide haben einen verstärkten analgetischen Effekt unter Entzündungsbedingungen (Stein, 1995; Stein et al., 2003). Die gesteigerte Analgesie ist auf eine vermehrte Opioidrezeptorexpression, deren verstärkten axonalen Transport zu den peripheren Nervenendigungen, auf eine erhöhte G-Proteinkopplung und auf ein Aussprossen der peripheren Nervenendigungen (*sprouting*) zurückzuführen (Ji et al., 1995; Mousa et al., 2001; Zoellner et al., 2003). Bei peripheren Entzündungen infolge von Gewebeschädigungen werden endogene Opioide verstärkt durch Immunzellen ausgeschüttet, die in das Gewebe einwandern (Przewlocki et al., 1992).

TRPV1 übernimmt vor allem unter entzündlichen Bedingungen eine wichtige Funktion in der Schmerztransduktion und Schmerzentstehung (Tominaga et al., 1998). Der Ionenkanal wird insbesondere durch Entzündungsmediatoren gegenüber noxischen Stimuli sensibilisiert (Amaya et al., 2004; Ji et al., 2002; Zhang et al., 2005a). Proinflammatorisch wirkende Chemokine potenzieren hitze- und capsaicininduzierte TRPV1-Ströme (Zhang et al., 2005a). Prostaglandine, Produkte des Arachidonsäurestoffwechsels, aktivieren mittels Prostaglandinrezeptoren den cAMP-PKA-Signaltransduktionsweg, woraufhin TRPV1 PKA-vermittelt phosphoryliert und gegenüber Capsaicin sensibilisiert wird. (Hu et al., 2002). Bradykinin und NGF potenzieren capsaicin- und protoneninduzierte TRPV1-Ströme durch Aktivierung der Phospholipase C- $\gamma$  (Chuang et al., 2001).

TRPV1 ist wesentlich an der Entstehung der thermalen Hyperalgesie beteiligt (Caterina et al., 2000): In DRG-Neuronen von TRPV1-Knockout-Mäusen sind capsaicin-, hitze- und protoneninduzierte Ionenströme zum großen Teil nicht detektierbar (Davis et al., 2000). Im Verhaltenstest mit TRPV1-Knockout-Mäusen verändert sich die thermale Algesie nach Carrageenan-Injektion in die Pfote im Vergleich zu Tieren ohne Entzündung nicht. Sie weisen dagegen eine normale Reaktion auf thermische noxische Stimuli unter physiologischen Konditionen auf. Davis et al. schlussfolgerten daraus, dass TRPV1 für die Empfindung einer entzündungsbedingten thermalen Hyperalgesie essentiell ist, nicht jedoch für Schmerzempfindung noxischer Reize unter physiologischen Bedingungen (Davis et al., 2000).

Aufgrund der besonderen Bedeutung von  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 im Entzündungsschmerz wurde von uns die Interaktion zwischen beiden Proteinen nach einer peripheren Entzündung untersucht. Wir wählten das seit Jahren in unserem Labor etablierte

---

Modell der *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)-induzierten Entzündung der rechten Rattenhinterpfote, um die Interaktion von  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 unter Entzündungsbedingungen zu untersuchen (Stein et al., 1988).

### **Zunahme der TRPV1-Expression**

Eine Hochregulation von  $\mu$ -Rezeptoren sowohl auf Protein- als auch auf transkriptioneller Ebene in DRG-Neuronen nach einer lokalen Entzündung wurde in zahlreichen Untersuchungen bereits gezeigt. Anstiege von  $\mu$ -Rezeptor-mRNA-Transkripten sind zu sehr frühen Zeitpunkten (1-2 h) nach CFA-induzierter Entzündung zu beobachten (Puehler et al., 2004). Die Proteinexpression von  $\mu$ -Rezeptoren in DRG-Neuronen nimmt nach CFA-Injektion kontinuierlich zu (Zoellner et al., 2003). Wir nutzten die Methoden der Radioligandbindungsstudie und der Fluoreszenzimmunhistochemie, um 96 h nach CFA-induzierter Entzündung die TRPV1-Proteinexpression in DRG-Neuronen zu analysieren.

Die mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien bestimmte maximale Rezeptorkonzentration ( $B_{\max}$ ) von 234 fmol/mg und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 400 pmol unter Kontrollbedingungen bestätigen bereits veröffentlichte Daten: Szallasi und Blumberg fanden in DRG-Neuronen eine  $B_{\max}$  von 160 fmol/mg und eine  $K_D$  von 270 pmol (Szallasi und Blumberg, 1990). Erstmals konnten wir zeigen, dass 96 h nach CFA-induzierter Entzündung die TRPV1-positiven Bindungsstellen ( $B_{\max}$ ) um das 2,8-Fache zunahm. Die Dissoziationskonstante  $K_D$ , die das Bindungsverhalten und die Affinität von [ $^3$ H]Resiniferatoxin gegenüber TRPV1 charakterisiert, veränderte sich dagegen unter Entzündungsbedingungen nicht. Die Zunahme der TRPV1-Proteinexpression war nur nach der Elimination des Nucleotids Adenosin aus der Membranpräparation messbar. Wie von Puntambekar et al. gezeigt, ist Adenosin ein kompetitiver Antagonist an TRPV1 (Puntambekar et al., 2004). Unter Entzündungsbedingungen wird Adenosin verstärkt im peripheren Nervensystem ausgeschüttet (Sawynok und Liu, 2003). Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass Adenosin unter den experimentellen Bedingungen der CFA-induzierten Entzündung an TRPV1 bindet und dadurch den Radioliganden [ $^3$ H]Resiniferatoxin kompetitiv verdrängt. Die Adenosin-Deaminierung ermöglichte den enzymatischen Abbau von Adenosin und daraus resultierend vermutlich die vollständige Bindung von [ $^3$ H]Resiniferatoxin an TRPV1.

Immunhistochemisch konnten wir nachweisen, dass sowohl die Anzahl der  $\mu$ -Rezeptor- als

auch der TRPV1-positiven Neurone nach CFA-induzierter Entzündung zunahm. Auch der Anteil der Neurone, die  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 co-exprimierten, stieg von 14 % auf 22 % an. Auf mRNA-Ebene konnte mit Hilfe der Real-time-PCR keine entzündungsbedingte Hochregulation von TRPV1-mRNA-Transkripten detektiert werden, weder 96 h nach CFA-Injektion noch zu wesentlich früheren Zeitpunkten der Entzündung. Eine mögliche Erklärung für die Zunahme der TRPV1-positiven Bindungsstellen, nicht aber der mRNA-Transkripte nach CFA-induzierter Entzündung wäre, dass der Ionenkanal in intrazellulären Vesikeln gespeichert wird und erst durch den Entzündungsstimulus an die Zelloberfläche rekrutiert wird. Bezzerides et al. konnten diesen Mechanismus für TRPC5 nachweisen, dessen vermehrter Transport zur Plasmamembran durch Wachstumsfaktoren initiiert werden kann (Bezzerides et al., 2004). Zudem ist bekannt, dass TRPV1 in intravesikulären Vesikeln gespeichert wird und an die Zelloberfläche rekrutiert werden kann (Morenilla-Palao et al., 2004).

Die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen, die immunhistochemisch ebenfalls eine Hochregulation von TRPV1 auf Proteinebene, jedoch nur geringe Änderungen der mRNA-Transkripte detektierten, bestätigen unsere Ergebnisse. Amaya et al. zeigten eine Zunahme der TRPV1-Immunreaktivität in besonders klein- bis mittelzelligen DRG-Neuronen nach 2-tägiger CFA Entzündung von 27 % auf 44 % (Amaya et al., 2003). Neurone, die positive TRPV1-mRNA-Transkripte aufweisen, veränderten sich nur geringfügig von 43 % auf 48 % (Amaya et al., 2003). Ji et al. fanden eine Zunahme der TRPV1 Proteinexpression von 23 % auf 36 %, Breese et al. von 11 % auf 25 % (Breese et al., 2005; Ji et al., 2002). Die Anzahl der TRPV1-mRNA-Transkripte blieb dagegen nach 24 h, 48 h und 168 h CFA-induzierter Entzündung unverändert (Ji et al., 2002; Voilley et al., 2001). Eine entzündungsbedingte Hochregulation der TRPV1-Proteinexpression ist nicht nur in sensorischen Neuronen zu beobachten, sondern kann auch in der Darmmucosa von Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn nachgewiesen werden (Yiangou et al., 2001).

Gründe für die Zunahme der TRPV1-Proteinexpression ergeben sich aus dem Entzündungsstimulus. Periphere Entzündungen stimulieren die Ausschüttung des *Nerve Growth Factors* (NGF), der daraufhin vom Ort der Entzündung retrograd zu den Zellkörpern der DRG-Neurone transportiert wird. NGF führt dort zur Aktivierung der MAP Kinase p38, die wiederum die TRPV1-Expression anregt (Zhang et al., 2005b). Ji et al. zeigten bereits, dass die Hochregulation der TRPV1-Proteinexpression mit

---

verantwortlich für die Entstehung einer entzündungsbedingte Hyperalgesie ist (Ji et al., 2002). Unsere Ergebnisse unterstützen diese Hypothese: Hyperalgesie unter pathophysiologischen Konditionen ist zumindest partiell auf eine Zunahme der TRPV1-Proteinmenge zurückzuführen.

### **TRPV1-Inhibition unter Entzündungsbedingungen**

In den *whole-cell* Patch-Clamp-Untersuchungen waren 80 % der klein- bis mittelzelligen DRG-Neurone von CFA-behandelten Tieren capsaicinsensitiv. Morphin bewirkte in 70 % der capsaicinsensitiven DRG-Neurone von Tieren mit CFA-Entzündung eine Abnahme der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität. Die funktionellen Untersuchungen haben gezeigt, dass 30 % der Neurone keine Reduktion der TRPV1-Antwort zeigten. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich, analog zu den Ergebnissen unter physiologischen Konditionen, um Neurone, die den TRPV1, nicht jedoch den  $\mu$ -Rezeptor exprimieren.

Immunhistochemisch konnten wir zeigen, dass die Anzahl der TRPV1-positiven Neurone unter Entzündungsbedingungen um das 1,6-Fache zunahm und ebenfalls die Bindungsstellen für TRPV1 um das 2,8-Fache anstieg. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass sich sowohl die Anzahl der Neurone, bezogen auf die gesamte Population, als auch die Dichte von TRPV1 pro Neuron signifikant veränderte. Der Anstieg der TRPV1-Proteinexpression hatte allerdings keine Auswirkungen auf die TRPV1-Physiologie: 1) Die capsaicininduzierten TRPV1-Ionenströme unterschieden sich nicht signifikant zwischen Kontrollneuronen und Neuronen von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung; 2) die morphinbedingte TRPV1-Inhibition fiel unter pathophysiologischen Bedingungen ähnlich stark aus wie unter Kontrollbedingungen. Die Diskrepanz zwischen veränderter TRPV1-Proteinexpression und dennoch gleich bleibender TRPV1-Aktivität nach Morphinexposition könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Radioligandenbindungsstudien unmittelbar nach Entnahme der DRG-Neurone, dagegen die elektrophysiologischen Untersuchungen nach Kultivierung der DRG-Neurone für mindestens 6-12 Stunden durchgeführt wurden. Die Kultivierung für einen bestimmten Zeitraum nach Entnahme der DRG ist notwendig, da nur adhärente Zellen elektrophysiologisch untersucht werden können. Während dieser Zeit könnte es aufgrund des fehlenden Entzündungsreizes zu einer TRPV1-Internalisierung mit einer quantitativen Abnahme der TRPV1-Bindungsstellen von der Oberfläche der DRG-Neurone kommen.

Darüber hinaus könnte der fehlende Entzündungsstimulus *in vitro* zu einer Reduktion der TRPV1-Sensibilisierung führen. Bolyard et al. konnten zeigen, dass eine Sensibilisierung in DRG-Neuronen nur so lange anhält, wie der Stimulus, in diesem Fall ein „Entzündungscocktail“, der Bradykinin, Serotonin, Histamin, PGE<sub>2</sub> und KCl enthielt, vorhanden war (Bolyard et al., 2000). Das Entfernen der Entzündungsmediatoren führte bereits nach kurzer Zeit zu einer Abnahme der Sensibilisierung der DRG-Neurone. Dies könnte ein Hinweis sein, dass eine TRPV1-Sensibilisierung mit elektrophysiologischen Untersuchungen an dissoziierten DRG-Neuronen von Tieren mit CFA-Entzündung *in vitro* nicht nachgewiesen werden kann. Ein weiteres Indiz für diese Annahme ist der Befund, dass sich ebenfalls die cAMP-Konzentration der DRG-Neurone unter dem Einfluss der peripheren Entzündung nicht veränderte. In der Literatur ist die Zunahme der cAMP-Konzentration unter entzündlichen Bedingungen beschrieben (Elattar und Lin, 1981; Futami, 1977; Hingtgen et al., 1995). Da auch die cAMP-Messung *in vitro*, das heisst nach einer Kultivierung der DRG-Neurone für mindestens zwei Stunden in Abwesenheit von Entzündungsmediatoren durchgeführt wurde, ist es denkbar, dass auch hier Unterschiede der cAMP-Inhibition durch Opioide bei Tieren mit und ohne CFA-induzierter Entzündung nicht nachgewiesen werden konnten.

### **Thermale Hyperalgesie**

Um die physiologische Relevanz der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion *in vivo* zu untersuchen, haben wir versucht, eine capsaicininduzierte Hyperalgesie durch die lokale Gabe eines Opioids zu inhibieren. Hierbei wurde Morphin in einer Konzentration appliziert, die keine systemischen Effekte hervorruft. Eine zentrale analgetische Morphinwirkung konnte demzufolge ausgeschlossen werden. Bisher ist bekannt, dass Opioide ihre periphere analgetische Wirkung über eine Inhibition von Calciumkanälen und TTX-resistenten Natriumkanälen bewirken und in dessen Folge die neuronale Depolarisation und Schmerzweiterleitung hemmen (Stein et al., 2003). Capsaicin führt zu einer Hyperalgesie, die durch die Aktivierung des TRPV1 und den nachfolgenden Ioneneinstrom am TRPV1 hervorgerufen wird. Die capsaicininduzierte Hyperalgesie konnten wir durch die lokale Gabe von Morphin signifikant hemmen. Dies könnte ein indirekter Hinweis sein, dass Opioide *in vivo* inhibierende Eigenschaften am TRPV1-Ionenkanal induzieren können. Dies wurde auch in einer Untersuchung von Butelman et al.

---

in Primaten gezeigt (Butelman et al., 2004). In dieser Studie führte die subkutane Injektion von Loperamid zu einer signifikanten Reduktion der capsaicininduzierten Allodynie. Die Autoren schlossen auf einen peripher wirksamen analgetischen Effekt von Loperamid an TRPV1. Der capsaicininduzierte Ionenstrom *in vivo* könnte sekundär jedoch zu einer Sensibilisierung anderer Ionenkanäle führen, die ebenfalls an der Schmerztransduktion beteiligt sind. Möglicherweise ist der schmerzhemmende Effekt der Opioide, neben dem TRPV1, auch auf die Inhibition dieser Ionenkanäle zurückzuführen.

## 5.2 Hypothese 2: TRPV1-Sensibilisierung im Opioidentzug

Opioide stellen die bedeutsamsten Analgetika zur Bekämpfung von Schmerzen dar. Allerdings kann paradoxerweise häufig schon nach kurzer Zeit der Opioidexposition und anschließendem Opioidentzug eine Sensibilisierung gegenüber Schmerzreizen festgestellt werden. Tierexperimentelle Studien zeigen, dass der Entzug des Opioids nach lang andauernder oder wiederholter Opioidexposition zur Ausbildung einer thermalen Hyperalgesie und zur Allodynie führen kann. Tiere, die über mehrere Tage mit Opioiden behandelt wurden, zeigen nach Opioidentzug eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber physikalischen und thermischen Noxen (Mao, 2002). Ähnliche Beobachtungen wurden in Patienten gemacht, die nach Absetzen der Opioidbehandlung eine Hyperalgesie entwickeln (Koppert, 2004). Zudem gibt es Hinweise, dass Patienten, die intraoperativ hohe Opioiddosen erhielten, postoperativ größere Opioidmengen als Patienten ohne intraoperative Opioidbehandlung verbrauchten (Chia et al., 1999; Joly et al., 2005).

An der Entstehung der thermalen Hyperalgesie sind mehrere Faktoren entscheidend beteiligt. Ein Opioidentzug kann zur Aktivierung der Proteinkinase C führen (Galeotti et al., 2006). Die PKC ist in der Lage, Opioidrezeptoren und NMDA-Rezeptoren zu phosphorylieren (Mao et al., 1994). Die Opioidrezeptor-Phosphorylierung führt zur Rezeptor-Internalisierung und einer daraus resultierenden Rezeptor-Desensibilisierung. NMDA-Rezeptoren werden durch die PKC-induzierte Phosphorylierung aktiviert. Die Aktivierung führt zu einem erhöhten Calciumeinstrom, einer zusätzlichen calciumvermittelten Aktivierung von PKC und der Freisetzung exzitatorischer Neurotransmitter (Koppert, 2004). Die NMDA-Aktivierung sorgt insgesamt für eine Verstärkung zentraler Sensibilisierungsprozesse auf Hinterhornebene und dadurch zu einer erhöhten Nozizeption.

Opioide hemmen bei akuter Anwendung die Adenylylcyclasen-Aktivität und reduzieren dadurch die Bildung des intrazellulären Botenstoffes cAMP (Sharma et al., 1975b). Nach chronischer Opioidbehandlung mit anschließendem Entzug (Opioidentzug) kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulation der Adenylylcyclasen-Aktivität und einem daraus resultierenden Anstieg an intrazellulärem cAMP (Nestler und Aghajanian, 1997). Das Phänomen der cAMP-Akkumulation wurde erstmals von Sharma et al. beschrieben, die in einer Neuroblastom-Zelllinie zeigen konnten, dass nach 12 h Morphinexposition und



---

Morphinentzug sowohl die basale als auch die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-stimulierte Adenylylcyclasen-Aktivität drastisch zunimmt (Sharma et al., 1975a). Die erhöhte Adenylylcyclasen-Aktivität und cAMP-Akkumulation führt zu einer verstärkten Sezernierung von Neurotransmittern.

Eine Beteiligung des TRPV1-Ionenkanals an der durch Entzug des Opioids ausgelösten Hyperalgesie ist bisher nicht untersucht worden. Aufgrund der großen Bedeutung von TRPV1 an der Entstehung einer thermalen Hyperalgesie und der zuvor gewonnenen Erkenntnisse über die  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion, stellten wir uns die Frage, inwieweit sich die erhöhte Adenylylcyclasen-Aktivität und die damit verbundene kompensatorische Hochregulation der cAMP-Konzentration nach Opioidentzug auf die  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion auswirkt. Entsprechend unserer Hypothese führt die Zunahme der cAMP-Konzentration nach Opioidentzug zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, die daraufhin den Ionenkanal TRPV1 phosphoryliert und gegenüber noxischen Stimuli sensibilisiert.

Wir entschieden uns, die Untersuchungen in einem heterologen Expressionssystem durchzuführen und wählten HEK293-Zellen für die folgenden Experimente aus. HEK293-Zellen sind leicht transfizierbar und wurden zudem in zahlreichen Studien zur Analyse opioidvermittelter Effekte verwendet (Bot et al., 1997; Gharagozlou et al., 2003). Zudem wurde in einigen Untersuchungen bereits gezeigt, dass Morphinentzug in  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen eine cAMP-Superaktivierung auslösen kann (Blake et al., 1997; Koch et al., 2005; Wang und Sadee, 2000).

### **5.2.1 cAMP-Akkumulation**

Um unsere Hypothese zu überprüfen, analysierten wir im ersten Schritt die cAMP-Akkumulation nach Opioidentzug in  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen. Der cAMP-Gehalt der  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen veränderte sich unter basalen Bedingungen (keine zusätzliche FSK-Stimulation) nach chronischer Morphinexposition für 6 h mit anschließendem Entzug nicht. Die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration stieg nach 6 h Morphinexposition und anschließendem Morphinentzug jedoch im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um das 1,9-Fache an. Warum nahmen demnach die FSK-stimulierten Werte, nicht aber die basalen cAMP-

Werte nach Opioidentzug zu? Die Diskrepanz zwischen basalen und FSK-stimulierten cAMP-Konzentrationen lässt sich zum einen dadurch begründen, dass der intrazelluläre cAMP-Gehalt neben der Adenylylcyclasen-Aktivität durch Phosphodiesterasen reguliert wird, die cAMP stetig wieder zu ATP umsetzen. Unterschiede in basalen unstimulierten cAMP-Werten sind aufgrund der permanenten Phosphodiesterasen-Aktivität in *in-vitro*-Assays, trotz Phosphodiesterase-Hemmstoff, nur schwer herauszuarbeiten. Zum anderen erreicht der verwendete [<sup>3</sup>H]cAMP-Assay im Bereich der basalen cAMP-Werte sein Detektionslimit; die FSK-stimulierten Werte befinden sich dagegen in einem gut messbaren Detektionsbereich. Aus den oben genannten Gründen stellt die zusätzliche FSK-Stimulation daher eine seit Jahren in der Opioidforschung etablierte und geeignete Methode dar, um Veränderungen der cAMP-Konzentration nachzuweisen (Wang und Sadee, 2000).

Der Anstieg des FSK-stimulierten cAMP-Gehalts nach Morphinentzug ist mit Ergebnissen anderer Gruppen vergleichbar: Wang und Sadee konnten in stabil transfizierten  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen eine morphinbedingte Zunahme der FSK-stimulierten cAMP-Konzentration um das 3,0-Fache darlegen (Wang und Sadee, 2000). Blake et al. zeigten ebenfalls in HEK293-Zellen bereits nach 3 h Morphinexposition eine FSK-bedingte cAMP-Akkumulation um das 3,4-Fache (Blake et al., 1997). Eine FSK-induzierte cAMP-Akkumulation in endogenen  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen um das 1,3-Fache wurde nach 18 h Morphin mit darauf folgendem Entzug beobachtet (Mouledous et al., 2005).

### **5.2.2 Zunahme der Adenylylcyclasen-mRNA**

Um zu analysieren, welche Adenylylcyclasen die cAMP-Hochregulation nach chronischer Opioidexposition und Opioidentzug induzierten, wurden die mRNA-Transkripte unterschiedlich regulierter Adenylylcyclasen mit Hilfe der Real-time-PCR untersucht.

In  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen konnten wir zeigen, dass nach 6 h chronischer Morphinexposition und anschließendem Morphinentzug die Transkripte der Adenylylcyclasen AC3 und AC5 signifikant anstiegen. AC3 und AC5 sind demnach wahrscheinlich für die Hochregulation der intrazellulären cAMP-Konzentration im Opioidentzug verantwortlich. Abschließend untersucht werden könnte diese Hypothese

---

beispielsweise mit der *siRNA* Technik, in dem AC3- und AC5-RNA spezifisch blockiert und die Auswirkung der Blockade auf die cAMP-Konzentration analysiert wird. Zudem ist in weiteren Untersuchungen zu klären, ob ebenfalls die Proteinexpression von AC3 und AC5 zunehmen. Nicht zwangsläufig führt eine Zunahme der mRNA-Transkripte zu einer erhöhten Proteinbiosynthese.

Die Expression der Adenylylcyclasen AC2, AC6 und AC9 blieb unverändert. AC1, AC4, AC7 und AC8 konnten von uns nicht amplifiziert werden, was darauf zurückgeführt werden kann, dass diese Cyclasen 1) entweder nicht von diesem Zellsystem exprimiert werden oder 2) von uns aufgrund ungeeigneter Primer oder Amplifikationsbedingungen nicht detektiert werden konnten.

An der Hochregulation der cAMP-Konzentration nach langzeitiger Applikation von Opioiden ist die kompensatorische Hochregulation von  $G_{\alpha s}$ -Proteinen beteiligt (Ammer und Schulz, 1997; Watts, 2002). Untersuchungen von Mouledous et al. zeigten, dass nach chronischer Morphinbehandlung  $G_{\alpha i}$ - und  $G_{\beta}$ -Einheiten durch proteolytische Vorgänge degradiert werden (Mouledous et al., 2005). Der inhibierende Effekt von  $G_{\alpha i}$  tritt daraufhin in den Hintergrund, währenddessen die stimulatorischen Eigenschaften von  $G_{\alpha s}$  eher zur Geltung kommen.  $G_{\alpha s}$ -Proteine können den PLC-PKC-Signaltransduktionsweg aktivieren. Die Proteinkinase C ist in der Lage, spannungsabhängige Calciumkanäle zu aktivieren und somit einen Calciumeinstrom in das Zellinnere zu induzieren. Dieser Mechanismus kann möglicherweise die Sensibilisierung der calciumaktivierbaren AC3 erklären.

AC5 präsentiert eine Adenylylcyclase, die hauptsächlich durch  $G_{\alpha i}$ -Proteine inhibiert wird. Die Zunahme der AC5-mRNA-Expression nach Opioidentzug kann durch die Degradation von  $G_{\alpha i}$ -Proteinen erklärt werden (Mouledous et al., 2005). Die Beteiligung der AC5 an der durch Opioidentzug bedingten cAMP-Akkumulation wird durch Befunde in AC5-Knockout-Mäusen gestützt: Typische opioidvermittelte Effekte wie Analgesie, aber auch die Entstehung von Opioidtoleranz und Opioidentzug sind in AC5-Knockout-Mäusen deutlich schwächer ausgeprägt als in Kontrolltieren (Kim et al., 2006).

Daten über die quantitative Expressionsanalyse von Adenylylcyclasen nach chronischer Opioidexposition wurden bisher zwar in mehreren heterologen Expressionssystemen, nicht jedoch in  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen erhoben. Avidor-Reiss et al. und Nevo et al. konnten in  $\mu$ -Rezeptor-exprimierenden COS-7 Zellen zeigen, dass die mRNA-Transkripte der Adenylylcyclasen AC1, AC5, AC6 und AC8 nach chronischer Morphinapplikation mit anschließendem Entzug hochreguliert werden (Avidor-Reiss et al.,

1997; Nevo et al., 1998). In Neuronen des *Nucleus Raphe Magnus* (NRM) der Ratte nimmt nach Morphinentzug die mRNA-Expression von AC6 und AC7 zu (Bie et al., 2005). Alles in allem scheint die Expression und Regulation der Adenylylcyclasen je nach Gewebetyp oder Zelllinie sehr variabel zu sein.

### 5.2.3 TRPV1-Sensibilisierung

Um die Interaktion zwischen  $\mu$ -Rezeptoren und TRPV1 nach chronischer Opioidexposition mit anschließendem Opioidentzug aufzuzeigen, sollte in *whole-cell* Patch-Clamp-Experimenten untersucht werden, ob sich die cAMP-Akkumulation nach Morphin- bzw. nach Fentanylentzug auf die capsaicininduzierte Aktivität des Ionenkanals TRPV1 auswirkt.

In  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen konnten wir zuvor zeigen, dass sich 6 h nach chronischer Opioidexposition und anschließendem Opioidentzug die basale cAMP-Konzentration nicht veränderte, jedoch die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration signifikant zunahm. Zeitgleich zu einem Anstieg der cAMP-Konzentration nach Opioidentzug ist eine Sensibilisierung von TRPV1 gegenüber Capsaicin festzustellen: Während sich nach 6 h Morphinexposition und anschließendem Morphinentzug die capsaicininduzierten TRPV1-Ionenströme nur gering veränderten, nahmen diese nach zusätzlicher FSK-Stimulation signifikant zu. Die TRPV1-Sensibilisierung durch Morphin korreliert demzufolge stark mit der cAMP-Akkumulation nach Morphinentzug.

Die morphinbedingte Sensibilisierung von TRPV1 war durch den  $\mu$ -Rezeptor-Antagonisten Naloxon blockierbar und daher  $\mu$ -Rezeptor-vermittelt. Die Zunahme der TRPV1-Aktivität nach Morphinentzug ist nicht auf eine direkte Interaktion von  $G_{\beta\gamma}$  mit dem Ionenkanal zurückzuführen, da die TRPV1-Sensibilisierung nach Morphinentzug ebenfalls in Zellen zu beobachten war, deren aktivierte  $G_{\beta\gamma}$ -Proteine durch den  $G_{\beta\gamma}$ -scavenger  $\beta$ -ark-ct inaktiviert wurden.

Der cAMP-PKA-Signalweg ist entscheidend an der Entstehung eines Opioidentzugs beteiligt: Untersuchungen zeigen, dass die cAMP-Superaktivierung nach Opioidentzug im ZNS zu einer gesteigerten synaptischen Transmission beiträgt. Bie et al. konnten nachweisen, dass die cAMP-Hochregulation nach Morphinentzug die glutamaterge präsynaptische Transmission steigert (Bie et al., 2005). Zudem bewirkt eine erhöhte PKA-

---

Aktivität eine Steigerung der Aktionspotentialrate während eines Opioidzugs (Bagley et al., 2005). PKA ist für die Entstehung der Hyperalgesie nach Opioidzug essentiell (Malmberg et al., 1997). PKA-Inhibitoren wirken einer Hyperalgesie entgegen, während Aktivatoren des cAMP-PKA-Signalweges die Schwelle für nozizeptive Reize herabsenken (Punch et al., 1997).

Die Beteiligung des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs konnte durch die gleichzeitige Applikation mit dem PKA-Inhibitor H-89 bestätigt werden. H-89 führte in unseren Untersuchungen dosisabhängig zu einer Inhibition der morphininduzierten TRPV1-Aktivierung. Zahlreiche Untersuchungen zeigen, dass TRPV1 auch durch weitere Modulatoren des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs sensibilisiert werden kann und unterstützen unser Ergebnis, dass der cAMP-PKA-Signalweg an der TRPV1-Sensibilisierung nach Opioidzug beteiligt ist. Die Entzündungsmediatoren Prostaglandin E<sub>2</sub> und Anandamid sensibilisieren TRPV1, vermittelt durch den cAMP-PKA-Signalweg (De Petrocellis et al., 2001; Hu et al., 2002; Moriyama et al., 2005). Das Prostanoid Prostaglandin-E<sub>2</sub> wird unter dem Einfluss pathophysiologischer Prozesse nach Aktivierung der Arachidonsäure-COX-Kaskade freigesetzt. Es sensibilisiert TRPV1 gegenüber Capsaicin (Hu et al., 2002). Die TRPV1-Sensibilisierung ist durch PKA-Inhibitoren vollständig aufhebbar. Anandamid ist ein Arachidonsäure-Metabolit und Cannabinoid-Rezeptor-Ligand, der ebenfalls die capsaicininduzierte TRPV1-Aktivität PKA-vermittelt potenzieren kann (De Petrocellis et al., 2001). Sugiura et al. zeigten, dass Serotonin protoneninduzierte TRPV1-Ströme potenziert und die Aktivierungsschwelle für Hitze deutlich herabsetzt (Sugiura et al., 2004). Serotonin bindet an G<sub>s</sub>-Protein gekoppelte Serotonin-Rezeptoren, die daraufhin die Aktivität der Proteinkinase A positiv beeinflussen.

### 5.3 Ausblick und klinische Relevanz

Opioide hemmen die capsaicin- und hitzeinduzierte TRPV1-Aktivität in sensorischen DRG-Neuronen und in  $\mu$ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen. Die Inhibition der TRPV1-Aktivität wird durch den cAMP-Signaltransduktionsweg vermittelt (Abbildung 5.1). Eine direkte Interaktion von  $G_{\beta\gamma}$  mit TRPV1, wie sie für die Modulation anderer Ionenkanäle durch Opiode beschrieben ist, konnte nicht nachgewiesen werden (Law et al., 2000). Da in zahlreichen Studien gezeigt wurde, dass die Sensibilisierung des TRPV1-Ionenkanals massgeblich am Entzündungsschmerz beteiligt ist, wurden unsere Untersuchungen auf das Tiermodell der CFA-induzierten Entzündung ausgedehnt. Unter Entzündungsbedingungen konnten wir in sensorischen DRG-Neuronen eine Zunahme der TRPV1-Proteinexpression, nicht jedoch der TRPV1-mRNA, nachweisen. Auch unter Entzündungsbedingungen führte die akute Applikation von Opioiden zu einer signifikanten Inhibition der TRPV1-Aktivität.

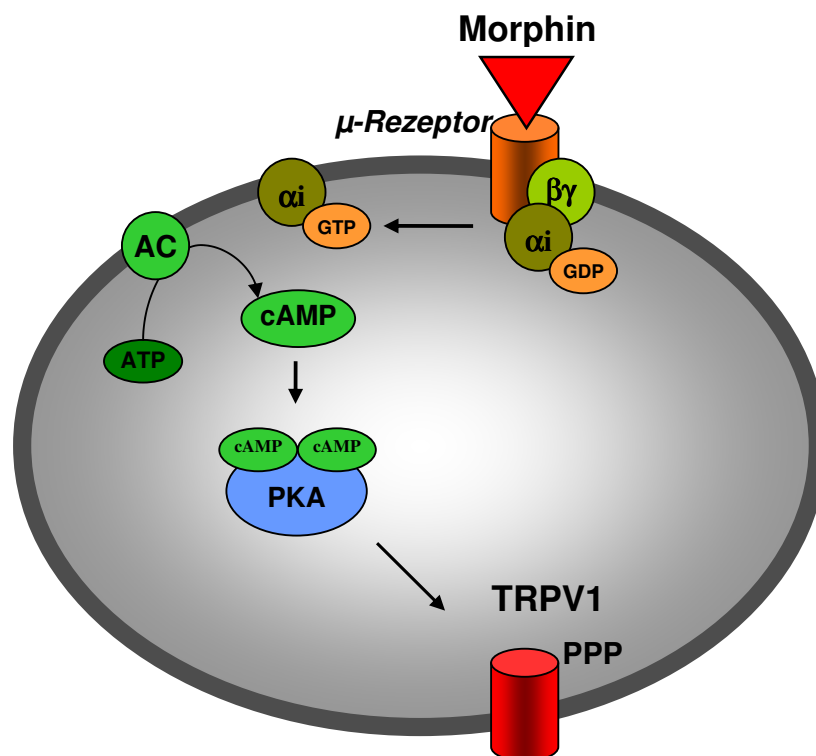
Im Gegensatz hierzu wurde im Opioidentzug TRPV1 gegenüber noxischen Stimuli sensibilisiert. Die TRPV1-Sensibilisierung durch Opiode ist auf eine erhöhte PKA-Aktivität zurückzuführen, die durch eine kompensatorische cAMP-Hochregulation nach Opioidentzug ausgelöst wird (Abbildung 5.1). Hauptsächlich die Adenylylcyclasen AC3 und AC5 trugen zur erhöhten Umsetzung von ATP zu cAMP und dem anschließenden Anstieg der PKA-Aktivität bei.

Im Focus dieser Arbeit stand die Beteiligung des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs an der opioidvermittelten TRPV1-Modulation. Nicht auszuschließen ist, dass weitere Signalwege an der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion beteiligt sind. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass cAMP nicht nur die Proteinkinase A, sondern auch die Proteinkinase C $\epsilon$ , vermittelt durch den *cAMP-activated guanine exchange factor* EPAC, aktivieren kann (Hucho et al., 2005). Eine mögliche Beteiligung der PKC $\epsilon$  an der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion stellt eine Fragestellung für weiterführende Untersuchungen dar. Zudem ist zu klären, ob andere Mitglieder der TRP-Ionenkanalfamilie, zum Beispiel der hitzesensible TRPV2-Ionenkanal oder der kälteempfindliche Ionenkanal TRPA1 durch Opiode moduliert werden können.

Opiode vermitteln ihre analgetische Wirkung und auch zahlreiche unerwünschte Nebenwirkungen nicht nur über den  $\mu$ -Rezeptor, sondern ebenfalls über  $\delta$ - und  $\kappa$ -

Rezeptoren. Abschließend bleibt zu klären, ob eine opioidbedingte TRPV1-Modulation auch durch Aktivierung dieser beiden Opioidrezeptor-Typen zu erzielen wäre.

Durch ein besseres Verständnis aller an der Transduktion nozizeptiver und antinozizeptiver Informationen beteiligten Mechanismen ist es möglich, neue Targets für die Therapie akuter und chronischer Schmerzen zu entwickeln. Bisher war bekannt, dass Opiode spannungsabhängige Ionenkanäle wie Calciumkanäle (Typ N-, P/Q-, R-) und TTX-resistente Natriumkanäle in primär afferenten Neuronen modulieren. Diese Mechanismen führen zur opioidvermittelten Reduktion der Schmerzweiterleitung im peripheren



**Abbildung 5.1: Darstellung der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion und der zugrunde liegenden intrazellulären Mechanismen.** Nach kurzzeitiger Applikation von Opioiden, zum Beispiel Morphin, werden Adenylylcyclasen gehemmt. Dies resultiert in einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die cAMP-Reduktion führt daraufhin zu einer Reduktion der capsaicin- und hitzeinduzierten TRPV1-Aktivität. Werden Opiode über einen längeren Zeitraum appliziert und dann entzogen (Opioidentzug), kommt es zu einer kompensatorischen Hochregulation der Adenylylcyclasen AC3 und AC5 und einem damit verbundenen Anstieg der cAMP-Konzentration. Aufgrund einer Zunahme der PKA-Aktivität wird TRPV1 phosphoryliert (PPP) und gegenüber dem noxischen Stimuli Capsaicin sensibilisiert.

Nervensystem. Unsere Untersuchungen konnten einen weiteren zellulären Mechanismus nachweisen, der vor allem beim Entzündungsschmerz zur opioidvermittelten Analgesie beiträgt:

Akut applizierte Opioide senken die Empfindlichkeit des Ionenkanals TRPV1 gegenüber noxischen Reizen etwa wie Capsaicin und Hitze. Die *in-vivo*-erzielten Ergebnisse veranschaulichen zudem die klinische Relevanz der  $\mu$ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion. Unsere Daten verdeutlichen, dass lokal applizierte Opioide in der Lage sind, entzündungsbedingte Schmerzen zu therapieren. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass der Opioidentzug zu einer Sensibilisierung der TRPV1-Aktivität führen kann. Die Sensibilisierung der TRPV1-Aktivität beim Opioidentzug könnte zu der in tierexperimentellen Studien und klinischen Untersuchungen mit opioidabhängigen Patienten (Barrett et al., 2003; Ferrer-Alcon et al., 2004) nachgewiesenen Hyperalgesie auf thermische Reize beitragen.