

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien und Bakterien

Escherichia coli-Zellen (E. coli) DH5 α	Invitrogen, Carlsbad, USA
HEK-293 (<i>human embryonic kidney</i>)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig

3.1.2 Tiere

Männliche Wistar-Ratten (180 - 240g) wurden in der Abteilung für Infektionsbiologie der Charité - Universitätsmedizin Berlin, Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, gehalten. Die Raumtemperatur betrug gleichbleibend 22°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40 - 60 % und einem Tag/Nacht- Rhythmus von jeweils 12 h.

3.1.3 Chemikalien und Radiochemikalien

[³ H] D-Ala ² -N-MePhe ⁴ -Gly ⁵ -ol-enkephalin (DAMGO)	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
[³ H] Resiniferatoxin	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
8-Bromo-cAMP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Agarose	Roche Diagnostics, Mannheim
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Buprenorphin HCl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Capsaicin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Capsazepin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DAMGO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Desoxyribonukleosidtriphosphat Mix (dNTP)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dithiothreitol (DTT)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dynabeads® M-450 CD8	Dynal Biotec, Oslo, Norwegen
Ethylendiamine-tetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fentanylcitrat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Forskolin (FSK)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glucose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Glycerin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Morphinsulfat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
N-[2-p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid (H-89)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natrium-ATP	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Naloxon (NLX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pertussistoxin (PTX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Picrinsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Polyethylenimin (PEI)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Poly-l-lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Primer(dT)15 <i>for cDNA synthesis</i>	Roche Diagnostics, Mannheim

Resiniferatoxin (RTX)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
t-Octylphenoxypolyethoxyethanol (Triton X-100)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	Roche Diagnostics, Mannheim

3.1.4 Enzyme

Adenosin-Deaminase	Sigma Aldrich, Taufkirchen
DNase, RNase-frei	Qiagen, Hilden
EcoR I (5'-GAATTC-3')	Invitrogen, Carlsbad, USA
Hind III (5'-AAGCTT-3')	Invitrogen, Carlsbad, USA
Kollagenase Typ II	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Reverse Transkriptase, AMV	Roche Diagnostics, Mannheim
RNase Inhibitor (40 U/ μ l)	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin Typ I	Sigma Aldrich, Taufkirchen

3.1.5 Antikörper und Antiseren

Esel anti-Meerschweinchen FITC	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Kaninchen anti- μ -Rezeptor	S. Schulz, V. Höllt, Pharmakologie, Universität Magdeburg
Meerschweinchen anti-TRPV1	Neuromics, Minneapolis, USA
Ziege anti-Kaninchen <i>Texas red</i>	Vector Laboratories, Burlingame, USA

3.1.6 Reaktionssysteme

cAMP Biotrak Enzymimmunoassay (EIA) System	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Fast Start DNA Master ^{PLUS} SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim
[³ H]cAMP Assay Kit	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Fugene® 6	Roche Diagnostics, Mannheim

Qiafilter™ Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
RNEasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden

3.1.7 Medien, Puffer, Lösungen

<i>DNA Molecular Weight Marker XIV</i> (100 bp)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>DNA Molecular Weight Marker XIV</i> (123 bp)	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Complete Freund's Adjuvant</i> (CFA)	Calbiochem, San Diego, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM)	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Eselserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethanol (99 %)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Isofluran	Willy Rüscher GmbH, Böblingen
Isopropanol	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum (FBS)	Biochrom, Berlin
LB-Agar	Invitrogen, Carlsbad, USA
LB-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
<i>Modified Eagle Medium</i> (MEM) <i>Earle's</i>	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Na-Hypochloritlösung, 6-14 % aktives Chlor	Merck, Darmstadt
<i>non essential amino acids</i> (NEAS)	Biochrom, Berlin
<i>phosphate buffered saline</i> (PBS); 0,1 M	Biochrom, Berlin
Pferdeserum	Biochrom, Berlin
Penicillin (10.000U)/Streptomycin (10.000 µg/ml)	Biochrom, Berlin
Protein Assay Dye Reagenz	Bio-Rad Laboratories, München
REACT II (10 x) Puffer	Invitrogen, Carlsbad, USA
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Carlsbad, USA
Schwefelsäure, konzentriert	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Szintillationsflüssigkeit "High Safe3"	PerkinElmer, Wellesley, USA
Trypsin (0,05 %) /EDTA (0,02 %) in PBS	Biochrom, Berlin
Ziegenserum	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3.1.8 Verbrauchsmaterialien

Borosilicatglaskapillaren mit Filament	Hilgenberg, Malsfeld
GF/B Glasfiber Filter	Whatman, Brentford, Großbritannien
Kryogefäße 1,5 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
LightCycler Kapillaren	Roche, Mannheim
Pistill DSTROY-S	Biozym, Hessisch Oldendorf
QIAShredder	Qiagen, Hilden
Silberdraht 0,25 mm	WPI Inc., Sarasota, USA
Sterilfilter	Millipore GmbH, Eschborn
Tissue-Tek	Miles Inc., Elkhart, USA

3.1.9 Geräte

1414 Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer Wallac GmbH, Freiburg
CO ₂ -Zellinkubator	Heraeus, Kleinostheim
Elektrophoresekammer Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories, München
Filtersatz 13	Zeiss, Göttingen
Hauptverstärker EPC-10	HEKA, Lambrecht
HS18 Laminar Airflow	Heraeus, Kleinostheim
Kryostat (Microm HM560)	MICROM International, Walldorf
Lasermikroskop, konfokales	Zeiss, Jena
LightCycler	Roche, Mannheim
M-48 Harvester	Brandel, Gaithersburg, USA
PCR Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg
Micro-Forge MF-200	WPI Inc., Sarasota, USA
Micromanipulator 5171	Eppendorf, Hamburg
Micropipette Puller P-97	Sutter Instrument, Novato, USA
Mikroskop H602-240	WPI Inc., Sarasota, USA
Mikroskop Zeiss Axiovert 200	Zeiss, Göttingen
Mikrowelle	Galanz Inc., Ontario, Kanada
Objektiv „A-Plan“ 10x/0,25 Ph1	Zeiss, Göttingen

Objektiv „LD Achroplan“ 63x/0,75 Korr. Ph2	Zeiss, Göttingen
Photometer Gene Quant II	Pharmacia Biotech, Piscataway, USA
Polychrome V	Till Photonics, Gräfeling
<i>Six channel valve controller</i>	Warner Instruments, Hamden, USA
SPECTRAmax® Spectrophotometer	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Temperature controller RDTC-1	ESF electronic, Göttingen
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
UV Licht (Macro Vue=25)	Hoefer Inc. San Francisco, USA
UV-1601 Spectrophotometer	Shimadzu, Duisburg
Zentrifuge Avanti TM J-25	Beckmann, München
Zentrifuge Rotixa 50 RS	Hettrich Zentrifugen, Königs Wusterhausen
Zentrifuge Varifuge 3.0R	Heraeus, Kleinostheim

3.2 Methoden

3.2.1 Tierexperimentelle Untersuchungen

CFA-induzierte Entzündung der rechten Rattenhinterpfote

Die Entzündung der rechten Pfote der männlichen Wistar-Ratte wurde durch intraplantare Injektion (i.pl.) von 0,15 ml *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)-Suspension erzielt. Kontrolltiere erhielten eine Injektion von 0,15 ml isotoner NaCl-Lösung ebenfalls in die rechte Hinterpfote. Die Injektionen erfolgten unter Isoflurannarkose.

Das Entzündungsmodell ist in der Arbeitsgruppe der Anaesthesiologie etabliert (Stein et al., 1990; Zoellner et al., 2003), wurde im Rahmen des KFO-Teilprojekts „*Opioid treatment and the effects on nociceptor specific ion channels*“ vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit (LaGetSi, Berlin; Registrierungsnummer G 0109/04) genehmigt und entspricht den Richtlinien „*ethical standards for investigations of experimental pain in animals*“ (Zimmermann, 1983).

Die Kultivierung von Hinterwurzelganglien-Neuronen (DRG-Neuronen)

Für die elektrophysiologischen Experimenten wurden DRG-Neurone in Kultur gebracht. Männliche Wistar-Ratten wurden durch eine Überdosis Isofluran getötet. Die dorsalen Hinterwurzelganglien (*dorsal root ganglia*; DRG) L3 - L5 wurden entnommen. Das entnommene Gewebe wurde in MEM Earle's Medium (1 ml) überführt und 50 min bei 37°C mit Kollagenase Typ II (3 mg/ml) inkubiert (Moises et al., 1994). Anschließend wurde Trypsin Typ I (1 mg/ml) für 10 min bei 37°C zugegeben. Die Gewebesuspension wurde vorsichtig 8-10 Mal unter aseptischen Bedingungen auf- und abpipettiert. Nach Zentrifugation für 5 min bei 500 g und 4°C wurde der Überstand abgossen, das Gewebepellet erneut in PBS aufgenommen und nochmals für 5 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Gewebe wurde in MEM-Earle's Medium (+ 10 % Pferdeserum und 5 % Penicillin/Streptomycin [P/S]) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf mit Poly-l-lysin (1 % [w/v]) beschichtete Zellkulturschalen (Ø 20 mm) gegeben und in einem Inkubator mit 5% CO₂-Gehalt für 6 - 12 h kultiviert.

Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. S.A. Mousa, (Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin) durchgeführt. Mit Hilfe der Immunhistochemie wurde die μ -Rezeptor- und TRPV1-positive Immunreaktivität in DRG-Neuronen detektiert und quantifiziert.

Männliche Wistar-Ratten wurden mit Isofluran narkotisiert und transkardial zuerst mit PBS (0,1 M; pH=7,4), danach mit Fixierpuffer (4 % Paraformaldehyd, 0,2 % Picrinsäure in PBS; pH=6,9) perfundiert. Die lumbalen DRG L3 - L5 wurden entnommen und anschließend 1) für 90 min bei 4°C in Fixierpuffer und 2) in 10 % sucrosehaltigem PBS über Nacht bei 4°C inkubiert. Das Gewebe wurde in Tissue-Tek gebettet, mit Hilfe eines Cryostats geschnitten (9 μ m) und auf gelatinebenetzte Glasträger aufgebracht. Um die unspezifische Bindung zu reduzieren, wurden die Schnitte mit 0,3 % Triton X-100, 1 % BSA, 4 % Ziegen Serum, and 4 % Esel Serum in PBS inkubiert. Die Schnitte wurden über Nacht bei 4°C mit Kaninchen anti- μ -Rezeptor in Kombination mit Meerschweinchen anti-TRPV1-Antikörper (1:1000) und danach mit Ziege anti-Kaninchen conjugated *Texas red* (1:250) und Esel anti-Meerschweinchen conjugated FITC (1:250) gefärbt. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit Vectashield fixiert.

Die Aufnahmen entstanden mit einem konfokalen Lasermikroskop bei einer Wellenlänge von 488 nm für FITC und 543 nm für *Texas red*. Die Quantifizierung erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von Ji et al. (Ji et al., 1995). Es wurden Schnitte von 5 Tieren ausgezählt. Pro Tier wurden 60 immunreaktive nucleushaltige Neurone aus 4 Schnitten quantifiziert. Der Anteil der μ -Rezeptor- und TRPV1-positiven Neurone wurde jeweils prozentual auf die Gesamtzahl der DRG-Neurone bezogen. Zusätzlich wurde die Anzahl der sowohl μ -Rezeptor- als auch TRPV1-positiven Neurone bestimmt.

Bestimmung der thermalen Hyperalgesie

Die Analyse der thermalen Hyperalgesie nach Capsaicininjektion in die Rattenhinterpfote erfolgte mit dem Hargreaves-Test. Die Verhaltensexperimente führte Frau Dr. Dominica Labuz (Klinik für Anaesthesiologie und Intensivmedizin, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin) durch.

Als Maß für die Schmerzempfindlichkeit wurde die Zeit bestimmt, nach der das Tier die Pfote aufgrund eines Hitzestimulus reflexartig wegzieht (*paw withdrawal latency* [PWL])

(Hargreaves et al., 1988). Die Ratte wurde in eine durchsichtige Plastikkammer mit Glasboden (Analgesia Meter; Modell 336; Firma IITC Life Science, Woodland Hills, USA) gesetzt. Mit Hilfe einer hitzeemittierenden Lampe, die von unten auf den Plastikboden gerichtet war, wurde die Plantarseite der Rattenhinterpfote bestrahlt. Die Hitzeintensität wurde so eingestellt, dass die basale PWL ungefähr 9 - 10 sec betrug. Nach spätestens 20 sec wurde das Experiment in jedem Fall abgebrochen, um Gewebeschädigungen zu vermeiden (*cut-off*). Die Algesiemesung wurde pro Pfote zweimal im Abstand von 30 sec durchgeführt. Aus den beiden Einzelwerten wurde der Mittelwert berechnet und für die statistische Analyse verwendet.

Die PWL wurde nach intraplantarer Capsaicininjektion (30 µg in 10 µl Ethanol) in die rechte Rattenhinterpfote untersucht. Die Algesiemesung wurde 15, 30, 45 und 60 min später durchgeführt. In einem zweiten Experiment wurde 10 min nach der Capsaicininjektion zusätzlich Morphin (100 µg in 20 µl H₂O) injiziert. 5 min später wurde erneut die PWL bestimmt.

3.2.2 Zellbiologische Techniken

Kultivierung der Zelllinie HEK293

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine humane embryonale Nierenzelllinie (HEK293) verwendet. HEK293-Zellen exprimieren endogen weder μ -Rezeptoren noch TRPV1 (Blake et al., 1997). HEK293-Zellen wurden in DMEM mit Zusatz von 10 % *fetal bovine serum* (FBS) und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C im Zellinkubator mit 5 % CO₂-Gehalt in Zellkulturflaschen kultiviert. Alle 3 - 4 Tage wurden die adherent wachsenden HEK293-Zellen vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen, danach mit Trypsin/EDTA-Lösung für 5 min vom Flaschenboden gelöst, anschließend bei 500 g für 5 min zentrifugiert, im Medium resuspendiert und im Verhältnis 1:5 - 1:10 passagiert. Spätestens nach der 25. Passage wurden die Zellen verworfen.

Allgemeine Grundlagen der Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion ermöglicht es, Fremd-DNA in eine lebende Zelle zu schleusen. Die Zelle ist anhand der genetischen Information der eingeschleusten DNA in der Lage, das gewünschte Protein zu exprimieren. Die zu transfizierende DNA ist in der Regel in ein Vektorsystem eingebaut, das zumeist ein Antibiotika-Resistenzgen als Selektionsmarker, eine Promotersequenz und mehrere Schnittstellen für Restriktionsenzyme enthält.

Die negative Ladung der DNA und die ebenfalls negative Ladung der Zellmembran resultieren in einer Abstoßungsreaktion, die mit Hilfe der Lipofektion umgangen werden kann. Bei der Lipofektion wird ein Komplex aus DNA und einem kationischen Lipid gebildet. Der resultierende DNA-Lipid-Komplex kann die Zellmembran endozytotisch passieren. Bei einer *stabilen Transfektion* wird die eingeschleuste DNA daraufhin in das Genom der Wirtszelle aufgenommen, wohingegen bei der *transienten Transfektion* die genetische Information der Fremd-DNA nicht ins Genom aufgenommen wird, sondern frei als Plasmid in der Zelle vorliegt. Bei der transienten Transfektion geht die genetische Information durch Teilung der Zellen verloren.

Transiente Transfektion

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen sowie für die Bestimmung der cAMP-Konzentration und der mRNA-Transkripte (von Adenylylcyclasen und TRPV1) wurden HEK293-Zellen transient mit μ -Rezeptor- und/oder TRPV1-Plasmid-DNA transfiziert. Die transiente Transfektion erfolgte mit Fugene®, einem lipidhaltigem Transfektionsreagenz, nach Angaben des Herstellers.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen (siehe auch Kapitel 3.2.7) wurden HEK293-Zellen in Kulturschalen (\varnothing 3,5 cm) ausgesät und nach zwei Tagen bei einer Konfluenz von 70 - 80 % - je nach Fragestellung - mit 3,0 μ l Fugene® und

- 0,25 - 1,00 μ g TRPV1-YFP
- 1,0 μ g μ -Rezeptor
- 1,0 μ g β -ark-ct

nach Angaben des Herstellers in serumhaltigem Medium transfiziert. 6 - 12 h nach der Transfektion wurden die Zellen durch Auf- und Abpipettieren in Trypsin/EDTA-Lösung vereinzelt, zentrifugiert (500 g, 5 min, 4°C), in frischem Medium resuspendiert und auf mit Poly-l-lysin beschichteten 20 mm-Kulturschalen sehr dünn ausgesät.

Für die cAMP-Messungen und die Real-time-PCR (siehe auch Kapitel 3.2.3 und 3.2.5) erfolgte die Transfektion der Zellen bei einer Konfluenz von ca. 80 % in mit Poly-l-lysin beschichteten Kulturschalen (10 cm) mit 2,0 μ g TRPV1, 2,0 μ g μ -Rezeptor und 6,0 μ l Fugene® in serumhaltigem Medium.

Vektoren und Plasmide für die Transfektion

Für die Transfektionen wurden verschiedene Plasmid-DNA-Konstrukte (Tabelle 2) verwendet. Als Vektor diente in allen Fällen pcDNA3.1 (Invitrogen, Leek, NL), der einen CMV-Promoter, ein Ampicillin- sowie ein Neomycin-Resistenzgen beinhaltet.

Tabelle 2: Plasmid-DNA mit Angabe des Vektors, des Bezugs und der Spezies

DNA	Vektor	Bezug	Spezies
β -ark-ct	pcDNA3.1	Alexander Oksche, Charité Berlin, Pharmakologie	Ratte
μ -Rezeptor	pcDNA3.1	Christian Zöllner, Charité Berlin, Anästhesiologie	Ratte
TRPV1-YFP	pcDNA3.1	Michael Schaefer, Charité Berlin, Pharmakologie	Ratte

Transformation und Vervielfältigung von Plasmid-DNA

Um ausreichende Mengen an Plasmid-DNA für die Transfektionen zu gewinnen, wird diese durch Transformation in Bakterien (*E. coli*) eingeschleust, um anschließend vervielfältigt zu werden. Während eines Hitzeschocks bei 42°C wird die Plasmid-DNA von den Bakterienzellen aufgenommen.

E. coli-Zellen wurden auf Eis getaut, 1 µl des Reaktionsansatzes (1,0-10,0 ng Plasmid-DNA) mit 100 µl Zellsuspension vermennt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 45 sec auf 42°C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 900 µl SOC-Medium wurde der Ansatz bei 225 rpm (37°C) für 1 h inkubiert. 20 µl bzw. 200 µl des Ansatzes wurden auf ampicillinhaltige (50 µg/ml) Luria-Bertani (LB)-Agarplatten verteilt. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine einzelne Kolonie mit einer sterilen Pipette von der Platte aufgenommen, in 100 ml ampicillinhaltiges (50 µg/ml) LB-Medium überführt und erneut bei 225 rpm (37°C) im Brutschrank über Nacht geschüttelt. 850 µl der Plasmid-DNA-exprimierenden Bakterienkultur wurden mit 150 µl Glycerin (85%) gemischt und sofort bei -80°C eingefroren (*glycerol stock*). Aus der restlichen Bakterienkultur wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des *QiafilterPlasmid Kits* nach Angaben des Herstellers isoliert und somit sowohl von Proteinresten als auch von RNA befreit. Der Ansatz wurde zunächst alkalisch lysiert und die DNA anschließend an eine Anionen-Austauscher-Säule gebunden. Die in der Säule gebundene Plasmid-DNA wurde mehrmals gewaschen, eluiert und mit 70 % Ethanol präzipitiert. Nach Zentrifugation bei 15.000 g für 30 min und 4°C wurde der Überstand verworfen und der DNA-Pellet in 1 ml H₂O aufgenommen. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

Die Quantifizierung der Plasmid-DNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Über das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ konnte zusätzlich die Reinheit der DNA ermittelt werden.

Um die Transformation zu überprüfen, wurde die Plasmid-DNA mit plasmidspezifischen Restriktionsenzymen (für pcDNA3.1: Hind III und EcoR I) geschnitten. Dazu wurde 15 µl Plasmid-DNA-Lösung mit je 1,0 µl Restriktionsenzym und 1,8 µl Reaktionspuffer (REACT II, 10x) versetzt und für mindestens 1 h bei 37°C erwärmt. Anschließend wurde die Fragmentgröße gelelektrophoretisch kontrolliert.

3.2.3 Die Bestimmung des cAMP-Gehalts in Zellkulturen

Die Zell-Stimulation

Um die cAMP-Hochregulation nach chronischer Opioidapplikation und Opioidentzug aufzuzeigen und die Hemmung der cAMP-Bildung durch Opiode zu analysieren, bestimmten wir den cAMP-Gehalt in μ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen.

24 - 48 h nach der transienten Transfektion wurden HEK293-Zellen je nach Fragestellung mit Morphin (10 μ M) oder Fentanyl (10 μ M) für 6 h oder 20 h vorbehandelt. Anschließend wurden die Zellen 3 Mal vorsichtig mit PBS gewaschen und das serumhaltige DMEM Medium gegen serumfreies ersetzt. In transfizierten Kontrollzellen wurde lediglich das serumhaltige Medium gegen serumfreies Medium ausgetauscht.

Um den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen zu minimieren, wurde dem serumfreien Medium der Phosphodiesterase-Hemmstoff Isobutylmethylxanthin (IBMX; 2 mM) zugegeben. Es wurden in der opioidvorbehandelten Gruppe und in der Kontrollgruppe jeweils drei Proben angesetzt:

- eine unstimulierte Probe zur Bestimmung des basalen cAMP-Gehalts
- eine stimulierte Probe mit Forskolin (10 μ M)
- eine stimulierte Probe mit Forskolin (10 μ M) und gleichzeitiger Exposition von Morphin (10 μ M) oder Fentanyl (10 μ M).

Die Stimulation der HEK293-Zellen erfolgte jeweils für 15 min bei 37°C im CO₂-Inkubator. Nach der Zellstimulation wurde das Medium entfernt. Die Zellen wurden einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und anschließend in 500 μ l Puffer (TRIS 50 mM; IBMX 2 mM) mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschalen gelöst. Die Zellsuspension wurde mit einem Homogenisator für 5 sec unter Eiskühlung homogenisiert. Zur Proteinbestimmung nach Bradford wurden 10 μ l der Suspension entnommen (Bradford, 1976). Die Proben wurden für 3 min bei 99°C in einem Thermoblock erhitzt, um die Zellmembran aufzubrechen. Die Abtrennung der Membranfragmente erfolgte durch Zentrifugation bei 4000 g für 10 min bei 4°C. Im Überstand wurde die Konzentration an intrazellulärem cAMP mit Hilfe des [³H]cAMP-Assays bestimmt.

Der [³H]cAMP-Assay

Der [³H]cAMP-Assay beruht auf dem Prinzip der kompetitiven Verdrängung: cAMP aus der zu untersuchenden Probe konkurriert mit einer festgelegten Menge an radioaktivmarkiertem [³H]cAMP um die Bindungsstelle an einem so genannten *Binding Protein*, das eine hohe Spezifität und Affinität für cAMP aufweist. Die Menge an radioaktivmarkiertem Protein-cAMP-Komplex verhält sich indirekt proportional zu der Menge an freiem cAMP aus der Probe. Durch Messung der proteingebundenen Radioaktivität lässt sich die Menge an freiem cAMP bestimmen.

Der [³H]cAMP-Assay wurde nach Protokoll des Herstellers (GE Healthcare) durchgeführt. Die zu analysierenden Proben, eine cAMP-Standardreihe und eine Nullprobe wurden jeweils in Duplikaten angesetzt. 50 µl der Proben bzw. des cAMP-Standards wurden zusammen mit 50 µl [³H]cAMP und 100 µl *Binding Protein* für 90 min inkubiert. Überschüssiges freies cAMP wurde anschließend durch Zugabe von medizinischer Kohle abgefangen und durch Zentrifugation (500 g, 12 min, 4°C) von der [³H]cAMP-Protein-Fraktion getrennt. 200 µl des Überstandes wurden in 3 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. 24 h später wurde die Radioaktivität der Proben mit einem Szintillationscounter bestimmt und mit Hilfe einer ermittelten Standardkurve die Menge an cAMP errechnet.

3.2.4 cAMP-Messungen in DRG-Neuronen

Die Stimulation der Neurone

Die DRG L3 - L5 der ipsilateralen Seite von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung (96 h) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren wurden entnommen und wie zuvor beschrieben (siehe Kapitel 3.2.1) aufgearbeitet. Die Neurone wurden in mit Poly-l-lysin beschichteten 96-well-Platten kultiviert (je 50 µl aus einer Zellsuspension; gewonnen aus 6 DRG-Neuronen in 1,5 ml Medium). Nach 2 h erfolgte die Stimulation der Zellen in PBS, dem 2 mM des Phosphodiesterase-Hemmstoffs IBMX zugesetzt waren. Es wurden sowohl in der vorbehandelten Gruppe als auch in der Kontrollgruppe jeweils drei Proben angesetzt:

- eine unstimulierte Probe zur Bestimmung des basalen cAMP-Gehalts

- eine stimulierte Probe mit Forskolin (5 μM)
- eine stimulierte Probe mit Forskolin (5 μM) und gleichzeitiger Exposition von Morphin (10 μM)

Nach 15 min wurde der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit der Bestimmung des cAMP-Gehalts mit Hilfe des cAMP-Enzymimmunoassays fortgeföhren.

Der cAMP-Enzymimmunoassay

Der cAMP-Enzymimmunoassay (EIA) wurde aufgrund seiner hohen Sensitivität gegenüber cAMP ausgewählt, da mit den DRG-Neuronen nur sehr wenig Gewebe zur Verfügung stand.

Der cAMP-EIA basiert auf dem Prinzip, dass freies cAMP aus der zu untersuchenden Probe mit einer cAMP-Peroxidase um eine Bindungsstelle an einem cAMP-spezifischen Antikörper konkurriert. Der cAMP-Antikörper/cAMP-Komplex wiederum bindet an ein Immunglobulin, das spezifisch für den cAMP-Antikörper ist. Nicht gebundene cAMP-Peroxidase oxidiert den Farbstoff Tetramethylbenzidin (TMB) zu einem blauen TMB-Derivat, dessen Intensität mit Hilfe eines ELISA-Photometers bei einer Wellenlänge von $\lambda=630$ nm gemessen werden kann. Alternativ kann die Reaktion durch Schwefelsäure gestoppt werden. Dabei bildet sich ein gelber Farbstoff, dessen Intensität photometrisch bei $\lambda=450$ nm gemessen wird.

Die praktische Durchführung des EIA erfolgte nach Protokoll (*non-acetylation protocol*) des Herstellers (GE Healthcare). Die kultivierten Neurone wurden nach der Stimulation lysiert. 50 μl der Suspension wurden jeweils in Triplikaten in die antigenbeschichtete (*Donkey anti-rabbit IgG*) ELISA-Platte gegeben. Gleichzeitig wurden eine cAMP-Standardkurve und ein Nullwert angesetzt. Die Proben wurden zuerst 1 h mit Antiserum (*Rabbit anti-cAMP*), danach für 2 h mit cAMP-Peroxidase inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausreichend gewaschen und TMB-Substrat hinzugegeben. Nach ungefähr 20 min entwickelte sich ausreichend blauer Farbstoff, der, mit H_2SO_4 versetzt, zu gelb umschlug. Die Farbintensität der Proben wurde in einem ELISA-Reader bei $\lambda=450$ nm gemessen. Die Datenanalyse erfolgte mit der Software SOFTmax® PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Mit Hilfe der ermittelten Standardkurve (semilogarithmische Auftragung der Konzentration gegenüber der Fluoreszenz) wurde der cAMP-Gehalt der Proben errechnet.

3.2.5 Real-time-PCR

Allgemeine Grundlagen

Die Real-time-PCR wurde genutzt, um die mRNA-Expression von μ -Rezeptoren und TRPV1 in DRG-Neuronen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CFA-induzierter Entzündung zu bestimmen. Um zu prüfen, welche Adenylylcyclasen für die cAMP-Akkumulation nach Opioidentzug verantwortlich sind, wurde in μ -Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen die mRNA-Expression unterschiedlicher Adenylylcyclasen quantitativ mit der Real-time-PCR untersucht.

Zur Echtzeit-Detektion („Real-time“) der PCR-Amplifikate wird ein fluoreszierender Farbstoff (SYBR green I) eingesetzt, der vorzugsweise an neu synthetisierter doppelsträngiger DNA bindet und daraufhin Fluoreszenz emittiert, deren Intensität sich proportional zur DNA-Konzentration verhält. Die abgegebene Fluoreszenz kann während jedes PCR-Zyklus mit Hilfe des LightCycler™ Fluorimeters bei einer Wellenlänge von 530 nm gemessen und direkt mit der zugehörigen Software dargestellt werden. Durch die Schmelzpunktanalyse des Produktes nach der Amplifikation können Primerdimere und kleinere Artefakte aufgrund niedriger Schmelzpunkte und breiter Schmelzkurven identifiziert werden.

totalRNA-Isolierung

HEK293-Zellen wurden in 6 cm Kulturschalen kultiviert und, wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben, mit μ -Rezeptor-Plasmid-DNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 6 h mit Morphin (10 μ M) behandelt. Als Kontrolle dienten jeweils transfizierte Zellen ohne Opioidvorbehandlung. Die Zellen wurden im Anschluss an die Stimulation vorsichtig mit sterilem PBS gewaschen, mit einem Zellschaber vom Schalenboden entfernt und in RNA-Stabilisationspuffer überführt.

Zu verschiedenen Zeitpunkten (2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 und 96 h) nach CFA-induzierter Entzündung der rechten Hinterpfote der Ratte wurden die lumbalen DRG L3 - L5 der ipsilateralen Seite entnommen. Von unbehandelten Kontrolltieren wurden die DRG beider Seiten verwendet. Das Gewebe wurde in 50 μ l RNA-Stabilisationspuffer auf Eis überführt und mit einem RNase-freiem Pistill zerkleinert.

Die RNA-Aufreinigung aus Gewebe und Zellkultur erfolgte mit Hilfe des *RNeasy-Kits* nach Angaben des Herstellers (Qiagen). Das biologische Material wurde zuerst mit β -Mercaptoethanol-haltigem Puffer lysiert und anschließend mit Hilfe des *QIAshredders* homogenisiert. Ein spezieller Puffer inaktivierte zudem RNAsen. Die RNA wurde an eine Silicagelmembran gebunden, gewaschen und genomische DNA mit RNase-freier DNase für 15 min verdaut. Die TotalRNA wurde mit RNase-freiem H₂O aus der Silicagelmembran eluiert.

Der totalRNA-Gehalt wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm bestimmt. ($A_{260\text{nm}}=1$ entspricht einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$). Über das Verhältnis $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ konnte zusätzlich die Reinheit der RNA ermittelt werden.

cDNA-Synthese

Aufgrund der unzureichenden Stabilität der totalRNA wurde diese unmittelbar im Anschluss an die Isolierung in doppelsträngige cDNA umgeschrieben.

1,0 μg totalRNA (in 30 μl RNase-freiem H₂O) wurde mit 3,0 μl OligodT (0,2 $\mu\text{g/ml}$) Primer versetzt, 3 min bei 65°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Danach wurde in Tabelle 3 aufgeführter cDNA-Mix zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde für 120 min auf 42°C erwärmt. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 3: Zusammensetzung des cDNA-Mixes für die Transkription

RT-Puffer 5x	6,2 μl
DTT (0,1 mM)	6,0 μl
dNTP (10 mM)	6,0 μl
RNase Inhibitor	0,3 μl
Reverse Transkriptase AMV	1,5 μl
Endvolumen	20,0 μl

Die praktische Durchführung der Real-time-PCR

Die Quantifizierung von mRNA erfolgte nach der Transkription zu cDNA mit dem LightCycler™ Thermocycler. Die cDNA wurde zusammen mit *forward* Primer, *reverse* Primer und einem speziellen MasterMix (LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR green I) nach in Tabelle 5 aufgeführtem Pipettierschema in Duplikaten angesetzt. Der MasterMix enthielt eine Taq DNA-Polymerase, die bei Raumtemperatur inaktiv war und durch 10 min Inkubation bei 95°C aktiviert werden konnte, zudem eine fixe Konzentration an MgCl₂, SYBR green I Farbstoff, dNTP Mix und Puffer.

Tabelle 4: Primer für die *Real-time*-PCR jeweils mit Angabe der Sequenz, Spezies, primerspezifischer Annealingtemperatur, Schmelzpunkt (T_m) und der Länge des zu erwartenden Fragmentes.

Primer	Sequenz	Spezies	Annealing-Temperatur	T_m	Fragmentgröße
TRPV1 for	5'-aaa ctc cac ccc acg ctg aa-3'	Ratte	57°C	90°C	310 bp
TRPV1 rev	5'-gtc ggt tca agg gtt cca cg-3'				
RPL19 se	5'-aat cgc caa tgc caa ctc tcg-3'	Ratte	57°C	90°C	330 bp
RPL19 as	5'-tgc tcc atg aga atc cgc ttg-3'				
AC1 for	5'-cac ccg ggt cca gtg ttt t-3'	human	57°C	89°C	426 bp
AC1 rev	5'-ggc cag cgc aca gga gaa-3'				
AC2 for2	5'-ccg tcc tgg gca tct cct tt-3'	human	57°C	92°C	465 bp
AC2 rev2	5'-ggg gtg gag tag gat ggt gtt-3'				
AC3 for	5'-gca acg gca ggg atg gag a-3'	human	57°C	93°C	390 bp
AC3 rev	5'-gtg tcc gtg cca gtt ttt cta-3'				
AC5 for	5'-cgt cgc gtc caa gat gaa ca-3'	human	60°C	94°C	492 bp
AC5 rev	5'-ggg cgt cac cac ctt caa-3'				
AC6 for	5'-ccc tga tgc ttg gga tct at-3'	human	57°C	92°C	482 bp
AC6 rev	5'-cca gca gaa gca gca cca aa-3'				
AC8 for	5'-ggc ccg gaa cgt cat cat c-3'	human	57°C	91°C	342 bp
AC8 rev	5'-ggg ccc cag gaa atc ttc tc-3'				
AC9 for	5'-ggc tcg gcc gca ctg att-3'	human	57°C	94°C	427 bp
AC9 rev	5'-gcc acg tgg tag ggg atg at-3'				
GAPDH for	5'-caa cta cat ggt tta cat gtt c-3'	human	57°C	89°C	181 bp
GAPDH rev	5'-gcc agt gga ctc cac gac-3'				

Die Primer für die Real-time-PCR wurden nach folgenden Kriterien generiert: 1) Produktgröße 250 - 500 Basenpaare 2) Guanosin/Cytosin-Gehalt 40 - 60 % 3) Primerlänge 18 - 30 Basenpaare. In Tabelle 4 aufgeführte Oligonukleotide wurden von der Firma TibMolbiol (Berlin) synthetisiert und aufgereinigt. In der Real-time-PCR wurden die Primer mit spezifischer Annealingtemperatur eingesetzt (siehe Tabelle 4).

Die PCR begann mit einer Inkubation und Denaturierung von 10 min bei 95°C, daran schlossen sich 45 Zyklen mit jeweils 10 sec bei 95°C (DNA-Denaturierung), 5 sec bei der Primer-Annealingtemperatur, abhängig von den thermodynamischen Eigenschaften der Primer und 16 sec bei 72°C (Elongation) an.

Tabelle 5: Zusammensetzung der Proben für die Real-time-PCR

cDNA	1,0 µl
Primer 1 (2 µM)	5,0 µl
Primer 2 (2 µM)	5,0 µl
Aqua dest.	4,0 µl
SYBR green Master Mix	4,0 µl
Endvolumen	20,0 µl

Die relative Quantifizierung erfolgte nach der Methode von Pfaffl unter Einsatz eines Referenz (*Housekeeping*)-Genes (Pfaffl, 2001). *Housekeeping*-Gene werden im Gegensatz zu anderen Genen in allen Geweben des Körpers exprimiert und zeichnen sich idealerweise, jeweils spezifisch für das entsprechende Gewebe, durch eine zu jedem Zeitpunkt gleich bleibende Expression aus. Für die Quantifizierung der Adenylylcyclasen- und μ -Rezeptor-Expression nach chronischer Opioidbehandlung wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als Referenz-Gen eingesetzt. Die mRNA-Expression von GAPDH ist auch nach längerer Opioidexposition stabil (Borner et al., 2004; Hoerndli et al., 2004). Die Quantifizierung der TRPV1-Expression unter Entzündungsbedingungen erfolgte in einem separaten Lauf mit Hilfe des Referenz-Gens *Ribosomal Protein L19* (RPL19).

Die Quantifizierung der Real-time-PCR wurde mit der LightCycler-Software (Version 3.5; Roche, Mannheim) ausgewertet. Dazu wurde der *crossing point* (CP) berechnet, das heißt

der Zeitpunkt der PCR bestimmt, an dem ein linearer Anstieg der Fluoreszenz einsetzte. Je niedriger der CP, desto höher die cDNA-Konzentration. Nach der Bestimmung der CPs konnte dann mit Hilfe der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Gleichung die relative Änderung der Expression (Ratio) bestimmt werden:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP}_{\text{PROBE}} - \text{CP}_{\text{REFERENZ (GAPDH/RPL-19)}}$$

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP}_{\text{VORBEHANDELT}} - \Delta\text{CP}_{\text{KONTROLLE}}$$

$$\text{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{CP}}$$

Die PCR-Amplifikationsprodukte wurden mit Hilfe der Schmelzpunktkurve analysiert. Nach Beendigung der Amplifikation wurden dazu die Proben von 65°C auf 99°C mit einer Erwärmungsrate von 0,1°C/sec erhitzt.

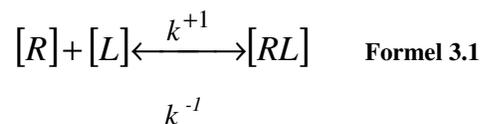
Gelelektrophorese zur Identifizierung primerspezifischer PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in einem 2 % (Ethidiumbromid 0,5 µg/ml) Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei –80 V in TBE-Puffer (100 mM TRIS; 100 mM Borsäure; 2,5 mM EDTA). Nach Auftrennung der DNA-Fragmente wurden diese mit UV-Licht ($\lambda=280$ nm) detektiert und die Fragmentgröße anhand eines 100 bp-Markers bestimmt.

3.2.6 Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudien

Allgemeine Grundlagen

Um die TRPV1-Proteinexpression in DRG-Neuronen und die TRPV1- und μ -Rezeptor-Expression in heterologen Expressionssystemen zu bestimmen, wurde das Prinzip des Radioligandrezeptorbindungsexperimentes genutzt. Mit Hilfe der Radioligandbindungsstudie ist es möglich, die Konzentration und Verteilung von membranständigen Rezeptorproteinen im Gewebe zu bestimmen. Die Eigenschaft eines Liganden (L), mit einem bestimmten Rezeptorprotein (R) zu interagieren, unterliegt dem Massenwirkungsgesetz (Motulsky und Christopoulos, 2003; Formel 3.1). k^{+1} bzw. k^{-1} stellen die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziation bzw. der Dissoziation dar. Die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D [mol/l] beschreibt die Ligandenkonzentration, bei der 50 % der Rezeptoren besetzt sind, und wird herangezogen, um das Gleichgewicht einer Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung zu beschreiben (Motulsky und Christopoulos, 2003; Formel 3.2). Gleichgewicht liegt vor, wenn die Hin- und die Rückreaktion mit gleicher Geschwindigkeit ablaufen. Mit Hilfe des Sättigungsexperiments, bei dem ansteigende Konzentrationen eines radioaktiv markierten Liganden (L_R , Radioligand) eingesetzt werden, kann die maximale Rezeptorkonzentration (B_{max}) und die Dissoziationsgleichgewichtskonstante K_D bestimmt werden (siehe Formel 3.2). Die K_D gibt die Affinität des Liganden zum Rezeptor wieder. Die Sättigungstherme nach Langmuir beschreibt das Sättigungsexperiment adäquat (Motulsky und Christopoulos, 2003; Formel 3.3).



$$K_D = \frac{k_{-1}}{k_{+1}} \quad \text{Formel 3.2}$$

$$[RL] = \frac{B_{max} \cdot [L_R]}{K_D + [L_R]} \quad \text{Formel 3.3}$$

Die Membranpräparation von DRG-Neuronen

Die Membranpräparation der DRG-Neurone und das Bindungsexperiment erfolgten in Anlehnung an ein Protokoll von Szallasi et al. (Szallasi et al., 1999), wurde allerdings folgendermaßen modifiziert:

Die lumbalen DRG L3 - L5 der ipsilateralen und der contralateralen Seite von Ratten mit CFA-induzierter Entzündung der rechten Hinterpfote (96 h) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren wurden entnommen. Das Gewebe wurde in eisgekühltem Puffer (5 mM KCl; 5,8 mM NaCl; 0,75 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 320 mM Saccharose; 10 mM HEPES; BSA 0,25 mg/ml) mit Hilfe eines Homogenisators 3 Mal für jeweils 10 sec zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Homogenisates bei 42.000 g und 4°C für 20 min. Nach Resuspendierung der Membranfraktion wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). 40 µg Protein in 600 µl Puffer wurden mit Adenosin-Deaminase (1 U/ml) bei 37°C für 15 Minuten inkubiert, um freies Adenosin zu eliminieren.

Die Membranpräparation von transient transfizierten Zellen

Nach transients Transfektion (siehe Kapitel 3.2.2) wurden HEK293-Zellen in 20 ml eisgekühltem Puffer (5 mM KCl; 5,8 mM NaCl; 0,75 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 320 mM Sucrose; 10 mM HEPES; BSA 0,25 mg/ml) suspendiert und mit Hilfe eines Homogenisators (Stufe 5, 10 sec, 3x) zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation des Homogenisates bei 42.000 g und 4°C für 20 min. Nach Resuspendierung der Membranfraktion in 1 ml Puffer wurde die Proteinmenge nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976). 50 µg Protein in 600 µl Puffer wurden für die Bindungsexperimente eingesetzt.

Proteinexpressionsanalyse in DRG-Neuronen und HEK293-Zellen

Zur Bestimmung der TRPV1-Proteinexpression in DRG-Neuronen und HEK293-Zellen wurde der radioaktiv markierte TRPV1-Agonist Resiniferatoxin ([³H]RTX) aufgrund seiner hohen Affinität an TRPV1 für das Bindungsexperiment ausgewählt. In vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass [³H]RTX mit einer Dissoziationskonstante K_D von 70 pM in DRG-Membranen bindet (Szallasi et al., 1999).

Für das Sättigungsexperiment in DRG-Neuronen wurden jeweils 75 μl [^3H]RTX in aufsteigenden Konzentrationen von 15 pM bis 2000 pM zusammen mit 600 μl Membransuspension (40 μg Protein) und 75 μl Puffer (TRIS 50 mM; EDTA 2 mM) inkubiert. Zur Bestimmung der TRPV1-Expression in HEK293-Zellen wurde [^3H]RTX als Radioligand in einer Konzentration von 60 pM eingesetzt. Die unspezifische Bindung wurde jeweils mit 10 μM kaltem (nicht radioaktiv markiertem) RTX bestimmt.

Zur Bestimmung der μ -Rezeptor-Konzentration in HEK293-Zellen wurde der Radioligand [^3H]DAMGO aufgrund seiner hohen Selektivität für den μ -Rezeptor eingesetzt. [^3H]DAMGO bindet am μ -Rezeptor mit einer K_D von $0,4 \pm 0,1$ nM (Shaquira et al., 2004). [^3H]DAMGO in einer Konzentration von 20 nM wurde zusammen mit 600 μl Zellsuspension (50 μg Protein) und 75 μl Puffer (TRIS 50 mM; EDTA 2mM) angesetzt. Naloxon (75 μl ; 10 μM) wurde eingesetzt, um die unspezifische Bindung zu bestimmen. Die Proben mit einem Gesamtvolumen von 750 μl wurden für 90 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Messung der Radioaktivität

Die tritiummarkierten Radioliganden emittieren energiearme β^- -Strahlung, deren Energie indirekt mit der Flüssigkeits-Szintillationsspektrometrie bestimmt werden kann (Yamamura und Hulme, 1992).

Die Trennung der membrangebundenen Radioaktivität von frei vorliegender Radioaktivität erfolgte durch Vakuumfiltration (Brandel-Harvester) mit Hilfe zuvor in Polyethylenimmin (0,1 % in TRIS 50 mM) eingeweichter Glasfiberfilter. Nach der Filtration wurden die Filter in ein Szintillationsgefäß mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit gegeben. Der Szintillatorcocktail enthält neben Lösungsmitteln einen primären und einen sekundären Szintillator. Der primäre Szintillator nimmt die Energie aus dem Solvens auf, die zuvor von β^- -Teilchen auf die Lösungsmittelmoleküle übertragen wurde. Der primäre Szintillator gibt die aufgenommene Energie wieder in Form von fluoreszierender Strahlung im Bereich höherer Wellenlängen ab. Der sekundäre Szintillator nimmt die emittierte Strahlung des primären auf. Das Emissionsspektrum des sekundären Szintillators liegt in einem für einen Photomultiplier detektierbaren Wellenlängenbereich. Die vom sekundären Szintillator emittierte Strahlung wird mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Dieser besteht z.B. aus zwei Photomultipliern, die in Koinzidenz geschaltet sind. Die beiden

Photomultiplier sind auf beiden Seiten der Probenkammer angeordnet. Ein Signal wird nur dann ausgewertet, wenn es gleichzeitig (± 10 nsec) von beiden Röhren detektiert wird. Dadurch werden Untergrundimpulse ausgeschaltet. Die emittierten Photonen des Szintillators setzen in der Photokathode Elektronen frei. Durch Elektronenvervielfachung entsteht ein Stromimpuls, der am Ausgang des Flüssigkeitsszintillationszählers in einen Spannungsimpuls umgewandelt wird. Die Spannungsimpulse werden verstärkt und als Zerfälle pro Minute (CPM) gezählt. Die CPM entsprechen nicht der tatsächlichen Anzahl der Zerfälle (DPM), da während der Dauer der Fluoreszenz keine weiteren Zerfälle gemessen werden können. Die Zählausbeute/Countereffizienz (CPM/DPM) beträgt für Tritium etwa 50 %. Durch die vielen aufeinander folgenden Energieübertragungsprozesse wird nur ein sehr geringer Teil der Energie der radioaktiven Strahlung detektiert (3 - 6 %).

Berechnung der B_{\max} und der K_d :

Die Radioaktivität der Proben wurde 24 h nach Filtration mit einem Flüssigkeitsszintillationszähler bei einer Countereffizienz von 70 % (Countereffizienz = $\text{CPM} \times 100 / \text{DPM}$) gemessen.

Die CPM der unspezifischen Bindung wurde von den CPM der Gesamtbindung subtrahiert, um die spezifische Bindung zu erhalten:

$$\text{CPM}_{\text{spezifisch}} = \text{CPM}_{\text{gesamt}} - \text{CPM}_{\text{unspezifisch}}$$

Mit Hilfe der spezifischen Radioaktivität des Radioliganden [Ci/mmol] wurde die spezifische Aktivität berechnet. 1 Ci/mmol entspricht dabei $2,2 \times 10^{12}$ Zerfällen [DPM]:

$$\text{Spezifische Aktivität [cpm/fmol]} =$$

$$\text{spez. Radioaktivität [Ci/mmol]} \times 2,2 \times 10^{12} \times \text{Countereffizienz} / 10^{12} \text{ [fmol]}$$

Die B_{\max} wurde folgendermaßen bestimmt:

$$B_{\max} \text{ [fmol/mg]} = \text{CPM}_{\text{spezifisch}} / \text{spezifische Aktivität [cpm/fmol]} \times \text{Proteingehalt [mg]}$$

Die Dissoziationskonstante K_D und die hyperbole Sättigungskurve wurden mit der nicht linearen Regression mit Hilfe des GraphPad Prism 4 Programms (San Diego, USA) berechnet.

3.2.7 Die Patch-Clamp-Technik

Allgemeine Grundlagen und die Entwicklung der Technik

Die Patch-Clamp-Technik stellt heutzutage eine der wichtigsten neurophysiologischen Methoden dar. Sie ermöglicht es, die Funktion und die Eigenschaften von Ionenkanälen zu charakterisieren. Die Patch-Clamp-Technik wurde 1976 von dem Physiker Neher und dem Mediziner Sakmann entwickelt, die dafür 1991 mit dem Nobelpreis für Medizin und Physiologie ausgezeichnet wurden. Sie konnten zum ersten Mal Ströme von Einzelkanälen in Membranen lebender Zellen nachweisen, indem sie eine Glaspipette auf die Zellmembran aufsetzten und einen kleinen Fleck (*patch*) der Membran durch Anlegen einer Spannung elektrisch isolierten (Neher und Sakmann, 1976). Die Technik wurde wesentlich verbessert, indem eine besonders dichte Verbindung zwischen Pipette und Zellmembran, ein so genannter *Gigaseal*, durch Anlegen besonders sauberer Pipetten und durch leichten Unterdruck hergestellt wurde (Hamill et al., 1981).

Der Versuchsaufbau

Auf einem schwingungsgedämpften Metalltisch war ein inverses Mikroskop mit Präzisionsmikromanipulator, Vorverstärker (*probe*), Elektrodenhalter und automatischem Zulaufsystem angeordnet. Ein geerdeter Faradaykäfig diente der elektrischen Abschirmung.

Der Vorverstärker stand mit dem Hauptverstärker (EPC-10, SerialNr. 520136-E, HEKA, Lambrecht) in Verbindung. Die Signale aus dem Verstärker wurden über einen Analog/Digital-Wandler (AD/DA-Wandler) digitalisiert und mit Hilfe der Pulse-Software (HEKA, Lambrecht) aufgenommen und analysiert. Zudem konnten mit Hilfe der Pulse-Software Spannungskommandos an den Verstärker gegeben werden.

Als Mess- und Referenzelektrode dienten Silberdrähte (Ag/AgCl-Elektrode), die mit Natriumhypochloritlösung regelmäßig neu chloriert wurden. Am Elektrodenhalter war ein flexibler Plastikschauch befestigt, der es ermöglichte, während des Experimentes Unter- oder Überdruck an der Pipettenspitze auszuüben. Der Mikromanipulator half, die Patchpipette möglichst genau an der Zelle zu positionieren. Die Patchpipetten wurden aus Borosilicatglaskapillaren mit Filament (Nr.:1103240, $\varnothing_{\text{außen}}$: 1,5 mm, $\varnothing_{\text{innen}}$: 0,87 mm,

Hilgenberg, Malsfeld) mit einem Elektrodenziehgerät hergestellt und mit einer *microforge* von Verunreinigungen befreit (*fire polishing*). Der Widerstand der mit intrazellulärer Lösung gefüllten Pipetten, der Auskunft über den Durchmesser der Pipettenspitze gibt, betrug durchschnittlich 3 - 6 M Ω . Der Pipettenwiderstand wurde zu Beginn des Experimentes mit Hilfe eines Testpulses (+ 5 mV, 5 ms) bestimmt.

Die Durchführung der Messungen

Die *whole-cell* Patch-Clamp-Technik wurde im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt, um TRPV1-spezifische Ionenströme in kultivierten DRG-Neuronen oder in TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen zu analysieren.

12 - 24 h nach der Kultivierung der DRG-Neurone bzw. 24 - 48 h nach der transienten Transfektion der HEK293-Zellen erfolgten die elektrophysiologischen Untersuchungen. Es wurden möglichst Zellen ausgewählt, die keinen Kontakt zu anderen Zellen hatten. Während des Experimentes wurden die Zellen stetig mit extrazellulärer Pufferlösung (ECS; Tabelle 6) perfundiert. Die Patchpipette wurde mit steril filtrierter intrazellulärer Lösung (ICS; Tabelle 6) gefüllt. Die Experimente wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

Die Etablierung des *whole-cell*-Modus erfolgte in Anlehnung an die Vorgaben aus den Current Protocols (Crawley und Gerfen, 2001). Nach Formation des *Gigaseals* ist die *cell-attached*-Konfiguration erreicht. Durch einen kurzen Sog nach Erreichen des *cell-attached*-Modus wird die Zellmembran perforiert und dadurch in die *whole-cell*-Konfiguration (Ganzzelleableitung) überführt (Abbildung 3.1). Bei der *whole-cell*-Konfiguration werden

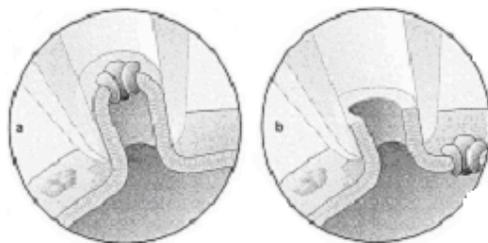


Abbildung 3.1: Patch-Clamp-Konfigurationen: A) *Cell-attached* B) *Whole-cell* (Abbildung aus Numberger and Draguhn, 1996).

Ströme aller Ionenkanäle der Zellmembran gemessen.

Sofern nicht anders angegeben, wurde das Haltepotential der Zelle nach dem Einstellen des *whole-cell*-Modus auf -60 mV festgelegt. Unmittelbar danach wurden die DRG-Neurone sowie die Zellen mit Capsaicin oder mit Hitze aktiviert. Eine Aktivierung von TRPV1 durch Capsaicin oder Hitze erfolgte bis zu viermal hintereinander in Zeitintervallen von 60 sec oder 300 sec. Die Capsaicinkonzentration variierte je nach Untersuchung zwischen 100 nM und 1 μ M. Zur Hitzestimulation wurde die extrazelluläre Pufferlösung mit Hilfe eines Temperaturreglers über ein Perfusionssystem mit einer Rate von 1°C/sec auf 46°C erhitzt. Ein Temperaturfühler, der nahe der gepatchten Zelle platziert war, nahm die Temperaturkurve auf.

Morphin (10 μ M), DAMGO (10 μ M), Fentanyl (10 μ M), Capsazepin (1 μ M), Naloxon (10 μ M), 8-Br-cAMP (10 μ M), H-89 (10 μ M), IBMX (2 mM) und Forskolin (10 μ M) wurden jeweils über die Badlösung appliziert. Pertussistoxin (100ng/ml) wurde 4 - 7 h vor dem Experiment in das Zellkulturmedium gegeben. Zur Untersuchung des Opioidzugs wurde Morphin (10 μ M) oder Fentanyl (10 μ M) für 6 h in das Zellkulturmedium gegeben und anschliessend mit Badlösung dreimal gründlich ausgewaschen.

Tabelle 6: Zusammensetzung der intrazellulären Lösung (ICS) und Badlösung (ECS) für die elektrophysiologischen Experimente.

Die Einstellung des pH-Werts erfolgte für die ECS mit NaOH, für die ICS mit KOH.

(mM)	ICS pH=7,4	ECS pH=7,4	ECS, calciumfrei pH=7,4
NaCl	-	140	140
KCl	140	5	5
MgCl ₂	1	1	1
CaCl ₂	-	2	-
Glucose	10	10	10
Na-ATP	2	-	-
Na-GTP	0,2	-	-
EGTA	-	-	1
HEPES	10	10	10

Selektion transfizierter HEK293-Zellen

Um transfizierte von untransfizierten Zellen unterscheiden zu können, wurde zur Transfektion von HEK293-Zellen ein TRPV1-Konstrukt verwendet, das die Information für das *yellow fluorescent protein* (YFP)-Protein enthielt und nach erfolgter Transfektion zusammen mit TRPV1 exprimiert wurde. YFP ist ein nicht-toxisches fluoreszierendes Protein, das durch Wellenlängen von $\lambda = 470\text{-}515\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{max}} = 512\text{ nm}$) angeregt werden kann und daraufhin energieärmere Strahlung von $\lambda = 520\text{-}600\text{ nm}$ ($\lambda_{\text{max}} = 535\text{ nm}$) emittiert (Hellwig, 2005). Aufgrund der gelblich-grünen emittierten Fluoreszenz ließen sich transfizierte Zellen eindeutig unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen. Die YFP-Markierung beeinflusst nicht die Funktion des TRPV1-Ionenkanals (Hellwig, 2005).

3.2.8 Statistische Auswertungen

Die graphische und statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit den Programmen Prism 4 (GraphPad, San Diego, USA) und Sigmapstat 2.03 (Systat Software, Point Richmond, USA). In allen Experimenten wurde eine Wahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ (*) als statistisch signifikant definiert; $p < 0.001$ (***) galt als statistisch hochsignifikant.

- **Immunhistochemie:** Es wurden Schnitte von 5 Tieren ausgezählt; pro Tier wurden 60 immunreaktive nucleushaltige Neurone aus 4 Schnitten quantifiziert. Die Mittelwerte (\pm S.E.M.) wurden berechnet und diese mit Hilfe des ungepaarten t-Tests (bei normalverteilten Werten) oder dem Mann-Whitney-Test (bei nicht normalverteilten Werten) analysiert.
- **Hargreaves-Test:** Je Tier wurde pro Pfote zweimal die PWL bestimmt. Daraus wurde der Mittelwert bestimmt. Aus mindestens 5 unabhängigen Ergebnissen je Gruppe (behandelt/unbehandelt) wurden erneut die Mittelwerte (\pm S.E.M.) berechnet. Die statistische Analyse erfolgte mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Bonferroni-Posttest (Analyse des zeitlichen Verlaufs) oder dem ungepaarten t-Test.
- **cAMP-Messungen:** Aus mindestens 5 unabhängigen cAMP-Werten pro Gruppe wurden die Mittelwerte (\pm S.E.M.) berechnet. Die statistische Analyse erfolgte dann

mit dem ungepaarten t-Test (Vergleich von 2 Gruppen) oder der einfaktoriellen Varianzanalyse mit anschließendem Dunnett's Posttest (Kontrolle als Referenz).

- **Real-time-PCR:** Aus mindestens 5 unabhängigen Experimenten je Zeitpunkt wurde mit der $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode die Ratio berechnet. Die Mittelwerte der Ratio (\pm S.E.M.) wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse (1way ANOVA) mit Dunnett's Posttest (Nullwert als Referenz) ausgewertet.
- **Radioligandbindungsstudie:** Der K_D -Wert und B_{max} der Radioligand-Rezeptor-Bindungsstudie wurde aus den Mittelwerten von 5 unabhängigen Experimenten mit Hilfe der nicht-linearen Regression berechnet. Statistisch wurden K_D -Wert und B_{max} mit dem ungepaarten t-Test ausgewertet.
- **Elektrophysiologie:** In den elektrophysiologischen Experimenten wurden capsaicin- oder hitzeinduzierte Ionenströme aufgezeichnet und die maximalen Ionenströme und/oder die AUC (*area under the curve*) miteinander verglichen. Aus den Einzelwerten wurden Mittelwerte \pm S.E.M. berechnet. Nach repetitiver Capsaicinapplikation wurden die Ionenströme einer Zelle jeweils zur initialen Stromantwort [=1] der Zelle normalisiert. Zur statistischen Analyse initialer Ionenströme wurde der ungepaarte t-Test angewendet. Zur statistischen Analyse repetitiver Ionenströme einer Gruppe wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (*1way ANOVA*) mit Dunnett's Posttest (initiale Stromantwort als Kontrolle) herangezogen. Zum Vergleich repetitiver Ionenströme zweier unterschiedlich behandelte Gruppen wurde die zweifaktorielle Varianzanalyse (*2way ANOVA*) mit Bonferroni-Posttest verwendet.