
4 ERGEBNISSE

4.1 TRPV1-Inhibition durch μ -Rezeptor-Liganden

Die Interaktion zwischen μ -Rezeptoren und TRPV1 wurde im nativen System der DRG-Neurone der Ratte, mit und ohne *Complete Freund's Adjuvant* (CFA)-induzierter Entzündung der rechten Rattenhinterpfote, und im heterologen Expressionssystem von μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen untersucht. Zur Funktionsanalyse von TRPV1 wurde die *whole-cell* Patch-Clamp-Technik eingesetzt. Die Untersuchungen zur μ -Rezeptor- und TRPV1-Expression erfolgten mit Hilfe der Real-time-PCR, der Immunhistochemie und der Radioligandbindungsstudie. *In vivo* wurde mittels Hargreaves Tests die thermale Hyperalgesie der rechten Rattenhinterpfote bestimmt.

4.1.1 DRG-Neurone

μ -Rezeptor- und TRPV1-Immunreaktivität

Grundvoraussetzung für die Untersuchung der Interaktion zwischen μ -Rezeptoren und TRPV1 in den DRG-Neuronen L3 - L5 der Ratte ist die Co-Expression beider Proteine in derselben Zellpopulation. Die Expression von μ -Rezeptoren und TRPV1 wurde daher mit Hilfe der konfokalen Fluoreszenzimmunhistochemie quantifiziert (in Zusammenarbeit mit Dr. S. A. Mousa, Charité, Anaesthesiologie, Berlin). 21 ± 2 % der Nozizeptoren exprimierten μ -Rezeptoren. 20 ± 3 % der Nozizeptoren wiesen TRPV1-Immunreaktivität auf. μ -Rezeptoren und TRPV1 waren in 14 ± 5 % der Gesamtneuronenpopulation co-exprimiert (Abbildung 4.1). 6 ± 2 % waren demzufolge nur μ -Rezeptor- und 7 ± 3 % lediglich TRPV1-positiv. 73 ± 6 % der Zellen zeigten weder Immunreaktivität für μ -Rezeptoren noch für TRPV1. Der Durchmesser der μ -Rezeptor- und/oder TRPV1-positiven Neurone lag im Durchschnitt bei 31 ± 3 μ m.

96 h nach CFA-induzierter Entzündung der rechten Rattenhinterpfote wurde die μ -Rezeptor- und TRPV1-positive Immunreaktivität in den lumbalen DRG-Neuronen L3 - L5

der ipsilateralen Seite bestimmt. Die Anzahl der μ -Rezeptor-positiven Neurone nahm signifikant von 21 ± 2 % unter Kontrollbedingungen auf 29 ± 3 % nach CFA-induzierter Entzündung zu (Abbildung 4.1 B+E; ungepaarter t-Test, $p < 0.05$). Die Anzahl der TRPV1-positiven Neurone stieg signifikant von 20 ± 3 % in der Kontrollgruppe auf 32 ± 4 % unter Entzündungsbedingungen an (Abbildung 4.1 A+D; ungepaarter t-Test, $p < 0.05$). Der Anteil der Neurone, die sowohl μ -Rezeptoren als auch TRPV1 co-exprimierten, veränderte sich

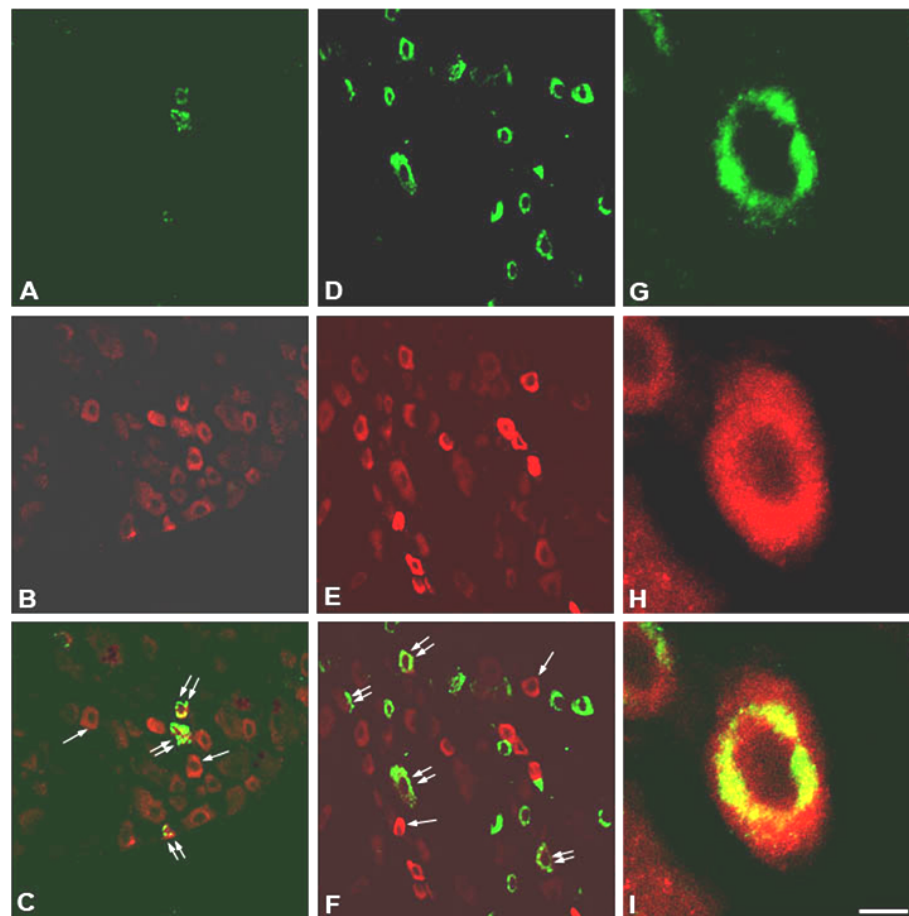


Abbildung 4.1: μ -Rezeptor- und TRPV1-Expression in DRG-Neuronen von Tieren mit und ohne CFA-induzierter Pfotenentzündung. μ -Rezeptor-positiv Neurone sind mit *Texas Red* (rote Färbung), TRPV1-positiv mit FITC (grüne Färbung) markiert. Die Doppelpfeile zeigen Zellen an, die μ -Rezeptoren und TRPV1 co-exprimieren. Ein einzelner Pfeil deutet auf Zellen mit alleiniger μ -Rezeptor-Expression hin. Maßstab: A-F=50 μ m; G-I=10 μ m. **A-B-C** μ -Rezeptor- und TRPV1-Expression in DRG-Neuronen von Kontrolltieren. **D-I** DRG-Neurone der ipsilateralen Seite von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung.

von $14 \pm 5 \%$ (Kontrollbedingungen) auf $22 \pm 4 \%$ nach CFA-induzierter Entzündung (Abbildung 4.1 C+F). Die Anzahl der μ -Rezeptor- und TRPV1-immunreaktiven Zellen im Verhältnis zur Anzahl der nur TRPV1-immunreaktiven Zellen lag unter Kontrollbedingungen bei $67 \pm 6 \%$, nach CFA-induzierter Entzündung bei $71 \pm 8 \%$. Statistisch gab es keinen signifikanten Unterschied (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$). Der Anteil der Zellen, die keine Immunreaktivität aufwiesen verringerte sich signifikant von $73 \pm 6 \%$ auf $61 \pm 7 \%$ unter Entzündungsbedingungen (ungepaarter t-Test, $p < 0.05$).

TRPV1-Proteinexpression nach CFA-induzierter Entzündung

96 h nach CFA-induzierter Entzündung der rechten Rattenhinterpfote wurden die membranständigen Bindungsstellen für TRPV1 der lumbalen DRG-Neurone L3 - L5 der ipsilateralen und der contralateralen Seite sowie der DRG-Neurone der ipsilateralen Seite von NaCl-behandelten Kontrolltieren mit dem radioaktiv markierten TRPV1-Agonisten [3 H]Resiniferatoxin (RTX) quantifiziert.

In initialen Untersuchungen konnten keine signifikanten Unterschiede in den TRPV1-positiven Bindungsstellen zwischen DRG-Neuronen von CFA-behandelten und NaCl-

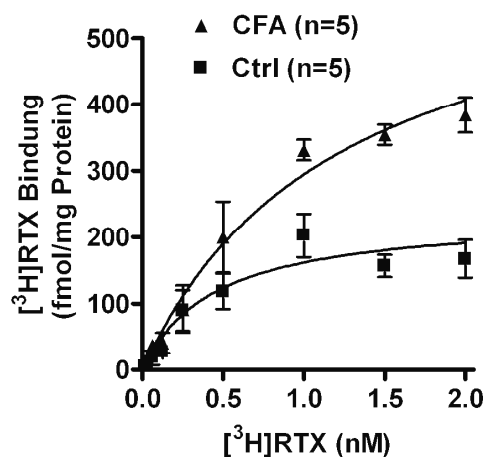


Abbildung 4.2: Auswirkung der CFA-induzierten Entzündung auf die Sättigungskurve der [3 H]Resiniferatoxin-Bindung in Membranpräparationen von DRG-Neuronen. [3 H]Resiniferatoxin ([3 H]RTX) wurde in aufsteigenden Konzentrationen bis 2 nM der Membranfraktion zugesetzt. Die unspezifische Bindung wurde mit nicht radioaktiv markiertem RTX (10 μ M) bestimmt.

behandelten Tieren gefunden werden (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$). Um auszuschließen, dass Adenosin, ein TRPV1-Antagonist und Entzündungsmediator, an TRPV1 bindet und somit die Bindung des Radioliganden [^3H]RTX an TRPV1 beeinflusst, inkubierten wir die Membranfraktion vor dem Sättigungsexperiment mit Adenosin-Deaminase, um freies Adenosin zu eliminieren. Adenosin-Deaminase überführt Adenosin in wasserlösliches Inosin, das nicht mit TRPV1 interagiert.

Nach der Adenosin-Elimination konnten im Sättigungsexperiment mit aufsteigenden Konzentrationen von [^3H]RTX Unterschiede in der Anzahl der TRPV1-positiven Bindungsstellen (B_{\max}) der Neurone der ipsilateralen Seite von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung (96 h) ($B_{\max} = 655,6 \pm 114,1$ fmol/mg) im Vergleich zu Neuronen der ipsilateralen Seite von NaCl-behandelten Kontrolltieren ($B_{\max} = 233,6 \pm 37,9$ fmol/mg) ermittelt werden (Abbildung 4.2). Die Zunahme der TRPV1-positiven Bindungsstellen nach CFA-induzierter Entzündung war signifikant (ungepaarter t-Test, $p < 0.05$). Hinsichtlich der Dissoziationskonstanten (K_D) ergaben sich dagegen keine signifikanten Unterschiede zwischen CFA-behandelten Tieren ($K_D = 1,2 \pm 0,4$ nM) und Kontrolltieren ($K_D = 0,4 \pm 0,2$ nM; ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

Zwischen den TRPV1-positiven Bindungsstellen in DRG-Neuronen der contralateralen Seite von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung und der contralateralen Seite von NaCl-behandelten Kontrolltieren ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, ebenfalls nicht in der Dissoziationskonstante K_D (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

TRPV1-mRNA-Expression nach CFA-induzierter Entzündung

Die relative Expression von TRPV1-mRNA-Transkripten der lumbalen DRG-Neurone L3 - L5 der ipsilateralen Seite wurde nach CFA-induzierter Entzündung quantifiziert. Als *Housekeeping-Gen* wurde RPL-19 eingesetzt. Die Expression von RPL-19 bleibt nach CFA-induzierter Entzündung unverändert (Puehler et al., 2004).

Die TRPV1-mRNA-Expression wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach CFA-induzierter Entzündung untersucht. Neben 96 h wurden die TRPV1-Transkripte 2, 4, 6, 8, 12, 18, 24 und 48 h nach CFA-Injektion quantifiziert (Abbildung 4.3 A+B). Mit Hilfe der Real-time-PCR wurden zu allen Zeitpunkten spezifische Amplifikationsprodukte für TRPV1 erhalten und anhand der Schmelzkurvenanalyse und der Gelelektrophorese eindeutig identifiziert (Abbildung 4.3 B+C). Zu keinem Zeitpunkt zeigten sich Unterschiede in der Expression der mRNA-Transkripte für TRPV1 zwischen DRG-Neuronen der ipsilateralen Seite nach CFA-induzierter Entzündung und DRG-Neuronen von NaCl-behandelten Kontrolltieren (1way ANOVA, Dunnett's Posttest, $p > 0.05$).

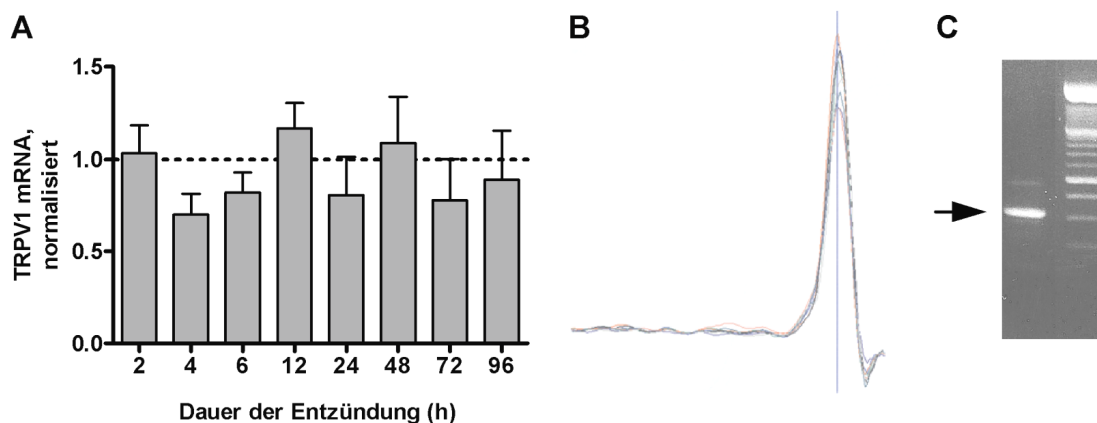


Abbildung 4.3: A) Relative Quantifizierung von TRPV1-mRNA-Transkripten in DRG-Neuronen zu verschiedenen Zeitpunkten nach CFA-induzierter Entzündung mit Hilfe der Real-time-PCR (Mittelwert \pm S.E.M.; $n=6$; 1way ANOVA; $p > 0.05$). B) Schmelzpunktanalyse des Amplifikationsproduktes ($T_m=90,2^\circ\text{C}$). C) Gelelektrophoretische Auftrennung des TRPV1-spezifischen Amplifikationsproduktes (310 bp). Als Referenz wurde ein 100 bp Marker eingesetzt.

cAMP nach CFA-induzierter Entzündung

Der Gehalt an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) wurde in DRG-Neuronen der ipsilateralen Seite von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung (96 h) und von NaCl-behandelten Kontrolltieren mit Hilfe des cAMP-Enzymimmunoassay (EIA) bestimmt.

Der cAMP-Gehalt in DRG-Neuronen von Kontrolltieren betrug 523 ± 54 fmol/mg Protein. 96 h nach CFA-induzierter Entzündung veränderte sich der basale cAMP-Gehalt nicht signifikant (Abbildung 4.4 A; 400 ± 5 fmol/mg Protein; ungepaarter t-Test, $p > 0.05$). Durch zusätzliche Stimulation mit dem Adenylylcyclasen-Aktivator Forskolin (FSK) stieg der cAMP-Gehalt der DRG-Neurone sowohl von NaCl-behandelten als auch von CFA-behandelten Tieren signifikant um das 2,2-Fache an (Abbildung 4.4 B; ungepaarter t-Test; Kontrolle: $p < 0.001$; CFA: $p < 0.05$). Die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration unterschied sich nicht signifikant zwischen Kontrollneuronen und Neuronen von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

Morphin führte zu einer Reduktion des FSK-stimulierten cAMP-Spiegels. In Kontrollneuronen nahm die cAMP-Konzentration nach Morphinexposition signifikant um 41,6 % ab (1way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.01$), in Neuronen von CFA-behandelten Tieren signifikant um 42,2 % (1way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.01$).

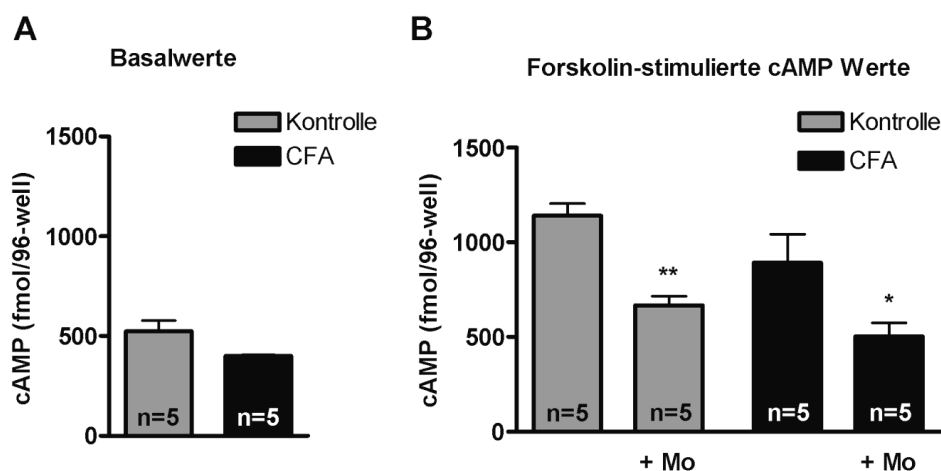


Abbildung 4.4: Intrazelluläre cAMP-Konzentration in DRG-Neuronen von Tieren mit und ohne CFA-induzierter Entzündung für 96 h. A) basaler cAMP-Gehalt (n.s., t-test, $p > 0.05$). **B)** cAMP-Konzentration nach FSK-Stimulation ($5 \mu\text{M}$, 15 min) und nach FSK-Stimulation mit gleichzeitiger Morphinexposition ($10 \mu\text{M}$, 15 min) (1way ANOVA, Bonferroni Posttest; Kontrolle: **, $p < 0.01$; CFA: *, $p < 0.05$).

Hemmung der capsaicin- und hitzeinduzierten TRPV1-Aktivität

Um die Interaktion zwischen μ -Rezeptoren und TRPV1 in einem nativen System zu untersuchen, wurde die Wirkung der μ -Rezeptor-Agonisten Morphin und D-Ala²-N-Me-Phe⁴-Gly⁵-ol-enkephalin (DAMGO) auf capsaicin- und hitzeinduzierte Ionenströme in dissoziierten lumbalen DRG-Neuronen untersucht. DRG-Neurone mit einem Durchmesser zwischen 15 und 40 μm (Nozizeptoren) wurden ausgewählt (Abbildung 4.5 A). Dabei wiesen mehr als die Hälfte der untersuchten Neurone einen Durchmesser zwischen 26 und 30 μm auf.

Zur Aktivierung von TRPV1 wurde eine Capsaicinkonzentration von 1 μM , nahe der halbmaximalen Wirkungskonzentration (EC_{50}) gewählt. Capsaicin aktiviert den nativen TRPV1 in DRG-Neuronen von Ratten mit einer EC_{50} von 1,1 μM (Oh et al., 1996). Die Stimulation der DRG-Neurone mit Capsaicin bei einem Haltepotential von -60 mV induzierte in 80 % der Neurone einen schnell beginnenden Einwärtsstrom (Abbildung 4.5 B). Die maximalen Amplituden der Einwärtsströme variierten zwischen -0,11 nA und -5,44 nA (siehe auch Abbildung 4.10 A). Im Durchschnitt ergab sich für 75 untersuchte Neurone ein capsaicininduzierter Strom von $-1,9 \pm 0,1$ nA und eine Kapazität von $32,9 \pm 3,6$ pF. 20 % der ausgewählten Zellen waren insensitive gegenüber der Capsaicinstimulation. Die Spezifität der capsaicinvermittelten TRPV1-Aktivität wurde mit Hilfe des TRPV1-Antagonisten Capsazepin (1 μM) überprüft. Die zeitgleiche Applikation von Capsaicin und Capsazepin blockierte die Initialisierung einer TRPV1-spezifischen Stromantwort (Abbildung 4.5 C).

Die repetitive oder lang andauernde Stimulation des TRPV1-Kanals führte zur Desensibilisierung (Abnahme der Antwort nach lang andauernder Stimulation) und Tachyphylaxie (Abnahme der Antwort nach wiederholter Stimulation). Insbesondere die Tachyphylaxie nach repetitiver Capsaicinstimulation galt es zu minimieren, um eine möglicherweise hemmende Wirkung von Opioiden auf die TRPV1-Aktivität besser analysieren zu können. Da Calcium die Desensibilisierung und Tachyphylaxie des Ionenkanals TRPV1 (Cholewinski et al., 1993; Petersen et al., 1996) fördert, wurden Calciumionen aus der Badlösung entfernt und weitere Calciumverunreinigungen mit dem Calciumchelator EGTA (1 mM) komplexiert und abgefangen. Die Elimination der Calciumionen aus der Badlösung reduzierte die Tachyphylaxie nach repetitiver Capsaicin- oder Hitze-Applikation deutlich. Wurde Capsaicin bis zu viermal hintereinander in

zeitlichen Abständen von 60 sec und danach jeweils nach weiteren 300 sec appliziert, nahmen die capsaicininduzierten Ionenströme im Vergleich zum initialen Einstrom nicht signifikant ab (Abbildung 4.6 A+B; 1way ANOVA; $p > 0.05$). In den folgenden Experimenten wurde aufgrund der vorliegenden Ergebnisse calciumfreier extrazellulärer Puffer bei einem Haltepotential von -60 mV verwendet.

Um die Wirkung von μ -Rezeptor-Agonisten auf die TRPV1-Aktivität zu untersuchen, wurden DRG-Neurone nach der initialen Capsaicinapplikation mit Morphin behandelt. Jeweils 60 sec und 360 sec nach Beginn der Morphinexposition wurde TRPV1 erneut mit Capsaicin aktiviert. Morphin reduzierte in 79 % der Zellen den capsaicininduzierten

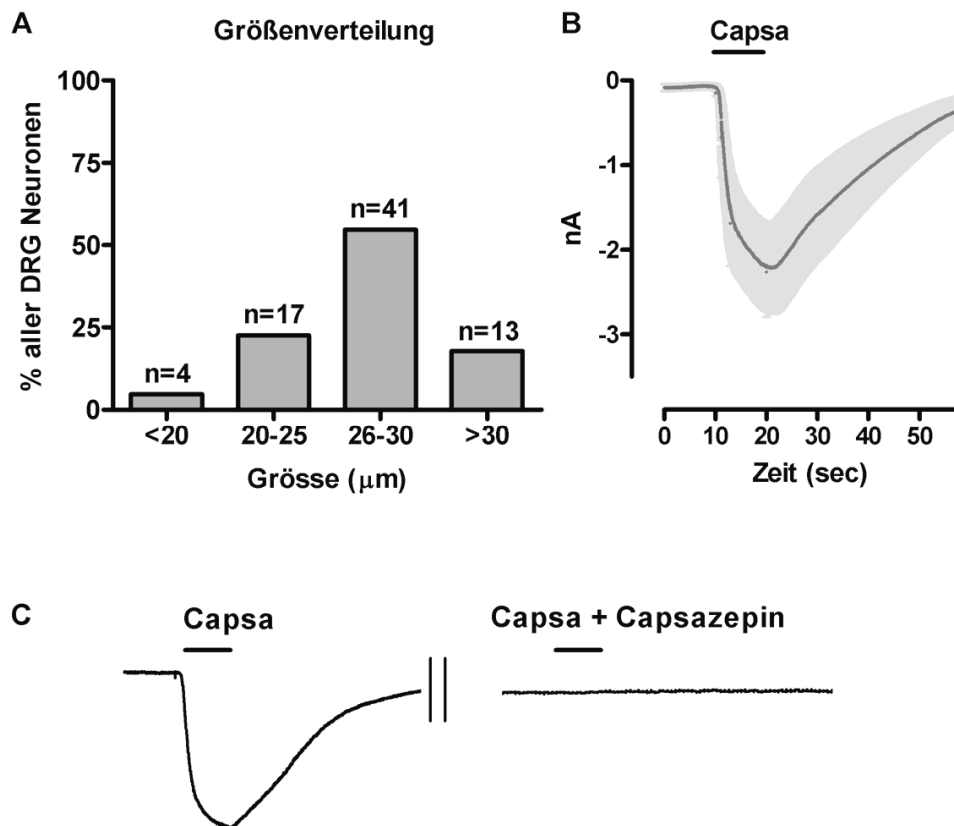


Abbildung 4.5: A) Durchmesser der für die Patch-Clamp-Untersuchungen ausgewählten Nozizeptoren. B) Repräsentative akkumulierte capsaicininduzierte Ionenströme in DRG-Neuronen (Mittelwert \pm S.E.M.; $n=10$). C) Blockade der capsaicininduzierten Ionenströme durch den TRPV1-Antagonisten Capsazepin (1 μM).

TRPV1-Ionenstrom (Abbildung 4.6 A+B). Morphinbehandelte Zellen zeigten nach der zweiten (nach 60 sec) und dritten Capsaicinstimulation (nach 360 sec) eine signifikante Abnahme der TRPV1-Aktivität (2way ANOVA; Bonferroni Posttest, $p < 0.01$).

Wie in Abbildung 4.6 C gezeigt, konnte in 21 % der Zellen kein hemmender Einfluss von Morphin auf die capsaicininduzierte TRPV1-Aktivität beobachtet werden (*Mo non-*

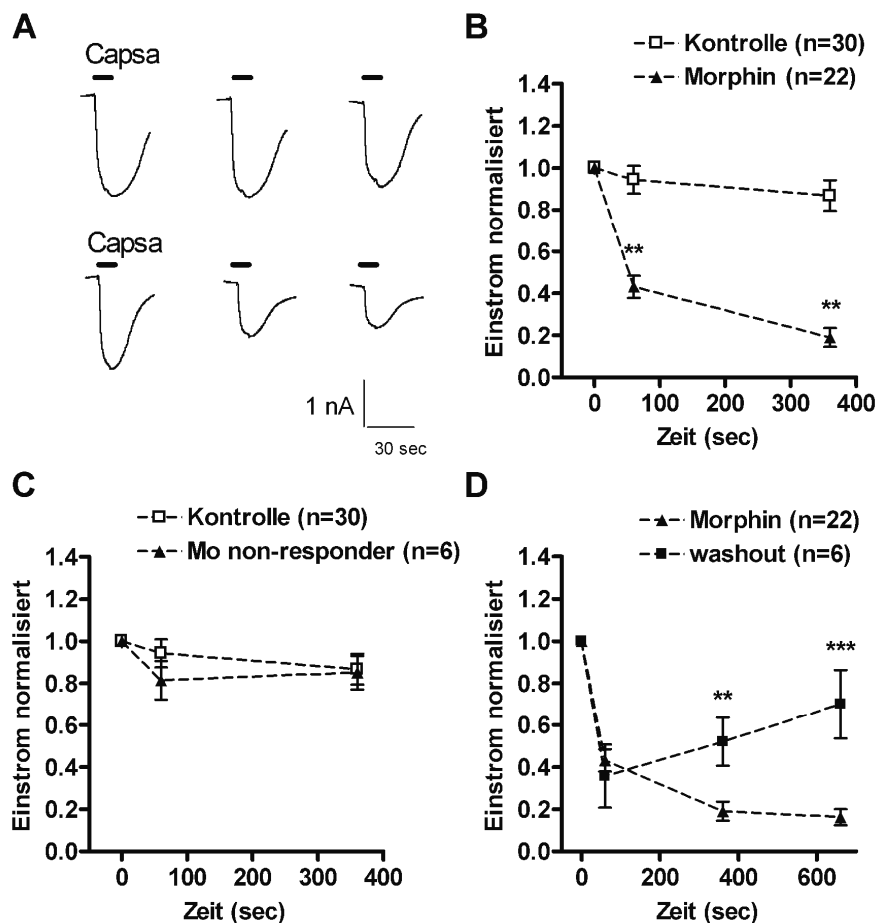


Abbildung 4.6: Abnahme capsaicininduzierter Ströme nach Morphinexposition in DRG-Neuronen. Die Maximalamplituden der Einwärtsströme nach repetitiver Capsaicinapplikation (1 μ M; initial, 60 sec, 360 sec, 660 sec) wurden zum initialen Einstrom normalisiert (I_{0sec} : $-1,9 \pm 0,1$ nA [=1]). Nach der initialen Capsaicinstimulation begann die Morphinbehandlung (10 μ M). **A)** Repräsentative Ionenströme von Kontrollneuronen (oberer Graph) und von morphinbehandelten Neuronen (unterer Graph). **B)** Normalisierte Ionenströme morphinsensitiver Neurone (**, 2way ANOVA, Bonferroni posttest, $p < 0.005$). **C)** Ionenströme morphinresistenter Neurone (*Mo non-responder*) (n.s., 2way ANOVA, $p > 0.05$). **D)** 60 sec Morphin und anschließendes wash-out (2way ANOVA; 360 sec: $p < 0.005$; 660 sec: $p < 0.001$).

responder). Die TRPV1-Ionenströme der morphinresistenten Neurone und der Kontrollzellen unterschieden sich nicht signifikant (2way ANOVA, $p > 0.05$).

Die Abnahme der TRPV1-Aktivität durch Morphin war reversibel: Wurde Morphin für 60 sec appliziert und anschließend mit Pufferlösung ausgewaschen, nahmen die capsaicininduzierten Ionenströme wieder zu (Abbildung 4.6 D). Nach 300 sec *wash-out* stiegen die Ionenströme von zuvor 36 % auf 52 % an. Nach weiteren 300 sec waren 70 % der Ausgangsamplitude erreicht. Die Ionenströme der *wash-out*-Gruppe wiesen nach der dritten (nach 360 sec) und nach der vierten (nach 660 sec) Capsaicinapplikation signifikante Unterschiede gegenüber der morphinbehandelten Gruppe auf (2way ANOVA, Bonferroni Posttest, 360 sec: $p < 0.005$; 660 sec: $p < 0.001$).

Um zu testen, ob die Abnahme der capsaicininduzierten TRPV1-Antwort auf das Alkaloid Morphin beschränkt war oder auch durch Opioidpeptide hervorgerufen werden kann, untersuchten wir die Wirkung des Peptids D-Ala²-N-MePhe⁴-Gly⁵-ol-enkephalin (DAMGO) auf capsaicininduzierte TRPV1-Ionenströme (Abbildung 4.7 B). DAMGO

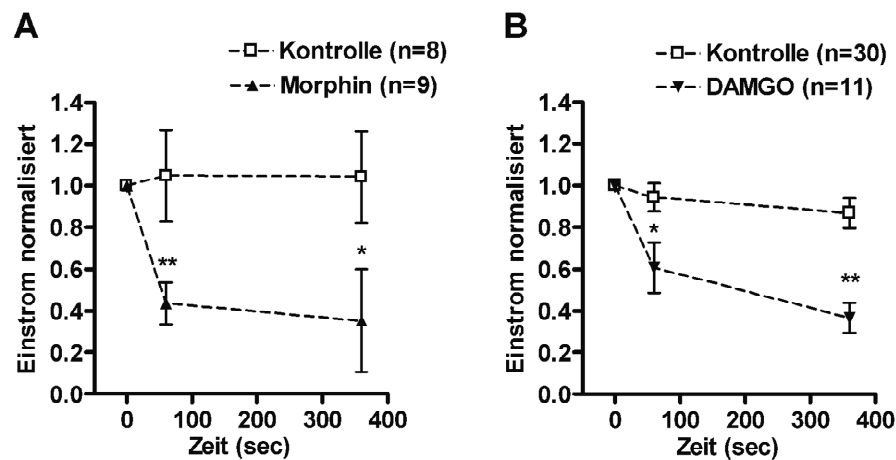


Abbildung 4.7: A) **Hemmender Effekt von Morphin auf hitzeinduzierte Ströme nach repetitiver Stimulation (>46°C; initial, 60 sec, 360 sec).** Nach der initialen Hitzestimulation wurde Morphin (10 μ M) appliziert (I_{0sec} : $-2,7 \pm 0,8$ nA [=1]; 2way ANOVA, $p < 0.05$). B) **Die Wirkung von DAMGO auf capsaicininduzierte Ionenströme in DRG-Neuronen.** Die Ionenströme wurden nach repetitiver Capsaicinapplikation (1 μ M; initial, 60 sec, 360 sec) zum initialen Einstrom normalisiert. Nach der initialen Capsaicinstimulation wurden die Zellen mit DAMGO (10 μ M) inkubiert (I_{0sec} : $-2,0 \pm 0,3$ nA [=1]; 2way ANOVA $p < 0.05$).

fürte in 73 % der analysierten Zellen zu einer hochsignifikanten Reduktion der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität sowohl 60 sec als auch 360 sec nach Beginn der Applikation (2way ANOVA, Bonferroni Posttest; 60 sec: $p < 0.05$; 360 sec: $p < 0.005$). 27 % der Zellen zeigten keine Abnahme der capsaicininduzierten Ionenströme nach DAMGO-Behandlung. Die zweifaktorielle Varianzanalyse wies keinen signifikanten Unterschied zwischen den capsaicininduzierten Ionenströmen DAMGO-resistenter Zellen und unbehandelter Kontrollzellen auf (2way ANOVA, $p > 0.05$). Die hemmende Wirkung von DAMGO unterschied sich nicht signifikant von der TRPV1-Inhibition nach Morphinexposition (2way ANOVA, $p > 0.05$).

Neben Capsaicin kann TRPV1 auch durch Temperaturen oberhalb von 43°C aktiviert werden. Um zu zeigen, dass Morphin ebenfalls hitzevermittelte Ionenströme modulieren kann, wurde die extrazelluläre Pufferlösung in Temperaturschritten von 1°C/sec von Raumtemperatur auf bis zu 50°C erhitzt. Temperaturen von durchschnittlich 46°C induzierten in 69 % der untersuchten DRG-Neurone einen Einwärtsstrom von $-2,7 \pm 0,8$ nA. 31 % der DRG-Neurone reagierten nicht auf den Hitzestimulus. Repetitive Hitzestimulationen 60 sec sowie 360 sec nach der initialen Aktivierung induzierten Ionenströme, die sich nicht signifikant von der initialen Stromantwort unterschieden (1way ANOVA, $p > 0.05$).

Die Morphinapplikation nach der initialen Hitzestimulation führte zu einer signifikanten Inhibition der Hitzeantwort in 86 % der hitzesensiblen Neurone (Abbildung 4.7 A; 2way ANOVA, $p < 0.005$). Nach 60 sec und 360 sec nahmen die Stromamplituden der morphinbehandelten Neurone im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle signifikant ab (Bonferroni Posttest, 60sec: $p < 0.01$; 360 sec: $p < 0.05$). 14 % der untersuchten Neurone zeigten indessen keine Abnahme der hitzeinduzierten Ionenströme nach Morphinapplikation (2way ANOVA, $p > 0.05$).

μ -Rezeptor- und $G_{\alpha i}$ -vermittelte Wirkung

Morphin und DAMGO binden mit hoher Selektivität am μ -Rezeptor. Um zu analysieren, ob die Abnahme der TRPV1-Aktivität im Zusammenhang mit einer μ -Rezeptor-Aktivierung steht, wurden DRG-Neurone zeitgleich zu Morphin mit dem kompetitiven μ -Rezeptor-Antagonisten Naloxon behandelt. Die Abnahme der capsaicininduzierten Ionenströme nach Morphinexposition ließ sich durch Naloxon vollständig aufheben

(Abbildung 4.8 A). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen TRPV1-Ionenströmen von Kontrollneuronen und von mit Morphin/Naloxon behandelten Neuronen 60 sec und 360 sec nach Beginn der Applikation (2way ANOVA, $p > 0.05$). Naloxon allein konnte capsaicininduzierte Ionenströme nicht modulieren. In naloxonbehandelten Neuronen veränderten sich die Ströme nach repetitiver Capsaicinstimulation im Vergleich zur initialen Stromantwort nicht signifikant (1way ANOVA, $p > 0.05$).

Zur Klärung der Frage, ob die Abnahme capsaicininduzierter Ströme nach Morphinexposition durch $G_{i/o}$ vermittelt war, wurden DRG-Neurone vor Beginn der Capsaicinbehandlung für 4 - 6 h mit Pertussisotoxin (PTX) inkubiert, um eine vollständige Hemmung inhibitorischer $G_{i/o}$ -Proteine zu induzieren. Durch Vorbehandlung der Neurone mit PTX konnte die morphinvermittelte Abnahme der TRPV1-Aktivität nach Capsaicinapplikation vollständig aufgehoben werden (Abbildung 4.8 B). Es gab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Ionenströmen der Kontrollneurone und der mit PTX/Morphin behandelten Neurone (2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p > 0.05$).

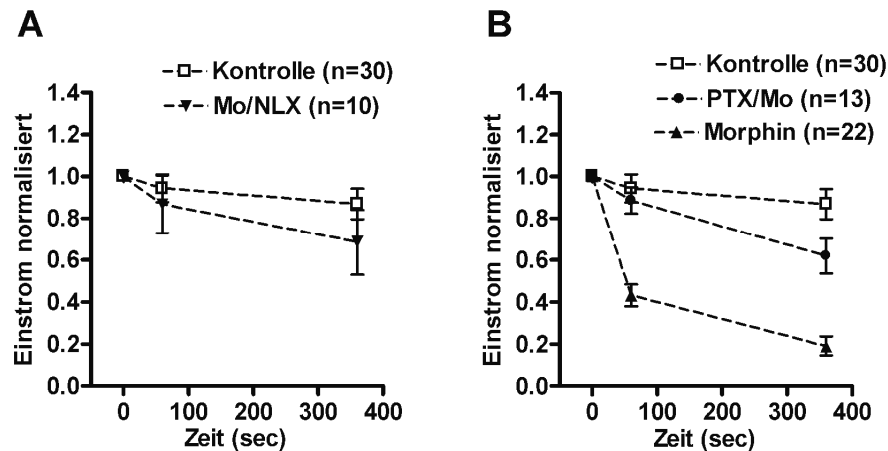


Abbildung 4.8: Die Beteiligung von μ -Rezeptoren und $G_{i/o}$ -Proteinen an der Abnahme der TRPV1-Aktivität nach Morphinexposition. TRPV1-Ionenströme wurden nach repetitiver Capsaicinapplikation (1 μ M; initial, 60 sec, 360 sec) aufgenommen und zum initialen Einstrom normalisiert. **A)** Nach der initialen Capsaicinstimulation wurden die Zellen mit Morphin (10 μ M) zeitgleich mit Naloxon (10 μ M) inkubiert (I_{0sec} : $-2,5 \pm 0,4$ nA [$n=1$]; 2way ANOVA, $p > 0.05$). **B)** Die Neurone wurden 4-6 h vor Beginn des Experimentes mit PTX (100 ng/ml) behandelt. (I_{0sec} : $-2,7 \pm 0,3$ nA [$n=1$]; 2way ANOVA, PTX/Mo vs. Kontrolle: $p > 0.05$).

Dagegen unterschieden sich die capsaicininduzierten Ströme der mit PTX/Morphin behandelten Neurone signifikant von den Neuronen mit alleiniger Morphinapplikation (2way ANOVA, $p < 0.05$).

Die Beteiligung des cAMP-PKA-Signalwegs

Messungen des cAMP-Gehalts in DRG-Neuronen zeigten, dass Morphin in einer Konzentration von 10 μM die FSK-stimulierte cAMP-Konzentration um 41 % senkt (nähere Beschreibung im Kapitel 4.1.1.). In weiteren Untersuchungen wollten wir analysieren, ob die morphininduzierte TRPV1-Inhibition auf eine Abnahme der cAMP-Konzentration und daraus resultierend auf eine verminderte Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) zurückzuführen ist. Dazu wurden die Zellen nach Capsaicinapplikation zeitgleich zu Morphin mit dem Adenylylcyclasen-Aktivator FSK behandelt, der im Gegensatz zu Morphin die intrazelluläre cAMP-Konzentration durch Aktivierung der Adenylylcyclasen erhöht.

Die morphinbedingte Inhibition von TRPV1 wurde durch FSK wieder aufgehoben. Nach 60 sec und 360 sec lagen die capsaicininduzierten Ionenströme der mit FSK/Morphin behandelten Zellen signifikant höher als in Zellen mit alleiniger Morphinexposition (Abbildung 4.9 A; 2way ANOVA, Bonferroni Posttest; 60 sec: $p < 0.05$; 360 sec: $p < 0.05$).

Ferner wurde die Wirkung des cAMP-Analogen 8-Br-cAMP auf die morphinbedingte Abnahme der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität untersucht. 8-Br-cAMP ist stabil gegenüber Phosphodiesterasen, weist allerdings eine hydrophile Struktur auf und ist daher schlecht membrangängig. Der Zeitraum zwischen initialer und zweiter Capsaicinapplikation wurde daher bewusst von 60 sec auf 300 sec ausgedehnt, um die Aufnahme von 8-Br-cAMP in das Cytosol sicherzustellen (Lopshire und Nicol, 1998). Wurde 8-Br-cAMP zeitgleich mit Morphin appliziert, nahmen die capsaicininduzierten Ionenströme nach 300 sec im Vergleich zur alleinigen Morphinapplikation deutlich zu (Abbildung 4.9 B). Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni Posttest ergab einen signifikanten Unterschied der Ionenströme von morphinbehandelten Zellen im Vergleich zu den mit Morphin/8-Br-cAMP behandelten Zellen ($p < 0.05$).

Zudem wurde untersucht, ob FSK und 8-Br-cAMP allein capsaicininduzierte Ionenströme modulieren können. Die Neurone wurden dazu nach der initialen Capsaicinapplikation mit FSK oder 8-Br-cAMP stimuliert. Nach FSK-Inkubation unterschieden sich die

Ionenströme nach der zweiten (60 sec) und dritten (360 sec) Capsaicinapplikation nicht signifikant von der initialen Stromantwort, wie in Abbildung 4.9 A gezeigt (1way ANOVA, $p > 0.05$). Zudem gab es keinen signifikanten Unterschied der Ionenströme zwischen unbehandelten Kontrollneuronen und FSK-behandelten Neuronen (2way ANOVA, $p > 0.05$). Auch 8-Br-cAMP allein beeinflusste die Ionenströme nach repetitiver Capsaicinapplikation nicht. Die Ionenströme veränderten sich nach 300 sec 8-Br-cAMP-Applikation nicht signifikant gegenüber der initialen Stromantwort (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

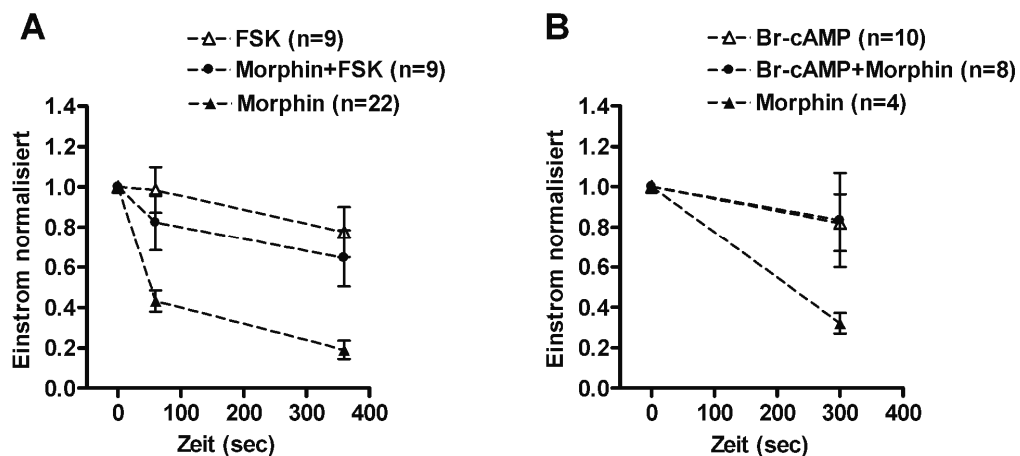


Abbildung 4.9: Reversibilität der Morphinwirkung durch Aktivatoren des cAMP-PKA-Signaltransduktionswegs. Die Ionenströme wurden nach repetitiver Capsaicinapplikation (1 μ M; initial, 60 sec, 360 sec) jeweils zum initialen Einstrom normalisiert. **A**) Nach der initialen Capsaicinstimulation wurden die Zellen mit Morphin (10 μ M), oder FSK (10 μ M), oder Morphin (10 μ M) zeitgleich mit FSK (10 μ M) behandelt (I_{0sec} : $-2,4 \pm 0,5$ nA [=1], (Mo/FSK vs. Mo: 2way ANOVA, $p < 0.05$). **B**) Nach der initialen Capsaicinstimulation wurde Morphin (10 μ M), oder Br-cAMP (10 μ M), oder Morphin (10 μ M) zeitgleich mit 8-Br-cAMP (10 μ M) appliziert (I_{0sec} : $-2,6 \pm 0,4$ nA [=1], (Mo/8-Br-cAMP vs. Mo: 2way ANOVA, $p < 0.05$).

TRPV1-Inhibition durch Morphin nach CFA-induzierter Entzündung

Elektrophysiologische Untersuchungen wurden durchgeführt, um zu prüfen, ob die morphininduzierte Reduktion der TRPV1-Aktivität unter Entzündungsbedingungen verstärkt ist. Capsaicininduzierte Ströme wurden in lumbalen DRG-Neuronen der ipsilateralen Seite nach CFA-induzierter Entzündung (96 h) der rechten Rattenhinterpfote untersucht.

Der TRPV1-Agonist Capsaicin löste in 80 % der analysierten DRG-Neurone einen TRPV1-spezifischen Einwärtsstrom aus. 20 % der Neurone waren gegenüber einer Capsaicinaktivierung resistent. Die maximalen Amplituden der capsaicininduzierten Ionenströme variierten zwischen -0,4 nA und -4,4 nA mit Ionenströmen von durchschnittlich $-2,2 \pm 0,2$ nA (Abbildung 4.10 A). Vergleich man die capsaicininduzierten Ionenströme der DRG-Neurone von Tieren mit Hinterpfotenentzündung mit den Ionenströmen der DRG-Neurone von Kontrolltieren, so ergab sich in der statistischen Analyse kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.10 A; ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

In DRG-Neuronen der CFA-behandelten Tiere führte eine repetitive Capsaicinstimulation 60 sec und 360 sec nach der initialen Capsaicinapplikation unter calciumfreien Bedingungen (in Anwesenheit des Calciumchelators EGTA) zu keiner signifikanten Abnahme des Ionenstroms im Vergleich zur initialen Stromantwort (1way ANOVA, $p > 0.05$).

Betrachtete man die Wirkung von Morphin auf TRPV1-Ionenströme in Neuronen von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung, so nahmen die TRPV1-Ionenströme nach repetitiver Capsaicinapplikation in 70 % der Zellen ab. Wie in Abbildung 4.10 B graphisch dargestellt, führte die Morphinbehandlung für 60 sec und nochmals 300 sec zu einer hochsignifikanten Abnahme der capsaicininduzierten Ionenströme (2way ANOVA, Bonferroni Posttest, 60 sec: $p < 0.001$; 360 sec: $p < 0.001$). In 30 % der Neurone veränderten sich die capsaicininduzierten Ionenströme nach Morphinexposition im Vergleich zu unbehandelten Neuronen dagegen nicht (*Mo non-responder*; Abbildung 4.10 C). Die capsaicininduzierten Ionenströme dieser morphinresistenten Neurone und der unbehandelten Neurone unterschieden sich nicht signifikant (2way ANOVA, $p > 0.05$).

Die Inhibition der capsaicininduzierten Ionenströme nach Morphinexposition in DRG-Neuronen von CFA-behandelten Tieren unterschied sich nicht signifikant von der morphinbedingten Reduktion in Neuronen von Tieren ohne Hinterpfotenentzündung (Abbildung 4.10 D; 2way ANOVA, $p > 0.05$).

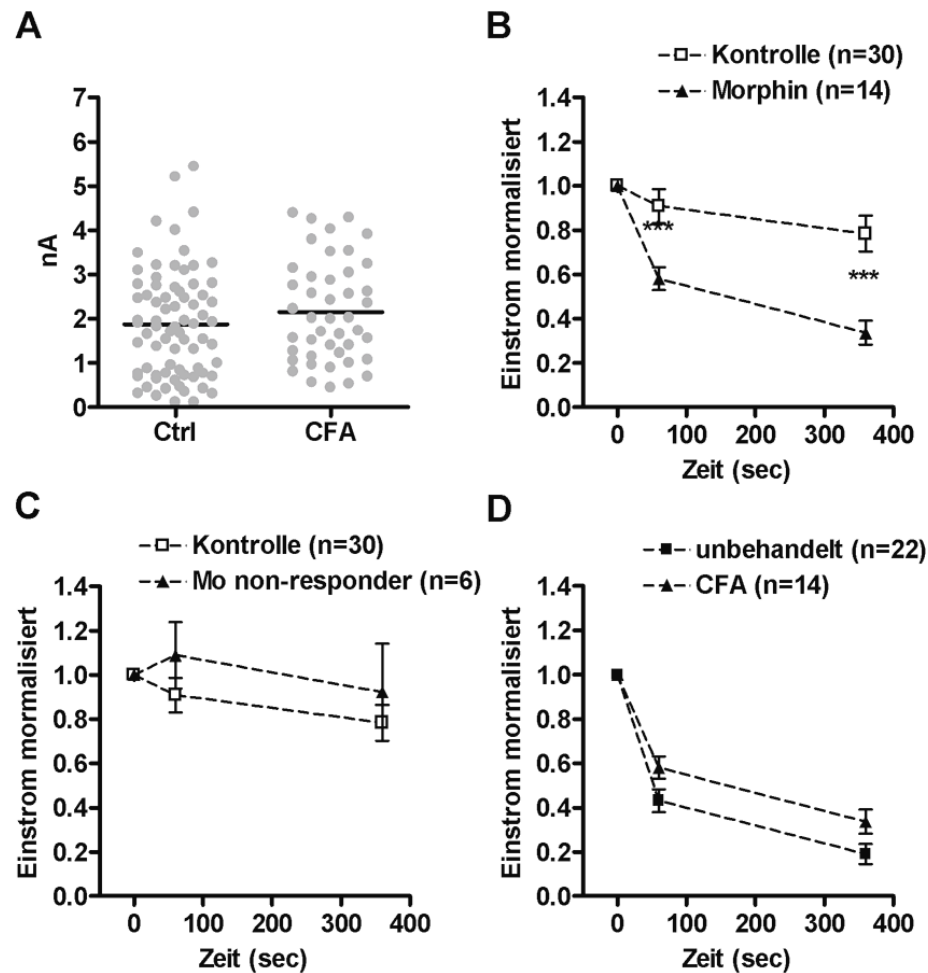


Abbildung 4.10: Die Wirkung von Morphin auf capsaicininduzierte TRPV1-Ionenströme in DRG-Neuronen von Tieren mit CFA-induzierter Entzündung (96 h). **A)** Vergleich der initialen capsaicininduzierten Ionenströme in DRG-Neuronen von Kontrolltieren (Ctrl) und von Tieren mit CFA-induzierter Pfotenentzündung (n.s., t-Test, $p > 0.05$). **B)** TRPV1-Ionenströme morphinsensitiver Neurone. Die maximalen Peakamplituden der Einwärtsströme nach repetitiver Capsaicinapplikation ($1 \mu\text{M}$; initial, 60 sec, 360 sec) wurden zum initialen Einstrom normalisiert ($I_{0\text{sec}}$: $-2.2 \pm 0.3 \text{ nA}$ [=1]). Die Zellen wurden nach initialer Capsaicinapplikation für 60 sec und danach weitere 300 sec mit Morphin ($10 \mu\text{M}$) behandelt (**, 2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.005$). **C)** Ionenströme von Zellen, die nach der Morphinbehandlung ($10 \mu\text{M}$) keine Abnahme der capsaicininduzierten TRPV1-Aktivität zeigten (Mo non-responder; n.s., 2way ANOVA, $p > 0.05$). **D)** Vergleich der capsaicininduzierten TRPV1-Ionenströme nach Morphinbehandlung in DRG-Neuronen von Kontrolltieren und von Tieren mit CFA-induzierter Hinterpfotenentzündung (n.s., 2way ANOVA, $p > 0.05$).

4.1.2 μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen

Um die zellulären Mechanismen der μ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion noch detaillierter zu untersuchen, wurde die Wirkung des μ -Rezeptoragonisten Morphin auf capsaicininduzierte Ströme im heterologen Expressionssystem der μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen mit der *whole-cell* Patch-Clamp-Technik untersucht.

Inhibition capsaicininduzierter TRPV1-Ströme

HEK293-Zellen wurden mit μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-Plasmid-DNA cotransfiziert. Die Expression beider Proteine wurde mit Hilfe von Radioligandbindungsstudien bestätigt. Die Bestimmung der TRPV1-YFP-Expression mit dem Radioliganden [3 H]RTX ergab 619 ± 36 fmol/mg positive Bindungsstellen (B_{\max}). Die μ -Rezeptor-Expression wurde mit dem Radioliganden [3 H]DAMGO quantifiziert. Die B_{\max} für den μ -Rezeptor betrug 136 ± 10 fmol/mg. Da TRPV1-YFP um den Faktor 4,5 mehr Bindungsstellen aufwies als der μ -Rezeptor, wurde die Konzentration an TRPV1-YFP-Plasmid-DNA für die transienten Transfektionen von 1,00 μ g auf 0,25 μ g herabgesetzt, während die μ -Rezeptor-Konzentration von 1,00 μ g beibehalten wurde. Dadurch konnte erreicht werden, dass eine äquimolare Anzahl an μ -Rezeptor- und TRPV1-Bindungsstellen erreicht wurde.

Für die elektrophysiologischen Untersuchungen geeignete transfizierte Zellen erkannte

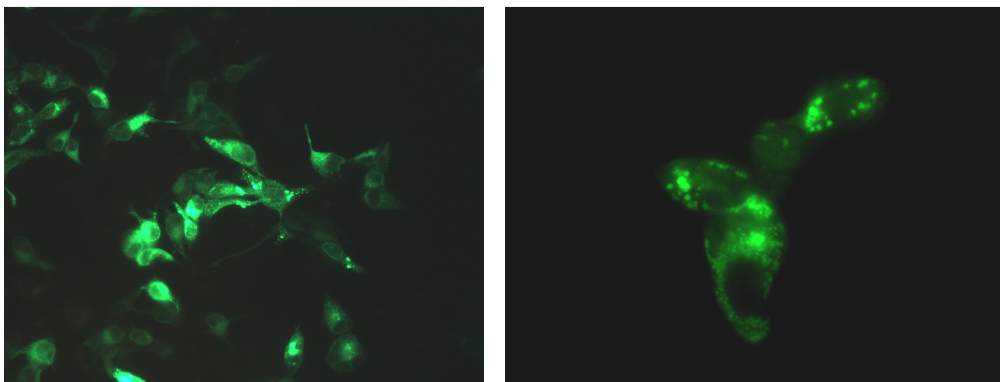


Abbildung 4.11: μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierende HEK293-Zellen für die Patch-Clamp-Untersuchungen. Zur Detektion der emittierten YFP-Strahlung wurden die Neuronen mit Strahlung der Wellenlänge $\lambda = 470\text{-}515$ nm angeregt.

man mikroskopisch an der emittierten Fluoreszenz des mit *Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-markierten TRPV1-Proteins (siehe Abbildung 4.11). YFP hat keine Auswirkungen auf die Funktion des TRPV1-Ionenkanals (Hellwig, 2005). In μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen führte die Stimulation mit Capsaicin bei einer Konzentration von 1 μ M zu Einstömen zwischen -5 und -15 nA. Um derart massive Ionenströme zu vermeiden, reduzierten wir die Capsaicinkonzentration auf 100 nM nahe der EC_{50} . Die EC_{50} für Capsaicin am klonierten TRPV1-Ionenkanal ist in der Literatur mit Werten zwischen 40 nM und 0,7 μ M angegeben (Caterina et al., 1997; Vetter et al., 2006). Die Capsaicinstimulation (100 nM) der μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen führte daraufhin zu Einwärtsströmen von durchschnittlich $-1,6 \pm 0,2$ nA (Abbildung 4.12 A). In Abwesenheit von Calciumionen erzeugten repetitive Capsaicinapplikationen 60 sec sowie 360 sec später Ionenströme, die sich nicht signifikant vom initialen Einstrom unterschieden (Abbildung 4.12 B; 1way ANOVA, $p > 0.05$). Die Spezifität der capsaicininduzierten Ströme für den Ionenkanal TRPV1 wurde mit dem TRPV1-Antagonisten Capsazepin überprüft. Durch zeitgleiche Applikation von Capsaicin

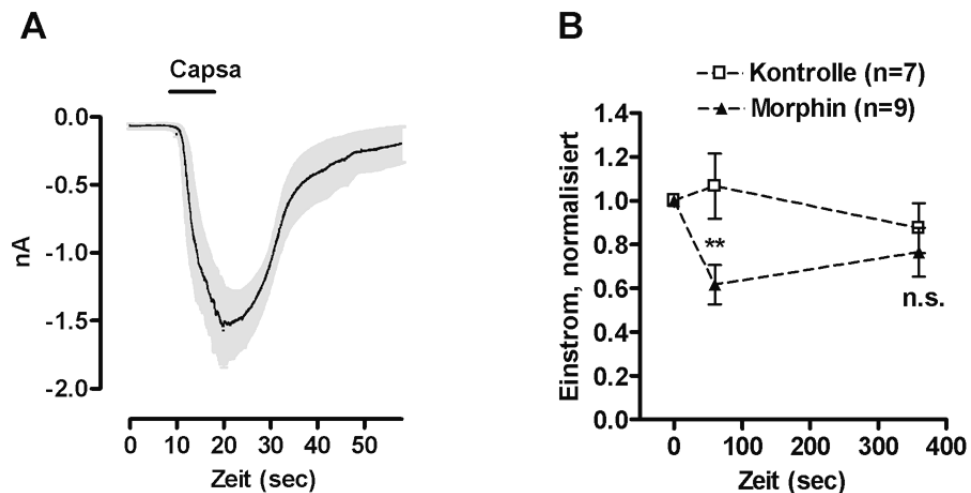


Abbildung 4.12: Die Wirkung von Morphin auf capsaicininduzierte Ströme nach repetitiver Stimulation (initial [=1], 60 sec, 360 sec) in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen. A) Repräsentative akkumulierte capsaicininduzierte Ionenströme (Mittelwert \pm S.E.M.). **B)** Nach der initialen Capsaicinstimulation wurden die Zellen mit Morphin (10 μ M) behandelt. Die Ionenströme wurden jeweils zum initialen Einstrom normalisiert ($I_{0sec} = -1,6 \pm 0,2$ nA [=1]; **, 2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.01$).

und Capsazepin wurde der capsaicininduzierte Ionenstrom vollständig unterdrückt. Untransfizierte HEK293-Zellen zeigten nach Capsaicinstimulation keinen Einwärtsstrom. Wie zuvor in DRG-Neuronen gezeigt, führte Morphin in μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen zu einer signifikanten Inhibition capsaicininduzierter Ionenströme (2way ANOVA, $p < 0.05$). Wurden die Zellen nach der initialen Capsaicinapplikation für 60 sec mit Morphin (10 μ M) behandelt, nahmen die Ionenströme nach erneuter Capsaicinapplikation im Vergleich zu Kontrollzellen signifikant ab (Bonferroni Posttest, $p < 0.01$). Im Gegensatz zu den Untersuchungen in DRG-Neuronen stiegen die capsaicininduzierten Ionenströme allerdings wieder an, wenn die Zellen weitere 300 sec mit Morphin behandelt wurden. Zu diesem Zeitpunkt gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen Kontrollneuronen und morphinbehandelten Neuronen (Abbildung 4.12 B, Bonferroni Posttest, $p > 0.05$).

Beteiligung von $G_{\beta\gamma}$ an der μ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion

Um eine mögliche direkte Interaktion von $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen mit TRPV1 nach μ -Rezeptor-Aktivierung zu untersuchen, wurden μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen zusätzlich mit einem Peptid transfiziert, das aktive $G_{\beta\gamma}$ -Proteine abfängt. Das Peptid β -ark-ct kodiert für die C-terminale Region der β -adrenergen Rezeptor Kinase (β -ark), die sich nach G-Protein-Freisetzung an $G_{\beta\gamma}$ anlagert und diese in die „aktive Form“ überführt. β -ark-ct ist in der Lage, eine Interaktion von $G_{\beta\gamma}$ mit Effektorsystemen zu unterbinden, in dem es irreversibel an $G_{\beta\gamma}$ bindet (Koch et al., 1994).

Wie in Abbildung 4.13 dargestellt, erzeugten repetitive Capsaicinapplikationen in β -ark-ct-exprimierenden Zellen jeweils Ionenströme, die sich nach 60 sec und 360 sec nicht signifikant vom initialen Einstrom unterschieden (1way ANOVA, $p > 0.05$). 60 sec nach Morphinbehandlung nahmen capsaicininduzierte Ionenströme im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle signifikant ab (2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.05$). Weitere 300 sec Morphinexposition erzeugten dagegen Ionenströme, die sich nicht signifikant von den unbehandelten, aber ebenfalls β -ark-ct transfizierten Zellen unterschieden (Abbildung 4.13; Bonferroni Posttest, $p > 0.05$). Insgesamt wurde die morphininduzierte Abnahme der capsaicininduzierten Einstrome durch β -ark-ct nicht aufgehoben.

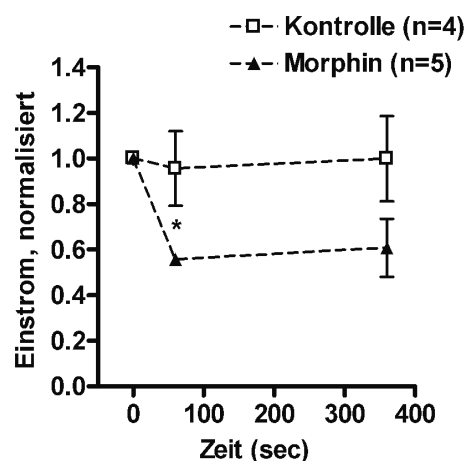


Abbildung 4.13: Der Einfluss von $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen an der Reduktion capsaicininduzierter Ionenströme nach Morphinexposition. μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierende HEK293-Zellen wurden zusätzlich mit dem $G_{\beta\gamma}$ -scavenger β -ark-ct transfiziert. Nach der initialen Capsaicinstimulation erfolgte die Morphinexposition (10 μ M) (I_{0sec} : $-2,2 \pm 0,6$ nA [=1], (*, 2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.05$).

Inhibition capsaicininduzierter Ströme nach Morphinexposition

Um zu prüfen, ob Morphin nicht nur nach repetitiver TRPV1-Stimulation zu einer Abnahme der TRPV1-Ionenströme führt, sondern auch initiale TRPV1-Ionenströme beeinflusst, wurden initiale capsaicininduzierte Ionenströme von μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen, die für 5 min mit Morphin vorbehandelt wurden, aufgezeichnet und mit den Ionenströmen unbehandelter Kontrollzellen verglichen. Die akute Morphinbehandlung der Zellen 5 min vor der initialen Capsaicin-Stimulation führte zu einer deutlichen Reduktion capsaicininduzierter TRPV1-Einwärtsströme. Der capsaicininduzierte TRPV1-Ionenstrom nahm von $-1,6 \pm 0,2$ nA unter Kontrollbedingungen auf $-0,8 \pm 0,2$ nA nach Morphin-Präexposition ab (Abbildung 4.14 A). Der Unterschied der TRPV1-Ionenströme morphinvorbehandelter und unbehandelter Kontrollzellen war statistisch hochsignifikant (ungepaarter t-Test, $p < 0.005$).

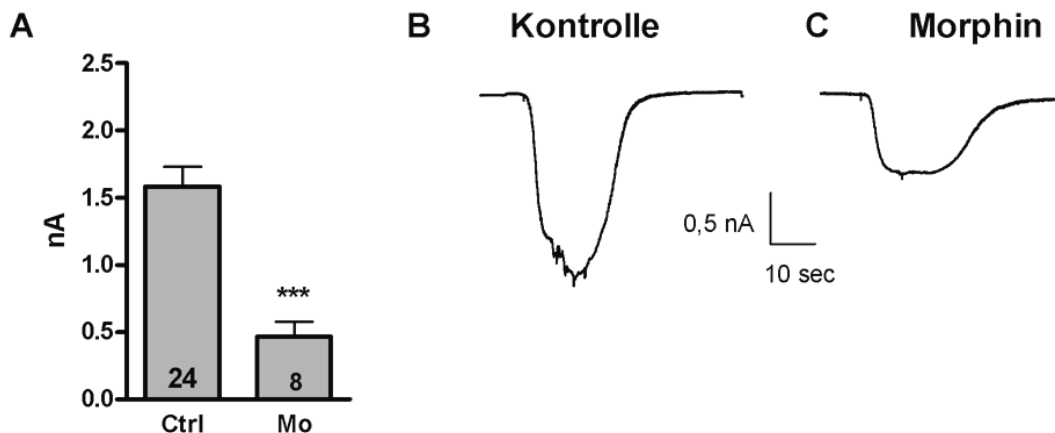


Abbildung 4.14: Die Wirkung von Morphin auf initiale capsaicininduzierte Ionenströme in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen. Morphin ($10 \mu\text{M}$) wurde 5 min vor Beginn der Capsaicinstimulation (100 nM , 10 sec) appliziert. **A)** Mittelwert \pm S.E.M. der maximalen Stromamplituden (***, t-test, $p < 0.005$). **B)** Repräsentativer capsaicininduzierter Einstrom einer Kontrollzelle. **C)** Repräsentativer Einstrom einer mit morphinvorbehandelten Zelle.

4.1.3 Thermale Hyperalgesie nach Capsaicin-Injektion

Zur Analyse der physiologischen Relevanz der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Hargreaves-Tests die thermale Hyperalgesie nach intraplantarer Morphin- und Capsaicin-Injektion in die rechte Rattenhinterpfote bestimmt. Als Maß für die Hyperalgesie wurde die Zeit bestimmt, nach der die Ratte die Pfote aufgrund eines Hitzestimulus reflexartig wegzieht (*paw withdrawal latency* [PWL]).

Die PWL von unbehandelten Kontrolltieren betrug $10,4 \pm 0,3$ sec. Eine intraplantare Capsaicininjektion ($30 \mu\text{g}$) induzierte eine zeitabhängige Abnahme der PWL. Nach 15 min war die Abnahme der PWL und somit die capsaicininduzierte thermale Hyperalgesie am stärksten ausgeprägt. Die Abnahme der PWL war zu allen untersuchten Zeitpunkten (15, 30, 45, 60 min) signifikant (Abbildung 4.15; 2way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.05$). Wurde 15 min nach der Capsaicininjektion zusätzlich Morphin ($100 \mu\text{g}$) injiziert, so stieg die PWL weitere 5 min später wieder signifikant an (Abbildung 4.15; ungepaarter t-Test, $p < 0.05$), die capsaicininduzierte thermale Hyperalgesie nahm demzufolge wieder ab.

In der contralateralen Pfote änderten sich die PWL nach Capsaicin- sowie kombinierter Capsaicin-/Morphin-Injektion im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nicht (ungepaarter t-Test, $p > 0.05$).

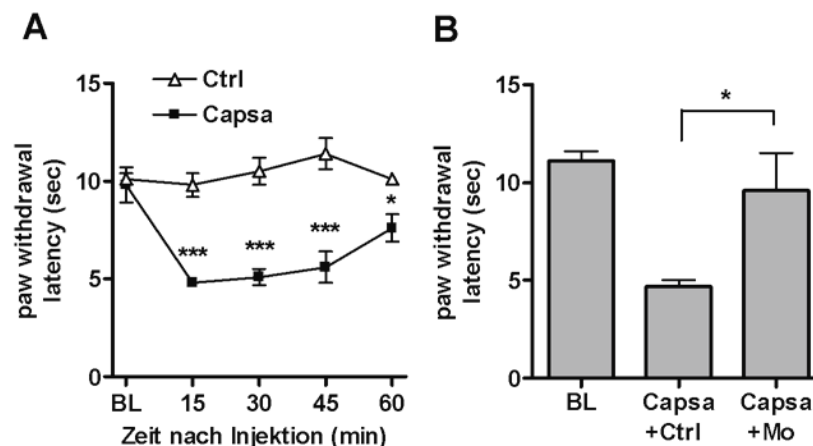


Abbildung 4.15: Die Wirkung von Morphin auf die capsaicininduzierte thermale Hyperalgesie. A) Die *paw withdrawal latency* (PWL) wurde 15, 30, 45 und 60 min nach Capsaicininjektion (Capsa, $30 \mu\text{g}$) bestimmt (2way ANOVA, Bonferroni Posttest; ***, $p < 0.001$; *, $p < 0.05$). B) 15 min nach der Capsaicininjektion wurde zusätzlich intraplantare Morphin (Mo, $100 \mu\text{g}$) injiziert. 5 min später wurde erneut die PWL bestimmt (*, ungepaarter t-Test, $p < 0.05$).

4.2 Die μ -Rezeptor-TRPV1-Interaktion im Opioidentzug

In diesem zweiten Teil der Arbeit analysierten wir, ob eine Opioidexposition über einen längeren Zeitraum mit anschließendem Opioidentzug die capsaicininduzierte Aktivität des Ionenkanals TRPV1 beeinflusst und inwiefern sich die Modulation von den akuten Opioideffekten unterscheidet. Für die Untersuchungen wurden HEK293-Zellen verwendet, die mit μ -Rezeptor und TRPV1-YFP transient transfiziert wurden. Die *Yellow Fluorescent Protein* (YFP)-Markierung von TRPV1 diente zur Identifikation der transfizierten Zellen für die elektrophysiologischen Untersuchungen. Das YFP-Protein hat keine Auswirkungen auf die Funktion des TRPV1-Ionenkanals (Hellwig, 2005).

Unsere Hypothese lautete: Der Entzug des Opioid führt zu einer kompensatorischen Hochregulation der cAMP-Konzentration, zu einer Zunahme der cAMP-abhängigen PKA-Aktivität und einer daraus resultierenden Phosphorylierung und Sensibilisierung des Ionenkanals TRPV1. Um diese These zu prüfen, wurde in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen eine cAMP-Hochregulation durch chronische Opioidexposition mit anschließendem Opioidentzug induziert. Zur Analyse der TRPV1-Funktion nach Opioidentzug wurde der TRPV1-Kanal mit Capsaicin aktiviert und die initialen Einströme opioidvorbehandelter und unbehandelter Kontrollzellen miteinander verglichen.

4.2.1 cAMP-Akkumulation

Der basale intrazelluläre Gehalt an zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Kontrollzellen betrug $1,1 \pm 0,2$ pmol/mg Protein. Um die Auswirkung eines Opioidentzugs auf die cAMP-Konzentration zu untersuchen, wurden die Zellen für 6 h mit Morphin (10 μ M) oder Fentanyl (10 μ M) behandelt. Anschließend wurde das Opioid Morphin/Fentanyl gründlich ausgewaschen und 15 min später die cAMP-Konzentration bestimmt. Die basale cAMP-Konzentration änderte sich nach Morphin- und Fentanylexposition für 6 h und anschließendem Entzug nur geringfügig. Der Unterschied im basalen cAMP-Gehalt der Kontrollzellen sowie der Zellen mit Fentanyl- oder Morphinvorbehandlung war nicht signifikant (Abbildung 4.16 A; 1way ANOVA, $p > 0.05$).

Eine zusätzliche Stimulation mit dem Adenylylcyclasen-Aktivator Forskolin (FSK) stellt eine in der Opioidforschung seit Jahren etablierte und geeignete Methode dar, um opioidbedingte Veränderungen der cAMP-Konzentration zu detektieren. Die zusätzliche FSK-Stimulation für 15 min erhöhte den cAMP-Gehalt unbehandelter Kontrollzellen (keine Morphinstimulation) signifikant um das 3,9-Fache (1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0.01$). Zellen, die wie zuvor beschrieben mit Morphin oder Fentanyl vorbehandelt waren, wurden ebenfalls nach dem gründlichen Auswaschen des Opioids zusätzlich für 15 min mit FSK behandelt. Der cAMP-Gehalt stieg daraufhin im Vergleich zu FSK-stimulierten Kontrollzellen um das 1,9-Fache (Mo) bzw. um das 1,3-Fache (Fen) an (Abbildung 4.16 B). Die FSK-induzierte cAMP-Konzentration der Zellen mit Morphin- oder Fentanylvorbehandlung unterschied sich signifikant vom FSK-induzierten cAMP-Gehalt unbehandelter Kontrollzellen (1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$).

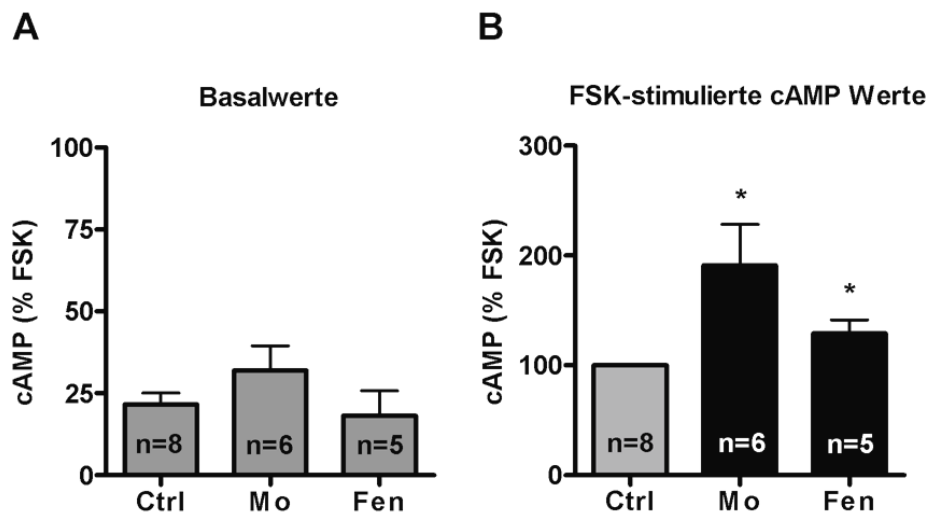


Abbildung 4.16: cAMP-Akkumulation in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen nach Morphin (Mo)- oder Fentanyl (Fen)-Exposition ($10 \mu\text{M}$) für 6 h und anschließendem Entzug für 15 min. Ermittelt wurde jeweils der basale cAMP-Gehalt (A) und der cAMP-Gehalt nach zusätzlicher FSK-Stimulation (B; $10 \mu\text{M}$) für 15 min (*, 1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$). Allen Proben war IBMX (2 mM) zugesetzt, um den cAMP-Abbau durch Phosphodiesterasen zu unterbinden.

4.2.2 mRNA-Expression verschiedener Adenylylcyclasen-Isoformen

Die mRNA-Transkripte der Adenylylcyclasen AC1 - AC9 wurden nach Morphinentzug quantitativ mit der Real-time-PCR bestimmt. μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen wurden für 6 h mit Morphin behandelt, das anschließend gründlich ausgewaschen wurde. 15 min später wurde die *total*RNA aus den Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern (siehe Tabelle 4) für die Adenylylcyclasen AC1 - AC9 amplifiziert. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung diente das *Housekeeping*-Gen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die mRNA-Transkripte der Adenylylcyclasen AC2, AC3, AC5, AC6 und AC9 konnten erfolgreich quantifiziert werden. Die Schmelzpunktanalyse zeigte jeweils ein einzelnes Produkt mit primerspezifischem Schmelzpunkt (Abbildung 4.17 A+B). Zudem wurden mit Hilfe der

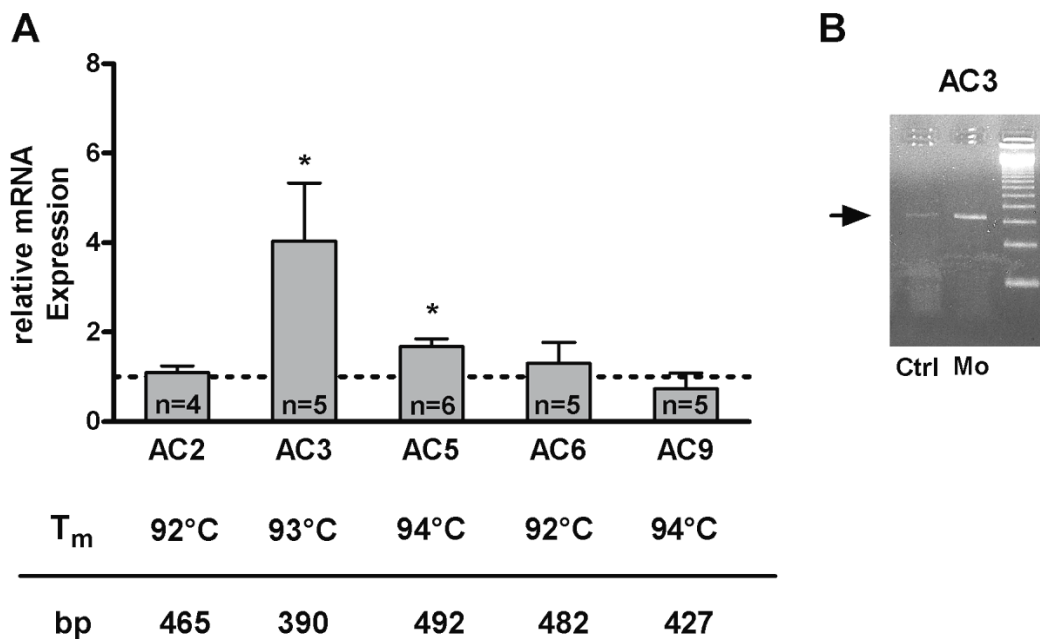


Abbildung 4.17: A) Relative Expression verschiedener Adenylylcyclasen-mRNA-Transkripte nach 6 h Morphinexposition (10 μ M) und Morphinentzug für 15 min in μ -Rezeptor exprimierenden HEK293-Zellen. Die *Crossing points* wurden jeweils auf das Referenzgen GAPDH normalisiert und dann auf die mRNA-Expression unbehandelter Kontrollzellen bezogen (*, 1way ANOVA, Dunnett's Posttest, $p < 0.05$). T_m: primerspezifische Schmelzpunkte. bp: Länge des Amplifikationsprodukts in Basenpaaren. B) Repräsentative gelelektrophoretische Auftrennung des Amplifikates mit Primern für AC3 (380 bp). Als Referenz diente ein 123 bp Marker.

Gelelektrophorese Produkte primerspezifischer Bandengrößen nachgewiesen (Abbildung 4.17 A+B). Die Amplifikation von mRNA-Transkripten für AC1, AC4, AC7 und AC8 gelang in μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen nicht.

Die mRNA-Expression der AC3 stieg nach Morphinenzug signifikant um das 4,0-Fache an (1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$). Die mRNA-Transkripte der AC5 nahmen nach Morphinenzug signifikant um das 1,7-Fache zu (1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p < 0.05$). Die mRNA der AC2, der AC6 sowie der AC9 änderte sich dagegen nach chronischer Morphinexposition und anschließendem Morphinenzug nicht (Abbildung 4.17 A, 1way ANOVA, Dunnett's Multiple Comparison Test, $p > 0.05$).

4.2.3 TRPV1-Sensibilisierung im Opioidentzug

Mit Hilfe der Patch-Clamp-Technik wurde die Auswirkung einer Morphin- und Fentanyl-Exposition mit anschließendem Opioidentzug auf die capsaicininduzierte TRPV1-Aktivität untersucht. Dazu wurden die μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen für 6 h mit dem Opioid behandelt, das anschließend gründlich ausgewaschen wurde. 15 min später wurden capsaicininduzierte Ionenströme (100 nM) im *whole-cell* Modus bei einem Haltepotential von -60 mV aufgezeichnet.

Im ersten Schritt wurden capsaicininduzierte TRPV1-Ionenströme nach Morphinentzug ohne zusätzliche FSK-Stimulation analysiert. Der capsaicininduzierte TRPV1-Ionenstrom stieg nach Morphinentzug von $-1,6 \pm 0,2$ nA unter Kontrollbedingungen um das 1,65-Fache an (siehe Abbildung 4.18 A). Die Zunahme war jedoch nicht signifikant (ungepaarter t-Test, $p > 0,05$). Betrachtete man die *area under the curve* (AUC) der TRPV1-Ionenströme, so nahm die AUC in den morphinvorbehandelten Zellen signifikant um das 2,0-Fache zu (Abbildung 4.18 C; ungepaarter t-Test, $p < 0,05$).

Im nächsten Schritt wurden sowohl die Kontrollzellen als auch die opioidvorbehandelten Zellen nach dem Auswaschen des Opioids und vor Beginn der Capsaicinstimulation zusätzlich für 15 min mit Forskolin (FSK) stimuliert. Betrachtete man nach zusätzlicher FSK-Stimulation erneut die initialen capsaicininduzierten Ionenströme, so nahmen die Einströme der morphinvorbehandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant um das 2,2-Fache zu (Abbildung 4.18 B; ungepaarter t-Test, $p < 0,01$). Nach Fentanylentzug mit zusätzlicher FSK-Stimulation erhöhten sich die capsaicininduzierten Ionenströme ebenfalls signifikant um das 1,6-Fache (ungepaarter t-Test, $p < 0,01$). Die AUC der capsaicininduzierten und zusätzlich FSK-stimulierten Einströme nahm sowohl nach Morphin- als auch nach Fentanylentzug signifikant um das 2,7-Fache (Mo) bzw. das 1,9-Fache (Fen) zu (ungepaarter t-Test, $p < 0,05$).

Um zu prüfen, ob die opioidinduzierte Zunahme der TRPV1-Aktivität nach Capsaicinstimulation durch μ -Rezeptoren vermittelt wurde, blockierten wir den μ -Rezeptor mit dem kompetitiven μ -Rezeptorantagonisten Naloxon. Durch zeitgleiche Inkubation der Zellen mit Morphin und Naloxon konnte die morphinvermittelte Sensibilisierung der TRPV1-Stromantwort nahezu vollständig aufgehoben werden (Abbildung 4.20). Die Ionenströme der morphinbehandelten Zellen unterschieden sich signifikant von den Ionenströmen der mit Morphin/Naloxon behandelten Zellen (1way

ANOVA, Bonferroni Posttest, $p < 0.05$). Zudem gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der mit Morphin/Naloxon behandelten Gruppe (1way ANOVA, $p > 0.05$).

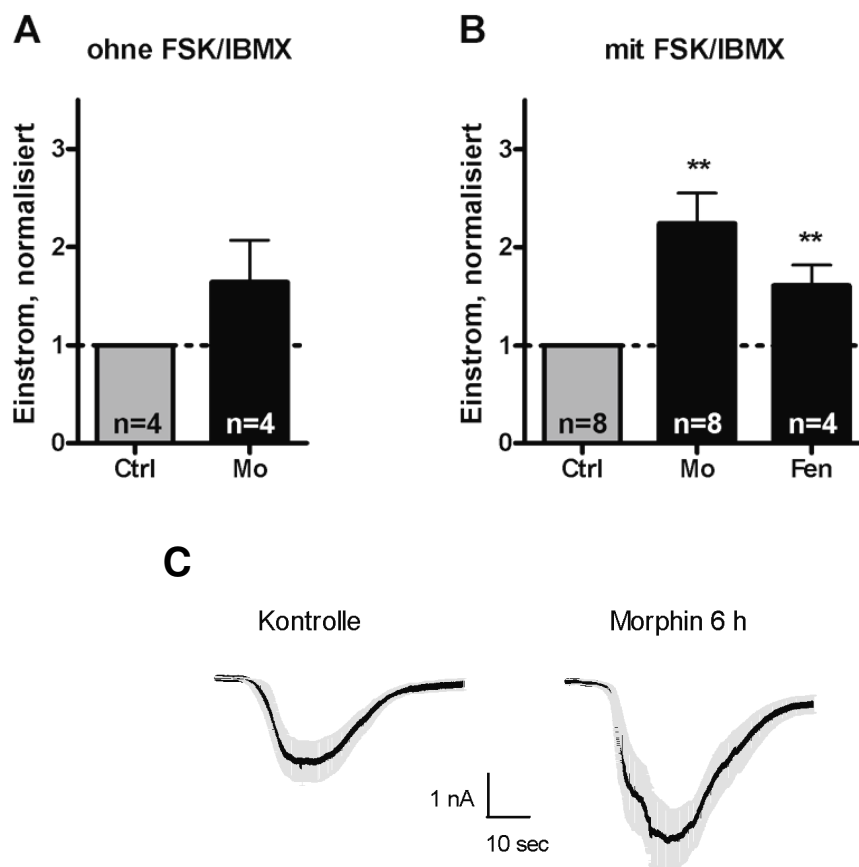


Abbildung 4.18: Capsaicininduzierte Ionenströme in μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-exprimierenden HEK293-Zellen nach 6 h Opioidexposition mit anschließendem Opioidentzug. 15 min nach dem Opioidentzug wurden die Zellen mit Capsaicin (100 nM) stimuliert. Die TRPV1-Ionenströme wurden jeweils zu den korrespondierenden Kontrollzellen ohne Opioidbehandlung [=1] normalisiert. **A)** Morphinentzug (10 μ M) (n.s., t-Test, $p > 0.05$). **B)** Während des Morphin (Mo)- und Fentanyl (Fen)-Entzugs wurde zusätzlich FSK (10 μ M) appliziert (**, t-Test, $p < 0.01$). Der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX verhinderte zudem die cAMP-Degradation. **Abbildung C** zeigt akkumulierte Ionenströme nach Morphinentzug ($AUC \pm S.E.M.$).

Beteiligung von $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen

Analog dem Vorgehen bei der Untersuchung der akuten Opioideffekte wurde die mögliche Beteiligung von $G_{\beta\gamma}$ -Proteinen an der TRPV1-Sensibilisierung durch Morphin untersucht. Zur Erörterung dieser Fragestellung wurden μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierende HEK293-Zellen zusätzlich mit dem $G_{\beta\gamma}$ -scavenger β -ark-ct transfiziert (nähere Erläuterungen siehe Kapitel 4.1.2).

Die morphinvermittelte TRPV1-Sensibilisierung ließ sich durch den $G_{\beta\gamma}$ -scavenger β -ark-ct nicht aufheben: Nach 6 h Morphinexposition und anschließendem Morphinentzug für 15 min induzierte Capsaicin einen TRPV1-spezifischen Ionenstrom, der 1,45-fach stärker ausfiel als in unbehandelten, aber ebenfalls β -ark-ct transfizierten HEK293-Zellen (Abbildung 4.19). Die capsaicininduzierten TRPV1-Ionenströme der morphinvorbehandelten Zellen unterschieden sich signifikant von den Ionenströmen der Kontrollgruppe (ungepaarter t-Test, $p < 0.05$).

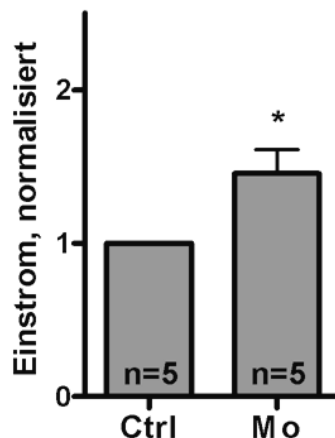


Abbildung 4.19: Die Beteiligung von $G_{\beta\gamma}$ an der morphinbedingten TRPV1-Sensibilisierung. HEK293-Zellen wurden zusätzlich zu μ -Rezeptor- und TRPV1-YFP-Plasmid-DNA mit dem $G_{\beta\gamma}$ -scavenger β -ark-ct transfiziert. Die Zellen wurden vor der Capsaicinstimulation (100 nM) für 6 h mit Morphin (10 μ M) vorbehandelt und anschließend für 15 min mit FSK stimuliert. Der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX verhinderte zudem die cAMP-Degradation. Die Stromamplituden wurden jeweils auf die Amplituden der korrespondierenden Kontrollzellen normalisiert [=1] (*, t-Test, $p < 0.05$).

PKA-vermittelte TRPV1-Sensibilisierung

Um zu prüfen, ob die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) an der morphinbedingten TRPV1-Sensibilisierung beteiligt ist, blockierten wir die PKA mit dem selektiven zellpermeablen Inhibitor N-[2-p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-Isoquinolinesulfonamid (H-89). H-89 inhibiert die cAMP-abhängige PKA mit einer K_i von 48 nM (Chijiwa et al., 1990). Durch Behandlung der μ -Rezeptor- und TRPV1-exprimierenden HEK293-Zellen mit Morphin zeitgleich mit H-89 wurde die morphininduzierte Zunahme der TRPV1-Aktivität vollständig aufgehoben (Abbildung 4.20). Hinsichtlich der Signifikanz ergab sich kein Unterschied zwischen capsaicininduzierten Ionenströmen von Kontrollzellen und den mit Morphin/H-89 vorbehandelten Zellen (1way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p>0.05$). Dagegen unterschieden sich die capsaicininduzierten Ionenströme der morphinbehandelten Zellen signifikant von den Ionenströmen der mit Morphin/H-89 behandelten Zellen (1way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p<0.05$).

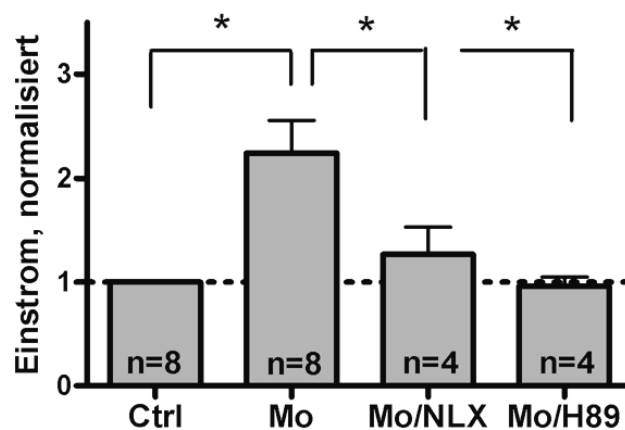


Abbildung 4.20: Die Wirkung von Morphin auf capsaicininduzierte TRPV1-Ionenströme. Die Zellen wurden vor der Capsaicinstimulation (100 nM) für 6 h mit Morphin (10 μ M) oder Morphin zeitgleich mit NLX (10 μ M) oder H-89 (10 μ M) vorbehandelt und nach Morphinentzug für 15 min mit FSK stimuliert. Der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX (2mM) verhinderte zudem die cAMP-Degradation. Die Stromamplituden wurden jeweils auf die Amplituden der korrespondierenden Kontrollzellen normalisiert [=1]. (*, 1way ANOVA, Bonferroni Posttest, $p<0.05$).