

Funktionelle Analyse der Rezeptortyrosinkinase c-Kit in der Schmerzempfindung

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

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

vorgelegt von

Christina Frahm
aus Hamburg

April 2007

1. Gutachter: ___Prof. F. Rathjen_____

2. Gutachter: ___Prof. C. Birchmeier_____

Disputation am ___10.10.2007_____

-----Section Break (Next Page)-----

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung.....	1
1.1 Nozizeption und Schmerz	1
1.2 Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit.....	10
1.3 Der Ligand SCF.....	12
1.4 Zielsetzung.....	14
2 Material und Methoden	15
2.1 Material	15
2.1.1 Chemikalien und Enzyme	15
2.1.2 Lösungen und Reagenzien.....	15
2.1.3 Oligonukleotide.....	18
2.1.4 Plasmidvektoren	19
2.1.5 Bakterienstämme.....	19
2.1.6 Antikörper	20
2.1.7 Zelllinien	20
2.1.8 Mausstämme	21
2.2 Methoden.....	21
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	21
2.2.1.1 DNA-Isolierung und -Aufreinigung	22
2.2.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten.....	23
2.2.1.3 Klonierung von DNA-Fragmenten	24
2.2.1.4 Herstellung von Antikörpern.....	26
2.2.1.5 <i>In vitro</i> -Transkription und DIG-Markierung von RNA Sonden	27
2.2.1.6 Radioaktive Markierung von Sonden	28
2.2.1.7 Southern-Blot Analyse von Agarosegelen.....	28
2.2.1.8 Radioaktive Hybridisierung	29
2.2.1.9 Autoradiographie.....	29
2.2.2 Histologische Methoden	30
2.2.2.1 Methacrylatschnitte	30
2.2.2.2 Gefrierschnitte.....	30
2.2.2.3 Vibratomschnitte	31
2.2.2.4 Toluidine-Blau-Färbung von Methacrylatschnitten	31

2.2.3	<i>In situ</i> -Hybridisierungsmethoden	31
2.2.3.1	Herstellung von Embryopulver	31
2.2.3.2	<i>In situ</i> -Hybridisierung auf Gefrierschnitten	32
2.2.4	Immunhistochemie.....	33
2.2.5	Zellbiologische Methoden	33
2.2.5.1	Präparation und Kultur primärer embryonaler Fibroblasten	33
2.2.5.2	Kultur, Transfektion und Selektion embryonaler Stammzellen	34
2.2.5.3	Präparation und Kultur von DRG-Neuronen.....	36
2.2.6	Verhaltensexperimente.....	37
2.2.6.1	Thermische Hyperalgesie	37
2.2.6.2	Taktile Allodynie.....	38
2.2.7	Elektronenmikroskopie	39
2.2.8	Datenanalyse.....	40
2.2.8.1	Dokumentation histologischer und histochemischer Daten.....	40
2.2.8.2	Auswertung der Expressionsanalyse	41
2.2.8.3	Statistik	41
3	Ergebnisse.....	42
3.1	Charakterisierung der Rezeptortyrosinkinase c-Kit	42
3.1.1	Expressionsanalyse mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung	43
3.1.2	Immunhistochemische Expressionsanalyse	43
3.1.3	Radioaktive Expressionsanalyse	48
3.2	Etablierung des c-Kit Stammes	49
3.3	Histologische vergleichende Expressionsanalyse	51
3.4	Verhaltenstests	54
3.4.1	Hitze-Hypoalgesie von c-Kit ^{-/-} Mäusen.....	54
3.4.2	c-Kit ^{-/-} Mäuse zeigen eine geringere Reizschwelle bei taktiler Stimulation	55
3.5	Kontrolle der sensorischen Nervenbahnen.....	56
3.5.1	Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Saphenous Nervs	57
3.5.2	Immunhistologische Analyse von Hautschnitten.....	59
3.5.3	Immunhistologische Analyse der Innervation des Rückenmarks.....	61
3.6	Vergleich der Expression neurochemischer Marker	62
3.7	Effekte von SCF auf sensorische Neuronen	63
3.7.1	SCF induziert eine kurzzeitige Hyperalgesie <i>in vivo</i>	63

3.7.2	Wirkung von SCF auf mechanische Sensitivität	66
3.8	Mutagenese des <i>Teashirt3</i>-Gens	67
3.8.1	Isolierung genomischer Subklone des <i>Teashirt3</i> -Gens	67
3.8.2	Konstruktion der „Targeting“-Vektoren für die <i>Teashirt3</i> -Mutagenese in ES-Zellen	67
3.8.2.1	Herstellung des genomischen Subklons des <i>Teashirt3</i> -Gens	67
3.8.2.2	Konstruktion des <i>Teashirt3</i> -Reporter-Allels.....	68
3.8.2.3	Konstruktion des konditionalen <i>Teashirt3</i> - Allels	69
3.8.3	Mutation des <i>Teashirt3</i> -Gens in ES-Zellen	70
3.8.4	Expressionsanalyse des <i>Teashirt3</i> -Gens	72
3.8.5	Phänotypische Analyse der <i>Teashirt3</i> -Mutation	73
4	Diskussion	76
4.1	Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit in nozizeptiven sensorischen Neuronen.....	76
4.2	Thermische Hypoalgesie in c-Kit mutanten Mäusen	78
4.3	SCF induziert TRPV1 abhängige Hitze-Hyperalgesie in Wildtyp Mäusen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	79
4.4	Mechanische Sensitivität bei c-Kit Mäusen.....	82
4.5	Ausblick.....	84
5	Zusammenfassung.....	86
6	Literaturverzeichnis	88

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

BAC	bakteriell abgeleitetes, artifizielles Chromosom
BCIP	5-Bromo-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
dCTP	Deoxycytidintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
Kan	Kanamycin
LIF	Leukemie-inhibierender Faktor
MCS	multiple Klonierungsstellen
MilliQ-H ₂ O	Wasser aus Ultrafiltrationsanlage (Milli-Q Plus Water System, Millipore)
mRNA	(engl. messenger RNA) Boten-Ribonukleinsäure
Na-Ac	Natriumacetat
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
Neo	Neomycin
NLS	nukleäre Lokalisierungssequenz
OD	optische Dichte
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
pBS	pBluescript SK II (+)
PCI	Phenol:Choroform:Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentium hydrogenii
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
PNS	peripheres Nervensystem
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat

Abkürzungen

SSC	Natriumchlorid- Natriumcitrat
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	TBS-Tween 20
TBSX	TBS-Triton-X 100
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
ün	über Nacht
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-D-Galaktopyranosid
ZNS	zentrales Nervensystem
FCS	fötales Kälberserum

Einheiten

bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
ca.	circa
d	Tage
g	Gramm
h	Stunde
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
mA	Milliampere
M	Molar
mM	Millimolar
mg	Milligramm
mmol	Millimol
min	Minute
ng	Nanogramm
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Pa	Pascal
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
U	“unit” (=Enzymeinheit)
V	Volumen
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen