

1 Einleitung

1.1 Nozizeption und Schmerz

Die International Association for the Study of Pain (IASP) definiert Schmerz als „an unpleasant sensory and emotional experience associated with actual or potential tissue damage, or described in terms of such damage“ (Merskey und Bogduk, 1994). Man könnte Schmerz folglich als eine Art Warnreiz betrachten, der den Organismus befähigt auf potenziell gewebeschädliche Reize rechtzeitig mit einer adäquaten Abwehr- oder Vermeidungsreaktion reagieren zu können. Dafür besitzt er ein hoch spezialisiertes nozizeptives System, das den peripheren Schmerz über freie Nervenendigungen nahe der Hautoberfläche registriert und weiterleitet. Die Auslösung, Weiterleitung und zentrale Verarbeitung von Schmerzimpulsen wird dabei als Nozizeption bezeichnet.

Die spezialisierten Afferenzen, deren Existenz schon durch Sherrington (1906) postuliert wurde, werden als Nozizeptoren bezeichnet. Nozizeptoren besitzen freie Nervenendigungen, die unter anderem durch Hitze, Kälte, mechanische Reizung oder chemische Substanzen wie z.B. Protonen und Bradykinin aktiviert werden können (Snider und McMahon, 1998; Raja *et al.*, 1999; Julius und Basbaum, 2001). Die aufgenommenen noxischen Reize werden als Aktionspotenziale über unmyelinisierte afferente C-Fasern und dünn myelinisierte A δ -Fasern weitergeleitet und treten über die Hinterwurzel in das schichtartig (Lamina I-V) organisierte Hinterhorn des Rückenmarks ein (Messlinger, 1997). Nozizeptive Afferenzen aus der Haut enden überwiegend in den Schichten I, II und V des Hinterhorns. Von hier aus findet direkt oder indirekt (über Zwischenneurone) die synaptische Übertragung des Schmerzsignals auf „Wide-dynamic-range“-Neurone statt. Die Signale gelangen entlang des Rückenmarks über verschiedene aufsteigende Trakte (spinothalamischer Trakt, spinoreticularer Trakt, spinomesencephalischer Trakt) zum Hirnstamm und zum Thalamus. Durch weitere Umschaltung in lateralen und medialen Kerngebieten des Thalamus gelangen die Impulsfolgen zu den sensorischen Projektionsfeldern der Großhirnrinde (Abb. 1.1). Zusammen mit dem Thalamus ist dieser Teil der Großhirnrinde für die sensorisch-diskriminative Schmerzkomponente zuständig.

An der affektiv-emotionalen Bewertung des Schmerzes ist das limbische System beteiligt, während vegetative Schmerzreaktionen über den Hypothalamus gesteuert werden (Iadarola *et al.*, 1997).

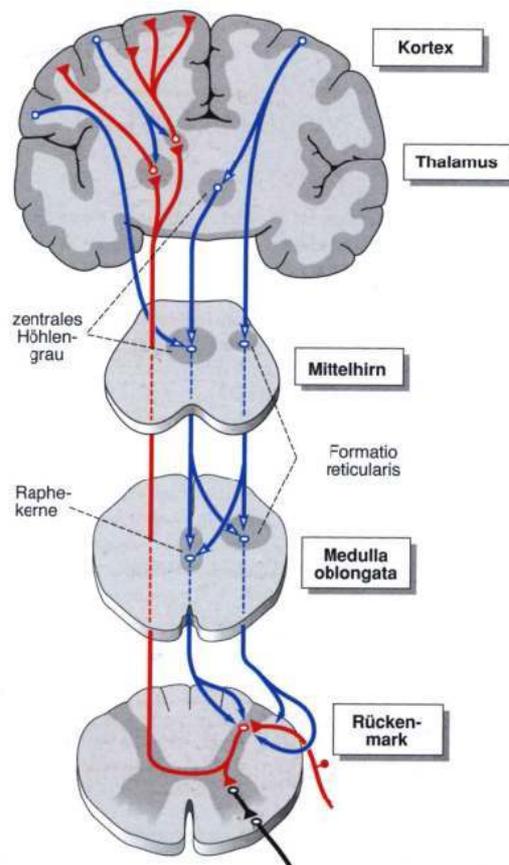


Abb. 1.1 Schematische Übersicht über den Verlauf der aufsteigenden nozizeptiven Bahnen (rot) und der absteigenden antinozizeptiven Bahnsysteme (blau) (Deetjen, 1999)

Im Rückenmark werden die nozizeptiven Afferenzen auf Neurone umgeschaltet, deren Axone zum Thalamus ziehen. Die Efferenzen der lateralen und medialen Thalamuskerns enden überwiegend im somatosensorischen Kortex. Unmittelbar absteigende Bahnen entspringen den Raphekerne und der Formatio reticularis der Medulla oblongata. Sie greifen prä- und postsynaptisch am nozizeptiv-spinalen Eingang an und werden absteigend vom zentralen Höhlengrau, dem generalisierten thalamischen System und dem Kortex gesteuert.

Leitgeschwindigkeit und Myelinisierungsgrad

Unter den afferenten sensiblen Nervenfasern findet man myelinisierte A α - und A β -Fasern, dünn myelinisierte A δ -Fasern sowie unmyelinisierte C-Fasern (Tab. 1.1). Die schnell leitenden A α -Fasern erfüllen propriorezeptive Aufgaben, während

A β -Fasern im physiologischen Zustand die Wahrnehmung von Druck und Berührung vermitteln (Julius und Basbaum, 2001). Einigkeit herrscht darüber, dass die Mehrheit von C- und A δ -Fasern nozizeptive Eigenschaften ausüben (Koltzenburg, 1995, 1999; Snider und McMahon, 1998). Die unmyelinisierten C-Fasern weisen eine langsame Leitungsgeschwindigkeit auf, während die dünn myelinisierten A δ -Fasern schneller leiten. In der Maus beträgt die Leitungsgeschwindigkeit der C-Fasern $< 1,0 \text{ ms}^{-1}$, für A δ -Fasern $6-15 \text{ ms}^{-1}$ (Koltzenburg *et al.*, 1997; Cain *et al.*, 2001). Es wird vermutet, dass die Aktivierung von A δ -Fasern den so genannten „ersten Schmerz“ vermittelt (Raja *et al.*, 1999; Julius und Basbaum, 2001). Damit wird die schnell einsetzende, scharfe und stechende Schmerzempfindung beschrieben, die z.B. den Fluchreflex auslöst. Die darauf folgende dumpfe und brennende Schmerzempfindung wird demnach auch „zweiter Schmerz“ genannt und wird vermutlich von C-Fasern vermittelt (Raja *et al.*, 1999). Es besteht eine enge Korrelation zwischen der Dicke der Myelinscheide der Afferenzen und dem Durchmesser des dazugehörigen Zellkörpers (Harper und Lawson, 1985; Lawson und Waddell, 1991; Djouhri *et al.*, 1998). C- und A δ -Fasern entspringen klein- bis mittelgroßen Zellkörpern ($15-30 \mu\text{m}$, (bei Maus und Ratte)), während A β -Fasern Zellkörpern mit einem großen Durchmesser ($30-50 \mu\text{m}$, (bei Maus und Ratte)) zugerechnet werden können. Diese Kenntnisse macht man sich in vielen *in vitro*-Studien zunutze, indem hauptsächlich kleine- bis mittelgroße Spinalganglienzellen als Model eines Nozizeptors untersucht werden (Wood *et al.*, 1988; Kress und Reeh, 1996).

Adäquate Stimuli für die Aktivierung von somatischen Afferenzen

In verschiedenen experimentellen Präparationen an Versuchstieren und an Menschen finden sich Populationen von Nozizeptoren mit einem typischen Repertoire von Stimulus-Modalitäten, die zu einer Aktivierung führen (Koltzenburg *et al.*, 1997; Raja *et al.*, 1999; Weidner *et al.*, 1999). Viele C-Fasern und eine kleine Population der A δ -Fasern sind polymodale Nozizeptoren, die durch Hitze, mechanische Reizung und chemische Substanzen aktivierbar sind. Diese werden entsprechend als CMH- (C-fiber mechano-heat) bzw. AMH- (A-fiber mechano-heat) Fasern bezeichnet. Entsprechend finden sich auch Neurone, die nur durch Hitze

(CH- bzw. AH-) oder durch mechanische Reizung (CM- bzw. AM-) aktivierbar sind. Die Mehrheit der polymodalen und hitzesensiblen Nozizeptoren wird durch Capsaicin, dem scharfen Inhaltsstoff des Chilipfeffers (*Capsicum annuum*), aktiviert (Szolcsányi *et al.*, 1988; Caterina *et al.*, 2000). Capsaicin ist ein Mitglied der chemischen Gruppe der Vanilloide, es ist seit langer Zeit als Aktivator von nozizeptiven sensorischen Neuronen bekannt und wird daher oft zur Identifikation dieser Population von Neuronen verwendet. Es ist aber auch eine Vielfalt von weiteren Vanilloid-Analoga, die capsaicinsensible Neurone erregen, beschrieben worden (Szolcsanyi und Jancso-Gabor, 1975; Heyman und Rang, 1985; Wood *et al.*, 1988; Holzer, 1991; Szallasi und Blumberg, 1999). Resiniferatoxin beispielsweise, ist ein Vanilloid, das aus der Kaktuspflanze *Euphorbia resinifera* gewonnen wird und ist bezogen auf das molekulare Gewicht ein weitaus potenterer Aktivator polymodaler Nozizeptoren als Capsaicin (Szallasi und Blumberg, 1989, 1990, 1999). Weiterhin werden viele Nozizeptoren von Protonen aktiviert, jedoch sind dafür relativ hohe Konzentrationen ($\text{pH} < 6,0$) notwendig, die z.B. bei einer Entzündung oder einer Ischämie erreicht werden können. Es wird vermutet, dass diese lokale Gewebeansäuerung maßgeblich zu einer Schmerzentstehung beiträgt (Steen und Reeh, 1993, 1995; Reeh und Stehen, 1996; Kress und Zeilhofer, 1999). Eine kleine Anzahl der C- und A δ -Fasern sind auch durch Kälte aktivierbar (Koltzenburg *et al.*, 1997; Viana *et al.*, 2002). Eine weitere Gruppe von sensiblen Neuronen, die zu den Nozizeptoren gezählt werden, sind die sogenannten „schlafenden Nozizeptoren“ oder CM δ Hi-Fasern (C-Faser mechano- und hitzeunempfindlich) (Schaible and Schmidt, 1988; Schmidt *et al.*, 1995). Diese Neurone sind im physiologischen Zustand weder druck- noch hitzesensibel, aber sie werden durch Entzündungsmediatoren und Capsaicin erregt und sensibilisiert, so dass sie druck- oder hitzesensibel werden. Dieser Gruppe von Neuronen wird eine Bedeutung u.a. bei entzündungsinduzierten Schmerzen beigemessen (Koltzenburg, 1999).

Das Antwortverhalten sensorischer Neurone auf mechanische Reizung ist sehr vielfältig, eine Übersicht wird in Tabelle 1.1 dargestellt. In Abgrenzung zu den A β -Mechanorezeptoren mit einer niedrigen Reizschwelle und korpuskulären Nervenendigungen wie Ruffini- und Meißner-Körperchen, weisen mechanosensible Nozizeptoren (C- und A δ -Fasern) eine deutliche höhere

Reizschwelle auf und enden als freie Nervenendigungen (Raja *et al.*, 1999; Koltzenburg *et al.*, 1997; Price *et al.*, 2000). Im Hinblick auf die Hitzesensibilität findet man hauptsächlich zwei unterschiedliche Antwortverhalten in sensorischen Neuronen (Reichling und Levine, 2000; Julius und Basbaum, 2001). Polymodale Nozizeptoren, C-Fasern und A δ -Fasern Typ 2 (AMH II), werden bei Temperaturen ab 43°C aktiviert, interessanterweise entspricht dieser Temperaturbereich in psychophysischen Untersuchungen der Schmerzschwelle (Robinson *et al.*, 1983; Treede *et al.*, 1992; Cesare *et al.*, 1999). Es findet sich ferner unter den A δ -Fasern (Typ I, AMH I oder HTMR (high threshold mechanoreceptor)) eine kleine Population von Neuronen, die erst ab 53°C aktiviert werden (Treede *et al.*, 1995; Raja *et al.*, 1999; Reichling und Levine, 2000).

Faser-Typ	Rezeptor	Endigung	Stimulus	Empfindung
A α	Propriorezeptor	Muskelspindel	Muskelkontraktion Dehnung	Gelenk- position
		Sehnenorgan		
A β	schnell adaptierender Mechanorezeptor	Guard-Follikel	Haut- oder Haar- bewegungen	Flattern oder Vibration
		Meißner-Körperchen (RA I)		
A β	langsam adaptierender Mechanorezeptor (SA)	Merkelzeppel (SA I)	Hautindentation	Druck
		Ruffini-Körperchen (SA II)	Hautdehnung	Gelenk- position
A δ	D-Haar-Rezeptor	Velus-Haarfollikel	Haarbewegung	Haar- bewegung
A δ , C	Thermorezeptor	freie Nervenendigung	Temperatur	Wärme, Kälte
A δ , C	Nozizeptor	freie Nervenendigung	Noxen	Schmerz

Tab. 1.1 Einteilung peripherer sensibler somatischer Neurone (modifiziert nach Koltzenburg und Lewin, 1997).

Neurochemische Charakteristik der Spinalganglienzellen

Eine weitere Einteilung von Nozizeptoren ist durch die Erforschung der Entwicklung und der phänotypischen Differenzierung sensibler Neurone entstanden. Es konnte gezeigt werden, dass verschiedene neurotrophe Faktoren den Phänotyp von sensiblen Neuronen maßgeblich beeinflussen (Koltzenburg und Lewin, 1997; Snider und McMahon, 1998). Im Hinblick auf die nozizeptiven Neurone konnte gezeigt werden, dass NGF (nerve growth factor) in der

Embryonalzeit essentiell sowohl für das Überleben als auch für die Entwicklung dieser Neurone ist (Silos-Santiago *et al.*, 1995; Snider and McMahon, 1998; Koltzenburg, 1999). Dabei erscheint die Expression des hochaffinen NGF-Rezeptors TrkA (tropomyosin-related kinase A) entscheidend für das Überleben unmyelinisierter und dünn myelinisierter Neurone zu sein, während der niedrigaffine NGF-Rezeptor p75 für die funktionelle Ausdifferenzierung und das Überleben einer kleineren Neuronenpopulation notwendig zu sein scheint (Lewin und Mendell, 1992; Bergmann *et al.*, 1997; Stucky und Koltzenburg, 1999). Postnatal verringert sich der Anteil TrkA-exprimierender Neurone auf ca. 40-45%, eine ähnlich große Gruppe von Neuronen verlieren TrkA und p75 und exprimieren postnatal Rezeptoren für neurotrophe Faktoren der GDNF- (glial cell line-derived neurotrophic factor) Familie (c-Ret, GFR α 1- GFR α 4 (glial cell line-derived neurotrophic factor receptor family)) (Molliver *et al.*, 1997; Bennett *et al.*, 1998). Das Ergebnis dieser phänotypischen Umwandlung von sensorischen Neuronen sind zwei distinkte Populationen von Neuronen im adulten Nervensystem, zwischen denen anatomische und expressionsspezifische Unterschiede nachgewiesen werden konnten (Abb. 1.2) (Bennett *et al.*, 1998; Michael und Priestley, 1999; Guo *et al.*, 1999; Amya *et al.*, 2000). Neurone, die ihre NGF-Empfindlichkeit beibehalten, exprimieren neben TrkA und p75 typischerweise Neuropeptide wie Substanz P und CGRP (calcitonin gene-related peptide). Diesen peptidergen Neuronen wird bei der Entstehung der neurogenen Entzündung sowie bei der so genannten zentralen Sensibilisierung eine wichtige Bedeutung zugeschrieben (Woolf und Salter, 2001). Sie terminieren in den Laminae I und II (outer) im Hinterhorn des Rückenmarks und bilden dort Synapsen mit Hinterhornneuronen, die u.a. den Rezeptor für Substanz P (Neurokinin 1) exprimieren (Snider und McMahon, 1998). Afferente Neurone, die Rezeptoren für GDNF exprimieren (30-40 % der Neurone), enthalten typischerweise das Enzym TMP (thiamine monophosphatase) sowie die Bindungsstelle für das Isolectin B4 (IB4, von *Griffonia simplicifolia*) (Silverman und Kruger, 1990; Plenderleith und Snow, 1993; Molliver *et al.*, 1997). Diese IB4-bindenden, „nichtpeptidergen“ Neurone terminieren hauptsächlich in Lamina III (inner) des Hinterhorns und es wird ihnen eine Bedeutung bei der Empfindung von neuropathischem Schmerz durch Läsion zugeschrieben. Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion dieser

zwei Populationen von Nozizeptoren liegen vor, da die Expression von spannungsabhängigen Natriumkanälen, Hitze-aktivierbaren Kanälen und purinergen Rezeptoren in den beiden Populationen unterschiedlich ist (Stucky und Lewin, 1998; Fjell *et al.*, 1999; Bradbury *et al.*, 1998).

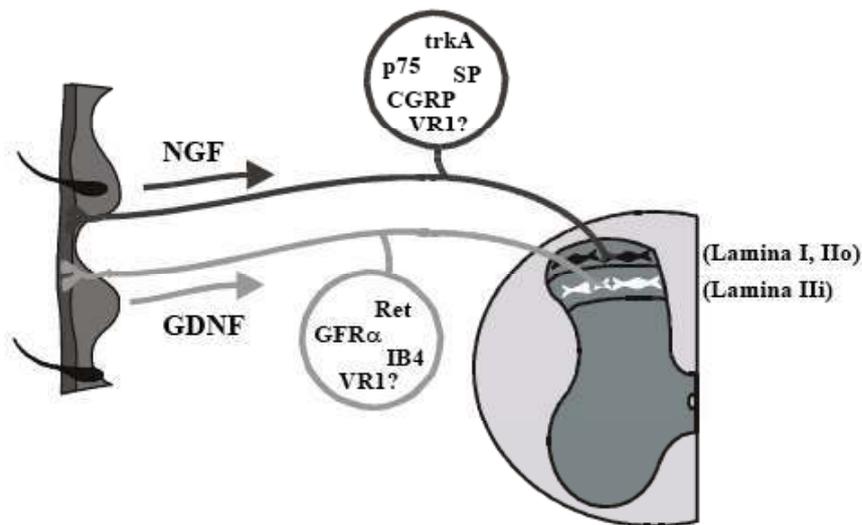


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der nozizeptiven sensorischen Afferenzen

Zwei Populationen von Nozizeptoren. NGF- bzw. GDNF-abhängige Neurone mit anatomischen und expressionsspezifischen Unterschieden (modifiziert nach Snider und McMahon, 1998).

Ein bedeutender Hinweis zum Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Sensitivität von Schmerz zu Grunde liegen, war die Klonierung spezifischer Mitglieder der TRP- (transient receptor potential) Familie, einschließlich des Capsaicin Rezeptors TRPV1 (VR1) (Caterina *et al.*, 1997). Die TRP-Untereinheiten sind nicht-spannungsabhängige Kationen-Kanäle, bestehend aus sechs transmembranen Segmenten, die vermutlich durch eine Gruppierung zu Tetrameren einen funktionellen Kanal bilden. Der so genannte „poreloop“ zwischen den Segmenten 5 und 6 bildet die Pore des Kanals aus (Montell *et al.*, 2002). Bei der Aktivierung des Kanals entsteht ein Kationen-Einstrom, wobei die Permeabilität für Kalzium am größten ist. Die Aktivierung von TRPV-Untereinheiten wird durch mehrere Stimuli erzielt, z.B. durch Hitze, Kälte,

Protonen, Endocannabinoide, Lipide, Phorbole, Osmolaritätsänderungen und Druck (Clapham *et al.*, 2001; Gunthorpe *et al.*, 2002; Montell *et al.*, 2002). Es konnte gezeigt werden, dass TRPV1 bei der Maus nahezu ausschließlich in sensiblen Neuronen exprimiert wird (Caterina *et al.*, 1997).

Anhand der Erkenntnisse, die durch neurophysiologische und morphologische Studien gewonnen wurden, konnten somit distinkte Populationen von Nozizeptoren mit spezialisierten funktionellen Eigenschaften identifiziert werden. Es wird daher vermutet, dass die spezialisierte Sensibilität funktionell verschiedener Gruppen von Nozizeptoren eine molekulare Grundlage hat (Snider und McMahon, 1998). Die Kenntnisse über die molekularen Transduktionsmechanismen in den peripheren Afferenzen konnten in den letzten Jahren um ein Vielfaches erweitert werden (Eglen *et al.*, 1999; Wood, 2000; Julius und Basbaum, 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde ein weiteres System, das durch molekularbiologische Methoden identifiziert werden konnte und dem eine bedeutende Rolle bei der Schmerzweiterleitung zuzukommen scheint, untersucht.

Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit und der Ligand SCF werden schon seit fast einem Jahrhundert untersucht: die allelischen Mutationen von c-Kit (*W*) und von SCF (*Steel*, *Sl*) führen zu einem dominanten weißen Bauchfleck. Die Untersuchungen an Tieren mit homozygoten Mutationen in diesen Genen gaben den ersten Hinweis auf eine essentielle Funktion dieses Rezeptortyrosinkinase-Signalweges in der Entwicklung von Säugern. Der SCF/c-Kit-Signalweg spielt eine zentrale Rolle bei der Entwicklung von Keimzellen, Melanozyten, Mastzellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen. Hypomorph oder loss-of-function Allele von *W* oder *Sl* führen zu perinataler Lethalität, welches es bisher unmöglich machte den c-Kit/SCF-Signalweg im adulten Tier zu untersuchen. Durch die Etablierung eines c-Kit/Epo Mausstammes (2.1.7) konnte c-Kit zum ersten Mal im adulten Nervensystem untersucht werden.

In Vorarbeiten zu dieser Arbeit konnte anhand von Expressionsanalysen gezeigt werden, dass die Rezeptortyrosinkinase c-Kit im dorsalen Horn des Rückenmarks

exprimiert wird. Durch *in situ*-Hybridisierung konnte nachgewiesen werden, dass c-Kit in Lamina I und in der Substantia gelatinosa des dorsalen Horns, sowie in kleinen und mittelgroßen Spinalganglien-Neuronen exprimiert wird und damit einen potenziellen Kandidaten für die Prozessierung von Schmerzempfindungen darstellt.

Die Ergebnisse konnten anhand der Affymetrix-Microarray-Methode bestätigt werden und zeigten, dass c-Kit neben zahlreichen anderen Genen im dorsalen Rückenmark exprimiert wird.

Mit der Affymetrix-Microarray-Methode wurde ein weiteres potenziell interessantes Gen, *Teashirt3* (*Tshz3*), identifiziert und anhand von Expressionsanalysen untersucht. Es kodiert für das murine Homolog von *Drosophila* Teashirt, ein Zink-Finger-Protein mit verschiedenen Funktionen in der Entwicklung der Fliege (Caubit *et al.*, 2000; Fasano *et al.*, 2001). *Drosophila Tshz* spielt bei der Regulation von Ziel-Genen des Wnt/Wingless-Signalweges eine Rolle und interagiert mit Komponenten unterhalb des Signalweges von BMPs (Bone Morphogenic Protein) (Gallet *et al.*, 1999; Saller *et al.*, 2002; Waltzer *et al.*, 2001). Die Teashirt-Gene der Maus werden in unterschiedlichen Geweben des sich entwickelnden Embryos exprimiert u.a. dem zentralen und peripheren Nervensystem und sind damit potenziell interessante Zielobjekte für die funktionelle Untersuchung in der Maus.

Um die *in vivo*-Funktion von *Teashirt3* während der Entwicklung des dorsalen Rückenmarks näher charakterisieren zu können, wurden zwei Mauslinien etabliert, deren detaillierte Phänotypanalyse in dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. In der ersten Mauslinie wurde die kodierende Sequenz des *Teashirt3*-Gens durch das *LacZ*-Reportergen ersetzt. In der zweiten Mauslinie wurde mittels Cre/loxP-System das *Teashirt3*-Gen latent (konditionales Allel) mutiert. Mithilfe des Cre/loxP-Systems lässt sich *Teashirt3* direkt im Zielgewebe ausschalten, ohne die Funktion des Gens in anderen Geweben zu beeinträchtigen. Damit ist es möglich die Funktion des *Teashirt3*-Gens auch in späteren Entwicklungsstadien zu untersuchen.

1.2 Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit

c-Kit wurde erstmals 1914 als „dominant white spotting mutation“ in Untersuchungen an der Hausmaus von Little *et al.* beschrieben (Little CC, 1937). Tiere mit dieser Mutation besitzen einen weißen Bauchfleck. Das c-Kit Gen hat strukturelle Homologien zu v-kit, dem Onkogen des Hardy-Zuckerman IV feline sarcoma virus (Besmer *et al.*, 1986). Insgesamt besteht eine hohe speziesübergreifende Homologie des Rezeptors. Das humane Proto-Onkogen c-Kit wurde 1987 von Yarden identifiziert und kloniert (Yarden *et al.*, 1987). c-Kit wurde bei der Maus auf dem White spotting (*W*)-Locus lokalisiert (Nocka *et al.*, 1989; Chabot *et al.*, 1988a; Geissler *et al.*, 1988a).

Der c-Kit-Rezeptor wird in hämatopoetischen Stammzellen, in Mastzellen sowie in Keimzellen konstitutiv exprimiert (Galli *et al.*, 1993a; Hamann *et al.*, 1994; Strohmeyer *et al.*, 1995). In der Haut wurde c-Kit in Melanozyten, vermehrt in denen der basalen Epidermis und der Haarfollikel, identifiziert (Lammie *et al.*, 1994). Der c-Kit-Rezeptor ist an der Proliferation, Adhäsion, Differenzierung, funktionellen Reifung sowie am Erhalt einer Vielzahl an differenzierten Zellen beteiligt (Alexander und Nicola, 1998; Kitamura *et al.*, 1998; Ashman, 1999).

Bei der Differenzierung von Melanozyten und in geringerem Maße bei der Proliferation embryonaler Melanoblasten spielt der c-Kit-Rezeptor eine zentrale Rolle (Mayer und Green, 1968; Mintz und Russel, 1957). Dies konnte beispielsweise bei Menschen mit Piebaldismus, einer Erkrankung, die mit der lokalen Reduktion der Melanozytenzahl einhergeht (Fleishman, 1996; Giebel und Spritz, 1991a), gezeigt werden. Hier wurden Mutationen des c-Kit-Rezeptors identifiziert.

Im zentralen Nervensystem wird c-Kit im Cerebellum, Hippocampus, dorsalen Horn des Rückenmarks sowie den dorsalen Hinterwurzelganglionen exprimiert. Es hat eine Größe von 145 kDa und ist auf Chromosom 4 des Menschen und Chromosom 5 der Maus lokalisiert (Yarden *et al.*, 1987).

Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit gehört zu einer Familie nahe verwandter Transmembranproteine, zu denen auch die Rezeptoren PDGFR- α , PDGFR- β , CSF-1R und Flk2/Flt3 gehören (Blume-Jensen and Hunter, 2001; Yarden *et al.*, 1987). Die extrazelluläre Domäne von c-Kit besteht aus fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen, von denen die äußeren drei für die Bindung des Liganden SCF verantwortlich sind (Papayannopoulou *et al.*, 1991) (Abb. 1.3). Nach Bindung von SCF kommt es im intrazellulären Teil des Rezeptors zur Aktivierung der Tyrosinkinasedomäne und damit zur Initiierung der Signalkaskade. Die folgende vierte Immunglobulin-ähnliche Domäne ist an der Rezeptordimerisierung beteiligt. Der Fünften konnte bisher keine bestimmte Funktion zugeordnet werden. Der Rezeptor ist durch eine 23 Aminosäuren lange Transmembrandomäne in der Zellmembran verankert. In Richtung Zellinnerem folgt eine Juxtamembrandomäne, die eine Anzahl von Signalmolekülen bindet: u.a. Lyn (Linnekin *et al.*, 1997), Lck (Krystal *et al.*, 1998), Fyn (Timokhina *et al.*, 1998), Grb2 (Thommes *et al.*, 1999), Shp1,2 und Src. Darauf folgt die Tyrosinkinase, die von einem Kinase-Insert unterbrochen ist. Der membrannähere Teil wird auch als Kinase I bezeichnet. Das Kinase-Insert dient der weiteren spezifischen Bindung von Signalmolekülen, wie die p85-Untereinheit der PI3-Kinase, die an Tyr721 von c-Kit bindet (Lev *et al.*, 1992; Serve *et al.*, 1994). Eine Mutation von Tyrosin zu Phenylalanin an dieser Stelle bewirkt nicht nur eine aufgehobene Phosphorylierung, sondern unterbindet auch die Bindung der zwei Proteine. In Mastzellen hat dies eine verminderte Adhäsion und Actinproduktion nach SCF Stimulierung zur Folge (Serve *et al.*, 1995; Vosseller *et al.*, 1997). Auf den zweiten Teil der Kinase folgt der C-terminale Anteil, der ebenfalls eine hohe Zahl an Bindungspartnern, wie z.B. die Adaptorproteine Grb2 und Grb7, die an Tyr936 binden, aufweist (Thommes *et al.*, 1999).

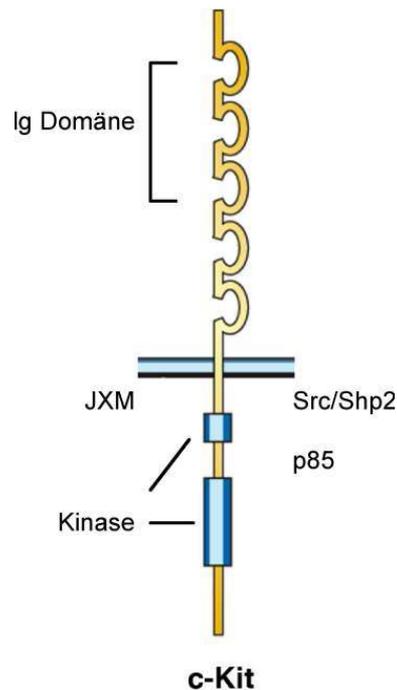


Abb. 1.3 Der c-Kit Rezeptor

Die Bindung von SCF findet über die extrazellulären immunglobulin ähnlichen Domänen statt. Darauf folgt die Transmembrandomäne und im Zellinnern die Juxtamembrandomäne (JXM) und die Kinasedomäne (Blume-Jensen *et al.*, 2001).

1.3 Der Ligand SCF

Der Ligand von c-Kit ist SCF (stem cell factor), auch KL (kit ligand), MGF (mast cell growth factor) oder SLF (steel factor) genannt (Zsebo *et al.*, 1990; Huang *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1990; Williams *et al.*, 1990). SCF wird von Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen produziert und reguliert die Entwicklung sowie funktionelle Prozesse in hämatopoetischen Stammzellen und Mastzellen (Grabbe *et al.*, 1994). Bei Melanoblasten reguliert SCF die Induktion der Proliferation, Differenzierung, Migration und den Erhalt der Zellen sowie die Integrin-Expression und Melanin-Pigmentierung (Miura und Suda, 1992; Lahav *et al.*, 1994; Scott *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 1995; Sviderskaya *et al.*, 1995; Costa *et al.*, 1996).

SCF liegt in zwei Spleißvarianten vor, die sich durch die An- bzw. Abwesenheit einer proteolytischen Schnittstelle unterscheiden (Huang E.J. *et al.*, 1992). Ist die Proteolysedomäne vorhanden, kann SCF durch Spaltung freigesetzt werden. Fehlt

die Proteolyse-domäne bleibt SCF membrangebunden (Abb. 1.4). Beiden Isoformen werden unterschiedliche Funktionen zugeordnet. Die freie Form von SCF ist u.a. an der Migration von Neuralleistenzellen beteiligt, während die membrangebundene Form bei der Differenzierung von Melanozyten und deren Erhalt in der Haut eine Rolle spielt (Wehrle-Haller und Weston, 1995). Die lösliche Form ist die biologisch aktive Form. Bei Versuchen an Mäusen hat sich jedoch gezeigt, dass die Expression der löslichen Form alleine auch zu Fehlern in der Hämatopoese, Pigmentierung und Reproduktion führt (Anderson *et al.* 1990). Beide Spleißvarianten wurden im Knochenmark, in neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut und in Mastzellen detektiert (Ramenghi *et al.*, 1994; Welker *et al.*, 1999).

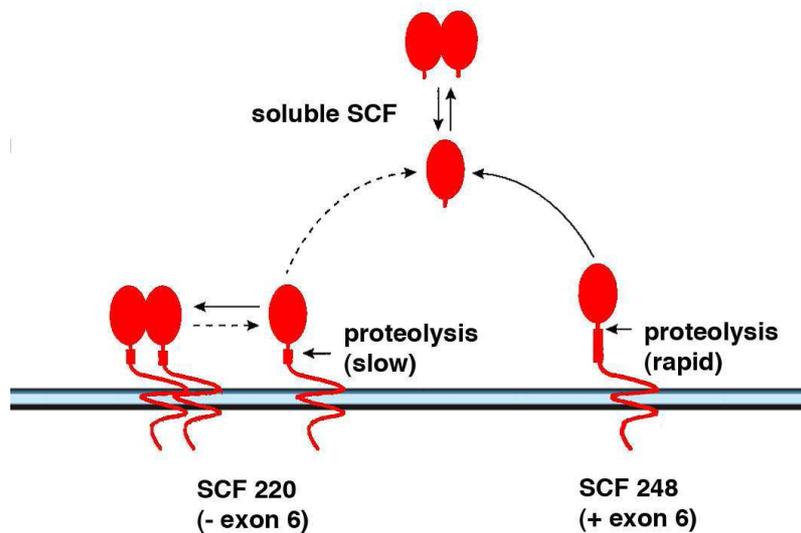


Abb. 1.4 Die unterschiedlichen Isoformen von SCF.

Vom SCF-Gen werden durch alternatives Spleißen zwei verschiedene mRNAs produziert, die sich durch An- und Abwesenheit von Exon 6 unterscheiden. Die daraus resultierenden Isoformen von SCF (220 oder 248 AS) unterscheiden sich hinsichtlich ihrer proteolytischen Spaltung. SCF 220 wird im Gegensatz zu SCF 248 nur langsam gespalten, was vornehmlich zu einem membrangebundenen Dimeren führt (Ashman, 1999).

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Eigenschaften der Rezeptortyrosinkinase c-Kit und des Liganden SCF in der Entwicklung und Funktion peripherer sensibler Neurone zu charakterisieren. Anhand von immunhistochemischen und elektrophysiologischen Analysen sowie Verhaltensexperimenten an c-Kit exprimierenden und c-Kit defizienten Mäusen wurde eine detaillierte Funktionsanalyse von c-Kit und SCF in sensorischen Neuronen und bei der Schmerzverarbeitung angestrebt.

Es soll untersucht werden, ob Mäuse, denen das funktionelle Protein für c-Kit fehlt, ein verändertes Schmerzverhalten gegenüber thermischen oder mechanischen Reizen aufweisen und welcher veränderte Phänotyp diesem Verhalten zugrunde liegt.

Ein weiterer Ansatz ist die Untersuchung des Liganden von c-Kit (SCF) *in vivo* und *in vitro*. Hierbei soll unter Anwendung der *Patch-clamp*-Methode (Neher und Sakmann, 1976) die Auswirkung von SCF auf hitzesensitive Ionenkanäle untersucht werden. Des Weiteren soll an transient mit c-Kit transfizierten HEK 293 eine mögliche Wechselwirkung zwischen c-Kit und Proteinen der hitzeempfindlichen TRP-Kanal-Familie untersucht werden.