

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurden die neuronalen Funktionen und Eigenschaften der Rezeptortyrosinkinase c-Kit und des Liganden SCF untersucht.

Während die Untersuchungen des Protonkogens c-Kit schon lange Gegenstand der Forschung sind, ist über seine Funktion und Eigenschaft in peripheren sensiblen Neuronen nur wenig bekannt.

Basierend auf der eingehenden Charakterisierung des Expressionsmusters des c-Kit Gens (3.1) war es möglich, c-Kit einer distinkten Population von Neuronen zuzuordnen und somit eine wichtige Funktion in diesen Nervenzellen zu postulieren. Da es sich bei diesen Neuronen um Zellen handelt, von denen bekannt ist, dass sie in der Weiterleitung von Schmerz eine Rolle spielen, wurde die Hitzesensitivität von Wildtyp mit der von c-Kit mutanten Mäusen mittels des Hargreaves Tests (Hargreaves *et al.* 1988) verglichen (3.4). Außerdem wurde aufgrund der Expressionsergebnisse auch die Mechanosensitivität überprüft (3.4). Darüber hinaus wurde der Frage nachgegangen, inwieweit der Ligand von c-Kit, SCF, Einfluss auf die Hitzesensitivität von Wildtyp und TRPV1^{-/-} Mäusen hat (3.7).

3.1 Charakterisierung der Rezeptortyrosinkinase c-Kit

Sensorische Modalitäten wie Hitze, Kälte und mechanische Reize werden durch spezialisierte Nervenendigungen der peripheren sensorischen Neurone, deren Zellkörper in den Spinal- und Trigeminalganglien lokalisiert sind, detektiert. Schmerzhaft Reize wie z.B. noxische, chemische, mechanische oder thermische Reize, aktivieren nozizeptive Neurone mit kleinem Durchmesser, die aufgrund ihres Fasertyps anatomisch klassifiziert werden können: nicht-myelinisierte C-Fasern oder dünn-myelinisierte A δ -Fasern.

Die phänotypische Differenzierung sensibler Neurone kann somit durch Größe, Myelinisierungsgrad und Leitungsgeschwindigkeit sowie durch neurochemische Marker vorgenommen werden. Zur genaueren Charakterisierung von c-Kit soll auf diese drei Punkte im Folgenden näher eingegangen werden.

3.1.1 Expressionsanalyse mittels *in situ*-Hybridisierung

Die zentralen afferenten sensorischen Nervenfasern bilden synaptische Verbindungen mit Ziel-Neuronen im Rückenmark, die die sensorischen Informationen in höhere Gehirnregionen wie z.B. den Thalamus weiterleiten. Nozizeptoren innervieren vorrangig den superfiziellen Bereich des dorsalen Horns (layer I und II). Anhand einer whole mount *in situ*-Hybridisierung konnte die Expression von c-Kit in genau diesen Regionen des dorsalen Rückenmarks und im Spinalganglion nachgewiesen werden (Abb. 3.1).

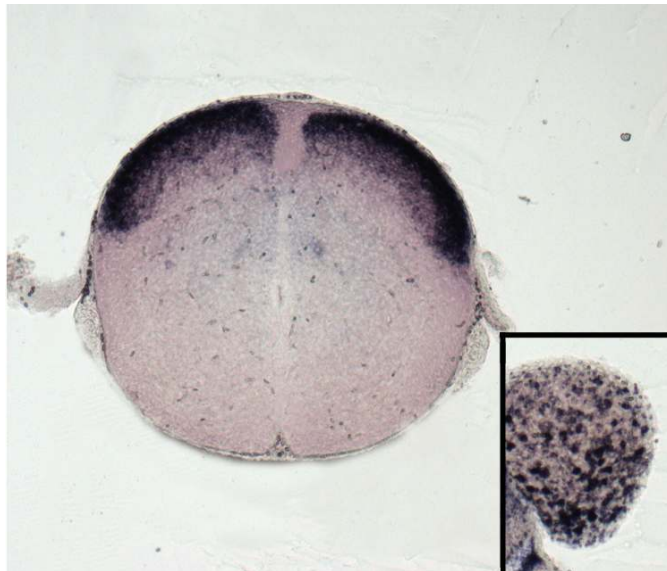


Abb. 3.1 c-Kit *In situ*-Hybridisierung im adulten Rückenmark und im Spinalganglion

In situ-Hybridisierung mit einer c-Kit spezifischen Sonde. Die dunkel gefärbten Bereiche zeigen die Expression von c-Kit im dorsalen Bereich des Rückenmarks (layer I und II) und im dorsalen Spinalganglion (Ausschnitt).

3.1.2 Immunhistochemische Expressionsanalyse

Durch die detaillierte Expressionsanalyse konnte c-Kit als eine Subpopulation der TrkA⁺ Neurone identifiziert werden. TrkA gilt als Marker für Nozizeptoren; dies könnte bedeuten, dass c-Kit im Zusammenhang mit Schmerzempfindung steht. Alle Nozizeptoren sind während Ihrer Entwicklung abhängig von der Signalgebung durch die Rezeptortyrosinkinase TrkA (1.1). In der postnatalen Entwicklung wird

die Expression von TrkA von ca 50% der Nozizeptoren abgeschaltet und die Expression der Rezeptortyrosinkinase c-Ret angeschaltet. TrkA⁺ und c-Ret⁺ Neurone können anhand von neurochemischen und elektrophysiologischen Parametern weiter in distinkte Klassen eingeteilt werden. Um diese zwei Hauptklassen von Nozizeptoren zu unterscheiden wurden Antikörper gegen die Rezeptortyrosinkinasen TrkA und c-Ret verwendet (Abb. 3.2 C,D,E,F). In Abbildung 3.2 C,D,D' ist zu sehen, dass die Mehrheit der c-Kit positiven Neurone (>95%) auch TrkA exprimieren und ein geringerer Anteil (14%) c-Ret positiv ist.

Mittels *in situ*-Hybridisierung auf Gewebeschnitten von Spinalganglien konnte gezeigt werden, dass c-Kit in kleinen und mittelgroßen Neuronen exprimiert wird (Abb. 3.2 A,B). Die Quantifizierung ergab, dass c-Kit in ca. 20% der DRG-Neurone exprimiert wird. Hierbei handelt es sich zum größten Teil um Neurone mit kleinem Durchmesser, aber auch in mittelgroßen DRG-Neuronen wird c-Kit exprimiert (Abb. 3.2 A,A',B,B'). Bei Neuronen mit kleinem Durchmesser handelt es sich vorrangig um C-Fasern, die wie in Kapitel 1.1 beschrieben an der Prozession von nozizeptivem Schmerz beteiligt sind.

Es wurden Antikörper gegen die Neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) und Substance P (SP) verwendet, die die peptidergen Neurone kennzeichnen. Des Weiteren wurden Antikörper gegen den Vanilloid Rezeptor 1 (TRPV1) und den purinergen Rezeptor P2X3 sowie gegen die Filament-Proteine Neurofilament (NF) und Peripherin verwendet. Ein weiterer Marker war das Lectin IB4, das (-D-Galaktopyranosyl-Reste erkennt und die nicht-peptidergen Neurone kennzeichnet. Eine kleine Anzahl von c-Kit positiven Neuronen ist positiv für IB4 (Abb. 3.3 A,B,B'). Die meisten der c-Kit positiven Neurone sind peptiderge Neurone, wie aus der Coexpression mit CGRP und Substance P ersichtlich ist (Abb. 3.2 I,J,J'). Mehr als die Hälfte der c-Kit⁺ Neurone exprimieren auch den Kationen-Kanal TRPV1 und den purinergen Rezeptor P2X3 (Abb. 3.3 C,D,D'; E,F,F'). Zusätzlich zu den Nozizeptoren, gekennzeichnet durch ihren schmalen Durchmesser und die Expression von Peripherin (Abb. 3.3 G,H,H'), wird die geringere Anzahl von mittelgroßen c-Kit positiven Neuronen durch die Coexpression mit Neurofilament (Abb. 3.2 G,H,H') sichtbar.

In Abbildung 3.4 ist zusammenfassend die Verteilung der c-Kit⁺ Neurone in Relation zu der gesamten Population im dorsalen Spinalganglion (McMahon *et al.*, 1995) dargestellt. Wie zuvor berichtet befindet sich der größte Anteil c-Kit positiver Neurone unter den TrkA exprimierenden C-Fasern, ein geringer Anteil unter den c-Ret⁺ Neuronen und ein Teil unter den myelinisierten A-Fasern.

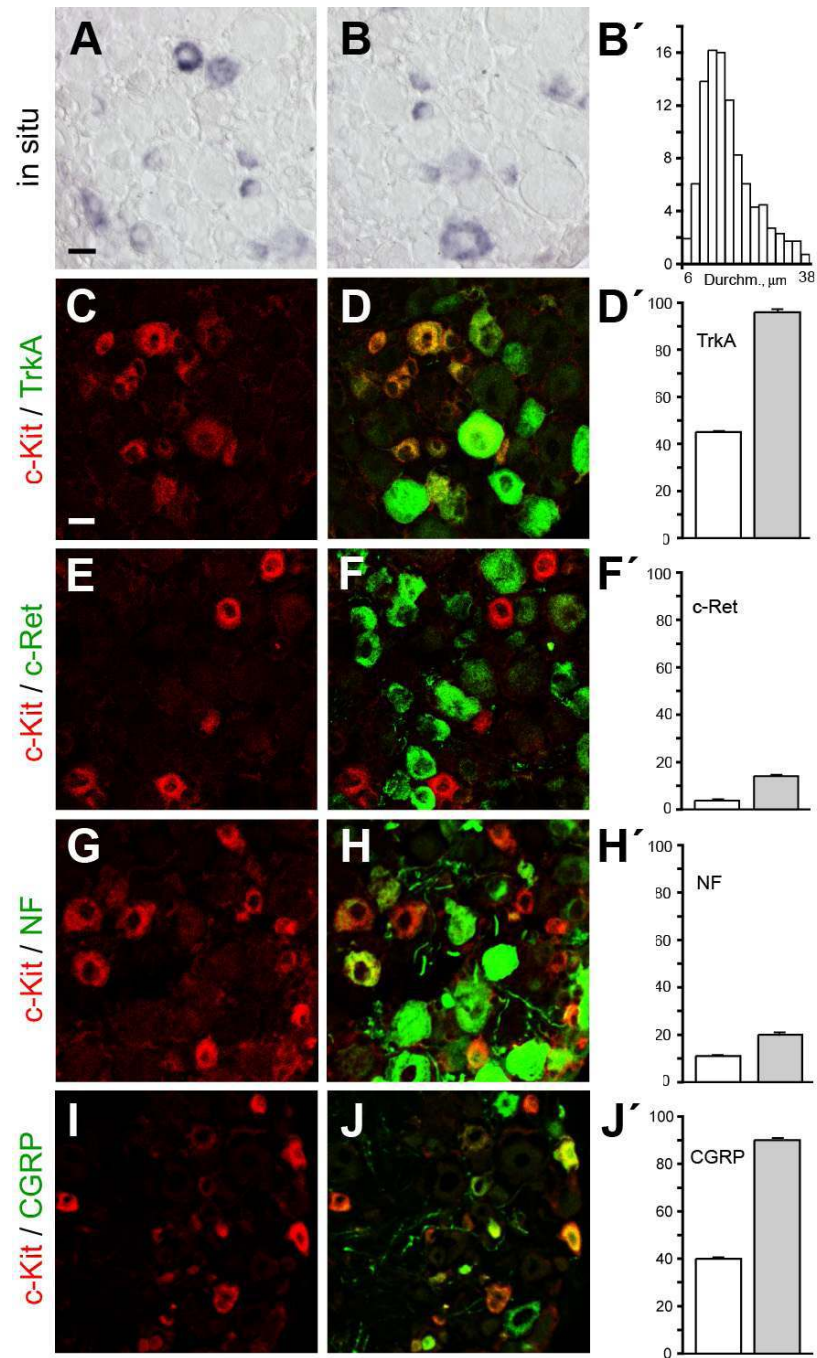


Abb. 3.2 *In situ* und immunhistochemische Expressionsanalyse von c-Kit im dorsalen Spinalganglion der adulten Maus

In situ-Hybridisierung von c-Kit. c-Kit ist in kleinen und mittelgroßen Neuronen exprimiert (A, B). Größen-Verteilung der c-Kit positiven Neurone; der prozentuale Anteil c-Kit⁺ Zellen ist im Verhältnis zum Durchmesser dargestellt (Darstellung in 2 μm Schritten) (B'). C- T, immunhistochemische Analyse der c-Kit Proteinexpression (rot) und der Co-Expression mit den folgenden neurochemischen Markern (grün): C, D, TrkA; E, F, c-Ret; G, H, isolectin B4; I, J, CGRP; D- J', Quantifizierung, Prozent der Neurone die positiv für einen neurochemischen Marker sind und c-Kit coexprimieren (weißer Balken); Prozent c-Kit positiver Neurone die einen neurochemischen Marker coexprimieren (grauer Balken). Größenstandard A-J, 20 μm .

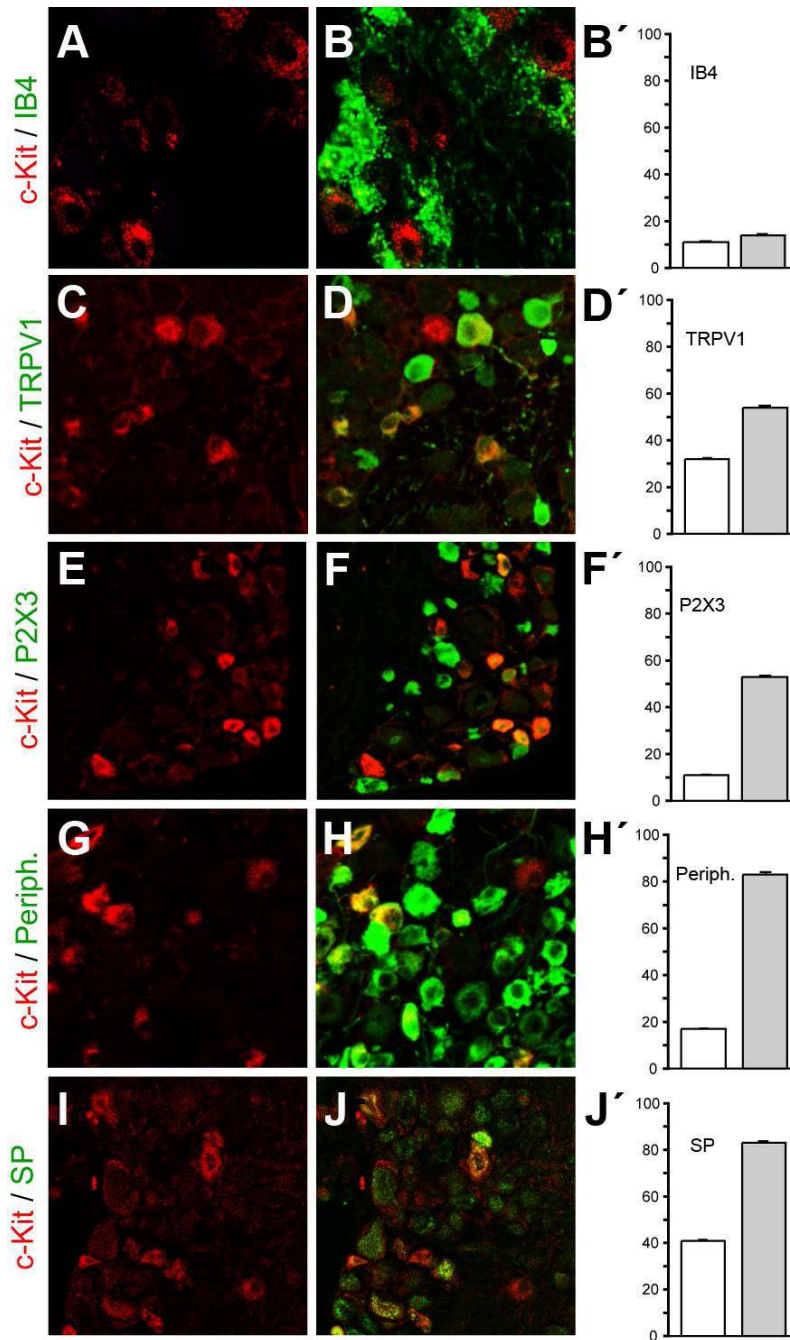


Abb. 3.3 *In situ* und immunohistochemische Expressionsanalyse von c-Kit im dorsalen Spinalganglion der adulten Maus

Immunohistochemische Analyse der c-Kit Proteinexpression (rot) und der Co-Expression mit den folgenden neurochemischen Markern (grün): A, B, IB4; C, D, TRPV1; E, F, P2X3; G, H, Peripherin; I, J, Substance P; A'- J', Quantifizierung, Prozent der Neurone die positiv für einen neurochemischen Marker sind und c-Kit coexprimieren (weißer Balken); Prozent c-Kit positiver Neurone die einen neurochemischen Marker coexprimieren (grauer Balken). Größenstandard A-J, 20 μ m.

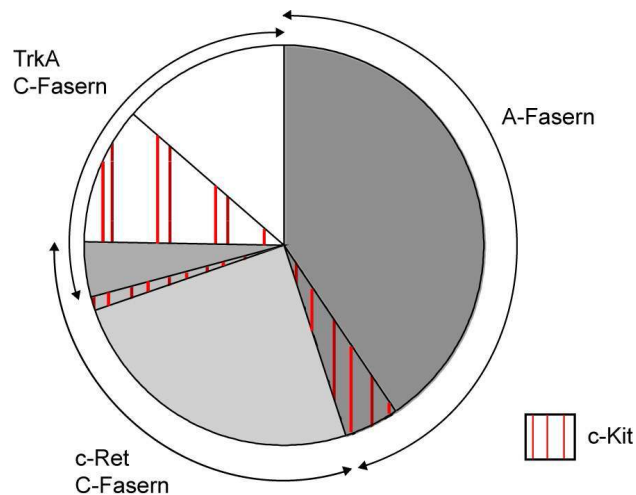


Abb. 3.4 Zusammenfassung der Ergebnisse zur Expressionsanalyse von c-Kit

Verteilung c-Kit positiver Neurone in Bezug auf die Gesamtpopulation im dorsalen Spinalganglion (McMahon *et al.*, 1995). c-Kit positive Fasern (rot gestrichelt) sind dargestellt als Teil der gesamten C-Fasern (weiß, TrkA+; hellgrau, c-Ret+; mittelgrau, TrkA+/c-Ret+) und der myelinisierten Afferenzen (dunkelgrau, A-Fasern).

3.1.3 Radioaktive Expressionsanalyse

Weitere Untersuchungen verschiedener Hirnareale wurden mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung mit einer Sonde gegen das c-Kit Gen durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass c-Kit in bestimmten Regionen des Olfaktorischen Bulbus (Abb. 3.5) exprimiert wird. Die stärkste Expression ist in der periglomerulären Schicht und der granulären Zellschicht zu sehen. Im Gehirn wird c-Kit im gesamten Cortex und den Basalganglien exprimiert. Das Muster ähnelt einem für Interneuronen typischen Bild (Abb. 3.5).

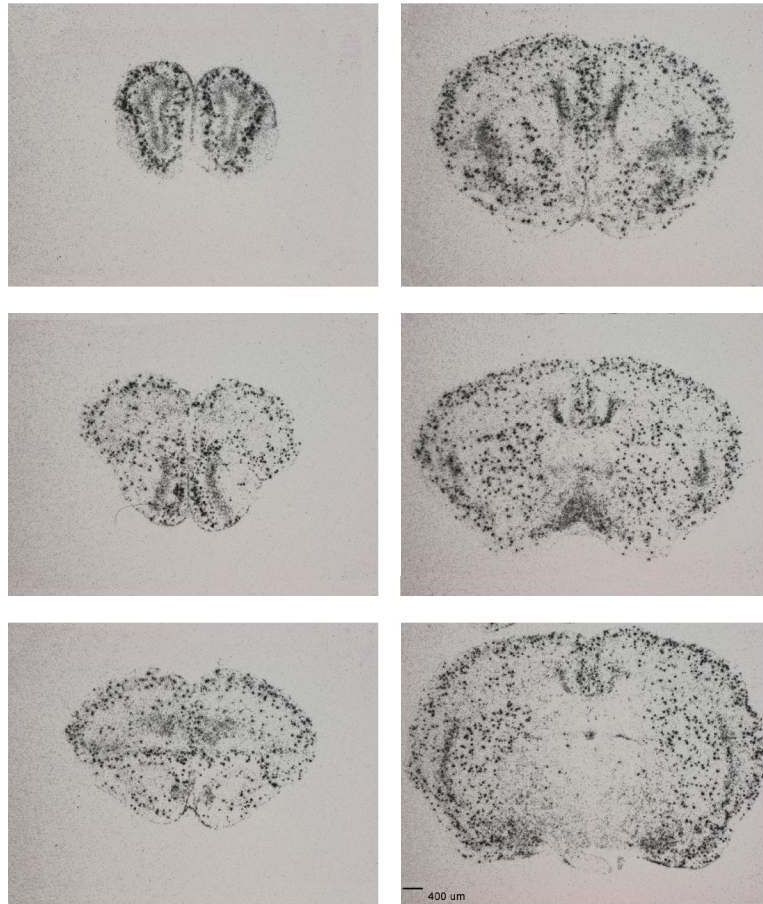


Abb. 3.5 Radioaktive *in situ*-Hybridisierung auf Transversalschnitten von adulten Mäusen

c-Kit ist in der periglomerulären Zellschicht und der granulären Zellschicht des Olfaktorischen Bulbus (links oben) exprimiert; außerdem in weiten Teilen des gesamten Cortex und den Basalganglien.

Die Expressionsdaten legten eine Funktion in der Schmerzempfindung nahe. Aus diesem Grund sollte die Funktion von c-Kit in peripheren sensiblen Neuronen weiter untersucht werden. Hierzu wurden c-Kit mutante Mäuse vermehrt, um aus dem resultierenden Phänotyp Rückschlüsse auf die Funktion ziehen zu können.

3.2 Etablierung des c-Kit Stammes

Im c-Kit Locus existieren viele spontane Allele, hypomorphe sowie loss-of-function Punkt-Mutationen oder Deletions-Allele. In dieser Arbeit wurde ein Mausstamm

verwendet, der ein loss-of-function Allel (bezeichnet als *W*, für dominant white spotting) besitzt, das aus einer Punktmutation in der 5' Intron donor Spleißstelle unterhalb der Exonsequenz die für die Transmembran-Domäne kodiert, entstanden ist (Hayashi *et al.*, 1991). Es wurde ein spezifischer Inzucht-Substamm, der das *W* Allel trägt (WB-pedigree, Jackson Labs), verwendet und während der Inzucht Prozedur durch Selektion von Elterntieren mit erhöhter Überlebensrate ihrer homozygoten Nachkommen, etabliert.

Die *c-Kit*^{-/-} Mutanten wurden durch Kreuzung von heterozygoten *c-Kit*^{W/-} Tieren erzeugt. Die meisten wachstumsfähigen *c-Kit*^{W/W} mutanten Tiere starben jedoch in der ersten postnatalen Woche zwischen Tag 7 und 9 wie zuvor beschrieben (Russel, 1995), nur ein geringer Anteil (6%) wurde älter als 4 Wochen (Abb. 3.6). Um die Überlebensrate zu erhöhen wurden *c-Kit*^{+/-} Weibchen mit transgenen Erythropoietin (*Epo*^{tg}, (Ruschitzka, 2000)) überexprimierenden Männchen gekreuzt. Dadurch wurden doppelheterozygote männliche Tiere erzeugt. Diese wurden dann mit *c-Kit*^{+/-} Weibchen verpaart, um gerettete *c-Kit*^{-/-}/*Epo*^{tg} Mutanten zu erhalten (Waskow, 2002), bei denen die Erythropoietin-Überexpression den starken Hämatopoese-Phänotyp der *c-Kit* Mutation mildert. Die Überlebensrate der Tiere wurde weiterhin durch spezielles Soft-Futter und Nähragar erhöht, das für Würfe, in denen sich Mutanten befanden, bereitgestellt wurde.

Abbildung 3.6 zeigt das äußere Erscheinungsbild von adulten Wildtyp-Tieren (+/+) sowie heterozygot (+/-) und homozygot (-/-) *c-Kit* mutanten Tieren. Eine Quantifizierung der Überlebensraten von Kontroll- (+/+; +/-) und mutanten (-/-) Nachkommen nach Einkreuzung des *c-Kit*^{+/-} mutanten Substammes (WB) oder nach Einführung des Erythropoietin exprimierenden Transgens (*c-Kit*^{-/-}/*Epo*^{tg}), ist in der Tabelle der Abbildung 3.6 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass deutlich mehr *c-Kit*^{-/-}/*Epo*^{tg} Mutanten (28%) als *c-Kit*^{-/-} Mutanten (6%) überleben.



	Kontrolle	c-Kit ^{-/-}	Kontrolle	c-Kit ^{+/-} /Epo ^{tg}
Nachkommen (% Gesamtzahl)	397 (79%)	107 (21%)	216 (81%)	50 (19%)
Überlebensrate (%) nach 4 Wochen	100%	6%	100%	28%

Abb. 3.6 Äußeres Erscheinungsbild der c-Kit Maus mit Überlebensraten der Nachkommen

Das Bild zeigt den äußerlichen Phänotyp der c-Kit Mäuse. Heterozygote Tiere tragen den charakteristischen weißen Bauchfleck, homozygote Tiere sind weiß, Wildtyp-Mäuse schwarz. In der Tabelle sind die Überlebensraten der mutanten c-Kit^{-/-} und c-Kit^{+/-}/Epo^{tg} Tiere dargestellt.

3.3 Histologische vergleichende Expressionsanalyse

Durch Arbeiten von Jin K (Jin K *et al.*, 2002) ist bekannt, dass c-Kit während der Ischemie in der Subventrikularschicht und in Teilen des Hippocampus vermehrt exprimiert wird. Um sicher zu gehen, dass die Entwicklung der c-Kit Neurone in mutanten Mäusen nicht gestört ist, wurde ein histologischer Vergleich von c-Kit Wildtyp und c-Kit mutanten Mäusen mittels Toluidin-Blau-Färbung auf Methacrylatschnitten durchgeführt. Dabei wurden Bereiche des Rückenmarks und bestimmte Areale des Gehirns, die auch durch die Expressionsanalysen mittels radioaktiver *in situ*-Hybridisierung bekannt waren, näher betrachtet. Es ließ sich kein eindeutiger Unterschied im Rückenmark von cervical nach lumbar zwischen Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren feststellen (Abb. 3.7).

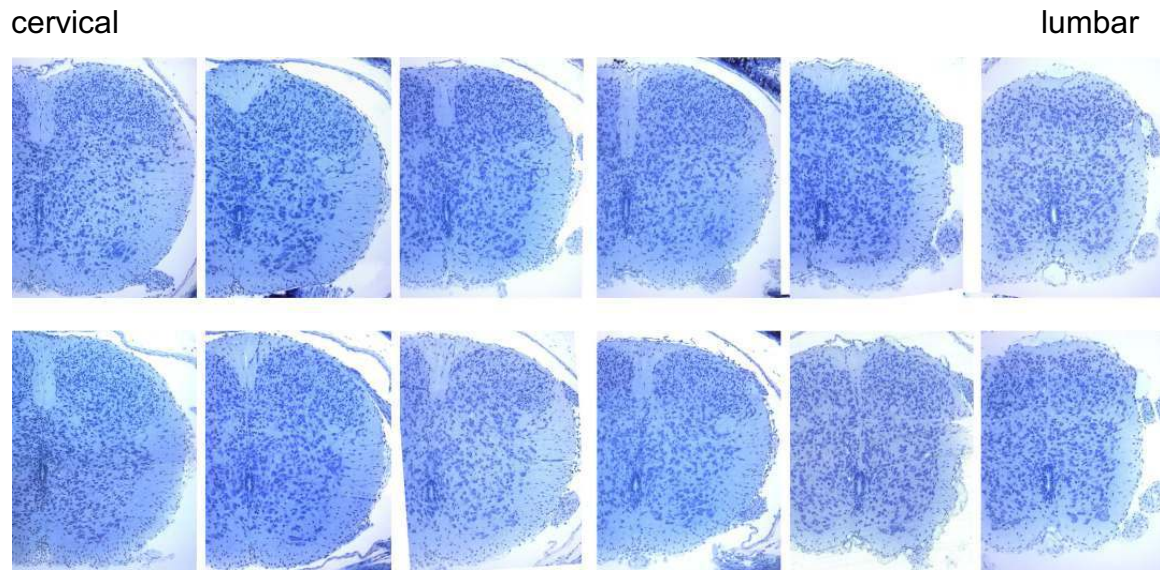


Abb. 3.7 Histologische Toluidin-Blau-Färbungen auf Methacrylatschnitten des Rückenmarks

Methacrylatschnitte des Rückenmarks von Wildtyp (obere Reihe) und c-Kit mutanten Tieren (untere Reihe) wurden mit Toluidin-Blau gefärbt. Darstellung der Schnitte von cervical nach lumbar. Es sind keine eindeutigen Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen.

Im Gehirn wurden Methacrylatschnitte im Bereich des Hippocampus und der Ventrikularschicht näher betrachtet. Abbildung 3.8 zeigt, dass in der Ventrikularschicht von c-Kit Mutanten im Vergleich zu Wildtyp Mäusen kein signifikanter Unterschied besteht. Betrachtet man die Region des Hippocampus näher, so fallen auch hier keine signifikanten Unterschiede auf.

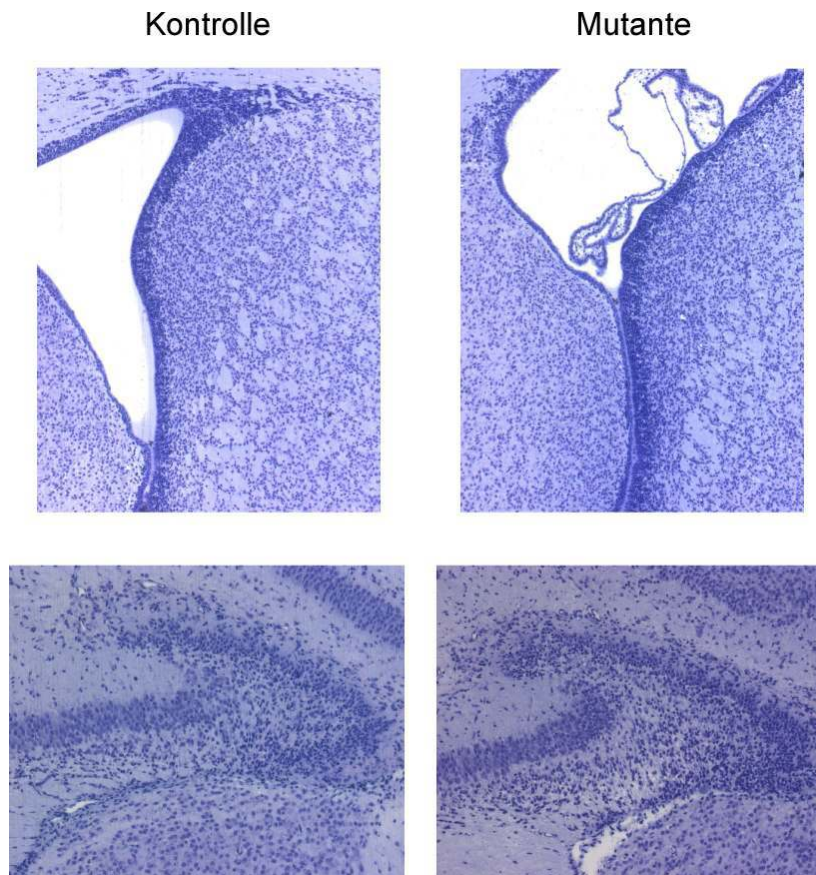


Abb. 3.8 Histologische Toluidin-Blau-Färbungen auf Methacrylatschnitten des Gehirns

Methacrylatschnitte der Ventrikularschicht (oben) von Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren und des Hippocampus (unten) von Wildtyp und Mutanten wurden mit Toluidin-Blau gefärbt. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante zu erkennen.

Des Weiteren wurden mittels vergleichender Analyse auch die Olfaktorischen Bulbi von c-Kit mutanten und Wildtyp Mäusen untersucht, da hier das Gen für c-Kit in distinkten Schichten (Abb. 3.5) stark exprimiert wird. In Abbildung 3.9 ist keine auffällige Veränderung zwischen Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren im Bereich des Olfaktorischen Bulbus zu erkennen.

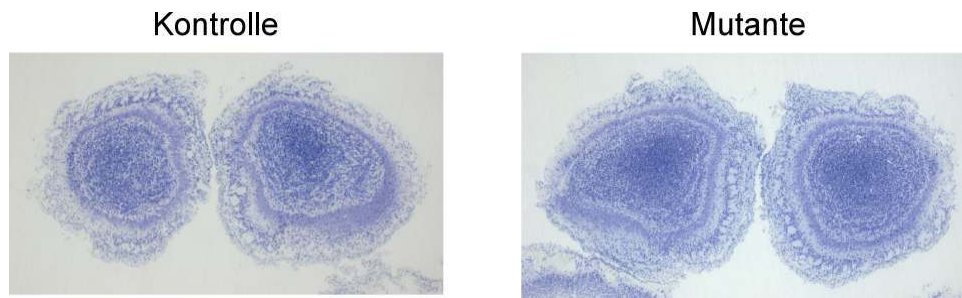


Abb. 3.9 Histologische Toluidin-Blau-Färbungen auf Methacrylatschnitten der Olfaktorischen Bulbi

Methacrylatschnitte der Olfaktorischen Bulbi von Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren gefärbt mit Toluidin-Blau. Es sind keine offensichtlichen Unterschiede zu erkennen.

3.4 Verhaltenstests

Es wurden Untersuchungen zu schmerz-assoziiertem Verhalten von Wildtyp und c-Kit defizienten Mäusen durchgeführt.

3.4.1 Hitze-Hypoalgesie von c-Kit^{-/-} Mäusen

Da c-Kit wie bereits gezeigt (Abb. 3.2) vorrangig in Nozizeptoren exprimiert ist und auch in einer Region des Rückenmarks (layer I,II) nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.1), in die Nozizeptoren projizieren, wurde zunächst der radiant heat test nach Hargreaves (Hargreaves *et al.*, 1988) durchgeführt.

Dafür wurde die Latenzzeit von jeweils 12 Wildtyp und 12 mutanten Tieren in Reaktion auf eine Hitzestimulation durch eine Leuchtdiode, die unter die Hinterpfote der Maus platziert wurde (2.2.6.1), in regelmäßigen Abständen gemessen.

Hierbei zeigten c-Kit defiziente Mäuse eine eindeutige Hypoalgesie auf den Hitzestimulus. Die Latenzzeit war gegenüber Wildtyp Tieren um 40% höher (Abb. 3.10).

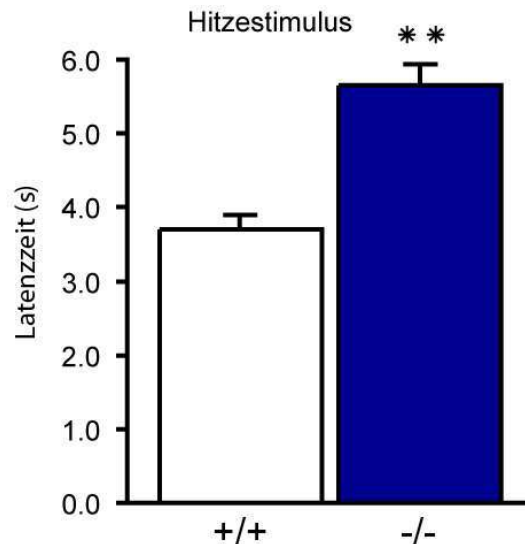


Abb. 3.10 Hitze-Hypoalgesie bei c-Kit defizienten Mäusen

Verhaltenstest von Wildtyp (weißer Balken) und c-Kit^{-/-} mutanten (blauer Balken) Mäusen. Die Daten zeigen eine um 40% erhöhte Latenzzeit bei c-Kit^{-/-} Mutanten in Reaktion auf Hitze (p<0,005).

3.4.2 c-Kit^{-/-} Mäuse zeigen eine geringere Reizschwelle bei taktile Stimulation

In diesem Versuch wurde mittels eines Aesthesiometers ein punktierter mechanischer Reiz an der Hinterpfote der Maus appliziert. Es wurden jeweils 10 Wildtyp und 10 mutante Mäuse auf ihre Latenzzeit in Reaktion auf den Reiz untersucht. Im Gegensatz zum Hitzetest nach Hargreaves wurde hier eine höhere Sensibilität c-Kit defizienter Tiere auf mechanische Reize beobachtet. Die mechanische Reizschwelle, bei der die Tiere ihre Pfote wegzogen, lag in etwa 20% unter der der Wildtyp Tiere (Abb. 3.11).

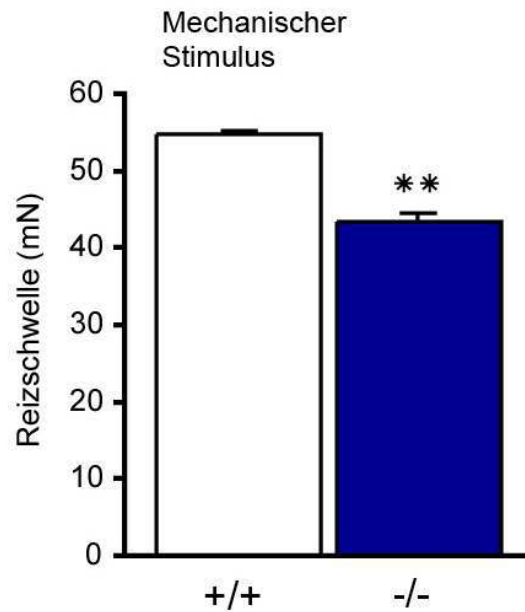


Abb. 3.11 Taktile mechanische Stimulation bei c-Kit defizienten Mäusen

Reaktion von Wildtyp (weißer Balken) und c-Kit^{-/-} mutanten (blauer Balken) Mäusen auf einen vertikal applizierten mechanischen Reiz. c-Kit^{-/-} Mutanten zeigen eine niedrigere Reizschwelle zur Auslösung einer Reaktion ($p < 0,005$).

3.5 Kontrolle der sensorischen Nervenbahnen

Über die peripheren Enden werden mechanische, thermische oder chemische Signale aus der Umgebung aufgenommen. Die Zellkörper der Primärafferenzen befinden sich im Spinalganglion. Die zentralen Enden werden mit spezifischen Projektionsneuronen im schichtartig (Lamina I-VI) organisierten dorsalen Horn des Rückenmarks verschaltet (Abb. 1.2). Neurone, die nozizeptive Informationen aufnehmen und weiterleiten (A-, C-Fasern), enden überwiegend in den Schichten I, II und V. Die als *Substantia gelatinosa* bezeichnete Schicht II enthält kleine Interneurone und die Ausläufer von Dendriten der großen Neurone aus Schicht V. Nozizeptive Afferenzen aus der Haut enden in der obersten Schicht und bilden synaptische Kontakte mit Neuronen der Schicht Ilo (outer) (C-Fasern) sowie I und V (A-Fasern), während nicht-nozizeptive taktile Afferenzen aus der Haut (A β -Fasern) in den Schichten IV und V enden (WDR-Neurone, „wide dynamic range“). Um auszuschließen, dass der hier dargestellte Phänotyp auf einer unzureichenden Innervation im peripheren Bereich beruht oder gar einem Verlust

von Neuronen zugrunde liegt, wurden im Folgenden elektronenmikroskopische Aufnahmen des Saphenous Nervs (3.5.1) und immunhistochemische Untersuchungen an der Haut (3.5.2) und des Rückenmarks (3.5.3) durchgeführt. Außerdem wurde überprüft, ob eventuelle Unterschiede in der Expression der verschiedenen neurochemischen Marker zwischen Wildtyp und c-Kit Mutanten bestehen (3.6).

3.5.1 Elektronenmikroskopische Aufnahmen des Saphenous Nervs

Zur Überprüfung der sensorischen Nervenfasern wurden semi-dünn und ultra-dünn Schnitte des Saphenous Nervs angefertigt, einem cutanen sensorischen Nerv, der die Haut der Hinterpfote der Maus innerviert. Dadurch konnte die genaue Anzahl von nicht-myelinisierten (C-Fasern (Nozizeptoren)) und myelinisierten (A δ Nozizeptoren, A β Mechanozeptoren) Axonen bestimmt werden. Es konnten hierbei keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und c-Kit^{-/-} mutanten Mäusen festgestellt werden. Abbildung 3.12 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts des Saphenous Nervs, in Abbildung 3.13 ist die Quantifizierung der myelinisierten und nicht-myelinisierten Axone dargestellt.

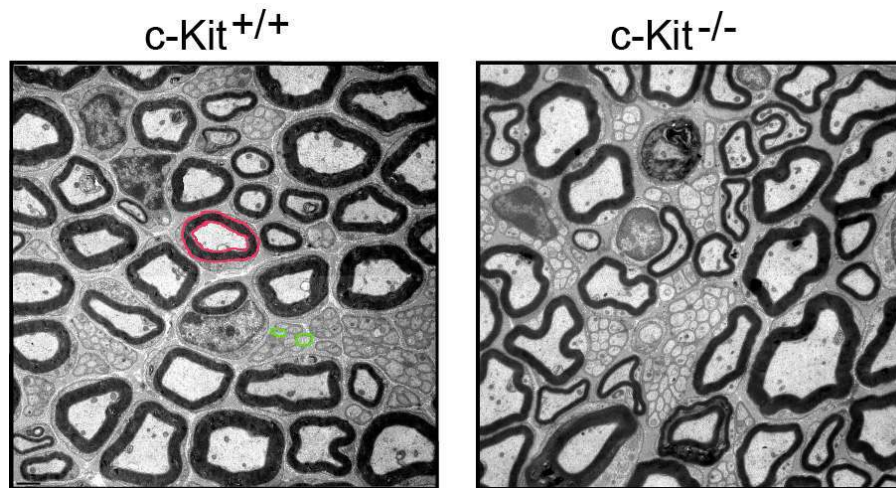


Abb. 3.12 Elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Querschnitts des Saphenous Nervs

Elektronenmikroskopische Aufnahme des Saphenous Nervs von Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren. Es sind myelinisierte (rot) und nicht-myelinisierte Axone zu erkennen (grün) (Balken:1 μm).

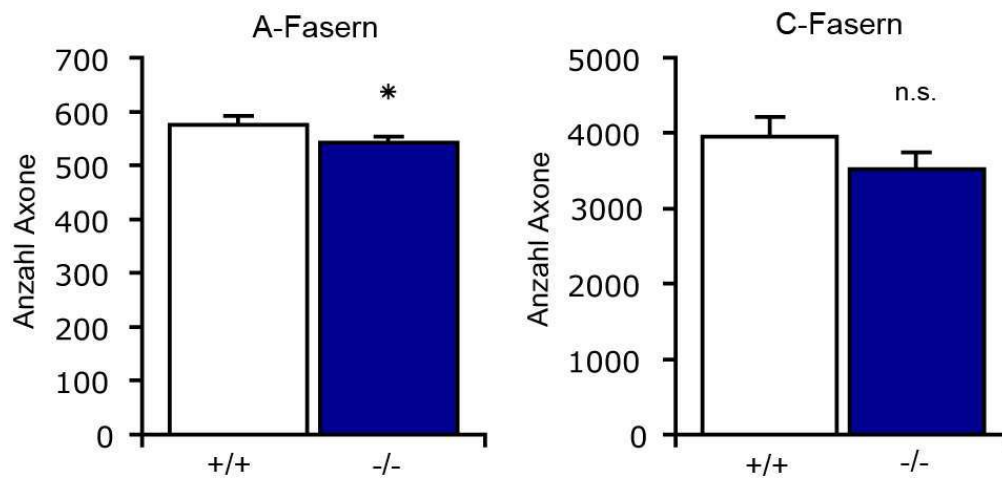


Abb. 3.13 Quantifizierung der Anzahl der Axone im Saphenous Nerv von Wildtyp und c-Kit^{-/-} Tieren

Quantifizierung der Anzahl der Axone im Saphenous Nerv von Wildtyp (weißer Balken) und c-Kit mutanten (blauer Balken) Tieren. Es ist ein geringer Unterschied in Anzahl myelinisierter Axone (A-Fasern) zu erkennen. Der Unterschied in der Anzahl nicht-myelinisierter Axone (C-Fasern) ist nicht signifikant ($p < 0,05$).

3.5.2 Immunhistologische Analyse von Hautschnitten

Die Innervation der Haut wurde immunhistologisch untersucht. Die Analyse mit dem panneuronalen Marker PGP9.5 (Abb. 3.14) zeigt keine offensichtlichen Verluste in der Innervation der Haut von c-Kit mutanten Mäusen; weder in der Dermis noch in der Epidermis oder anderem Zielgewebe wie Arterien oder Muskeln. Auch bei Färbungen mit den peptidergen neurochemischen Markern Substance P und CGRP sind keine offensichtlichen Unterschiede in der Innervation der Haut zu erkennen.

Des Weiteren wurden Färbungen mit dem Liganden von c-Kit, SCF, durchgeführt. In Abbildung 3.15 ist deutlich zu erkennen, dass SCF im Bereich der suprabasalen Keratinozyten (Abb. 3.15 B) nahe der Terminierungspunkte der freien Nervenendigungen (Abb. 3.15 A) exprimiert wird und sogar in den Nervenendigungen selbst vorkommt (Abb. 3.15 D).

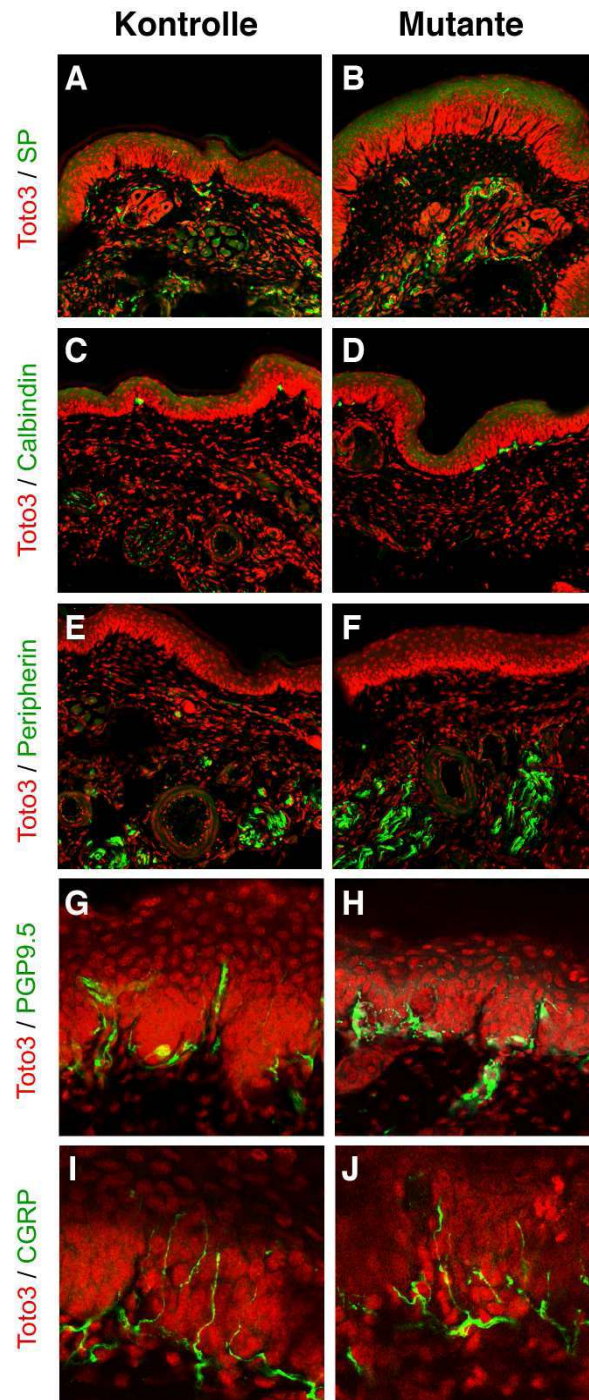


Abb. 3.14 Innervation der Haut bei Wildtyp und c-Kit mutanten Mäusen

Färbungen mit PGP9.5, Substance P oder CGRP (grün) zeigen keine offensichtlichen Unterschiede in der Innervation der Haut zwischen Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren. Färbungen mit Calbindin und Peripherin zeigen ebenfalls keine Auffälligkeiten. Die Nuclei sind rot gefärbt.

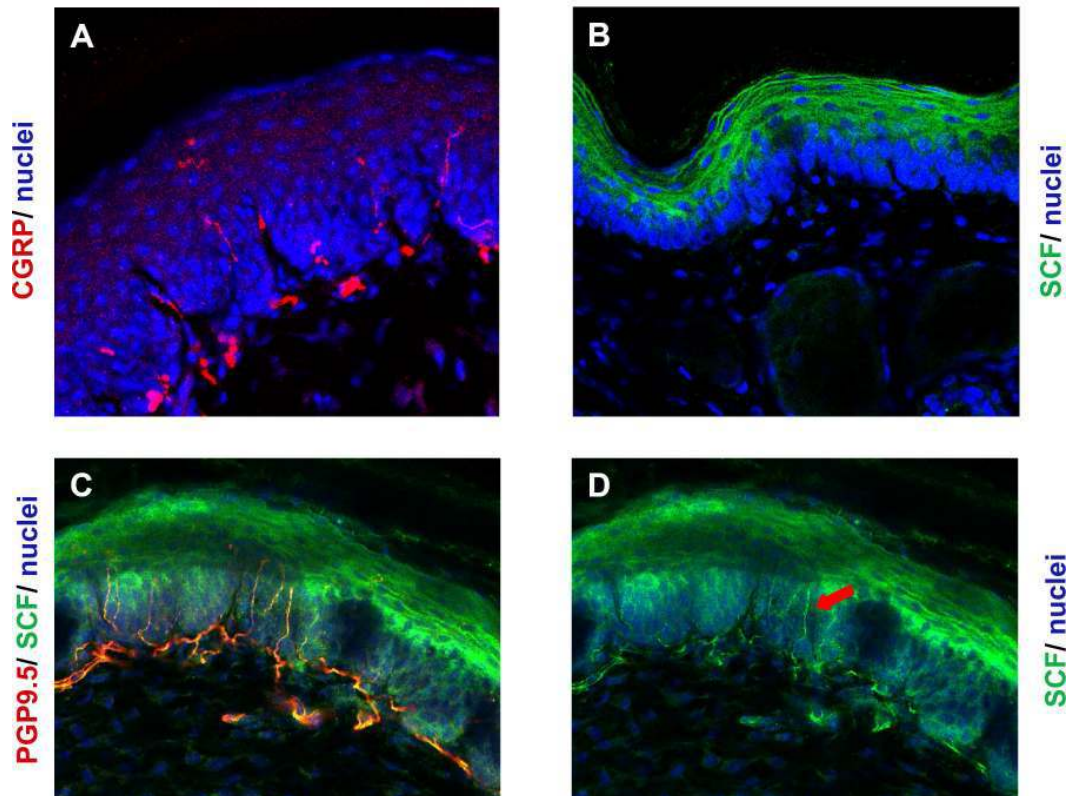


Abb. 3.15 Innervation der Haut und Expression von SCF

Färbung der peptidergen Neurone mit CGRP (A, rot); (B) SCF ist im Bereich der suprabasalen Keratinozyten exprimiert (grün). Färbungen mit PGP9.5 (rot) und SCF (grün), SCF ist auch direkt in einigen Nervenendigungen exprimiert (roter Pfeil).

3.5.3 Immunhistologische Analyse der Innervation des Rückenmarks

Neurochemisch werden in adulten Mäusen zwei distinkte Populationen von schmerzempfindlichen sensorischen Neuronen unterschieden. Die TrkA^+ peptidergen Neurone, die Neuropeptide wie Substance P und CGRP (Calcitonin gene-related peptide) exprimieren, terminieren in den Laminae I und IIo (outer) im Hinterhorn. Die c-Ret^+ IB4-bindenden, „nichtpeptidergen“ Neurone, terminieren hauptsächlich in Lamina IIi (inner) des Hinterhorns.

Untersuchungen zur Innervation des Rückenmarks mit verschiedenen neurochemischen Markern ließen keine eindeutigen Veränderungen in $\text{c-Kit}^{-/-}$ Tieren erkennen (Abb. 3.16).

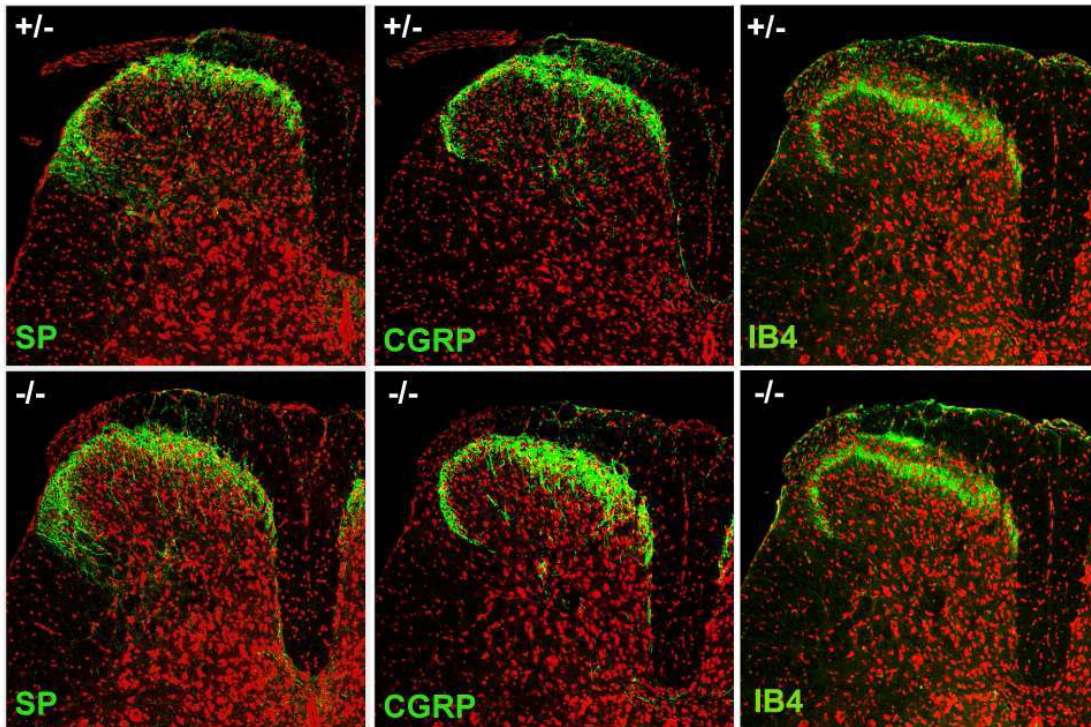


Abb. 3.16 Innervation des Rückenmarks bei Wildtyp und c-Kit defizienten Mäusen

Färbungen des Rückenmarks mit CGRP, substance P und IB4 (grün) in Wildtyp (oben) und c-Kit^{-/-} (unten) Tieren. Es sind keine eindeutigen Unterschiede zu erkennen.

3.6 Vergleich der Expression neurochemischer Marker

Das c-Kit^w Allel ermöglicht es, auch das mutante c-Kit Protein zu detektieren. Dieses wird allerdings in etwas geringerem Maße exprimiert als das normale Genprodukt (Watson *et al.*, 2002). Es war deshalb interessant, die Expression der einzelnen neurochemischen Marker im Spinalganglion zwischen Wildtyp und c-Kit mutanten Tieren zu vergleichen (Abb. 3.17). Übergreifend lässt sich sagen, dass die neurochemische Natur der c-Kit⁺ Neurone in mutanten Tieren nicht essentiell verändert ist. Es gibt allerdings kleine Veränderungen in der Proportion von c-Kit⁺ Neuronen die ebenfalls P2X3 exprimieren. Die Expression von P2X3 in mutanten Tieren ist signifikant verringert.

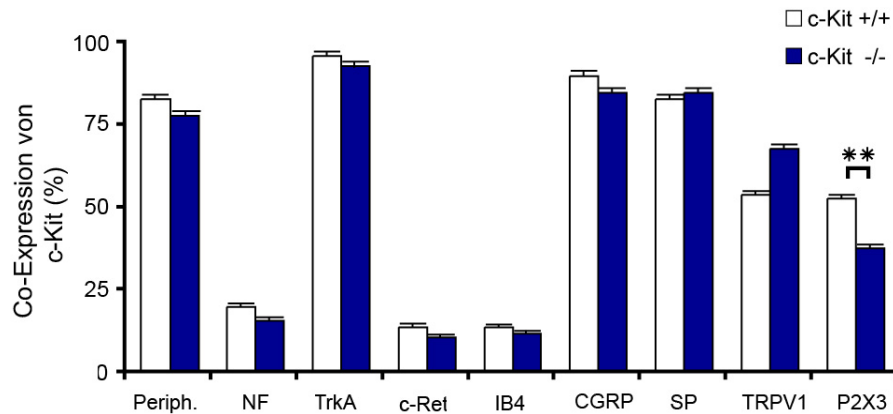


Abb. 3.17 Vergleichende Quantifizierung der Expression einzelner neurochemischer Marker

Neurochemische Quantifizierung der Neuronenzahl im Vergleich von Wildtyp zur c-Kit Mutante. Die Anzahl der c-Kit⁺ Neurone in mutanten Tieren die TRPV1 exprimieren war erhöht, die die P2X3 exprimieren verringert ($p < 0,005$).

3.7 Effekte von SCF auf sensorische Neuronen

3.7.1 SCF induziert eine kurzzeitige Hyperalgesie *in vivo*

Um die Funktion von c-Kit weiter zu untersuchen, sollten im Folgenden die Effekte seines Liganden SCF (stem cell factor) auf sensorische Neuronen analysiert werden. Hierfür wurde SCF intraperitoneal (1mg/g, i.p.), einem systematischen Protokoll folgend (2.2.6.1), injiziert. Daraufhin wurden die Latenzzeiten der Tiere in Reaktion auf Hitze oder einen mechanischen Stimulus gemessen. Die systematische Injektion von SCF verursachte eine kurz (bis zu 3 Stunden) anhaltende Hitze-Hyperalgesie in Wildtyp Mäusen. Deutlich wurde dies durch eine um 37% reduzierte Latenzzeit des Fußreflexes in Reaktion auf einen radiären Hitzereiz 1 Stunden nach Injektion (Abb. 3.18 A). Nach 7 Stunden kehrten die Werte auf den Normalzustand zurück.

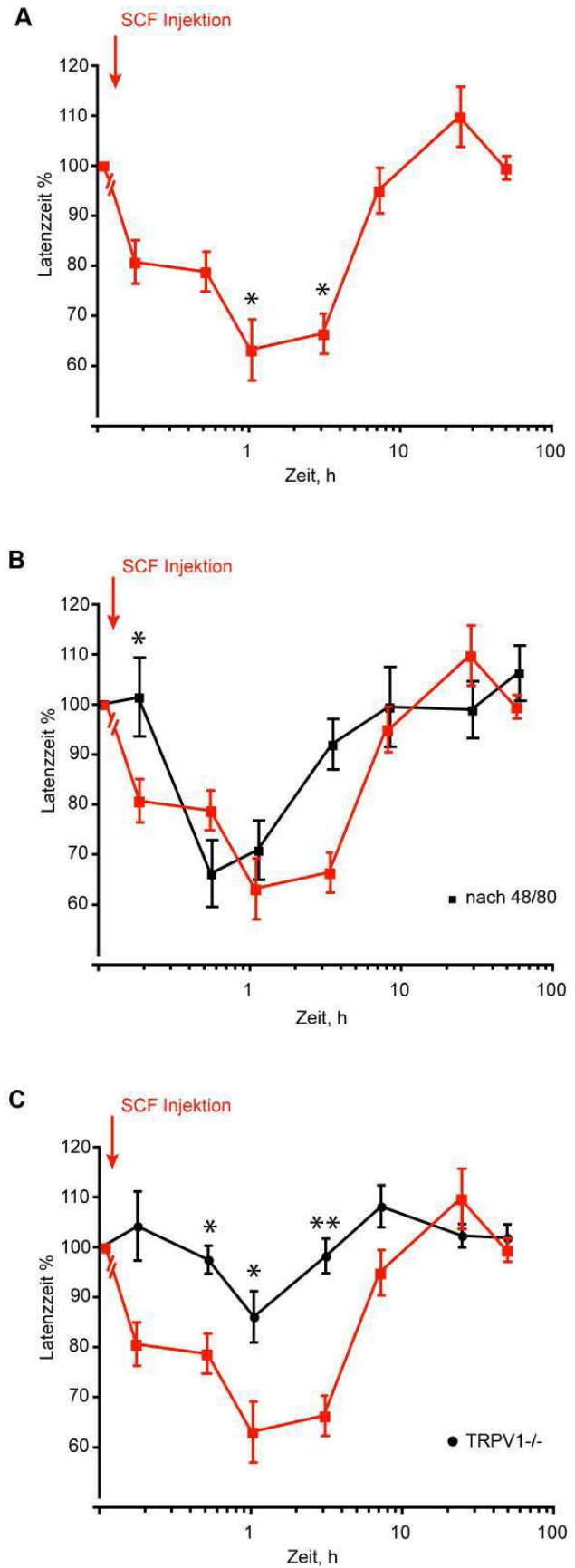
Von Taylor (Taylor *et al.*, 1995) wird SCF als Stoff beschrieben, der eine Degranulierung von Mastzellen auslöst. Hierbei könnte es zur Ausschüttung von inflammatorischen Substanzen kommen, die eine Hyperalgesie verursachen könnten (Horigome *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1994). Aus diesem Grund wurden im Folgenden Wildtyp Mäuse getestet, die zuvor mit dem Mastzell-Degranulierungsganz 48/80 behandelt wurden. Hierdurch sollten Einwirkungen des umliegenden peripheren Gewebes auf die durch die Injektion von SCF

ausgelöste Hyperalgesie ausgeschlossen werden. Die Latenzzeiten dieser Tiere nach Injektion von SCF waren immer noch verkürzt, was darauf schließen lässt, dass die Hitze-Hyperalgesie ausgelöst durch SCF weitestgehend unabhängig von einer inflammatorischen Reaktion des peripheren Gewebes ist (Abb. 3.18 B).

In vorherigen Arbeiten wurde gezeigt, dass der Capsaicin Rezeptor TRPV1 essentiell für die inflammatorische Hyperalgesie durch Bradikinin oder NGF (nerve growth factor) ist (Chuang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2005). Aus diesem Grund wurden hier die Reaktions-Latenzzeiten nach akuter SCF Administration in gleichaltrigen Mäusen, denen der Rezeptor für Capsaicin TRPV1 fehlt, untersucht (Abb. 3.18 C). Im Gegensatz zu den Wildtyp Kontrolltieren desselben genetischen Hintergrunds, waren die Latenzzeiten nach SCF Injektion in TRPV1^{-/-} Mutanten nicht signifikant verändert. Dies lässt vermuten, dass TRPV1 Teil des c-Kit Signalweges ist.

Abb. 3.18 Hitze-Hyperalgesie von Wildtyp Mäusen nach SCF Injektion

SCF löst eine kurzzeitige Hitze-Hyperalgesie in Wildtyp Mäusen aus (A). Die Hyperalgesie ist unabhängig von einer peripheren Gewebsreaktion (B). $VR1^{-/-}$ Tiere zeigen keine signifikant veränderten Reaktionen auf Hitzereize nach SCF Injektion (C).



3.7.2 Wirkung von SCF auf mechanische Sensitivität

Injiziert man SCF in Wildtyp Mäuse und untersucht danach die Veränderung der Sensitivität auf mechanische Reize, so lässt sich nur eine sehr geringe Reaktion beobachten. Hierfür wurden sechs Wildtyp Mäuse intraperitoneal mit (1 mg/g, i.p.) SCF gespritzt und mithilfe eines Aesthesiometers ein punktierter mechanischer Reiz an der Hinterpfote der Maus appliziert. Es wurde die Latenzzeit in Reaktion auf den Reiz untersucht. In Abbildung 3.19 ist zu erkennen, dass es eine erste Reaktion auf SCF gibt, die aber in der ersten halben Stunde nach Injektion auftritt und im Gegensatz zum Hitzetest nach Hargreaves, bei dem die größte Reaktion nach einer Stunde gemessen wurde, zu diesem Zeitpunkt schon fast wieder den Normalzustand erreicht hat.

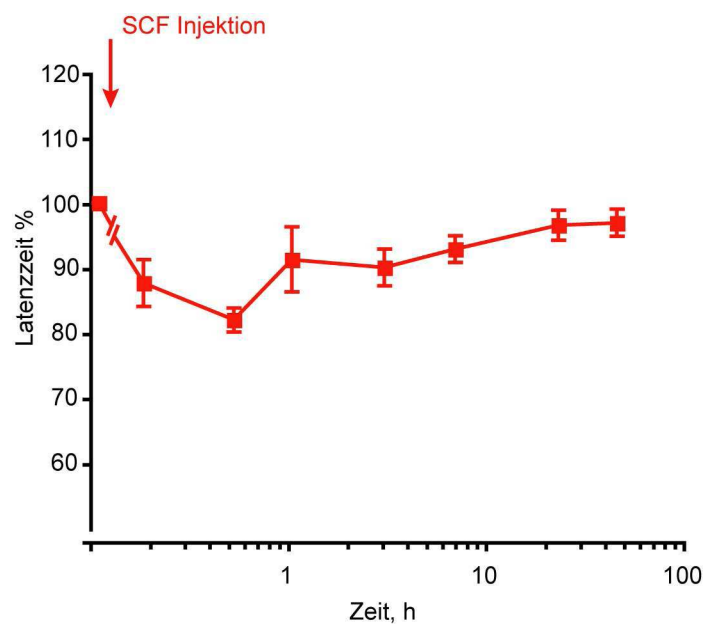


Abb. 3.19 Geringe Veränderung der mechanischen Sensitivität bei Wildtyp Mäusen nach SCF Injektion

In Wildtyp Mäusen löst SCF keine mechanische Allodynie aus. Die Latenzzeiten in Reaktion auf SCF haben zum Zeitpunkt $t = 1$ h schon fast wieder den Normalzustand erreicht.

3.8 Mutagenese des *Teashirt3*-Gens

In dieser Arbeit wurde mit der Affimetrix-Microarray-Methode ein weiteres Gen, *Teashirt3*, identifiziert (1.1). 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). Die Expressionsanalysen und die Mutagenese des *Teashirt3*-Gens sind im Folgenden dargestellt.

Um die entwicklungsbiologische *in vivo*-Funktion von *Teashirt3* zu untersuchen, wurden durch homologe Rekombination in ES-Zellen zwei Mauslinien etabliert, in denen das *Teashirt3*-Gen mutiert ist. Die detaillierte Phänotypanalyse konnte in dieser Arbeit allerdings nicht durchgeführt werden. Für die homologe Rekombination in ES-Zellen wurden Targeting-Vektoren verwendet, auf deren Konstruktion in den folgenden Abschnitten eingegangen wird.

3.8.1 Isolierung genomischer Subklone des *Teashirt3*-Gens

Anhand der genomischen Sequenz des *Teashirt3*-Gens der Maus wurden Primer zur Amplifikation einer DNA-Sonde entworfen. Die mittels PCR amplifizierte Sonde wurde zur Hybridisierung einer BAC-Bibliothek (RPCL-22, BACPAC Resources, Oakland CA) mit genomischer DNA der Maus eingesetzt. Auf diese Weise wurden fünf BAC-Klone identifiziert, die das *Teashirt3*-Gen enthalten. Die Integrität der *Teashirt3*-Sequenz in diesen Klonen wurde durch mehrere Southern-Blot-Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden überprüft.

3.8.2 Konstruktion der „Targeting“-Vektoren für die *Teashirt3*-Mutagenese in ES-Zellen

3.8.2.1 Herstellung des genomischen Subklons des *Teashirt3*-Gens

Als Ausgangspunkt der Konstruktion der „Targeting“-Vektoren diente ein BAC-Klon (pBACe3.6). Aus diesem Klon wurden mittels homologer Rekombination in Bakterien zwei Subklone des *Teashirt3*-Gens isoliert. Hierfür wurde ein DNA-Fragment verwendet, dass die Sequenz des Vektors pBluescript II und eine

Kassette zur negativen Selektion in ES-Zellen enthielt. An beiden Enden des DNA-Fragments befanden sich zum *Teashirt3*-Gen homologe Sequenzen, die den Ort der Rekombination bestimmten. Auf diese Weise wurden zwei verschiedene genomische Subklone mit einer Größe von 22,1 kb und 18,5 kb hergestellt. Beide Klone enthielten die gesamte kodierende *Teashirt3*-Sequenz. Der 22,1 kb große Klon diente zur Generierung des „Targeting“-Vektors für das *Teashirt3*-Reporter-Allel. Der 18,5 kb große Klon wurde zur Herstellung des konditionalen Allels verwendet. Zur Negativselektion wurde eine Kassette verwendet, die die Sequenz des Diphtheria Toxin-A (DT-A) (Yagi *et al.*, 1993) enthält. Im Falle einer zufälligen Integration des gesamten Vektors in das Mausgenom während der homologen Rekombination in ES-Zellen führt die resultierende Expression des DT-A-Proteins zum Tod der Zelle.

3.8.2.2 Konstruktion des *Teashirt3*-Reporter-Allels

Für die Konstruktion des *Teashirt3*-Reporter-Allels wurde der 22,1 kb genomische Subklon des *Teashirt3*-Gens verwendet. Mittels homologer Rekombination in Bakterien wurde das offene Leseraster durch das *LacZ*-Gen (S. Arber, Universität Basel) ersetzt (im Weiteren als *Tshz3^{LacZ}* bezeichnet). In Mäusen, die das *NLS-LacZ*-Reporter gen tragen, ist es möglich, die Expression von *Tshz3* anhand der enzymatischen Aktivität des *LacZ*-Proteins zu untersuchen (X-Gal-Färbung). Neben dem *NLS-LacZ*-Reporter gen enthielt der „Targeting“-Vektor *Tshz3^{LacZ}* eine Selektionskassette („self excision cassette“) (Abb. 3.20 A). Sie kodiert das Gen für die *Cre*-Rekombinase unter der Kontrolle eines Testis-spezifischen Promotors und das *Neomycin*-Resistenz-Gen (Neo-Kassette) unter der Kontrolle eines ubiquitären Promotors. Die Kassette wird zudem von zwei *loxP*-Sequenzen flankiert. Das *Neomycin*-Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion auf Integration des Vektors in ES-Zellen. Die *Cre*-Rekombinase erkennt die *loxP*-Sequenzen und entfernt durch Rekombination die DNA-Fragmente, die zwischen zwei *loxP*-Sequenzen lokalisiert sind (Sauer und Henderson, 1990). Da die *Cre*-Rekombinase in der Testis exprimiert wird, schneidet sich die Kassette selbst aus, wenn das Allel über die männliche Keimbahn an die Nachkommen vererbt wird.

3.8.2.3 Konstruktion des konditionalen *Teashirt3*-Allels

Der Targeting-Vektor $Tshz3^{flox}$ für die Konstruktion eines konditionalen *Teashirt3*-Allels wurde ebenfalls mittels homologer Rekombination in Bakterien generiert (Abb. 3.20 B).

Zunächst wurden zwei „Mini“-Targeting-Vektoren konstruiert, die aus einer *Neomycin*-Selektionskassette und FRT und loxP Sequenzen bestehen und von der Sequenz des *Teashirt3*-Gens flankiert werden. Der „Mini“-Targeting-Vektor 1 wurde mittels homologer Rekombination in wenig konservierte Bereiche *downstream* der kodierenden Sequenz von *Teashirt3* eingebracht. Die homologe Rekombination in Bakterien ermöglicht die sequenzspezifische Integration beliebiger DNA Fragmente unabhängig von Restriktionsenzymen. 30-50 bp Homologie an dem 5' und 3' Ende eines Fragments sind ausreichend um eine hohe Rekombinationsfrequenz zu erzielen. Um ein DNA Fragment in einen Vektor zu rekombinieren, wurde der Vektor in DY380 Bakterien transformiert. Dieser Stamm trägt die für die Rekombination notwendigen red Gene (*exo* und *pol*) unter der Kontrolle des temperatursensitiven λ Repressors, da die permanente Expression der red Gene letal für die Bakterien ist (Liu *et al.*, 2003). Die gefloxt Neo-Kassette wurde mittels Cre-Rekombinase entfernt und zurück blieb eine loxP-Stelle downstream von Exon2. Im 5'-Bereich wurde ebenfalls mittels homologer Rekombination der „Mini“-Targeting-Vektor 2 eingebracht. Dadurch enthält der Vektor $Tshz3^{flox}$ im 5'-Bereich von *Teashirt3* eine FRT-Neomycin-FRT-loxP-Kassette und im 3'-Bereich eine loxP-Stelle (Abb. 3.20 B). Zusätzlich wurde eine *BamHI* Schnittstelle nahe der 3-loxP-Sequenz eingeführt, die für die Southern-Blot-Analyse der ES-Zell-Klone benötigt wird. Im mutierten $Tshz3^{flox}$ -Allel wird die kodierende *Teashirt3*-Sequenz von zwei loxP-Sequenzen flankiert und kann mittels Cre-Rekombinase-vermittelter sequenzspezifischer Rekombination im Zielgewebe deletiert werden.

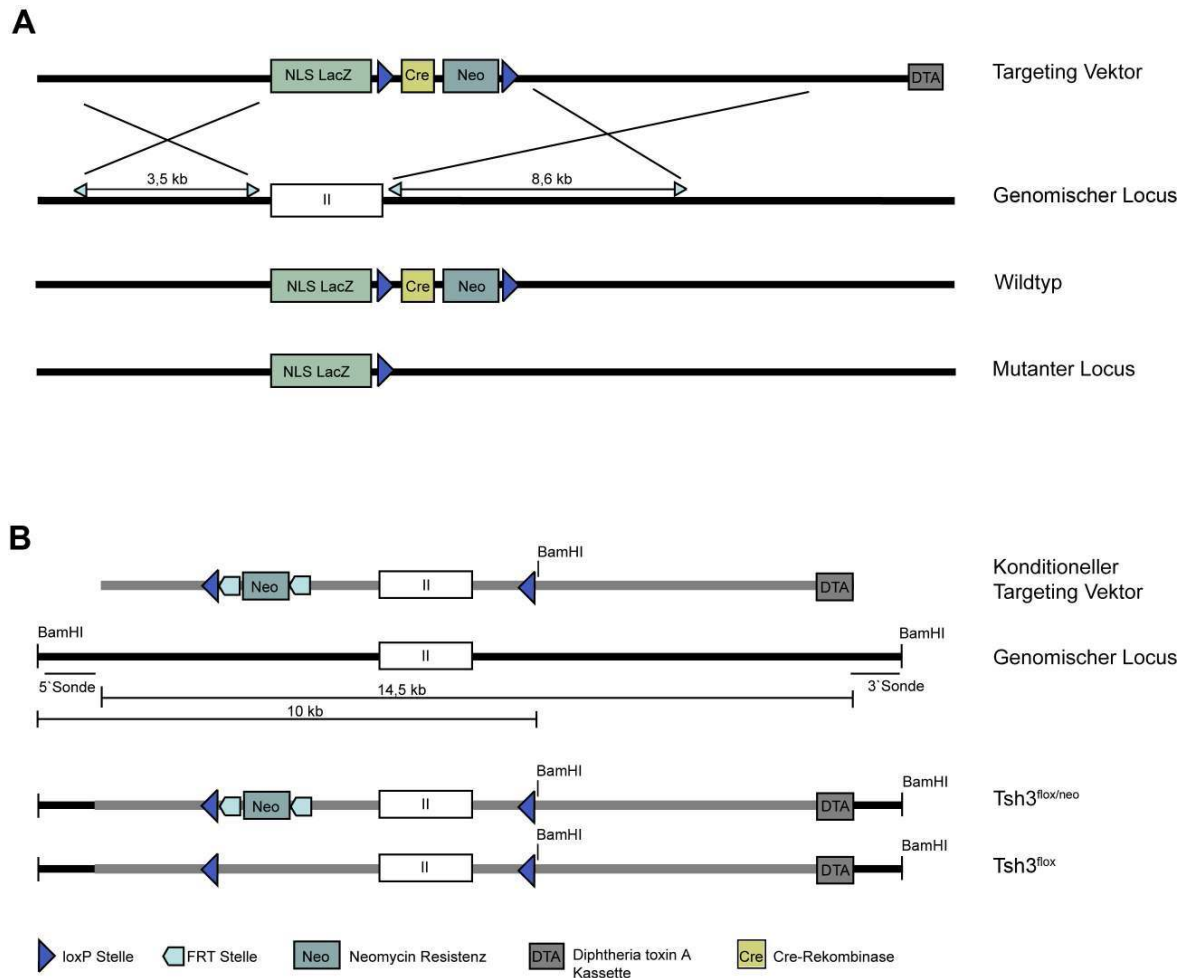


Abb. 3.20 Targeting-Strategie zur Mutagenese des *Teashirt3*-Gens

(A) Herstellung des *Tshz3*-Reporter-Allels. Schematische Darstellung des Targeting-Vektors, der genomischen Struktur des Wildtyp *Tshz3*-Locus sowie des mutierten *Tshz3*-Allels. Zusätzlich zur *Tshz3*-kodierenden Sequenz sind die *LacZ*-kodierende Sequenz (grün), die *loxP*-Sequenzen (blau), das *Cre*-Rekombinase-Gen (gelb), die *Neomycin*-Kassette (hellblau) und die *DT-A*-Kassette (grau) eingezeichnet. (B) Schema des Targeting-Vektors zur konditionalen Mutagenese des *Tshz3*-Gens. Der „Targeting“ Vektor, die genomische Struktur des Wildtyp *Tshz3*-Locus, das Allel nach homologer Rekombination und das mutierte *Tshz3*-Allel sind dargestellt. Der *Tshz3*-Locus sowie die *loxP*-Sequenzen (blau), die *FRT*-Sequenzen (türkis), die *Neomycin*-Kassette (hellblau) und die *DT-A*-Kassette (grau) sind eingezeichnet. (A,B) Die Lage der für die Southern-Analyse verwendeten Sonden und Restriktionsenzyme sind eingezeichnet.

3.8.3 Mutation des *Teashirt3*-Gens in ES-Zellen

Die Targeting-Vektoren wurden linearisiert und durch Elektroporation in ES-Zellen der Linie R1 eingebracht. Nach Selektion auf Neomycin wurden resistente ES-Zellklone vereinzelt, expandiert und mittels Southern-Blot-Analyse auf homologe Rekombination überprüft. Für die Southern-Blot-Analyse wurde die 3'-*Tshz3*-

Sonde verwendet. Homolog rekombinierte Klone wurden expandiert und die Integrität des *Teashirt3*-Allels durch Hybridisierungen mit mehreren Sonden (3`-, 5`- und einer internen Neomycin-DNA-Sonde) überprüft. Exemplarisch sind in der Abbildung 3.21 die Ergebnisse der Analyse mittels 5`-Sonde dargestellt.

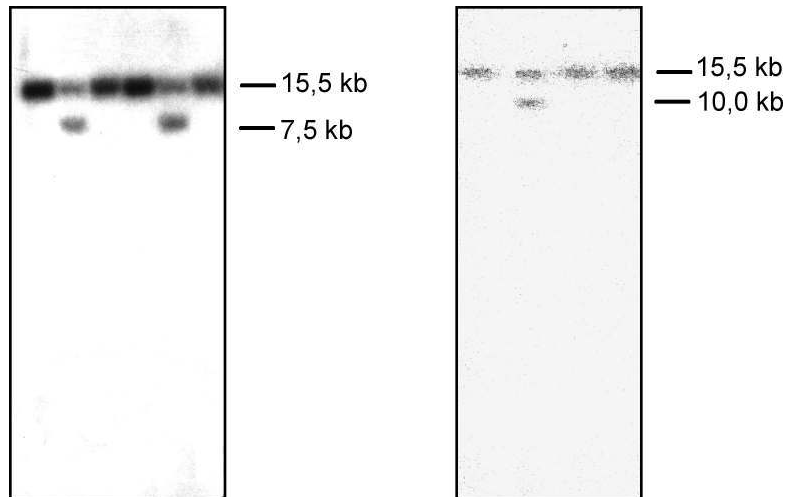


Abb. 3.21 Southern-Blot-Analyse von ES-Zell-DNA nach *Bam*HI-Restriktionsverdau

Die Hybridisierung wurde mit der 5`-Sonde (siehe Abb. 3.20 B) durchgeführt. Das Wildtyp-Allel zeigt eine 15,5 kb große Bande, während das *Tsh3^{lacZ}*-Allel eine Größe von 7,5 kb aufweist. Das *Tshz3^{flox}*-Allel mit Neomycin-Kassette weist eine 10 kb große Bande auf.

Die verifizierten ES-Zellklone wurden in Blastozysten injiziert und die Blastozysten anschließend in scheinchwangere Weibchen des Stammes CB6F1 eingebracht. Von den injizierten Klonen wurden chimäre Mäuse geboren. Im Falle des *Tshz3^{flox}*-Allels wurden diese anschließend mit Mäusen, die das Gen für die Flp-Rekombinase enthalten, verpaart, um die Neomycin-Resistenzkassette zu entfernen. Mehrere männliche Tiere gaben die Mutation an ihre Nachkommen (F1) weiter und wurden zur Etablierung des *Teashirt3^{flox}*-Stammes verwendet. Die Genotypen der Nachkommen wurden mittels PCR und Southern-Blot-Analyse bestimmt. Die Nachkommen der *Teashirt3^{LacZ}* chimären Mäuse konnten bis jetzt nicht verifiziert werden.

3.8.4 Expressionsanalyse des *Teashirt3*-Gens

Es wurden *whole mount in situ*-Hybridisierungen zu verschiedenen embryonalen Stadien durchgeführt. *Teashirt3* wird zu Beginn der Embryonalentwicklung (E10,5) im superfiziellen Bereich des dorsalen Horns exprimiert. Außerdem lässt sich eine Expression im Bereich der Extremitätenknospen beobachten (Abb. 3.22 A,C). Am Tag 12,5 der Embryonalentwicklung kann man weiterhin die Expression im dorsalen Horn beobachten, hinzu kommt eine verstärkte Expression in den dorsomedialen Bereichen (Abb. 3.23 A).

In Abbildung 3.23 B ist außerdem die Expression zum Zeitpunkt E14,5 gezeigt; sie ist klar im Bereich des dorsalen Horns erkennbar. Postnatal wird *Teashirt3* klar in der sogenannten „Augenbrauen“-Form im dorsalen Horn des Rückenmarks (layer I und II) exprimiert (Abb. 3.23 C). Zusätzlich scheint die Expression sich in zwei Schichten zu zeigen (Abb. 3.23 D).

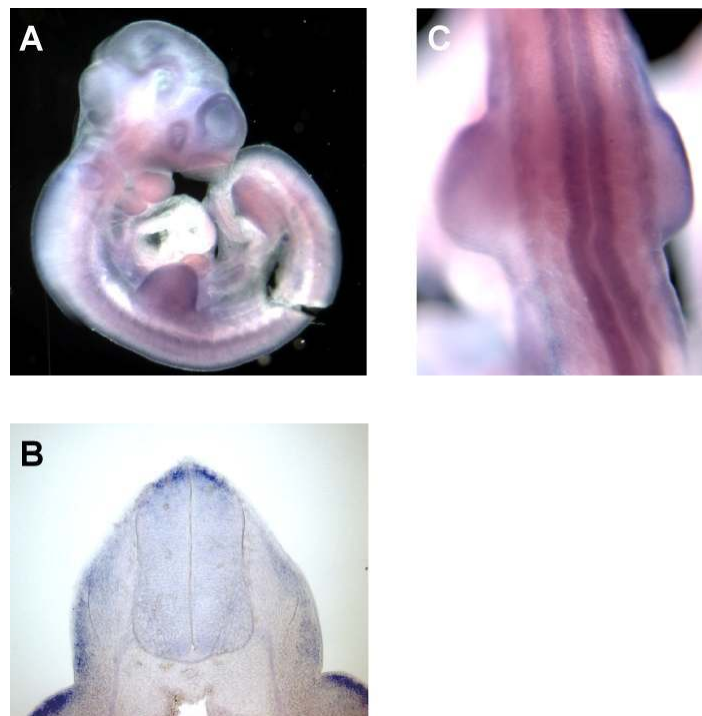


Abb. 3.22 Expression von *Teashirt3* an Tag E10,5 der Embryonalentwicklung

In situ-Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für das *Teashirt3*-Gen. Am Tag E10,5 der Embryonalentwicklung ist die Expression von Tshz3 entlang des Rückenmarks und in den Extremitätenknospen zu sehen (A,C). (B) Expression von Tsh3 im superfiziellen Teil des dorsalen Horns.

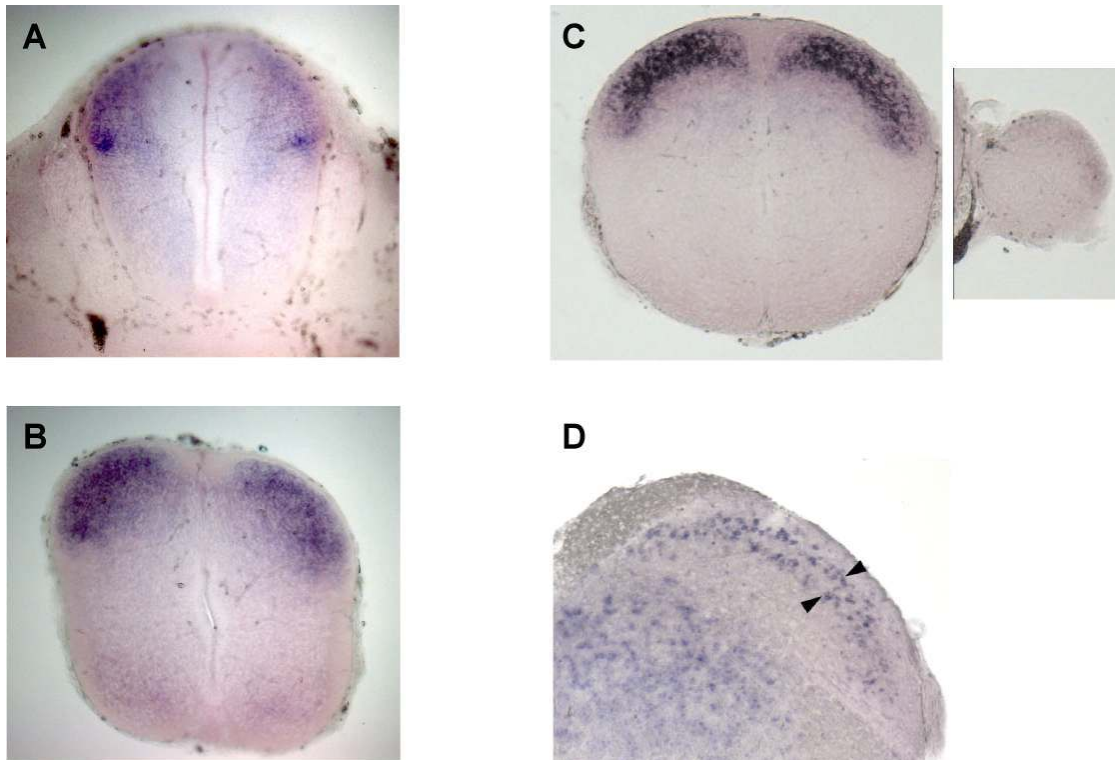


Abb. 3.23 Expression von *Teashirt3* in der Embryonalentwicklung

In situ-Hybridisierung mit einer Sonde spezifisch für das *Teashirt3*-Gen. Am Tag E12,5 der Embryonalentwicklung ist die Expression von Tshz3 stark im dorsomedialen Bereich erkennbar (A). (B) Am Tag E14,5 der Embryonalentwicklung ist die Expression weiter im dorsalen Horn zu sehen. Postnatal ist Tshz3 stark im dorsalen Bereich exprimiert (C) und scheint in zwei Schichten formatiert (D).

3.8.5 Phänotypische Analyse der *Teashirt3*-Mutation

In Dieser Arbeit wurden Antikörper gegen Tshz1, Tshz2 und Tshz3 generiert und die Expression im Rückenmark von adulten Wildtyp Tieren getestet (Abb. 3.24). Tshz1,2 und 3 sind eindeutig im dorsalen Horn des Rückenmarks exprimiert. Im Gegensatz zu Tshz1 und 2 scheint Tshz3 nicht im dorsalen Hinterwurzelganglion exprimiert zu sein.

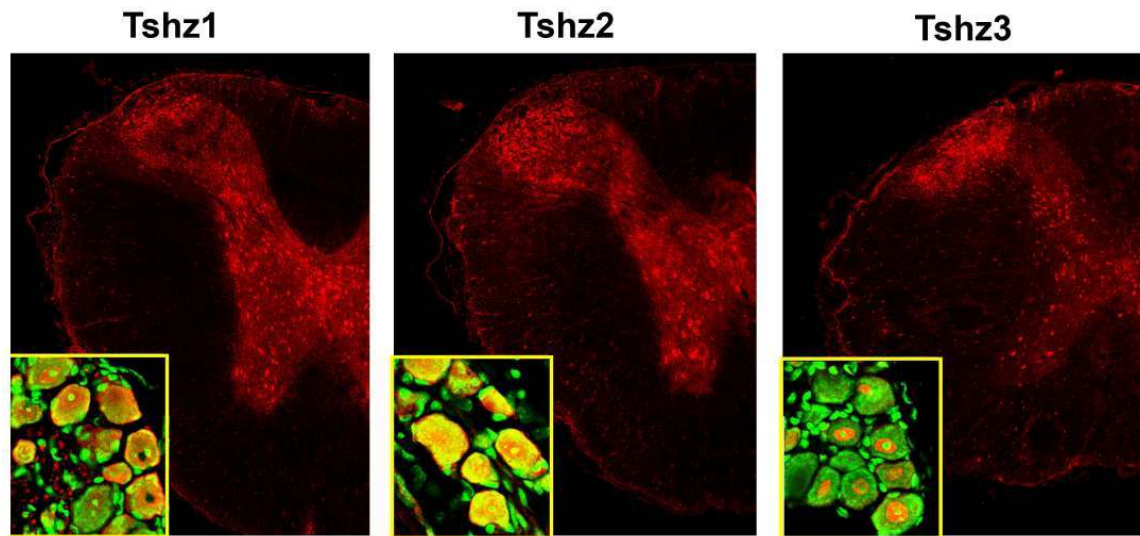


Abb. 3.24 Expression von Tshz1,2,3 im Rückenmark der adulten Maus und im dorsalen Hinterwurzelganglion

Immunhistochemische Untersuchung von Tshz1, Tshz2 und Tshz3 (rot) auf transversal Schnitten des Rückenmarks und des dorsalen Hinterwurzelganglions (Einrahmung). Tshz3 scheint nicht im dorsalen Hinterwurzelganglion exprimiert zu sein.

Durch weitere immunhistochemische Färbungen wurden verschiedene Antikörper auf Transversalschnitten durch das Rückenmark von Embryonen im Stadium E17 und E18 von $Tshz3^{LacZ}$ Mäusen (generiert von Laurent Fasano) getestet. Die Expressionsanalyse von Lbx1 ergab ein verändertes Expressionsmuster bei Tshz3 mutanten Tieren im Vergleich zu Wildtyp Tieren (Abb. 3.25). Die Expression von Lbx1 in Tshz3 Mutanten ist am Tag E18 der Embryonalentwicklung signifikant verringert.

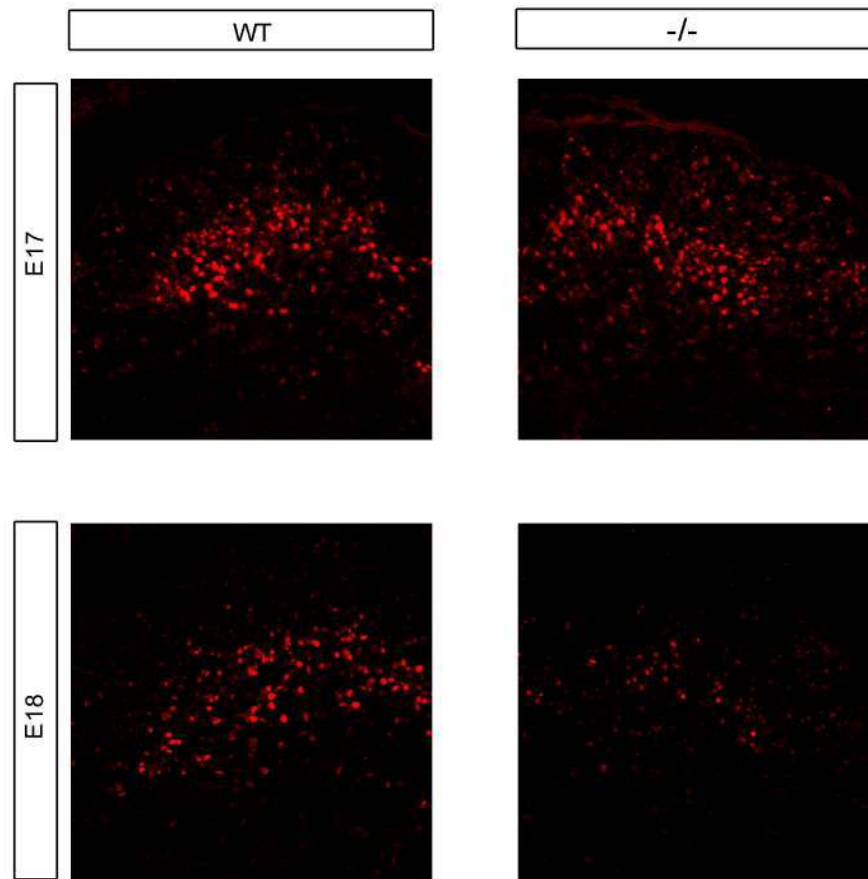


Abb. 3.25 Verändertes Expressionsmuster von Lbx1 in Tshz3 mutanten Mäusen an Tag E18

Lbx1 zeigt eine verringerte Expression in Tshz3 mutanten Mäusen an Tag E18 der Embryonalentwicklung (untere Reihe). An Tag E17 sind noch keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (obere Reihe).

Die Generierung von Antikörpern gegen Tshz1, Tshz2 und Tshz3 ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Expression dieser Mitglieder der Tshz-Genfamilie im Rückenmark, die in dieser Arbeit nicht weiter betrachtet wurde.

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.