

4 Diskussion

Die Charakterisierung von Molekülen, die die Eigenschaften von nozizeptiven sensorischen Neuronen regulieren, sind von fundamentaler Bedeutung. In dieser Arbeit wurde eine Schlüsselfunktion der Rezeptortyrosinkinase c-Kit und deren Liganden SCF (stem cell factor) in der Biologie von peripheren sensiblen Neuronen dargelegt. Es wird zum ersten Mal eine klare Rolle des c-Kit/SCF-Signalweges in der Entwicklung und Funktion von neuronalen Zellen beschrieben. Die Signalgebung durch c-Kit/SCF beeinflusst die Reizschwelle von hitzesensitiven polymodalen Nozizeptoren akut und auch chronisch. Darüber hinaus scheint in der frühen Embryonalentwicklung die Signalgebung durch c-Kit Einfluss auf die Stimulus-Sensitivität von langsam adaptierenden Mechanorezeptoren zu haben. Im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen im Spinalganglion spielt die Signalgebung durch c-Kit/SCF eindeutig keine Rolle für das Überleben von sensorischen Neuronen.

4.1 Die Rezeptortyrosinkinase c-Kit in nozizeptiven sensorischen Neuronen

Ausgangspunkt für die Untersuchungen an c-Kit Mäusen war ein Affimetrix-Screen, anhand dessen Gene (u.a. c-Kit und Teashirt), die im Bereich des dorsalen Rückenmarks hochreguliert sind, identifiziert wurden. Die *in situ*-Hybridisierungen geben Aufschluss über die Expression von c-Kit in Layer I und II des Rückenmarks sowie in ca. 20% der Neurone der Spinalganglien. Hierunter befanden sich vorrangig Neurone kleinen Durchmessers, die für ihre nozizeptorischen Eigenschaften bekannt sind, aber auch mittelgroße Neurone. Alle Nozizeptoren sind während ihrer Entwicklung abhängig von der Signalgebung durch die Rezeptortyrosinkinase TrkA, die aber in der weiteren postnatalen Entwicklung in etwa 50% der Neurone durch die Rezeptortyrosinkinase c-Ret abgelöst wird (Hunt, 2001). Die meisten c-Kit⁺ Neurone im dorsalen Spinalganglion coexprimieren die Rezeptortyrosinkinase TrkA und nur ein kleiner Anteil ist auch c-Ret positiv. Durch die Coexpression mit CGRP und Substance P

konnte gezeigt werden, dass c-Kit prinzipiell zu den peptidergen Neuronen zählt, jedoch interessanterweise auch eine kleine Anzahl positiv für IB4 ist. Zusätzlich findet man c-Kit auch in einem kleinen Teil der mittelgroßen Neurone; dies hat die Rezeptortyrosinkinase interessant für die Untersuchungen bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Mechanosensitivität gemacht. Hierauf wird in Kapitel 4.4 näher eingegangen.

Im Vergleich der Expression neurochemischer Marker zwischen der c-Kit Mutante und den Wildtyp Tieren (3.6) lässt sich sagen, dass die neurochemische Natur der c-Kit⁺ Neurone nicht verändert ist. Daraus kann man schließen, dass c-Kit im Gegensatz zu anderen Rezeptortyrosinkinasen nicht essentiell notwendig für das Überleben einer substantiellen Anzahl sensorischer Neurone ist. Darüber hinaus haben vorherige Analysen gezeigt, dass in Kultur von embryonalen sensorischen Neuronen SCF alleine neurotrophe Funktionen und Überlebensfunktionen für c-Kit⁺ Neurone hat (Hirata *et al.*, 1993). Außerdem synergisiert SCF mit NGF und unterstützt damit neuronales Überleben (Hirata *et al.*, 1995).

Auffallend ist jedoch, dass der purinerge Rezeptor P2X3, der in mehr als 50% der Wildtyp c-Kit⁺ Neurone exprimiert wird, in der c-Kit^{-/-} Mutante deutlich runterreguliert ist. Genetische Analysen haben gezeigt, dass Mäuse, denen der P2X3 Rezeptor fehlt, eine reduzierte Sensitivität gegenüber thermischen Reizen aufweisen (Souslova *et al.*, 2000). Dies könnte P2X3 zu einem interessanten Kandidaten für die Regulation durch c-Kit Aktivität machen. Ob dies im Zusammenhang mit der in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Hypoalgesie steht konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Es ist aber wahrscheinlich, dass durch chronische Signalgebung von c-Kit auch Veränderungen in der Aktivität von anderen hitzesensitiven Kanälen verursacht werden. Dies könnte unabhängig oder zusätzlich zu den Veränderungen von P2X3 geschehen und dann zu den Hypoalgesie-Effekten der Nozizeptoren in den c-Kit^{-/-} Mäusen führen.

4.2 Thermische Hypoalgesie in c-Kit mutanten Mäusen

Aufbauend auf den Ergebnissen aus der Expressionsanalyse lag es nahe, anhand von Verhaltensexperimenten die nozizeptorischen Eigenschaften von c-Kit Mutanten mit denen von Wildtyp Mäusen zu vergleichen. Grundlage hierfür war eine mithilfe von Erythropoethin überexprimierenden Mäusen bis zum adulten Tier überlebende c-Kit Mutante, die im Hargreaves Test untersucht wurde (3.4.1). Hierbei wurde eine starke thermische Hypoalgesie bei c-Kit^{-/-} Mäusen festgestellt. Die gemessene Latenzzeit bei c-Kit^{-/-} Mäusen war im Vergleich zu den Wildtyp Tieren um 40% erhöht. Die enorm verringerte Hitzesensitivität kann auf verschiedenste Faktoren, wie z.B. einen Verlust an Neuronen, ein verändertes Innervationsmuster in der Haut oder dem dorsalen Rückenmark zurückzuführen sein (Bennett *et al.*, 1998). In dieser Arbeit konnte ausgeschlossen werden, dass diese Ergebnisse durch einen Verlust an peripherer oder zentraler Innervation verursacht werden. Die Färbungen an Hautschnitten mit dem panneuronalen Marker PGP9.5 zeigten keine offensichtlichen Unterschiede in der Innervation der Haut, weder in der Dermis noch der Epidermis oder anderem Zielgewebe (3.5.2). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der nicht-myelinisierten Axone des Saphenous Nervs, die anhand von elektronenmikroskopischen Aufnahmen untersucht wurde, nicht signifikant verändert war (3.5.1).

Da es sich hier weder um Apoptose-Effekte noch um ein verändertes Innervationsmuster handelt, lag es nahe zu vermuten, dass das akute Schmerzverhalten der c-Kit Mutanten Mäuse auf funktionelle Veränderungen in den primären Nozizeptoren zurückzuführen ist. Dieser Frage wurde anhand von Experimenten mittels Haut-Nerv-Präparation nachgegangen (Reeh, 1986). Dabei sollten die physiologischen Eigenschaften einzelner sensorischer Neurone von c-Kit^{-/-} Mäusen untersucht werden. Diese Arbeiten wurden in Kooperation durchgeführt (Frahm *et al.*, 2007).

Bei der Methode des Haut-Nerv-Präparats wird zunächst der Saphenous Nerv zusammen mit der Haut der Hinterpfote, die er innerviert, freipräpariert. Dann wird durch mechanische Stimulation entlang des Hautstücks nach dem rezeptiven Feld von afferenten Endigungen polymodaler C-Faser Nozizeptoren (C_{MH}) oder A-Typ Mechanorezeptoren gesucht. In diesem Fall wurden, nach Stimulation des

rezeptiven Felds mit gerichteten thermischen und mechanischen Reizen, Einzel-Unit-Aufnahmen gemacht. Anhand der Verhaltensexperimente wurde eine Hitze-Hypoalgesie bei c-Kit^{-/-} mutanten Mäusen festgestellt. Aus diesem Grund lag der Fokus zunächst auf der Untersuchung von hitzesensitiven polymodalen Nozizeptoren. Hierbei konnte eine eindeutige Reduktion in der Sensitivität von sensorischen Afferenzen in isoliertem Gewebe von c-Kit mutanten Tieren festgestellt werden (Frahm *et al.*, 2007). Darüber hinaus ist die thermische Reizschwelle zur Aktivierung in c-Kit^{-/-} Mutanten um 5-7° C erhöht, während die Frequenz der Aktionspotenziale merklich reduziert ist (Frahm *et al.*, 2007). Hier wird deutlich, dass c-Kit Einfluss auf die Natur von hitzesensitiven Nozizeptoren hat. Im Gegensatz dazu sind die Feuerungs-Frequenzen von C-Faser Nozizeptoren in Antwort auf mechanische Reize nicht signifikant verändert (Frahm *et al.*, 2007). Dies bedeutet, dass c-Kit einen spezifischen Einfluss auf die Thermosensitivität von C-Fasern hat und ist damit das erste Beispiel für ein Gen, dass für die normale thermische Schmerzempfindung von C-Fasern benötigt wird. Selbst das Gen für TRPV1 beeinflusst nicht die schmerzhaftige Hitzesensitivität von C-Fasern (Woodbury *et al.*, 2004). Allerdings resultiert die Immunodepletion von NGF ebenfalls in einem ähnlichen Verlust der schmerzhaften Thermo-Sensitivität von C-Fasern (Bennett *et al.*, 1998; Lewin and Mendell, 1994). Eine genetische Analyse des NGF/TrkA Systems wurde bisher ausgeschlossen, da NGF/TrkA essentiell für das Überleben aller Nozizeptoren ist. Des Weiteren sind die Mutanten nach der Geburt nicht lebensfähig (Crowley *et al.*, 1994; Smeyne *et al.*, 1994). Im Gegensatz dazu ist die Signalgebung durch c-Kit zwar an der Regulation der funktionellen Eigenschaften von Nozizeptoren beteiligt, ist aber für das Überleben dieser nicht essentiell.

4.3 SCF induziert TRPV1 abhängige Hitze-Hyperalgesie in Wildtyp Mäusen *in vivo* und *in vitro*

Die bisherigen genetischen Analysen weisen darauf hin, dass chronische Signalgebung durch c-Kit für die normale sensorische Wahrnehmung von polymodalen Nozizeptoren notwendig ist. Dies führte zu der Frage, ob der

spezifische Ligand für c-Kit, SCF, der durch Antikörperfärbungen in der Epidermis und sogar in einzelnen Nervenendigungen nachgewiesen werden konnte, einen direkten Einfluss auf die Hitzesensitivität von Nozizeptoren hat.

Dieser Frage wurde durch intraperitoneale Injektion von SCF nachgegangen, durch die eine kurzzeitige Hyperalgesie in Wildtyp Mäusen ausgelöst wurde (3.7.1). Eine Stunde nach der Injektion wurde eine um 37% verkürzte Latenzzeit auf einen thermischen Reiz gemessen. Durch den Mastzell-Degranulationsstoff 48/80 wurde weitestgehend ausgeschlossen, dass die Reaktionen von inflammatorischen Substanzen verursacht wird, die durch Degranulation von Mastzellen ausgeschüttet werden (Horigome *et al.*, 1993; Lewin *et al.*, 1994). Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass die Anwesenheit von TRPV1 essentiell für die inflammatorische Hitze-Hyperalgesie ausgelöst durch Bradykinin oder NGF ist (Chuang *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde der Frage nachgegangen, ob die durch SCF ausgelöste Hyperalgesie über den gleichen Ionenkanal funktioniert.

SCF wurde daraufhin in Mäuse injiziert, denen der Capsaicin Rezeptor TRPV1 fehlt. Die hierbei gemessenen Latenzzeiten waren im Gegensatz zu den Wildtyp Tieren nicht signifikant verändert. Dies zeigt, dass TRPV1 Teil des c-Kit Signalweges ist.

Die bisherigen Analysen deuten darauf hin, dass die Aktivierung des c-Kit-Rezeptors für die normale Entwicklung der Hitzesensitivität von Nozizeptoren notwendig ist. Darüber hinaus lässt die Tatsache, dass die Aktivierung von c-Kit durch SCF in einer TRPV1 abhängigen Hitze-Hyperalgesie resultiert, vermuten, dass genau wie bei TrkA (Galoyan *et al.*, 2003; Shu and Mendell, 1999; Shu and Mendell, 2001) die Signalgebung durch c-Kit akut die hitzeaktivierten Einwärtsströme in Nozizeptoren sensetisiert.

Dieser Frage wurde ebenfalls in Kooperation nachgegangen (Frahm *et al.*, 2007). Mittels der *patch-clamp* Methode (Sackmann und Neher, 1995) wurden hitzeinduzierte Einwärtsströme von isolierten Nozizeptoren während und nach Applikation von SCF gemessen. Transient applizierte Hitzestimuli resultierten in typischen Einwärtsströmen von 200-400 pA. Innerhalb von 30 s nach Applikation von SCF (10 nM) konnten zwei Populationen von thermosensitiven Neuronen ausgemacht werden: eine davon mit fast keiner Reaktion auf SCF (<50% Veränderung im Hitze induzierten Einwärtsstrom), die andere mit einer

nennenswerten Potenzierung des Einwärtsstroms (>50% Veränderung im Einwärtsstrom). Darüber hinaus resultierte die Behandlung mit SCF in einer Reduktion der Temperaturschwelle, die die Aktivierung des Einwärtsstroms auslöst.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass c-Kit mutante Nozizeptoren extrem hyposensitiv gegenüber Hitzestimuli sind. Sie haben eine höhere thermische Reizschwelle und eine geringere Feuerungs-Frequenz nach einem Hitzereiz, Veränderungen, die für den gesamten Phänotyp zutreffend sind. Ähnliche Beobachtungen wurden bei Unterbrechung der NGF/TrkA Signalgebung gemacht; dies führte ebenfalls zu thermischer Hypoalgesie in Mäusen (Galoyan *et al.*, 2003; McMahon *et al.*, 1995). c-Kit/SCF und NGF/TrkA haben mehrere *downstream* Transduktionskomponenten und *second-messenger* Wege, wie z.B. die Signalgebung über Src und die MAP-Kinase Kaskade gemeinsam. Neuere Arbeiten zeigen, dass die Aktivierung von PI3-Kinase durch TrkA zur Phosphorylierung von TRPV1 und zu einem vermehrten Einbau des Kanals in der Zellmembran führt (Zhang *et al.*, 2005). Es wäre denkbar, dass beide Rezeptoren die gleichen Zelloberflächen-Moleküle benutzen, die an der sensorischen Reizweiterleitung beteiligt sind.

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass der Kationen-Kanal TRPV1 für die NGF/TrkA abhängige Hyperalgesie notwendig ist (Chuang *et al.*, 2001). In dieser Arbeit konnte eindeutig demonstriert werden, dass Mäuse, denen der TRPV1 Kanal fehlt, insensitiv gegenüber den thermischen Hyperalgesie-Effekten durch SCF sind. Daraus lässt sich schließen, dass c-Kit und TrkA einen gemeinsamen Signalweg benutzen und möglicherweise andere Signal-Systeme, die bei der Schmerzempfindung während der Entzündung eine Rolle spielen. Der TRPV1-Rezeptor wird in c-Kit^{-/-} Mäusen weiterhin exprimiert, dennoch bleibt die Mitwirkung einer möglichen veränderten TRPV1-Aktivität auf die im Verhalten festgestellte thermische Hypoalgesie in c-Kit^{-/-} Mäusen ungeklärt.

4.4 Mechanische Sensitivität bei c-Kit Mäusen

Da c-Kit auch in mittleren bis großen (25-40 μm) sensorischen Neuronen von adulten Mäusen exprimiert ist wurde auch eine detaillierte Analyse seiner Funktion in mechanosensitiven Neuronen durchgeführt.

Die Ergebnisse der in Kooperation durchgeführten Untersuchungen am Haut-Nerv-Präparat von c-Kit^{-/-} Mutanten sind im Folgenden erläutert. Grundsätzlich werden mittel bis schnell leitende mechanosensitive Afferenzen in zwei Kategorien eingeteilt: AM (A δ Nozizeptoren und D-hair Afferenzen) und A β mechanosensitive Neuronen mit großem Durchmesser (SA langsam adaptierende; RA schnell adaptierende). Diese unterschiedlichen Typen von afferenten Fasern können elektrophysiologisch durch ihre Leitungsgeschwindigkeit (AM mittel; A β schnell) und ihr spezifisches Feuermuster durch mechanische Verdrängung unterschieden werden.

Die c-Kit^{-/-} Mutanten zeigten eine Verschiebung der Proportionen von langsam adaptierenden (SA) cutanen Mechanorezeptoren. Diese wurden in einer ungewöhnlich hohen Anzahl detektiert. Die Verteilung von SAs zu RAs von 60:40 in Wildtyp Tieren veränderte sich auf ein Verhältnis von 85:15 in c-Kit^{-/-} Mutanten (Frahm *et al.*, 2007). Die absolute Zahl an cutanen myelinisierten Fasern verringerte sich um ca. 5%. Dieser Verlust könnte ein Grund für die Veränderungen in der Population der RAs sein. Außerdem kann man daraus schließen, dass c-Kit eine Rolle bei der Differenzierung von cutanen Mechanorezeptoren spielt. In Abwesenheit von c-Kit scheinen sich die unreifen Mechanorezeptoren vermehrt zu dem langsam adaptierenden Phänotyp (SA) zu entwickeln.

Zusätzlich zeigten c-Kit^{-/-} Mutanten eine Veränderung speziell im Antwortverhalten von langsam adaptierenden Mechanorezeptoren (SA). Die SA Afferenzen von c-Kit Mutanten zeigten eine deutliche Erhöhung der relativen Feuerungsaktivitäten in Antwort auf mechanische Verdrängung (Frahm *et al.*, 2007). Außerdem waren die Stimulus-Schwellen von beiden SA und A δ afferenten Mechanorezeptoren auf mechanische Stimulation mit von Frey-Haaren um ca. 20% reduziert.

In c-Kit Mutanten wurde außerdem festgestellt, dass A-Typ myelinisierte Mechanorezeptoren mit einer hohen Reizschwelle eine signifikante Erhöhung der Sensitivität zeigen. Dies könnte die Ursache für die Verhaltens-Hyperalgesie sein, die im mechanischen Schmerztest untersucht wurde. Im Gegensatz dazu sind die Feuerungsraten der C_{MH} Nozizeptoren oder der AM Mechanorezeptoren mit kleinem Durchmesser in Reaktion auf mechanische Verdrängung relativ unverändert.

Darüber hinaus ist die Sensitivität von langsam adaptierenden Mechanorezeptoren sowie schnell adaptierenden (RA) und D-hair Afferenzen unverändert.

Um auch den Einfluss von SCF auf die mechanische Sensitivität von Wildtyp Mäusen zu testen, wurde SCF erneut in Wildtyp Mäuse injiziert, die anschließend im Aesthesiometer getestet wurden. In den Untersuchungen blieben die Latenzzeiten nahezu unverändert.

Die systemische Aktivierung von c-Kit durch Injektion von SCF in lebende Mäuse resultierte somit nicht in signifikanten Unterschieden in der mechanischen Reizschwelle. Dies lässt vermuten, dass die SCF/c-Kit-Signalgebung keinen akuten Einfluss auf die Regulation der mechanischen Sensitivität hat (im Gegensatz zu den Effekten bei der Detektion von thermischen Reizen).

Bis jetzt sind nur wenige Moleküle charakterisiert worden, die die Mechanosensitivität von sensorischen Neuronen beeinflussen (Gillespie and Walker, 2001; Lewin and Moshourab, 2004). Die Resultate der c-Kit mutanten Mäuse zeigen, dass Langzeit-Veränderungen in der c-Kit Signalgebung sowohl die Sensibilität von harmlosen als auch von schmerzhaften mechanischen Reizen beeinflussen. Es ist wahrscheinlich, dass die mechanische Hyperalgesie in den c-Kit Mutanten eine Funktion von SCF/c-Kit Signalgebung während der späten embryonalen oder der frühen postnatalen Entwicklung von mechanosensitiven neuronalen Subtypen reflektiert.

Eine kleine Anzahl von myelinisierten Afferenzen mit großem Durchmesser im dorsalen Hinterwurzelganglion, möglicherweise cutane Mechanorezeptoren, exprimieren weiterhin c-Kit im adulten Tier. Bis jetzt kann man die Natur dieser

c-Kit⁺ Neurone mit großem Durchmesser nicht eindeutig identifizieren und es muss weiterhin untersucht werden, ob Langzeit-Störungen im SCF/c-Kit Signalweg einen direkten Effekt auf Mechanosensitivität in adulten Mäusen haben.

4.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal eine Funktion des c-Kit/SCF Signalweges im entwickelten peripheren Nervensystem beschrieben werden. Die meisten c-Kit⁺ Neurone coexprimieren die Rezeptortyrosinkinase TrkA; dies und andere Parallelen zum Signalweg von NGF/TrkA machen c-Kit als neuen Kandidaten in der Erforschung von Faktoren, die den Phänotyp von sensiblen Neuronen beeinflussen, interessant.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen des purinergen Rezeptors P2X3 zeigten, dass P2X3 in der c-Kit Mutante signifikant herunterreguliert ist. Hier gilt es zu klären, ob P2X3 tatsächlich durch die c-Kit Aktivität beeinflusst ist. Die Untersuchungen zu TRPV1 zeigen, dass in den c-Kit Mutanten TRPV1 hochreguliert ist; ob dies im Zusammenhang mit der Hypoalgesie steht, bleibt offen. An dieser Stelle wäre es interessant eine direkte Wechselwirkung von TRPV1 und c-Kit beispielsweise mittels Coimmunopräzitation nachzuweisen. Dieser Zusammenhang konnte schon in vorherigen Arbeiten zwischen TRPV1 und NGF hergestellt werden (Zhang *et al.*, 2005). Es ist aber wahrscheinlich, dass die Signalgebung durch c-Kit auch die Aktivität von anderen hitzesensitiven Kanälen beeinflusst, unabhängig von oder zusätzlich zu P2X3 oder TRPV1, die dann zu den Hypoalgesie-Effekten der Nozizeptoren in den c-Kit^{-/-} Mäusen führen.

Die bisherigen Versuche zur Funktion von SCF führten zu interessanten neuen Ergebnissen. SCF löst *in vivo* und *in vitro* starke Hyperalgesie-Effekte aus, die von relativ kurzer Dauer sind. Der stärkste Effekt konnte *in vivo* nach ca. 1 Stunde festgestellt werden und war nach 7 Stunden schon wieder auf den Ausgangszustand zurückgekehrt. Bei der direkten Applikation von SCF auf Neurone sah man eine starke Potenzierung des Einwärtsstroms, die aber schon

nach 90 s nicht mehr messbar war. Es wäre sicherlich interessant zu untersuchen, wie es zu diesem kurzzeitigen Effekt von SCF kommt. Darüber hinaus würden Versuche an Mäusen, denen das funktionelle Gen für SCF fehlt, sicherlich zu weiteren spannenden Erkenntnissen führen.

Aufbauend auf den Ergebnissen der Verhaltensversuche, in denen festgestellt wurde, dass c-Kit Einfluss auf die Mechanosensitivität hat, wurde die Funktion von c-Kit auch direkt auf neuronaler Ebene untersucht.

Es war möglich den Einfluss von c-Kit auf die Funktion von langsam adaptierenden Mechanorezeptoren (SAs) nachzuweisen. Dabei ist es wahrscheinlich, dass c-Kit eine Verschiebung von SAs zu RAs verursacht. Bis jetzt konnte aber die Natur dieser c-Kit⁺ Neurone mit großem Durchmesser nicht eindeutig bestimmt werden. Es muss weiterhin untersucht werden, ob es einen direkten Effekt auf die Mechanosensitivität in adulten Mäusen durch Störungen im SCF/c-Kit Signalweg gibt.

In dieser Arbeit wird u.a. eine zentrale Rolle der Rezeptortyrosinkinase c-Kit in der Funktion von neuronalen Zellen, in der Bestimmung der Reizschwelle von sensiblen Neuronen unter Hitzeeinfluss sowie in der Stimulus-Sensitivität von Mechanorezeptoren demonstriert. Nicht allein aus diesen Gründen erscheint die weitere Analyse des SCF/c-Kit Signalweges äußerst interessant und die weitere Analyse der Gene von großer Bedeutung.