

5 SUMMARY

The skin is our largest sensory organ and required for the perception of the outside world using our sense of touch and pain. The underlying mechanism is called mechanotransduction but at the molecular level this process is still poorly understood. We wish to identify new molecular components involved in sensory neuron mechanotransduction in mammals. In this study, two proteins, namely stomatin-like protein 3 (SLP3) and paraoxonase have been investigated for their role in cutaneous mechanosensation in mice. SLP3 and paraoxonase are homologues of *C. elegans* MEC-2 and MEC-6 respectively, which have been shown to function as subunits of the mechanotransducing ion channel MEC-4/MEC-10.

Using electrophysiological assays on SLP3 mutant mice, we could show that SLP3 is required for the normal function of about one-third of myelinated mechanoreceptors since these fibres are not able to form mechanosensitive receptive fields in the skin. However, mechano-insensitive afferents could not be assigned to any single mechanoreceptor class and the remaining mechanoreceptor function was largely normal. This indicates that there might be a molecular logic underlying this finding that still remains unexplained. In addition, mechanosensitive ion channels expressed in the neurites of sensory neurones of the DRG do not function without SLP3, i.e. about thirty percent of cultivated primary neurones do not possess mechanically gated ion currents.

So far, from anatomical studies on SLP3 mutant mice it turned out that lack of the protein does not cause any sensory neurone loss and nor is the morphology of sensory afferents in the skin affected by *slp3* deletion.

To address the question of whether SLP3 mutant mice have deficits in touch perception we developed a new quantitative behavioural assay for testing tactile acuity in mice and found that the tactile driven behaviour is impaired in SLP3 mutant mice.

In a smaller project some initial experiments were carried out on paraoxonase validating its possible role in sensory mechanotransduction in mammals using biochemical and immunohistochemical techniques. We found that PON2, a member

of the paraoxonase family, is expressed in sensory neurones of the DRG in mice. In addition, it is localised in the plasma membrane and may be bound to the membrane via a GPI-anchor.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Haut als unser größtes sensorisches Organ vermittelt unter anderem über die Wahrnehmung sensorischer Reize, wie Berührung und Schmerz, den Kontakt des Körpers mit der Außenwelt. Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe um Prof. Gary Lewin ist die Identifizierung bisher unbekannter molekularer Komponenten, die in dem zugrundeliegenden Prozeß, der als Mechanotransduktion bekannt ist und die Umwandlung eines physikalischen Stimulus in einen Nervenimpuls darstellt, involviert sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Proteine, nämlich Stomatin-like protein 3 (SLP3) und Paraoxonase bezüglich ihrer Rolle in der cutanen Mechanotransduktion untersucht. SLP3 und Paraoxonase haben Homologe in *C. elegans*, die als MEC-2 und MEC-6 regulatorische Untereinheiten des mechanosensitiven Ionenkanals (ein MEC-4/MEC-6 Heterooligomer) bilden und essentiell für die Transduktion mechanischer Berührungstimuli in *C. elegans* sind. Auf Säugetierebene konnte anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen von gentechnisch modifizierten Mäusen, in denen die Expression von SLP3 blockiert wurde, gezeigt werden, dass etwa ein Drittel der sensorischen Afferenzen in der Haut ihre Eigenschaft, mechanische Stimuli zu detektieren verloren haben, obgleich axonale Projektion und periphere Targetinnervation nicht gestört zu sein scheinen. Zudem konnte für Primärkulturen sensorischer Neuronen aus den Hinterwurzelganglien von SLP3^{-/-} Mäusen nachgewiesen werden, dass bei Verlust von SLP3 die Transduktion mechanosensitiver Ionenkanäle in etwa einem Drittel der untersuchten Zellen gestört war. In der Anwendung eines von uns entwickelten, taktil gesteuerten Verhaltenstests konnten wir außerdem zeigen, dass sich der beobachtete mechanoinsensitive Phänotyp der SLP3^{-/-} Mäuse auf deren Fähigkeit niederschlägt, strukturierte Oberflächen von der sie umgebenden Fläche zu diskriminieren, und insofern konnte verhaltensbiologisch nachgewiesen werden, dass die

elektrophysiologisch gemessene Mechanoinsensitivität eine defizitäre Detektion strukturierter Oberflächen nach sich zieht.

In einem untergeordneten Projekt wurde untersucht, inwieweit Paraoxonase (PON) als Säugetierhomolog des *C. elegans* Proteins MEC-6 eine Rolle in der Mechanotransduktion spielen könnte. Es konnte gezeigt werden, dass ein Mitglied der Paraoxonase-Proteinfamilie, konkret PON2, in DRG-Neuronen exprimiert ist. Zudem konnte in *in vitro* Expressionsstudien dieses Protein in der Zellmembran lokalisiert werden, wo es vermutlich auf der extrazellulären Seite über einen GPI-Anker an die Zellmembran gebunden ist. Da frühere Studien darauf hindeuten, dass eine GPI-verankerte Protease eventuell „Low-Threshold“-Mechanorezeptoren in der Haut reguliert, halten wir weitere Untersuchungen zur Evaluierung einer möglichen Rolle von PON2 in der Mechanotransduktion in Säugetieren für angebracht und vielversprechend.