



UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
der Universität zu Lübeck

Direktorin: Prof. Dr. med. C. Nau

**Modulation der elektrischen Erregbarkeit sensorischer Neurone  
durch Funktionsveränderungen von Nav1.9-Kanälen**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck

Aus der Sektion Naturwissenschaften

vorgelegt von  
Samuel Kühs  
aus Hameln

Lübeck, 2024

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Enrico Leipold
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Kristina Kusche-Vihrog
3. Vorsitz Prüfungskommission: Prof. Dr. rer. nat. Henrik Oster

Tag der mündlichen Prüfung: Lübeck, 25. Februar 2025

Zum Druck genehmigt. Lübeck, 27. Februar 2025

# I. Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Natriumkanäle	1
1.2	Physiologie und Pathophysiologie von Nav1.9	6
1.2.1	Funktion und Regulation von Nav1.9 in sensorischen Neuronen	6
1.2.2	Nav1.9-abhängige Erkrankungen	10
1.2.3	Rolle von Nav1.9 im enterischen Nervensystem	12
1.2.4	Weitere Funktionen von Nav1.9	14
1.3	Zielstellung der Arbeit	14
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1	Arbeitsmaterialien und Chemikalien	16
2.2	Molekularbiologische Methoden	18
2.2.1	Expressionskonstrukte	18
2.2.2	Herstellung von Kanalchimären	19
2.2.3	Herstellung von Kanalmutanten	20
2.2.4	Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmid-DNA	21
2.3	3D-Modell von Nav1.9	21
2.4	Versuchstiere	21
2.5	Präparation von murinen DRG-Neuronen	22
2.6	Präparation von murinen Darmneuronen	23
2.7	Zellkultur und Transfektion der isolierten Neurone	23
2.8	Elektrophysiologie	24
2.8.1	<i>Patch-Clamp</i> -Technik	24
2.8.2	Experimenteller Ablauf	25
2.8.3	Elektrophysiologische Pufferlösungen	27

2.8.4	Stimulationsprotokolle.....	27
2.8.5	Untersuchung von Aktionspotentialen in <i>Current-Clamp</i> -Experimenten.....	32
2.8.6	Datenanalyse.....	33
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	dKO-DRG-Neurone als Expressionssystem für humane Nav1.9-Kanäle .....	34
3.2	Molekulare Determinanten der besonderen Schalteigenschaften von Nav1.9 .....	38
3.2.1	Rolle des C-Terminus für das Inaktivierungsverhalten von Nav1.9 .....	39
3.2.2	Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten von Nav1.9.....	43
3.2.3	Relevanz nicht konservierter Reste in DIV S4-S5 und DIV S4-S5 für das Schaltverhalten von Nav1.9 .....	46
3.3	Krankheitsassoziierte Nav1.9-Varianten .....	48
3.3.1	Funktionelle Eigenschaften potenziell Analgesie-auslösender Nav1.9-C1355F-Kanäle.....	49
3.3.2	Funktionelle Untersuchung von Nav1.9-W684L-Kanälen.....	51
3.3.3	Charakterisierung potenziell Schmerz-auslösender Nav1.9-Y66S-Kanäle...	57
3.3.4	Analyse Analgesie- und Obstipation-assoziiierter Nav1.9-L396P-Kanäle in murinen enterischen Neuronen.....	62
3.4	Analyse der ROS-Sensitivität Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle.....	65
3.4.1	TTX-resistente Nav-Kanäle zeigen eine höhere ROS-Sensitivität als TTX-sensitive Nav-Kanäle.....	66
3.4.2	Intrazelluläre ROS beeinträchtigen die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9-Kanälen.....	68
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>72</b>
4.1	dKO-DRG-Neurone sind ein effizientes Expressionssystem zur Untersuchung von Nav1.9-Kanälen.....	72

4.2	Der mediale C-Terminus beeinflusst die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9-Kanälen .....	74
4.3	Der N-Terminus beeinflusst die Aktivierung und Deaktivierung von Nav1.9-Kanälen .....	76
4.4	Nav1.9-Varianten sind mit komplexen Krankheitsbildern korreliert .....	77
4.5	Isolation enterischer Neurone .....	85
4.6	Nav1.9-Kanäle werden funktionell durch ROS moduliert.....	86
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>i</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>xviii</b>
<b>8</b>	<b>Eigene Publikationen .....</b>	<b>xxii</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>xxiii</b>

## II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A <sub>N</sub>	Numerische Apertur
AP	Aktionspotential
AS	Aminosäure
CIP	<i>Congenital Insensitivity to Pain</i> , kongenitale Analgesie
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i>
CSS	<i>Complete Saline Solution</i>
DI/ II/ III/ IV	Domäne 1/ Domäne 2/ Domäne 3/ Domäne 4
dKO	Doppelknockout (der Gene: <i>Scn10a</i> und <i>Scn11a</i> )
DRG	<i>Dorsal root ganglia</i> , dorsale Hinterwurzelganglien
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMG	Elektromyographie
ENS	Enterisches Nervensystem
FKS	Fetales Kälberserum
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
GOF	<i>gain-of-function</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl) -1-piperaziny) -ethansulfonsäure
HSAN	Hereditäre sensorische und autonome Neuropathie
IPANs	intrinsische primäre afferente Neurone
Kontr.	Kontrolle
LOF	<i>loss-of-function</i>
LY	<i>Lucifer Yellow</i>
mM	Mikromolar
Nav-Kanal	Spannungsgesteuerter Natriumkanal
n	Anzahl experimenteller Replikate
nm	Nanometer
Norm. I	Normalisierte Stromamplitude
Nr.	Nummer
NTRK1	Tyrosin Kinase Rezeptor Typ 1
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PNS	Peripheres Nervensystem
RMP	Ruhemembranpotential
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
s.e.m.	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
SFN	<i>Small-Fiber-Neuropathie</i> , Kleinfaserneuropathie
sog.	sogenannt
TTX	Tetrodotoxin
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

Aktionspotentiale sind die Basis der Informationsweiterleitung entlang der Plasmamembran elektrisch erregbarer Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen. Dabei handelt es sich um wenige Millisekunden andauernde Auslenkungen des Membranpotentials, welche durch das orchestrierte Öffnen und Schließen spannungsgesteuerter Ionenkanäle vermittelt werden. Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Nav-Kanäle) sind hierfür zentral, denn sie initiieren Aktionspotentiale und tragen zu ihrer gerichteten Weiterleitung bei (Catterall, 2000). Die physiologische Bedeutung der Nav-Kanäle wird durch eine Reihe von Erkrankungen unterstrichen, die auf vererbte oder erworbene Fehlfunktionen der Kanäle zurückzuführen sind (D. L. H. Bennett & Woods, 2014; Laedermann et al., 2015).

Im Folgenden werden zunächst der Aufbau und die molekulare Funktionsweise der Nav-Kanäle beschrieben und ihre Rolle für die Nozizeption beleuchtet. Besonderes Augenmerk wird auf den Subtyp Nav1.9 und seine Bedeutung für die Nozizeption und die Darmphysiologie gelegt.

## 1.1 Aufbau und Funktion spannungsgesteuerter Natriumkanäle

Nav-Kanäle sind Proteinkomplexe, bestehend aus einer großen  $\alpha$ -Untereinheit (~260 kDa) und 1-2 kleineren akzessorischen  $\beta$ -Untereinheiten (30-40 kDa) (Catterall, 2000). Die Familie der Säuger-Nav-Kanäle ( $\alpha$ -Untereinheiten) umfasst neun Mitglieder (Nav1.1-Nav1.9), die von den SCN-Genen (*SCN1A-5A*, *SCN8A-11A*) kodiert und gewebespezifisch exprimiert werden (Goldin, 2001; Goldin et al., 2000). Sie vermitteln den transienten  $\text{Na}^+$ -Einstrom in elektrisch erregbaren Zellen und sind somit für deren Erregbarkeit von fundamentaler Bedeutung. Obwohl die Proteinsequenzen der Nav-Kanäle eine hohe Homologie aufweisen (Goldin, 2001; Goldin et al., 2000), üben die Subtypen im Organismus zum Teil nicht-redundante Funktionen aus.

Neben den neun klassischen Nav-Kanälen, wird von einem zehnten Gen (*SCN7A*) ein Nav-ähnliches Protein ( $\text{Na}_X$ ) kodiert (Goldin, 2001). Trotz seiner Homologie zu den Nav-Kanälen scheint es sich bei  $\text{Na}_X$  um keinen klassischen Nav-Kanal zu handeln, sondern vielmehr um einen unspezifischen Kationenkanal, der vermutlich mit der Regulation der Salzhomöostase in Verbindung steht (Hiyama et al., 2002; Noland et al., 2022).

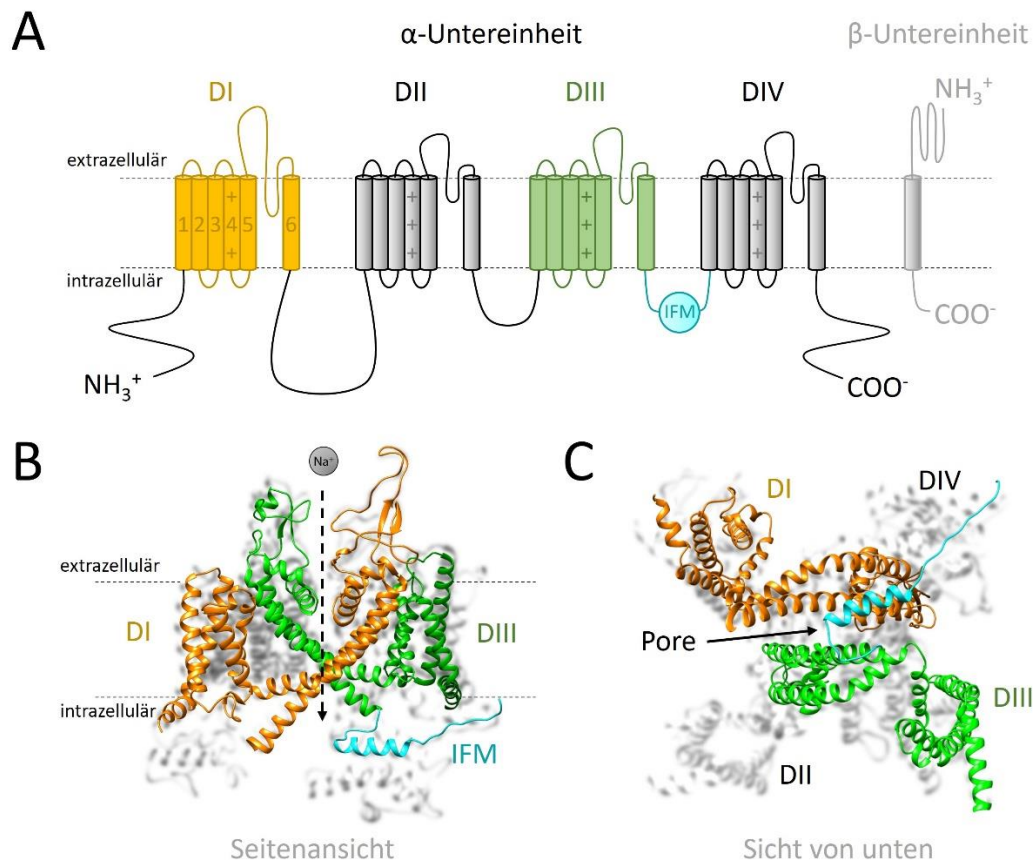
Nav-Kanäle werden gewebespezifisch exprimiert (Tabelle 1) und lassen sich historisch anhand ihrer Sensitivität gegenüber dem Neurotoxin Tetrodotoxin (TTX) klassifizieren (Catterall et al., 2005; Goldin, 2001; Goldin et al., 2000). Dabei werden sie in TTX-sensitive (TTXs) und TTX-resistente (TTXr) Kanäle eingeteilt. Nav1.1, Nav1.2, Nav1.3, Nav1.4, Nav1.6 und Nav1.7 gehören zu den TTXs Kanälen, da sie bereits durch nanomolare Konzentrationen an TTX (IC<sub>50</sub> zwischen 1-25 nM) inhibiert werden (Goldin, 2001). Zu den TTXr-Kanälen zählen Nav1.5, Nav1.8 und Nav1.9 (IC<sub>50</sub> >> 1 μM) (Goldin, 2001).

**Tabelle 1: Familie humaner Nav-Kanäle und ihre akzessorischen β-Untereinheiten.** Angegeben sind die kodierenden Gene, das primäre exprimierende Gewebe, sowie die TTX-Sensitivität. Die primär in Nozizeptoren exprimierten Nav-Kanäle sind rot umrandet. ZNS: Zentralnervensystem, PNS: peripheres Nervensystem, DRG: dorsale Hinterwurzelganglien.

Kanal	Gen	Primäres Gewebe	TTX-Resistenz
Nav <sub>v</sub> 1.1	<i>SCN1A</i>	ZNS, PNS	nein
Nav <sub>v</sub> 1.2	<i>SCN2A</i>	ZNS	nein
Nav <sub>v</sub> 1.3	<i>SCN3A</i>	ZNS	nein
Nav <sub>v</sub> 1.4	<i>SCN4A</i>	Skelettmuskulatur	nein
Nav <sub>v</sub> 1.5	<i>SCN5A</i>	Herzmuskel, Darmneurone	ja
Nav <sub>v</sub> 1.6	<i>SCN8A</i>	ZNS, PNS	nein
Nav <sub>v</sub> 1.7	<i>SCN9A</i>	PNS: Aδ- und C-Fasern	nein
Nav <sub>v</sub> 1.8	<i>SCN10A</i>	PNS: DRG, Aδ- und C-Fasern	ja
Nav <sub>v</sub> 1.9	<i>SCN11A</i>	PNS: DRG, C-Fasern	ja
Na <sub>x</sub>	<i>SCN7A</i>	DRG, Herz- und Skelettmuskulatur, Uterus, Astrozyten	nein
Navβ1	<i>SCN1B</i>	ZNS, PNS, Herz	
Navβ2	<i>SCN2B</i>	ZNS, PNS, Herz	
Navβ3	<i>SCN3B</i>	ZNS, PNS, Herz	
Navβ4	<i>SCN4B</i>	ZNS, PNS, Herz	

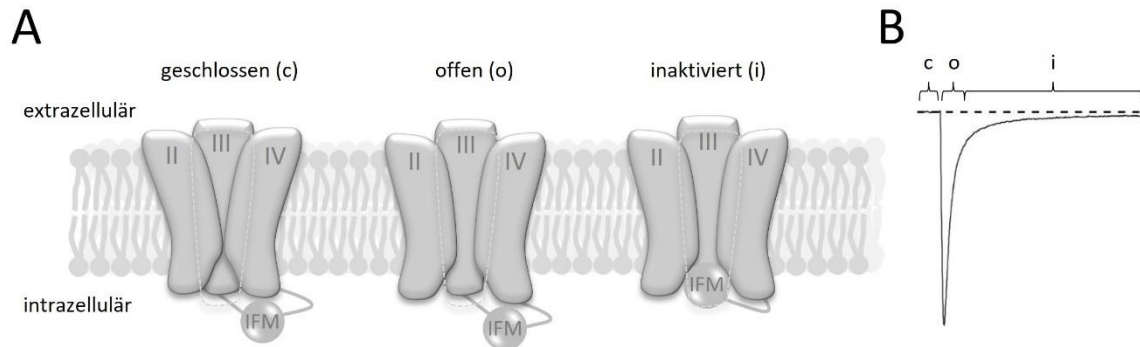
Strukturell betrachtet bildet die α-Untereinheit der Nav-Kanäle einen langen Proteinstrang (Abb. 1A), der vier homologe Domänen (DI-DIV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) formt, die über extra- und intrazelluläre Linker miteinander verknüpft sind (Numa & Noda, 1986). Die Transmembransegmente S1-S4 der einzelnen Domänen bilden die Spannungssensoren des Kanals, die am Aktivierungsvorgang der Kanäle beteiligt sind (Payandeh et al., 2011). Die S4-Segmente enthalten positiv geladene Aminosäure (AS)-Reste (sog. Schaltladungen), die von hydrophoben AS-Resten in S1-S3 umgeben sind und auf Spannungsänderungen der Zellmembran reagieren (Bezanilla, 2000). Bei einer Depolarisation der Zellmembran bewegen sich die positiven Ladungen der S4-Segmente in Richtung extrazellulär, wodurch weitere Konformationsänderungen eingeleitet werden und

damit das Öffnen der Kanalpore veranlasst wird (Catterall, 2000). Infolgedessen können Na<sup>+</sup>-Ionen in die Zelle einströmen. Die Kanalpore wird von den Transmembransegmenten S5 und S6 zusammen mit den dazwischen liegenden Linker-Regionen geformt (Catterall, 2000). Die Na<sup>+</sup>-Selektivität der Nav-Kanäle wird durch einen ringförmigen Selektivitätsfilter determiniert, der von Asparaginsäure, Glutaminsäure, Lysin und Alanin (sog. DEKA-Motiv) in den extrazellulären S5/S6-Linkern gebildet wird (Heinemann et al., 1992). Dem Aktivierungsvorgang folgt eine schnelle Inaktivierung der Kanäle, bei der ein hydrophobes AS-Motiv, gebildet durch die drei hydrophoben Reste Isoleucin, Phenylalanin und Methionin (sog. IFM-Motiv) die Kanalpore verschließt und den weiteren Einstrom von Na<sup>+</sup> verhindert (West et al., 1992). Diese in allen Säuger-Nav-Kanälen stark konservierte Sequenz befindet sich im zytoplasmatischen Linker zwischen DIII und DIV (Catterall, 2000). Nach dem „*hinged-lid*“-Modell ist der intrazelluläre Linker mit dem IFM-Motiv freibeweglich und verschließt beim Inaktivierungsvorgang die Kanalpore, indem es an einen intrazellulär zugänglichen Rezeptor innerhalb der Kanalstruktur bindet (West et al., 1992). Studien deuten darauf hin, dass es sich bei dem Rezeptor um Epitope in den S4-S5-Linkern der Domänen DIII und DIV handelt (Filatov et al., 1998; Lerche et al., 1997; McPhee et al., 1998; M. R. Smith & Goldin, 1997; Tang et al., 1998). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die S6-Segmente am Aktivierungs- und Inaktivierungsvorgang der Nav-Kanäle beteiligt sind und AS-Austausche in den distalen Bereichen mit schwerwiegenden Krankheitsbildern wie beispielsweise kongenitaler Analgesie (*Congenital Insensitivity to Pain, CIP*) assoziiert sind (King et al., 2017; Leipold et al., 2013; McPhee et al., 1995; Yarov-Yarovoy et al., 2002). Neben den beschriebenen Strukturen konnte nachgewiesen werden, dass auch der C-Terminus zur Inaktivierung der Nav-Kanäle beiträgt (Choi et al., 2004; Goral et al., 2015; Mantegazza et al., 2001).



**Abbildung 1: Schematische Darstellung eines eukaryotischen spannungsgesteuerten Natriumkanals.** (A) Topologiemodell der  $\alpha$ -Untereinheit, bestehend aus vier homologen Domänen (DI-DIV) mit je sechs Transmembransegmenten (S1-S6), die durch extra- bzw. intrazelluläre Linker miteinander verknüpft sind. Der DIII/DIV-Linker vermittelt die schnelle Inaktivierung der Kanäle. Die Spannungssensoren sind mit „+“ gekennzeichnet. Domäne I und III, sowie der IFM-Linker sind farblich hervorgehoben. Zusätzlich ist eine  $\beta$ -Untereinheit schematisch dargestellt. (B) 3D-Struktur eines  $\text{Nav}$ -Kanals in Seitenansicht. (C) 3D-Struktur eines  $\text{Nav}$ -Kanals aus der Sicht von unten (intrazellulär). Analog zu A wurden DI, DIII und DIII/DIV farblich hervorgehoben.

Der Schaltzyklus der  $\text{Nav}$ -Kanäle lässt sich vereinfacht durch drei Zustände beschreiben (Ahern et al., 2016). Dazu gehört der geschlossene, der offene und der inaktivierte Zustand. Im stark hyperpolarisierten Zustand der Membran befinden sich die  $\text{Nav}$ -Kanäle in einem geschlossen deaktivierten Zustand und die Kanalleitfähigkeit beträgt 0 (Abb. 2A, links). Bei einer Depolarisation der Membran öffnet der Kanal und  $\text{Na}^+$ -Ionen strömen in die Zelle ein (Abb. 2A, mitte). Daraufhin wird der Kanal in einen inaktivierten Zustand überführt und der weitere Einstrom von  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle verhindert (Abb. 2A, rechts).



**Abbildung 2: Schaltzustände von Nav-Kanälen.** (A) Schematische Darstellung der drei Konformationszustände „geschlossen“, „offen“ und „inaktiviert“. Die Domänen II, III und IV sind schematisch dargestellt. Die Domäne I wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit als gestrichelte Linie angedeutet. Die Inaktivierung vermittelnde hydrophobe IFM-Motiv (DIII/DIV) verschließt nach dem „hinged-lid“-Modell die Kanalpore. (B) Stromantwort von TTXs-Kanälen auf eine Depolarisation der Zellmembran von -120 mV auf -30 mV, gemessen in einem kleinkalibrigen murinen DRG-Neuron. Die Schaltzustände sind analog zu A in geschweiften Klammern angegeben: c-geschlossen; o-offen; i-inaktiviert.

Schalteigenschaften von Nav-Kanälen können durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine, wie z.B. durch akzessorische  $\beta$ -Untereinheiten moduliert werden (Bouza & Isom, 2017; O'Malley & Isom, 2015). Die  $\beta$ -Untereinheiten gehören zu den Zelladhäsionsmolekülen und bilden eine Familie von vier Subtypen (Nav $\beta$ 1-Nav $\beta$ 4) (O'Malley & Isom, 2015). Sie bestehen aus einem Transmembransegment mit einem extrazellulären N-Terminus und einem intrazellulären C-Terminus und beeinflussen neben der Membranlokalisation auch die Schalteigenschaften der Kanäle, indem sie mit den  $\alpha$ -Untereinheiten interagieren (O'Malley & Isom, 2015). Eine Interaktion mit den  $\alpha$ -Untereinheiten kann entweder nicht-kovalent (Nav $\beta$ 1 und Nav $\beta$ 3) oder kovalent (Nav $\beta$ 2 und Nav $\beta$ 4) über extrazelluläre Disulfidbrücken erfolgen (O'Malley & Isom, 2015). Jüngst wurde gezeigt, dass die  $\alpha$ -Untereinheiten der Säuger-Nav-Kanäle miteinander interagieren und als Dimere funktionell miteinander wechselwirken (Clatot et al., 2017). Daneben wurden Kanalinteraktionen mit Proteinen, wie Calmodulin (Choi et al., 2006), Ankyrin-G (Shirahata et al., 2006) oder Annexin II (Okuse et al., 2002) nachgewiesen. Es wurde auch gezeigt, dass die Kanäle posttranslational glykosiliert, ubiquitiniert, palmitoyliert, nitrosyliert und von Kinasen phosphoryliert werden können (Cheng et al., 2021; Pei et al., 2018; Tyrrell et al., 2001). Die Vielzahl dieser regulatorischen Mechanismen weist auf eine komplexe Modulation der Kanäle im physiologischen und pathophysiologischen Kontext hin.

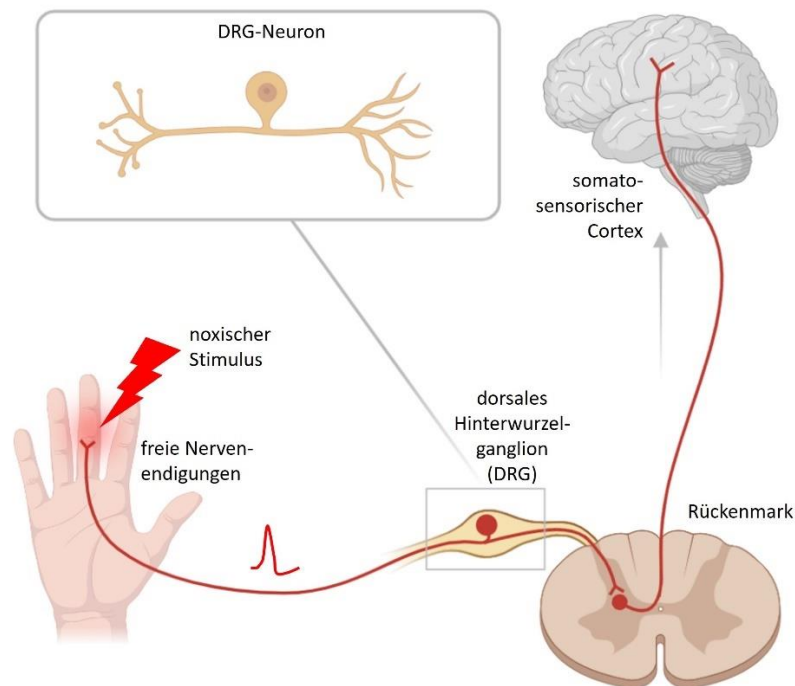
## **1.2 Physiologie und Pathophysiologie von Nav1.9**

Aufgrund seiner hohen Expression in den sensorischen Neuronen der dorsalen Hinterwurzelganglien (DRG), wurde Nav1.9 schon früh mit der Nozizeption in Verbindung gebracht. Die Entdeckung von Nav1.9-abhängigen Schmerzerkrankungen beim Menschen, die von neuropathischen Schmerzen bis hin zu *CIP* reichen, bestätigte zudem, dass Nav1.9 auch für die menschliche Schmerzphysiologie von großer Bedeutung ist (Huang et al., 2017; Leipold et al., 2013, 2015; Okuda et al., 2016). Interessanterweise zeigten diese Fallstudien auch, dass Fehlfunktionen von Nav1.9 zu ausgeprägten gastrointestinalen Beschwerden, wie Obstipation und Diarrhö, führen können. Die bisherige Forschung konzentrierte sich primär auf die Funktion von Nav1.9 in Nozizeptoren und wird – trotz großer Fortschritte – nach wie vor durch die notorisch schwierige Expression der Kanäle in heterologen Systemen erschwert. Die Rolle von Nav1.9 in enterischen Neuronen ist weitaus weniger gut untersucht, vor allem deshalb, weil enterische Neurone in dicken Gewebeschichten eingebettet und für die experimentelle Manipulation weitaus weniger gut zugänglich sind als DRG-Neurone. Nachfolgend wird ein Überblick über die physiologischen und pathophysiologischen Aspekte von Nav1.9 gegeben.

### **1.2.1 Funktion und Regulation von Nav1.9 in sensorischen Neuronen**

Für das Detektieren schmerzhafter Reize ist der Säugerorganismus mit hoch spezialisierten Neuronen, sog. Nozizeptoren, ausgestattet. Dabei handelt es sich um primäre sensorische Neurone, die Zielstrukturen, wie z.B. Haut oder Muskelgewebe innervieren, dort schädigende Stimuli hoher Intensität registrieren und den Reiz in elektrische Signale, d.h. Aktionspotentiale, übersetzen (Dubin & Patapoutian, 2010). Diese nozizeptive Transduktion findet in den Endigungen der dünnen myelinisierten A $\delta$ -Fasern und nicht myelinisierten C-Fasern statt (McEntire et al., 2016), deren Zellkörper in den DRGs lokalisiert sind (siehe Abb. 3). Die DRGs befinden sich in den *Foraminae intervertebrales*, den Öffnungen des Wirbelkanals zwischen je zwei benachbarten Wirbeln der Wirbelsäule (Platzer, 2013). Diese zum PNS gehörenden Ganglien umfassen über ein Dutzend verschiedene hoch komplexe neuronale Subtypen (Sharma et al., 2020), die die eingehenden Signale registrieren und die Information über das dorsale Hinterhorn an Neurone des ZNS im Rückenmark weiterleiten (Dubin & Patapoutian, 2010). Abhängig von Art und Intensität des Stimulus können innerhalb des Rückenmarks Reflexbögen ausgelöst werden, die eine schnelle motorische Antwort (z.B. Kontraktion der Skelettmuskulatur) veranlassen (Pape et

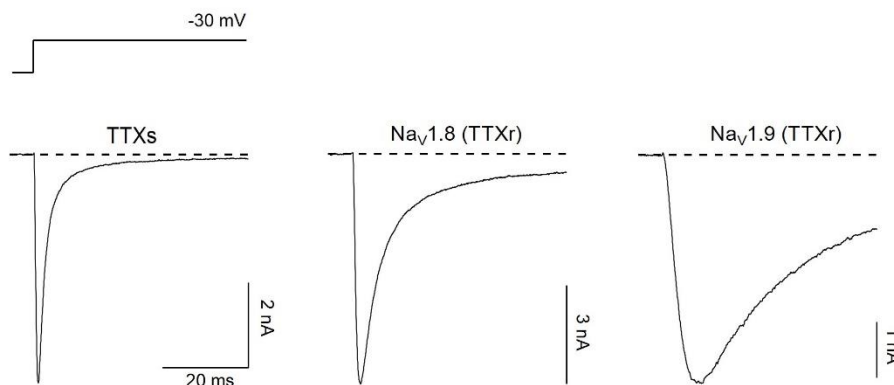
al., 2019). Vom Rückenmark aus werden die Signale weiter zur Medulla und über das Mesencephalon zum Thalamus geleitet, dessen Neurone sie zum somatosensorischen und anterioren cingulären Kortex übertragen, wo die kognitiven Aspekte der Schmerzwahrnehmung vermittelt werden (Tracey & Mantyh, 2007).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Grundprinzips der peripheren Nozizeption.** Freie Nervenendigungen spezialisierter sensorischer Neurone, sog. Nozizeptoren, registrieren sensorische Reize hoher Intensität (noxische Stimuli), die in Aktionspotentiale übersetzt und entlang afferenter Bahnen über die dorsalen Hinterwurzelganglien zum Rückenmark und von dort weiter zum somatosensorischen Cortex im Gehirn geleitet werden, wo die Information dann als Schmerz wahrgenommen wird. Die Abbildung wurde mithilfe von BioRender.com (2023) erstellt.

Die Kanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 leisten den größten Beitrag zur Na<sup>+</sup>-Leitfähigkeit nozizeptiver Fasern (D. L. Bennett et al., 2019; S. Dib-Hajj et al., 1998; Tate et al., 1998). Nav1.7 und Nav1.8 werden sowohl in den C-Fasern, als auch in den A $\delta$ -Fasern exprimiert, wohingegen Nav1.9 im Wesentlichen in den kleinkalibrigen C-Faser-Neuronen vorkommt (Akopian et al., 1996; S. Dib-Hajj et al., 2002). Die drei Nav-Subtypen unterscheiden sich funktionell hinsichtlich ihrer Spannungsabhängigkeit und Schaltkinetik (Abb. 4) (D. L. Bennett et al., 2019). Aufgrund dieser Unterschiede übernehmen sie teilweise nicht-redundante Funktionen in den Nozizeptoren. Während Nav1.7 als Schwellenwertkanal fungiert und Nav1.8 den schnellen AP-Aufstrich vermittelt, wird angenommen, dass Nav1.9 nicht direkt APs initiieren kann, sondern die Lage des Ruhemembranpotentials (RMP) reguliert und auf diese Weise die Erregbarkeit der Neurone beeinflusst (D. L. Bennett et al., 2019; Herzog et al., 2001; Renganathan et al., 2001). Gegenstand aktueller Forschung ist

unter anderem die Frage, welche Epitope der Kanalstruktur für die ausgeprägt langsamen Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9 verantwortlich sind (Goral et al., 2015).



**Abbildung 4: Stromantworten unterschiedlicher Nav-Subtypen sensorischer Neurone.** Repräsentative Stromantworten von TTXs und TTXr Nav-Kanälen bei einer Membrandepolarisation von -30 mV im Vergleich. TTXs-Kanäle sensorischer Neurone (z.B. Nav1.7) weisen eine schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik auf (links), während diese Prozesse bei den TTXr Subtypen Nav1.8 und Nav1.9 deutlich langsamer ablaufen.

Erste Belege für eine Rolle von Nav1.9 bei der Nozizeption wurden durch tierexperimentelle Studien gewonnen. Der Knockout des *Scn11a*-Gens in Mäusen bewirkte eine verminderte inflammatorische Hyperalgesie der Tiere, was auf die Bedeutung von Nav1.9 bei inflammatorischen Schmerzprozessen hindeutet (Amaya et al., 2006; Lolognier et al., 2011; Priest et al., 2005). Murine Nervenfaserableitungen von Nav1.9-KO-Tieren zeigten weiterhin eine verminderte Erregbarkeit der C-Faser-Neurone und unterstreichen damit die Relevanz von Nav1.9 für die Regulation der Nozizeptor-Erregbarkeit (Hoffmann et al., 2017). Die Bedeutung von Nav1.9 für inflammatorische Prozesse wird weiter durch *in-vitro*-Studien an murinen Wildtyp-DRG-Neuronen unterstützt, die zeigen, dass die gemeinsame Applikation der inflammatorischen Mediatoren Bradykinin, ATP, Histamin, Prostaglandin-E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) und Norepinephrin, die Stromantwort von Nav1.9 erhöht und damit die Erregbarkeit der Nozizeptoren steigert (Maingret et al., 2008). In Colon-innervierenden Afferenzen von Wildtyp-Mäusen resultierte die Applikation einer ähnlichen Kombination inflammatorischer Mediatoren, nämlich Bradykinin, ATP, Histamin, PGE<sub>2</sub> und 5-Hydroxytryptamin in einem verstärkten Feuerverhalten der Neurone (Hockley et al., 2014). Dieser Effekt konnte jedoch nicht in Nav1.9-KO-Tieren beobachtet werden (Hockley et al., 2014). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Neurokinin-3-Rezeptors (NK3) in enterischen Neuronen zu einem Anstieg der Stromantwort von Nav1.9 führt (Copel et al., 2009). Dies unterstützt die Annahme, dass sowohl NK3 als auch Nav1.9

mit viszeralem Schmerz und Stress-induzierter viszeraler Hypersensitivität assoziiert sind (Martinez & Melgar, 2008; Sanger, 2004).

Auch für Kälteschmerzen wird Nav1.9 eine wichtige Bedeutung zugeschrieben, was mit seiner hohen Expression in kältesensitiven sensorischen Neuronen korreliert (Lolignier et al., 2015). Untersuchungen zeigten, dass zum Feuern von APs als Folge von Kälteeinwirkung, Nav1.9 benötigt wird und dass die durch Kälte induzierte Schmerzantwort bei Nav1.9-KO Mäusen und Ratten reduziert ist (Lolignier et al., 2015). Die Relevanz von Nav1.9 für Kälteschmerz wird zudem durch Studien belegt, in denen durch Kälte ausgelöste und intensivierete, periphere Schmerzattacken auf hyperaktive Nav1.9-Varianten zurückgeführt werden können. (Leipold et al., 2015; Matsubara et al., 2021).

Für die Regulation von Nav1.9 in sensorischen Neuronen wurden neben inflammatorischen Mediatoren auch weitere regulatorische Faktoren, wie Kinasen und G-Proteine beschrieben, die vermutlich über Signalkaskaden in unmittelbarer Verbindung miteinander stehen (Baker et al., 2003; Östman et al., 2008). Experimentelle Untersuchungen weisen darauf hin, dass Nav1.9 von Proteinkinase C (PKC) in nozizeptiven DRG-Neuronen als Folge von inflammatorischen Prozessen hochreguliert wird (Bai et al., 2020). Neben der Modulation durch PKC, wurde auch die Modulation von Nav1.9 durch Proteinkinase A (PKA) beschrieben (Gold et al., 1998; Kakimura et al., 2010). Auch eine Beteiligung von G-Proteinen an der Regulation der Aktivität von Nav1.9 konnte nachgewiesen werden (Vanoye et al., 2013). Eine Studie zeigt, dass G-Protein-Signalwege durch den inflammatorischen Mediator PGE<sub>2</sub> beeinflusst werden und dadurch Nav1.9 in murinen DRG Neuronen hochreguliert wird (Rush & Waxman, 2004). Darüber hinaus kann die Funktionsweise von Nav1.9 durch vielfältige interagierende molekulare Strukturen beeinflusst werden, z.B. durch posttranslationale Modifikationen in Form von Glykosylierung (Tyrrell et al., 2001) oder durch die Bindung des Zelladhäsionsmoleküls Contactin, das den Transport des Kanals zur Plasmamembran beeinflusst (Liu, Dib-Hajj & Black, 2001). Es wird angenommen, dass Nav1.9 in Cholesterol-reichen „Lipid-Rafts“ innerhalb der Membran lokalisiert ist und dort durch Adhäsionsmoleküle, wie z.B. Contactin verankert wird (Amsalem et al., 2018; Liu et al., 2001). Störungen dieser Interaktion innerhalb der „Lipid-Rafts“ können zu einer veränderten neuronalen Erregbarkeit führen (Pristerà et al., 2012). Untersuchungen weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem Cholesterol-Level in der Plasmamembran und der Stromantwort von Nav1.9 hin (Amsalem et al., 2018). Es wird angenommen, dass inflammatorische Mediatoren durch einen von

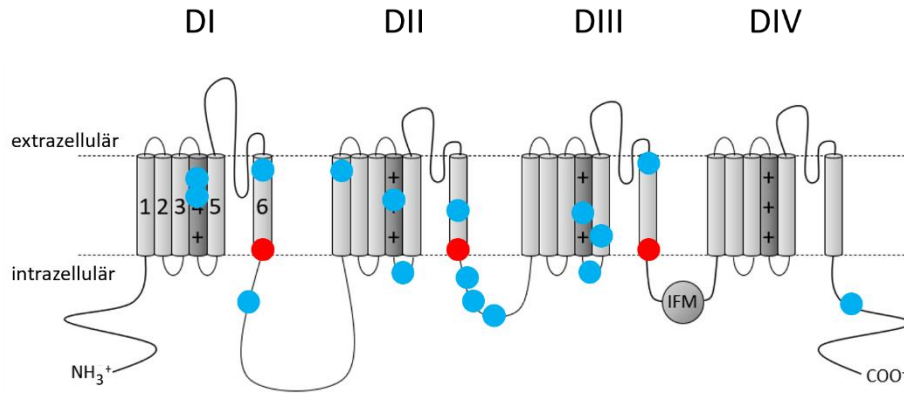
reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)-abhängigen Mechanismus auf Cholesterol und Nav1.9 in der Membran wirken, wodurch Schmerzsignalwege moduliert werden könnten (Amsalem et al., 2018). Eine direkte Interaktion von ROS mit Nav-Kanälen konnte bereits nachgewiesen und an einzelnen Subtypen, wie z.B. Nav1.4 und Nav1.8 systematisch untersucht werden (Kassmann et al., 2008; Schink et al., 2016). ROS modulieren vor allem den Prozess der Kanalinaktivierung, indem sie die dafür relevanten Strukturen angreifen. Es konnte gezeigt werden, dass unter den Nav-Kanälen Nav1.8 besonders sensitiv gegenüber ROS zu sein scheint, wobei einerseits dessen Inaktivierung verlangsamt und andererseits die Stromamplitude reduziert wird (Schink et al., 2016). Als Folge werden die APs in DRG-Neuronen breiter, während die Feuerfrequenz abnimmt (Schink et al., 2016). Wichtig zu erwähnen ist, dass die Daten aus der Studie unter dem Einsatz unphysiologisch hoher ROS-Level gewonnen wurden. Wie sich physiologisch relevante Level von ROS auf Nozizeptoren auswirken und ob hierbei auch Nav1.9 eine Rolle spielt, ist unbekannt. Aufgrund der Schwierigkeiten seiner heterologen Expression existieren bislang keine Daten zur ROS-abhängigen Modulation von Nav1.9-Kanälen.

### **1.2.2 Nav1.9-abhängige Erkrankungen**

Bis heute wurden mehr als 19 Mutationen im humanen *SCN11A*-Gen identifiziert und mit einem breiten Spektrum an Schmerzerkrankungen in Verbindung gebracht (Baker & Nassar, 2020). Dieses erstreckt sich von *CIP* bis hin zu peripheren Schmerzattacken, wobei letztere entweder dem familiären episodischen Schmerzsyndrom Typ III (FEPS-III) oder dem klinischen Bild der *Small-Fiber-Neuropathie (SFN)* zugeordnet werden. Die Nav1.9-abhängige Analgesie ist durch einen Verlust der Schmerzwahrnehmung als Leitsymptom gekennzeichnet und wird von Hyperhidrose sowie Missempfindungen, z.T. Pruritus sowie Darmfunktionsstörungen begleitet (King et al., 2017; Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016). Die Darmsymptomatik kann bis hin zur lang anhaltenden Obstipation und damit verbundener künstlicher Ernährung des betroffenen Patienten führen, wie es z.B. für Träger der Analgesie-assoziierten Variante Nav1.9-L811P berichtet wurde (Leipold et al., 2013). Die Mehrzahl der bis heute beschriebenen Nav1.9-Varianten verursachen bei den Trägern periphere Schmerzattacken, die unterschiedlich stark ausgeprägt sind und auch hinsichtlich ihres Onsets variieren. Bei einigen Patienten (FEPS-III) beginnen die Symptome bereits in der Kindheit (Han et al., 2017; Huang et al., 2019; Leipold et al., 2015; Leng et al., 2017; Okuda et al., 2016; X. Y. Zhang et al., 2013), während sie in anderen Fällen (*SFN*) erst im

Erwachsenenalter auftreten (Ginanneschi et al., 2019; Han et al., 2015; Huang et al., 2014). Das klinische Bild von FEPS-III ist primär gekennzeichnet durch episodische Schmerzattacken, meist die distalen unteren Extremitäten betreffend, Hyperhidrose, sowie Darmfunktionsstörungen, die jedoch im Vergleich zu denen der oben erwähnten *CIP*-Patienten deutlich milder ausgeprägt sind (Han et al., 2017; Leipold et al., 2015; Leng et al., 2017; Okuda et al., 2016; X. Y. Zhang et al., 2013). Der klinische Phänotyp der Nav1.9-abhängigen *SFN* ist dem von FEPS-III sehr ähnlich, allerdings ist Nav1.9-assoziierte *SFN* zusätzlich gekennzeichnet durch eine Degeneration der kleinen peripheren Nervenfasern (Han et al., 2015; Huang et al., 2014). Nennenswert ist zudem, dass von einigen Trägern Schmerz-assoziiierter Nav1.9-Varianten davon berichtet wird, dass ihre Beschwerden durch Kälte verstärkt werden (Leipold et al., 2015).

Interessanterweise weisen alle der bis heute bekannten und funktionell charakterisierten pathologischen Nav1.9-Varianten *gain-of-function (GOF)*-Charakteristika auf, die sich in Form einer verstärkten Kanalaktivierung, einer beeinträchtigten Kanalinaktivierung oder einer Kombination beider Funktionsveränderungen äußern (Huang et al., 2014, 2017; Leipold et al., 2013; X. Y. Zhang et al., 2013). Dabei fällt die Ausprägung dieser Effekte zwischen den einzelnen Varianten sehr unterschiedlich aus. Interessant ist es, die Lokalisation der pathogenen AS-Austausche innerhalb der Kanalstruktur zu betrachten (Abb. 5). Beispielsweise befinden sich alle drei bis heute bekannten Nav1.9 abhängigen Analgesie-assoziierten Varianten L396P, L811P und L1302F (King et al., 2017; Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016; Woods et al., 2015) in den distalen S6-Segmenten (Abb. 5, rote Markierungen), die den intrazellulären Bereich der Kanalpore formen. Nav1.9-Varianten, die mit einem Schmerzphänotyp assoziiert sind, zeigen hingegen keine Clusterbildung und verteilen sich über die gesamte Kanalstruktur (Abb. 5, blaue Markierungen).



**Abbildung 5: Topologische Repräsentation bekannter Mutationen im Nav1.9-Kanal.** Alle bekannten *CIP*-auslösenden Mutationen (rot) befinden sich in den S6-Segmenten der Domänen I, II und III. Mit einem Schmerzphänotyp assoziierte Mutationen (blau) verteilen sich über die gesamte Kanalstruktur (nach Baker & Nassar, 2020).

Sowohl bei Nav1.9-abhängigen Analgesie-assoziierten Varianten als auch bei den Schmerzvarianten wurde beobachtet, dass das klinische Bild von Darmfunktionsstörungen unterschiedlichster Ausprägung begleitet wird (Huang et al., 2014; King et al., 2017; Leipold et al., 2013, 2015; Okuda et al., 2016; Phatarakijirund et al., 2016; Zhao et al., 2022). Der Zusammenhang zwischen Darmsymptomatik und Fehlfunktionen von Nav1.9 ist nicht verwunderlich, da Nav1.9 auch in Darmneuronen funktionell exprimiert wird (Coste et al., 2004; Padilla et al., 2007; Rugiero et al., 2003).

### 1.2.3 Rolle von Nav1.9 im enterischen Nervensystem

Das enterische Nervensystem (ENS) besteht im Wesentlichen aus zwei neuronalen Netzwerken, dem Auerbach Plexus (*Plexus myentericus*) und dem Meissner Plexus (*Plexus submucosus*), die größtenteils unabhängig vom ZNS fungieren und Verdauungsfunktion, Peristaltik und Sekretion von Botenstoffen steuern (Grundy et al., 2006). Innerhalb dieser Netzwerke wurden 12 Subtypen von Neuronen identifiziert, die sich in exzitatorische und inhibitorische Motoneurone, Interneurone und intrinsische primäre afferente Neurone (IPANs) unterteilen lassen (Morarach et al., 2021). IPANs sind mechanosensorische Neurone, die physiologische Reize, wie Bewegung der Villi, intestinale Muskelkontraktion und Veränderungen der chemischen Zusammensetzung im Lumen detektieren (Furness, 1998). Es konnte nachgewiesen werden, dass Nav1.9 in neuronalen Subtypen des Darmtraktes, wie den IPANs funktionell exprimiert wird (O'Donnell et al., 2016; Rugiero et al., 2003) und der Kanal an der Regulation der Darmmotilität beteiligt ist (Osorio et al., 2014; Rugiero et al., 2003). Dies wird unterstützt durch Untersuchungen an Nav1.9-KO-

Mäusen, die zeigen, dass diese Tiere Darmmotilitätsstörungen aufweisen (Copel et al., 2013).

Darmneurone weisen eine andere Kanalausstattung als DRG Neurone auf und exprimieren kein Nav1.8, jedoch die TTXr Kanäle Nav1.5 und Nav1.9 (Osorio et al., 2014; Rugiero et al., 2003) sowie die TTXs Kanäle Nav1.7 und Nav1.3 (Sage et al., 2007). Studien an murinen Darmplexus-Präparaten zeigten weiterhin, dass Nav1.5 zum schnellen AP-Aufstrich in Darmneuronen beiträgt und Nav1.9 der AP-Repolarisationsphase entgegenwirkt (Osorio et al., 2014). Weitere Untersuchungen an Darmplexus-Präparaten zeigten, dass die Aktivierung des NK3-Rezeptors, zu einem Anstieg der Stromantwort von Nav1.9 in enterischen Neuronen führt und dadurch der Schwellenwert zur Auslösung von APs gesenkt wird (Copel et al., 2009). In Ratten wurde außerdem gezeigt, dass Nav1.9 in der Hälfte der zum Darm projizierenden sensorischen DRG-Neuronen exprimiert wird und dass Nav1.9 für die Mechanosensation, die Erregbarkeit der Neurone und die Sensitivierung durch inflammatorische Mediatoren wichtig ist (Hockley et al., 2014). So ist es nicht verwunderlich, dass Dysfunktionen von Nav1.9-Kanälen mit komplexen gastrointestinalen Beschwerden einhergehen. Im Einklang damit zeigten etwa Untersuchungen an Darmgewebe von Patienten mit Hirschsprung-Erkrankung eine verminderte Expression des Nav1.9-Kanals (O'Donnell et al., 2016). Auch Patienten mit Nav1.9-assoziierten Schmerzerkrankungen sind von ausgeprägten Darmfunktionsstörungen betroffen. So ist beispielsweise ein Patient mit *CIP*, der Träger der Variante Nav1.9-L396P ist, von Obstipation betroffen (King et al., 2017), ein weiterer *CIP*-Patient mit der Variante Nav1.9-L1302F von chronischer Diarrhöe (Phatarakijirund et al., 2016) und *CIP*-Patienten mit der Variante Nav1.9-L811P von wechselnden Phasen mit Obstipation und Diarrhöe, die mitunter auch eine temporäre parenterale Ernährung erforderlich machen (Leipold et al., 2013). Doch nicht nur Patienten mit Nav1.9-abhängiger Analgesie sind von gastrointestinalen Beschwerden betroffen. Auch Patienten mit Nav1.9-abhängiger Schmerzsymptomatik weisen gastrointestinale Beschwerden, wie Diarrhöe oder Obstipation, auf (Huang et al., 2014; Leipold et al., 2015; Okuda et al., 2016), wobei die Darmsymptomatik in diesen Fällen generell milder ausgeprägt ist. Bislang existieren kaum Daten zur Pathophysiologie von Nav1.9 in enterischen Neuronen, da die Neurone in dicken Muskelschichten eingebettet sind und somit der experimentelle Zugang limitiert ist. Da die Isolation von Darmneuronen kompliziert und bisher nur sehr ineffizient möglich ist, bleibt

unklar, wie sich pathologische Nav<sub>v</sub>1.9-Varianten auf die Funktion enterischer Neurone auswirken.

#### **1.2.4 Weitere Funktionen von Nav<sub>v</sub>1.9**

Neben der funktionellen Expression von Nav<sub>v</sub>1.9 in sensorischen DRG-Neuronen und Darmneuronen, wurde der Kanal auch in Trigeminalganglien (Scroggs, 2012), sowie in den sensorischen Haarzellen und Neuronen des auditorischen und vestibulären Systems identifiziert (Cai et al., 2015; Zu et al., 2021). Nav<sub>v</sub>1.9-KO-Mäuse zeigten bereits im Alter von zwei Monaten einen Verlust der Wahrnehmung von hohen Frequenzen (Zu et al., 2021). Weitere Untersuchungen an Nav<sub>v</sub>1.9-KO-Mäusen zeigten ein vermindertes Axonwachstum von Motoneuronen (Subramanian et al., 2012). Eine weitere Studie konnte Nav<sub>v</sub>1.9-Expression in den magnozellularären neurosekretorischen Zellen des *Nucleus supraopticus* im Hypothalamus nachweisen (Black et al., 2014). Weiterhin deuten molekularbiologische und immunhistochemische Daten darauf hin, dass der Kanal in Photorezeptoren und Müller-Gliazellen des visuellen Systems exprimiert wird (O'Brien et al., 2008). Andere Untersuchungen weisen auf die Beteiligung von Nav<sub>v</sub>1.9 an inflammatorischen Prozessen und damit assoziierter Fehlfunktion der Harnblase hin (Ritter et al., 2009). Kürzlich veröffentlichte Forschungsergebnisse zeigen eine Rolle von Nav<sub>v</sub>1.9 bei der Aktivierung von C-Fasern der Atemwege durch inflammatorische Mediatoren (J. S. Kim et al., 2023).

### **1.3 Zielstellung der Arbeit**

Funktionsstörungen von Nav<sub>v</sub>1.9-Kanälen können beim Menschen chronische periphere Schmerzattacken, aber auch *CIP* und schwerwiegende Beeinträchtigungen der Darmfunktion hervorrufen. Insbesondere der Verlust der IFM-vermittelten Inaktivierung der Kanäle scheint mit den Phänotypen Analgesie und Darmfunktionsstörungen einherzugehen.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik, Funktionsstörungen von Nav<sub>v</sub>1.9-Kanälen und deren Auswirkungen auf sensorische Neurone qualitativ und quantitativ zu erfassen und dadurch ein besseres Verständnis über die Mechanismen der mit Nav<sub>v</sub>1.9 in Verbindung stehenden Erkrankungen zu erlangen. Die in der vorliegenden Arbeit dargelegten Untersuchungen umfassen folgende drei Schwerpunkte:

### *1. Molekulare Determinanten der besonderen Schalteigenschaften von Nav1.9*

Mittels systematisch generierter Kanalchimären wird untersucht, welche molekularen Mechanismen den besonderen Schalteigenschaften der Nav1.9-Kanäle zugrunde liegen.

### *2. Analyse krankheitsassoziierter Nav1.9-Varianten*

Die im Rahmen dieser Arbeit neu identifizierten Schmerz-assoziierten Varianten Nav1.9-W684L und Nav1.9-Y66S, sowie die kürzlich beschriebene potenziell Analgesie-assoziierte Variante Nav1.9-C1355F werden hinsichtlich Schalteigenschaften und Nozizeptor-Erregbarkeit untersucht. Nav1.9-abhängige Schmerzerkrankungen gehen zudem regelhaft mit Darmfunktionsstörungen einher. Während nozizeptive Neurone experimentell sehr gut zugänglich sind, erweisen sich die Isolation und funktionelle Analyse enterischer Neurone als sehr schwierig. Es wurde deshalb ein Verfahren entwickelt, das die Isolation, Transfektion und systematische elektrophysiologische Analyse enterischer Neurone ermöglicht. Das Verfahren wird genutzt, um die mit Obstipation und Analgesie in Verbindung stehende Kanalvariante Nav1.9-L396P in enterische Neurone einzubringen und funktionell zu charakterisieren.

### *3. Analyse der ROS-Sensitivität Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle*

In diesem Arbeitsabschnitt werden die Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies auf das Schaltverhalten Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle, insbesondere auf die des Nav1.9-Kanals, qualitativ und quantitativ untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Arbeitsmaterialien und Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von hoher Reinheit und wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Herstellern Sigma-Aldrich, Carl Roth GmbH oder Thermo Fisher Scientific bezogen. Die für die elektrophysiologischen Experimente verwendeten Puffer wurden mit reinem Wasser aus einem Wasseraufbereitungssystem (Milli-Q Direct, Merck, Darmstadt, Deutschland) angesetzt. Eine detaillierte Auflistung der verwendeten Verbrauchsmaterialien, Werkzeuge, Kits und Geräte ist in Tabelle 2 zu finden.

**Tabelle 2: Verwendete Reagenzien, Verbrauchsmaterialien, Werkzeuge, Kits und Geräte.**

Artikel	Hersteller (Artikelnummer)
<b>Reagenzien</b>	
Accutase™	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (A6964)
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (B6768)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (A2153)
DMEM/F12-Medium (1:1)	Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland (P04-41154)
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (EN0521)
Fetales Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (F7524)
Isofluran	Baxter International, Deerfield, IL, USA (HDG9623)
Lucifer Yellow	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (L0144)
Liberase™ TH	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz (05401135001)
Liberase™ TM	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz (5401127001)
Papain	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland (107144)
Penicillin/Streptomycin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland (A2213)
Phosphatpuffer (PBS)	Biowest, Nuaille, Frankreich (L0615-500)
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland (P9155)
Restriktionsenzyme	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium	Gibco™ by Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (52400-017)
Silikon-Elastomer RTV 615	Momentive Performance Materials, Waterford, NY, USA
SOC-Medium	New England BioLabs GmbH, Ipswich, MA, USA (B9020S)
Tetrodotoxin (TTX)	Alomone Labs, Jerusalem, Israel (T-550)
Trypsin-Inhibitor (TI)	F. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz (10109886001)
<b>Verbrauchsmaterialien, Werkzeuge, Kits</b>	
24-Loch Zellkulturplatte	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (662160)
Deckgläser (rund, Ø 12 mm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA (0880)
<i>Escherichia coli</i> , Linie JM109	Promega GmbH, Walldorf, Deutschland (L2005)

<b>Artikel</b>	<b>Hersteller (Artikelnummer)</b>
Glaskapillaren (GB 150 TF – 8P)	Science Products GmbH, Hofheim am Taunus, Deutschland (GB 150 TF – 8P)
Mikropipetten (10/100/200/1000 µl) mit Einwegspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
NucleoBond Xtra Midi Plus Kit	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland (740412.50)
P3 Primary Cell 4D-Nucleofector™ X Kit S	Lonza Group, Basel, Schweiz (V4XP-3032)
Pinzette (gebogen)	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland (BD313R)
Pinzette (gerade, fein)	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland (BD331R)
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schere (Mikroschere)	Nopa instruments, Tuttlingen, Deutschland (AC 776/01)
Schere (chirurgisch)	Aesculap, Tuttlingen, Deutschland (BC110R)
Sterile Pasteurpipetten	Th. Geyer, Renningen, Deutschland (7691060)
Sterilfilter (Filtropur S)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland (83.1826.001)
Wattestäbchen	NOBAMED Paul Danz AG, Wetter (Ruhr), Deutschland (974116)
Zellkulturschale (35 mm Durchmesser)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (627161)
Zellkulturschale (90 mm Durchmesser)	Th. Geyer, Renningen, Deutschland (7696773)
Zentrifugenröhrchen (15 ml / 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland (188261/227270)
<b>Geräte</b>	
3D Rotor Platform (Nutator)	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland (55H3D1020-E)
4D-Nucleofector™ (Core Unit, X Unit)	Lonza Group, Basel, Schweiz
CO <sub>2</sub> Inkubator (5 %)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
EPC10 Verstärker	HEKA Elektronik GmbH, Reutlingen, Deutschland
GFP-Filterset	AHF Analysetechnik AG, Tübingen, Deutschland
Horizontalpuller P-1000	Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA
Inkubator (95 % O <sub>2</sub> –5 % CO <sub>2</sub> ),	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
LED-Lichtquelle pE-300 <sup>ultra</sup>	CoolLED, Andover, England
Mikroinkubator-Plattform (HCMIS)	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA
Mikromanipulator MP-225	Sutter Instrument Company, Novato, CA, USA
Mikroskop (Invers) Axio Vert.A1	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrozentrifuge	Neuation Technologies, Gandhinagar, Indien
Stereomikroskop mit Lichtquelle	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Temperatur-Kontrollsystem (PTC-10)	Npi Electronic GmbH, Tamm, Deutschland

## 2.2 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1 Expressionskonstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Nav-Kanäle heterolog exprimiert. Hierfür wurden pcDNA3-basierte Expressionsplasmide verwendet. In Tabelle 3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte aufgelistet.

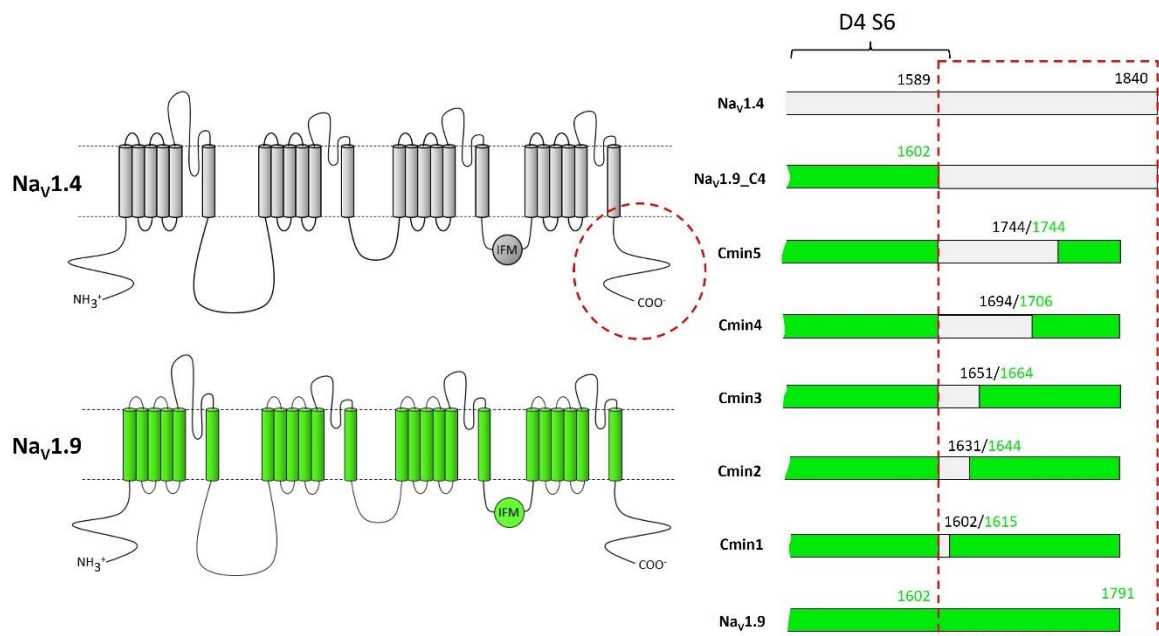
**Tabelle 3: Verwendete Nav-Expressionskonstrukte.** Die mit (\*) markierten Konstrukte wurden von mir mit der Unterstützung einer studentischen Hilfskraft hergestellt. AS: Aminosäure.

Kanalkonstrukt	Gen ( <i>Spezies</i> )	Erläuterung
rNav1.4 (Lab. ID: rNav1.4-pcDNA3)	<i>Scn4A</i> ( <i>rattus norvegicus</i> )	Quelle: AG-Leipold
rNav1.4-Y401S (Lab. ID: rNav1.4-Y401S)	<i>Scn4A</i> ( <i>rattus norvegicus</i> )	TTXr Variante; Quelle: AG-Leipold
hNav1.8 (Lab. ID: hNav1.8-pcDNA3-REP-GFP <sub>zco</sub> )	<i>SCN10A</i> ( <i>homo sapiens</i> )	Quelle: AG-Leipold
rNav1.8 (Lab. ID: rNav1.8-pcDNA3)	<i>Scn10A</i> ( <i>rattus norvegicus</i> )	Quelle: AG-Leipold
hNav1.9 (Lab. ID: hNav1.9-pcDNA3-GFP <sub>zco</sub> )	<i>SCN11A</i> ( <i>homo sapiens</i> )	Quelle: AG-Leipold
Nav1.9_C4 (Lab. ID: hNav1.9 9c4)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1791 durch die AS 1589-1840 aus rNav1.4 ausgetauscht.
Cmin5 (Lab. ID: hNav1.9 p4d9)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1744 durch die AS 1589-1744 aus rNav1.4 ausgetauscht.
Cmin1 (Lab. ID: hNav1.9 cmin1)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1615 durch die AS 1589-1602 aus rNav1.4 ausgetauscht.
Cmin3 (Lab. ID: hNav1.9 cmin2)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1664 durch die AS 1589-1651 aus rNav1.4 ausgetauscht.
Cmin2* (Lab. ID: hNav1.9 cmin3)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1644 durch die AS 1589-1631 aus rNav1.4 ausgetauscht.
Cmin4* (Lab. ID: hNav1.9 cmin4)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1602-1706 durch die AS 1589-1694 aus rNav1.4 ausgetauscht.
hNav1.9 N4 (Lab. ID: hNav1.9 N4)	<i>SCN11A/ Scn4A</i> ( <i>homo sapiens/ rattus norvegicus</i> )	In hNav1.9 wurden die AS 1-135 durch die AS 1-135 aus rNav1.4 ausgetauscht.
hNav1.9W684L (Lab. ID: hNav1.9 W684L)	<i>SCN11A</i> ( <i>homo sapiens</i> )	hNav1.9-Variante W684L (DII/S4).
hNav1.9 A1177S (Lab. ID: hNav1.9 A1177S)	<i>SCN11A</i> ( <i>homo sapiens</i> )	hNav1.9-Variante A1177S (DIII/S5).
hNav1.9 S1496A (Lab. ID: hNav1.9 S1496A)	<i>SCN11A</i> ( <i>homo sapiens</i> )	hNav1.9-Variante S1496A (DIV/S5).

hNav <sub>v</sub> 1.9 C1355F* (Lab. ID: hNav <sub>v</sub> 1.9 C1355F)	<i>SCN11A (homo sapiens)</i>	hNav <sub>v</sub> 1.9-Variante C1355F (Ende IFM-Linker). Vermutete Ursache für hereditäre sensorische und autonome Neuropathie (Typ IX) (Poojary et al., 2020).
hNav <sub>v</sub> 1.9 Y66S* (Lab. ID: hNav <sub>v</sub> 1.9 Y66S)	<i>SCN11A (homo sapiens)</i>	hNav <sub>v</sub> 1.9-Variante Y66S (N-Terminus).
hNav <sub>v</sub> 1.9 L396P (Lab. ID: hNav <sub>v</sub> 1.9 L396P)	<i>SCN11A (homo sapiens)</i>	hNav <sub>v</sub> 1.9-Variante L396P (DI/S6). <i>CIP</i> und gastrointestinale Symptomatik (King et al., 2017).

## 2.2.2 Herstellung von Kanalchimären

Es wurden chimäre Nav<sub>v</sub>1.9-Kanäle hergestellt, indem systematisch Teile aus rNav<sub>v</sub>1.4 in hNav<sub>v</sub>1.9 eingesetzt wurden. Zur Herstellung der Chimären lagen die Expressionskonstrukte rNav<sub>v</sub>1.4-pcDNA3 und hNav<sub>v</sub>1.9-pcDNA3-GFP<sub>zco</sub> vor. Das Nav<sub>v</sub>1.9-Plasmid beinhaltete neben der durch einen CMV-Promoter kontrollierten Kanal-kodierenden Sequenz, auch eine separate Reporter-Sequenz, kodierend für das *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP), welche durch den SV40 Promoter kontrolliert wird. Erfolgreich transfizierte Zellen konnten so anhand ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert werden.



**Abbildung 6: Aufbau chimärer Nav<sub>v</sub>1.9-Kanäle.** Topologiemodell der Nav<sub>v</sub>-Subtypen Nav<sub>v</sub>1.4 (links oben, grau) und Nav<sub>v</sub>1.9 (links unten, grün). Der rot umrandete Bereich markiert den C-Terminus der Kanäle. Eine Detailansicht des C-terminalen Abschnitts systematisch erzeugter Nav<sub>v</sub>1.9-basierter Chimären mit unterschiedlichen Nav<sub>v</sub>1.4-Anteilen (grau) ist rechts abgebildet. Ziffern markieren Aminosäurepositionen in den Sequenzen von Nav<sub>v</sub>1.4 (schwarz) bzw. Nav<sub>v</sub>1.9 (grün).

Die Kanalchimären aus hNav1.9 und rNav1.4 wurden mittels *Overlap-Extension-PCR* konstruiert. Für die Herstellung der Cmin2-Chimäre wurde die Primerkombination Nr. 116 und Nr. 118 (rNav1.4-Sequenz) sowie Nr. 117 und Nr. 31 (hNav1.9-Sequenz) verwendet und die entsprechenden Fragmente mittels PCR amplifiziert. Anschließend wurden die beiden Fragmente in einer dritten PCR zusammengefügt. Bei der Herstellung des Cmin4-Konstrukts diente die Primerkombination Nr. 116 mit Nr. 120 zur Amplifikation der Sequenz aus rNav1.4 und Nr. 119 mit Nr. 31 für die Sequenz aus hNav1.9. Die generierten Fragmente wurden im Anschluss mit einer dritten PCR zusammengefügt. Die Sequenzen der finalen Konstrukte wurden mittels Sanger-Sequenzierung (Macrogen Europe, Amsterdam, Niederlande) überprüft.

**Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Primer.** Kleinbuchstaben markieren Basentriplets, die zum AS-Austausch in Nav1.9 führen.

ID	Nukleotidsequenz	Labor-interner Name
31	AACTAGAAGGCACAGTCGAGGC	h19_C2_back
47	CAGGAAAAGTAAAGTCCAGTTAGC	h19_fwd_6
114	CACGGCCTCTGAACAAAAttcCAAGGTCTCGTGTTCGAC	h19_C1355F_fwd
115	GTCGAACACGAGACCTTGgaaTTTGTTCAGAGGCCGTG	h19_C1355F_back
116	CAACAGTATCATCTGCCTCTTCG	r4_fwd_1
117	TGGGAGAAGTTCGACCCAGAAGCAACACA	h9_Cmin3_fwd
118	TGTGTTGCTTCTGGGTGCAACTTCTCCCA	h9_Cmin3_back
119	ATGGAGGAGAAGTTCATGGAAGCCAATCCT	h9_Cmin4_fwd
120	AGGATTGGCTTCCATGAACTTCTCCTCCAT	h9_Cmin4_back
121	GCAAGGCTTGACCGACAATTGC	preCMVpcDNA3_fwd
122	GGAACAGGCACTGTTACCCATCC	postEcoRI_h9_back
123	GAAGTTGCCCAAGCTCagcGGCGACATTCTCGTGAGC	h9_Y66S_fwd
124	GCTCACGAGGAATGTCGCCgctGAGCTTGGGCAACTTC	h9_Y66S_back

### 2.2.3 Herstellung von Kanalmutanten

Für die Herstellung der Kanalmutante hNav1.9-C1355F wurde die Mutagenese als *Overlap-Extension-PCR* durchgeführt. Dazu wurde als Template hNav1.9-pcDNA3-GFPzeo verwendet und mit den Primern Nr. 47 und Nr. 115 in einer ersten PCR sowie den Primern Nr. 31 und Nr. 114 in einer zweiten PCR entsprechende Fragmente aus dem Konstrukt amplifiziert. Die PCR-Fragmente der beiden Reaktionen wurden dann in einer dritten PCR zusammengefügt. Anschließend wurde der Ansatz mit den Restriktionsenzymen XcmI und Bsu36I verdaut und die Sequenz in den Zielvektor hNav1.9-pcDNA3-GFPzeo ligiert. Das

Konstrukt hNav1.9-Y66S wurde ebenfalls mittels *Overlap-Extension-PCR* erstellt. Als Primer dienten Nr. 121 und Nr. 124 für das erste Fragment und die Primer Nr. 123 und Nr. 122 für das zweite Fragment. Nach dem Zusammenfügen beider Fragmente in einer dritten PCR, wurde das Produkt mit den Enzymen MluI und EcoRI verdaut und anschließend in den Zielvektor hNav1.9-pcDNA3-GFPzeo ligiert. Die DNA-Sequenz beider Kanalkonstrukte wurde mittels Sanger-Sequenzierung (Macrogen Europe, Amsterdam, Niederlande) überprüft.

#### **2.2.4 Vervielfältigung und Aufreinigung der Plasmid-DNA**

Kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes JM109 (L2005, Promega GmbH, Walldorf, Deutschland) wurden mit 10-100 ng Plasmid-DNA nach Vorgaben des Anbieters transformiert und über Nacht kultiviert. Die Aufreinigung der Plasmid-DNA erfolgte unter der Verwendung des NucleoBond Xtra Midi Plus Kits (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland).

### **2.3 3D-Modell von Nav1.9**

Zur Erstellung eines 3D-Modells der Nav1.9-Kanalstruktur wurde als Template die Röntgenkristallstruktur der  $\alpha$ -Untereinheit des eukaryotischen Nav-Kanals der amerikanischen Großschabe *Periplaneta americana* (NavPaS, PDB ID: 6A90 (Shen et al., 2017)) verwendet und mithilfe der Modellierungssoftware SWISS-MODEL (SIB Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Schweiz) und der Sequenz von hNav1.9 (NP\_001336182.1) ein Homologie-Modell erstellt. Grafische Darstellungen der Kanalstruktur wurden mit UCSF Chimera 1.14 (Pettersen et al., 2004) erstellt. Proteinabschnitte, für die keine Strukturinformation vorlag, wurden ausgeblendet.

### **2.4 Versuchstiere**

Für die Experimente wurden männliche und weibliche C57BL/6JRj Wildtyp-Mäuse (Janvier Labs CERJ, le Genest Saint Isle, Frankreich) sowie *Scn10a*<sup>-/-</sup>/*Scn11a*<sup>-/-</sup> Mäuse (generiert im Institut für Humangenetik, RWTH Aachen, Deutschland) im Alter zwischen 8-12 Wochen verwendet. In den *Scn10a*<sup>-/-</sup>/*Scn11a*<sup>-/-</sup> Mäusen (dKO) sind die Gene *Scn10a*<sup>-/-</sup>, kodierend für Nav1.8, und *Scn11a*<sup>-/-</sup>, kodierend für Nav1.9, ausgeschaltet. Aus diesem Grund exprimieren die Neurone dieser Tiere keine endogenen Nav1.8- und Nav1.9-Kanäle (siehe

Abschnitt 3.1). Die Tiere wurden in belüfteten Green Line Käfigen (Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg, Deutschland), sowie einem 12-h Licht-Dunkel-Rhythmus gehalten und mit autoklavierten pelletierten Standard-Futter *ad libitum* gefüttert. Entsprechend genehmigten Protokollen des Tierschutz-Komitees der Universität zu Lübeck (27\_2018-11-13), wurden die Tiere mittels Isofluran-Inhalation betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Die Tierpflege, sowie das experimentelle Vorgehen waren in Übereinstimmung mit den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes.

## **2.5 Präparation von murinen DRG-Neuronen**

Die DRGs wurden nach einem Standardprotokoll präpariert (Leipold et al., 2013; Loose et al., 2023). Dabei wurde dem Versuchstier zunächst die Wirbelsäule entnommen und diese sagittal in zwei Hälften geteilt. Für die Isolation von murinen DRG-Neuronen wurden je Versuchstier ca. 30 DRGs entnommen und von umliegendem Gewebe befreit, bevor sie in ein mit *Complete Saline Solution* (CSS) (Dib-Hajj et al., 2009) befülltes Reaktionsgefäß (1.5 ml) überführt wurden. Die CSS-Lösung enthielt 137 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM Sorbitol und 10 mM HEPES. Der pH-Wert wurde mit NaOH auf 7.2 eingestellt. Die Ganglien wurden bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert und anschließend für 25-30 min bei 37 °C verdaut. Der Reaktionsansatz enthielt 1.4 ml CSS-Lösung, versetzt mit 0.5 U Liberase Blendzyme TH, 30 U Papain und 0.5 mM EDTA. Anschließend wurden die teilverdauten DRGs erneut bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Ganglien in 1 ml Accutase, supplementiert mit 0.5 U Liberase Blendzyme TM und 0.5 mM EDTA, für 15-20 min bei 37 °C weiter verdaut. Der Verdauansatz wurde erneut bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert und der Überstand entfernt. Um die enzymatische Reaktion abzustoppen, wurde das Pellet in 0.5 ml DMEM/F12-Medium, das 1.5 mg/ml BSA und 1.5 mg/ml Trypsin Inhibitor enthielt, aufgenommen. Das Pellet wurde anschließend durch 10- bis 15-maliges kräftiges auf- und abpipettieren mit einer 1 ml Pipette trituriert und die Zellsuspension bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert. Für die Untersuchung von nicht transfizierten Neuronen, wurden die Zellen in 500 µl Standardmedium (89.5 % DMEM/F12 (1:1), 9.5 % fetales Kälberserum (FKS), und 1 % Penicillin/Streptomycin) aufgenommen und auf ca. 6-8 in 24-Loch Platten platzierten Poly-L-Lysin beschichteten Glass-Coverslips ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend für 24-48 h kultiviert (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>), bevor elektrophysiologische Untersuchungen durchgeführt wurden.

## 2.6 Präparation von murinen Darmneuronen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Methode zur Isolation enterischer Neurone aus dem Darmtrakt von Mäusen entwickelt mit dem Ziel, die Neurone für systematische elektrophysiologische Assays nutzbar zu machen (Kuehs et al., 2022). Zunächst wurde dem Tier der Darmtrakt entnommen und vorsichtig die Mesenterien entfernt. Kleine Stücke des Dünndarms (Duodenum, Jejunum, Ileum) wurden mithilfe einer feuerpolierten Pasteurpipette und CSS-Lösung gereinigt. Im Anschluss wurde der longitudinale Muskel zusammen mit dem *Plexus myentericus* mit einem CSS-befeuchteten Wattestäbchen abgelöst. Anschließend wurde das Gewebe für ca. 5 h enzymatisch verdaut. Der Verdauansatz enthielt 1.2 ml FKS-freies DMEM/F12-Medium, supplementiert mit 3 U Liberase TH, 10 U DNase I und 1 % Penicillin/Streptomycin. Nach dem Verdau wurde der neuronale Plexus sichtbar. Die verdauten Plexus-Segmente wurden unter mikroskopischer Kontrolle mithilfe einer Pipette gesammelt und ein zweites Mal für 30 min mit einer weiteren Enzymmischung, bestehend aus 1.15 ml Accutase, 0.5 U Liberase TM und 15 µl einer 50 mM EDTA-Lösung, verdaut. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert. Um den Verdauprozess abzustoppen, wurde das Pellet in 0.5 ml DMEM/F12-Medium aufgenommen, dem 1.5 mg/ml BSA und 1.5 mg/ml Trypsin Inhibitor zugesetzt wurde. Das Pellet wurde daraufhin durch 10-15-maliges Auf- und Abpipettieren mittels einer 1 ml Pipette trituriert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension bei 250 x g für 2 min abzentrifugiert. Analog zur Isolation von DRG-Neuronen (Abschnitt 2.5) konnten die Zellen daraufhin bis zu ihrer weiteren Verwendung kultiviert oder transfiziert werden (Abschnitt 2.7).

## 2.7 Zellkultur und Transfektion der isolierten Neurone

Um Nav-Kanal-Varianten in primären Neuronen zu exprimieren, wurden die Neurone mittels Elektroporation transfiziert (Kuehs et al., 2022; Leipold et al., 2015). Dazu wurde der 4D-Nucleofector der Firma Lonza (Basel, Schweiz) und das P3 Primary Cell 4D-Nucleofector Kit (V4XP-3032) nach Herstellerangaben verwendet. Die isolierten Neurone wurden mit 0.5 ml  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ - freiem PBS gewaschen und anschließend in einem Transfektionsansatz, bestehend aus 16.4 µl P3 Primary Cell Solution und 3.6 µl Supplement 1, sowie 1.5-2.5 µg Plasmid-DNA resuspendiert. Der Ansatz wurde in eine dem Nucleofector-Kit beigefügten Micro-Küvette überführt und mit dem Protokoll CA137 des

4D-Nukleofektors elektroporiert. Anschließend wurde dem Ansatz 150 µl vorgewärmtes RPMI-Medium zugefügt und die Küvette mit der Zellsuspension 10 min im Zellkultur-Inkubator inkubiert (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>). Die transfizierten Zellen wurden nun auf in 24-Loch Platten platzierten Poly-L-Lysin beschichteten Glass-Coverslips ausplattiert und bis zur weiteren Verwendung kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Standardmedium (89.5 % DMEM/F12 (1:1), 9.5 % fetales Kälberserum (FKS), und 1 % Penicillin/Streptomycin). Elektrophysiologische Messungen erfolgten 24-72 h nach Transfektion.

## **2.8 Elektrophysiologie**

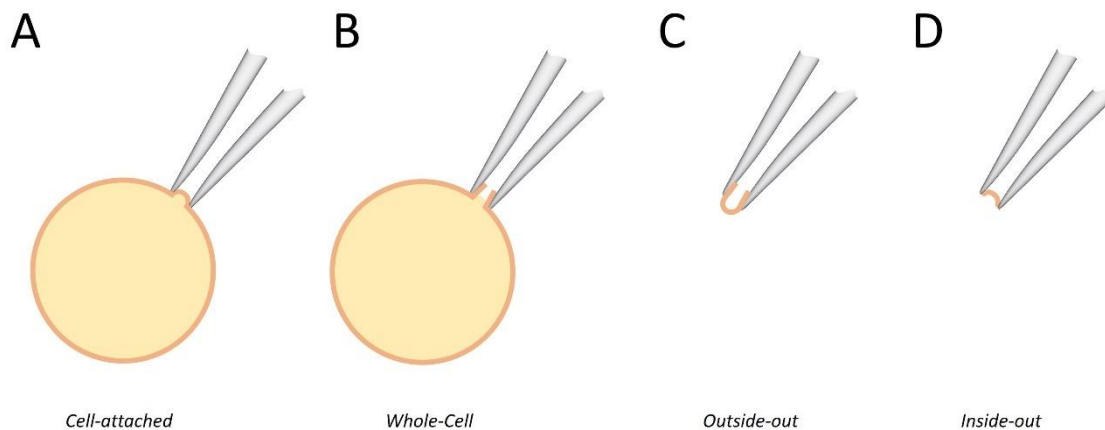
### **2.8.1 Patch-Clamp-Technik**

Erste Arbeiten, die das Vorhandensein von Bioelektrizität in Muskel- und Nervenzellen zeigen, gehen zurück auf den italienischen Arzt Luigi Galvani (1727-1798), den Neurophysiologen Carlo Matteucci (1811-1868) sowie den Begründer der wissenschaftlichen Elektrophysiologie Emil du Bois-Reymond (1818-1896) (Roth et al., 2023). Mit der Entwicklung der Spannungsklemme (*Voltage-Clamp*-Technik) Ende der 1930er Jahre durch Kenneth S. Cole (1900-1984) und Howard J. Curtis (1906-1972) konnten die in erregbaren Zellen ablaufenden elektrischen Phänomene detaillierter untersucht werden (Roth et al., 2023). Alan Hodgkin (1914-1998) und Andrew Huxley (1917-2012) verwendeten die *Voltage-Clamp*-Technik in den 50er Jahren zur Untersuchung der Erregbarkeit von neuronalen Zellmembranen, wofür ihnen 1963 zusammen mit Sir John Carew Eccles (1903-1997) der Nobelpreis für Physiologie/Medizin verliehen wurde (Nobel Prize Outreach AB, 2023a). In ihren Arbeiten untersuchten sie Aktionspotentiale und konnten zeigen, dass diese durch die Aktivität von Na<sup>+</sup>- und K<sup>+</sup>-selektiven Ionenkanälen vermittelt werden. Basierend auf diesen initialen Arbeiten wurde einige Jahre später die *Patch-Clamp*-Technik entwickelt, die es ermöglicht, die Schalteigenschaften einzelner Ionenkanäle systematisch zu untersuchen. Dazu wird die Öffnung einer Glaspipette (ca. 1 µM Durchmesser) auf die zu untersuchende Zelle aufgesetzt, sodass eine elektrisch dichte Verbindung mit der Zellmembran durch leichten Unterdruck in der Pipette entsteht (*Giga-Seal*). Die Aktivität der dort befindlichen Ionenkanäle kann nun untersucht werden. Für ihre Arbeiten zur Untersuchung „der Funktion einzelner zellulärer Ionenkanäle“ erhielten die deutschen Physiologen Erwin Neher (\*1944) und Bert Sakmann (\*1942) im Jahr 1991 den Nobelpreis für Physiologie/Medizin (Nobel Prize Outreach AB, 2023b).

Die *Patch-Clamp*-Technik stellt mittlerweile eine Standarduntersuchungsmethode in der Elektrophysiologie dar, denn sie ermöglicht eine detaillierte Betrachtung der biophysikalischen Eigenschaften einzelner Ionenkanäle aber auch der elektrischen Ströme über die gesamte Membran einer Zelle.

## 2.8.2 Experimenteller Ablauf

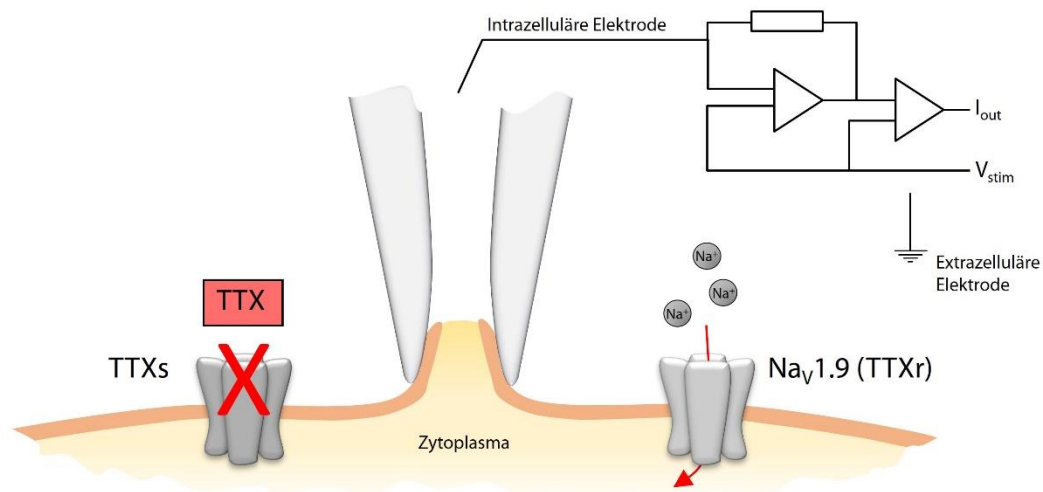
Je nach Experiment lässt sich die *Patch-Clamp*-Technik in unterschiedlichen Konfigurationen verwenden (siehe Abb. 7). Neben der *Cell-attached*-Konfiguration zur Untersuchung einzelner Ionenkanäle, ermöglicht die *Whole-Cell*-Konfiguration das Messen der Gesamtströme über die Membran. Die *Whole-Cell*-Konfiguration zeichnet sich zudem dadurch aus, dass eine direkte Verbindung zwischen Zellinneren und dem Inneren der Messpipette hergestellt wird, wobei die Pipettenlösung in das Zellinnere gelangt und somit ein definiertes intrazelluläres Milieu geschaffen wird. Mithilfe der *Inside-out*- oder *Outside-out*-Konfiguration lassen sich Membranstücke außerhalb des Zellsystems untersuchen.



**Abbildung 7: Unterschiedliche Konfigurationen der *Patch-Clamp*-Technik.** (A) *Cell-attached*-Konfiguration. (B) *Whole-Cell*-Konfiguration. (C) *Outside-out*-Konfiguration. (D) *Inside-out*-Konfiguration.

Zur funktionellen Untersuchung von  $\text{Na}_v$ -Kanälen wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die *Patch-Clamp*-Technik in der *Whole-Cell*-Konfiguration angewendet. Für die Experimente wurden Patchpipetten mit einem elektrischen Widerstand von 1.6-2.6 M $\Omega$  aus Borosilikat-Glas hergestellt, die zur Reduktion von kapazitiven Artefakten mit Silikon-Elastomer (RTV 615, Momentive Performance Materials, Waterford, NY, USA) beschichtet wurden. Zu Beginn eines Experiments wurden die auf Coverslips ausplattierten Zellen zunächst in eine mit Badlösung (siehe 2.8.3) befüllte Messkammer überführt. Eine Patchpipette wurde mit entsprechender Intrazellulärlösung (siehe 2.8.3) befüllt und am

Pipettenhalter befestigt. Mithilfe eines Mikromanipulators wurde die Patchpipette einer geeigneten Zelle angenähert und durch Unterdruck in der Pipette eine hochohmige Verbindung ( $> 1 \text{ G}\Omega$ , *Giga-Seal*) zwischen Glaspipette und Zellmembran aufgebaut. Durch sukzessives Erhöhen des Unterdrucks wurde die Zellmembran durchbrochen, sodass eine Verbindung zwischen dem Inneren der Patchpipette und dem Zytoplasma der Zelle hergestellt wurde (Abb. 7B). In dieser *Whole-Cell*-Konfiguration konnte nun entweder der durch die Zellmembran fließende Strom bei einer vorgegebenen Spannung (*Voltage-Clamp*) oder die Spannungsänderungen der Membran bei vorgegebenen Strominjektionen (*Current-Clamp*) gemessen werden. Hier wurden  $\text{Na}_v$ -Kanäle in primären Neuronen untersucht, die sowohl TTXr als auch TTXs Subtypen exprimieren. Um selektiv TTXr-Kanäle untersuchen zu können, wurde der Badlösung TTX ( $1 \mu\text{M}$ ) zugesetzt (Abb. 8).



**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Patch-Clamp-Technik in der Whole-Cell-Konfiguration.** Nach Etablierung einer dichten Verbindung zwischen Patchpipette und Zellmembran (*Seal*) wird die Zellmembran durchbrochen und damit ein Zugang zum Zellinneren geschaffen. In der Patchpipette befindet sich ein chlorierter Silberdraht, der mit einem Operationsverstärker verbunden ist. Dieser sorgt dafür, dass die gemessene Membranspannung der vom Experimentator vorgegebenen Soll-Spannung ( $V_{stim}$ ) angepasst wird. Das Ausgangssignal  $I_{out}$  wird am Computer visualisiert. Bei Verwendung von TTX in der Badlösung können TTXs  $\text{Na}_v$ -Kanäle inhibiert und TTXr-Kanäle, z.B.  $\text{Na}_v1.9$ , selektiv untersucht werden.

Die Messungen wurden mit einem EPC-10 Verstärker durchgeführt, der über Patch-Master Software (HEKA-Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) bedient wurde. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Messungen bei  $20 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$  durchgeführt. Die Daten wurden mittels Tiefpassfilter bei  $5 \text{ kHz}$  gefiltert und mit einem Sampling-Intervall von  $40 \mu\text{s}$  digitalisiert. Leck- und kapazitive Ströme wurden unter der Verwendung eines P/6 Protokolls mit 6 Leckpulsen aufgezeichnet und online mittels Patch-Master vom Gesamtstrom subtrahiert.

### 2.8.3 Elektrophysiologische Pufferlösungen

Die Badlösung für die *Voltage-Clamp*-Experimente enthielt (in mM) 130 NaCl, 2 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 20 TEA-Cl, 1 4-Aminopyridine, 0.1 CdCl<sub>2</sub> (pH 7.4. mit NaOH). An den angegebenen Stellen wurde der Badlösung 1 µM TTX (Alomone Labs, Jerusalem, Israel) hinzugefügt. Die entsprechende Lösung in der Patchpipette enthielt (in mM) 10 NaCl, 130 CsF, 10 EGTA und 10 HEPES (pH 7.4 mit CsOH).

Um Stromantworten endogener Na<sub>v</sub>-Kanäle in DRG-Neuronen zu messen, kamen Puffer mit reduzierter Na<sup>+</sup>-Konzentration zum Einsatz. Die Badlösung enthielt (in mM) 35 NaCl, 2 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 HEPES, 20 TEA-Cl, 1 4-Aminopyridine, 0.1 CdCl<sub>2</sub> und 1.5 Cholin-Cl. Die Pipettenlösung enthielt (in mM) 5 NaCl, 135 CsF, 10 EGTA und 10 HEPES.

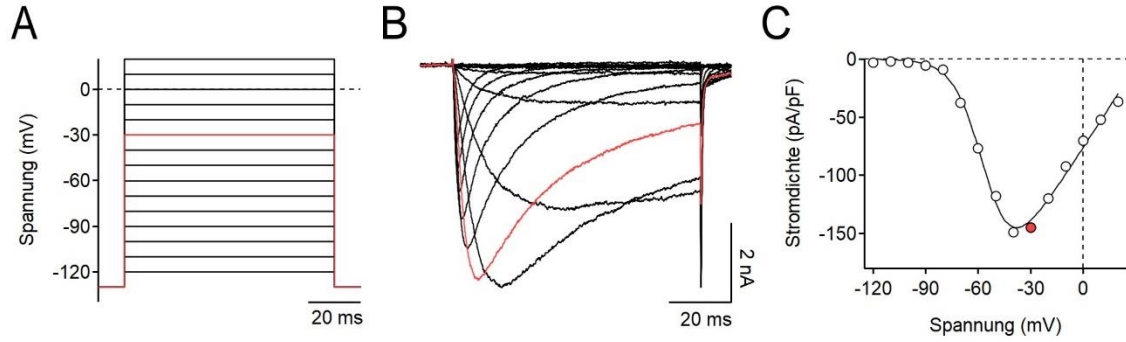
Für die *Current-Clamp*-Experimente beinhaltete die Badlösung (in mM) 120 NaCl, 3 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 30 HEPES, 15 Glukose (pH 7.4 mit NaOH), und die Pipettenlösung 125 KCl, 8 NaCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 0.4 Na<sub>2</sub>-GTP, 4 Mg-ATP, 10 EGTA und 10 HEPES (pH 7.3 mit KOH). Die Pipettenlösung für die *Current-Clamp*-Experimente wurde zusätzlich mit 0.4 mM Na<sub>2</sub>-GTP und 4 mM Mg-ATP supplementiert, zu 2 ml aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 2.8.4 Stimulationsprotokolle

*Kanalaktivierung*: Zur Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung wurden Strom-Spannungs-Kennlinien aufgezeichnet. Hierfür wurden 80 ms dauernde Testpulse generiert, die - wenn nicht anders angegeben - ausgehend von einem Haltepotential von -130 mV bis auf 20 mV in 10 mV-Schritten appliziert wurden (Abb. 9A). Das Pulsintervall betrug 10 s. Die Peakstromdichten wurden gegen die Testpulsspannung aufgetragen und mit folgendem Formalismus beschrieben:

$$\frac{I(V)}{C_m} = G_{max} \cdot (V - E_{rev}) \cdot \frac{1}{\left(1 + e^{-\frac{V-V_m}{k_m}}\right)} \quad (2.1)$$

Dabei entspricht  $C_m$  der elektrischen Membrankapazität,  $G_{max}$  der maximalen Membranleitfähigkeit,  $E_{rev}$  dem Na<sup>+</sup>-Umkehrpotential,  $V_m$  der halb-maximalen Aktivierungsspannung pro Aktivierungstor und  $k_m$  dem zugehörigen Steigungsfaktor.



**Abbildung 9: Untersuchung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung von Nav-Kanälen.** (A) Pulsprotokoll. Ausgehend von einem Haltepotential von -130 mV wurde die Zellmembran in 10 mV-Schritten bis auf 20 mV depolarisiert. Der Testpuls auf -30 mV ist rot hervorgehoben (B) Repräsentative Stromantworten von Nav1.9-Kanälen auf depolarisierende Spannungspulse wie in A gezeigt. (C) Peakstromdichte der in B gezeigten Stromspuren als Funktion der Testpulsspannung. Daten bei einer Testpulsspannung von -30 mV wurden in B und C rot hervorgehoben. Die Aufnahme erfolgte in einem kleinen dKO-DRG-Neuron, transfiziert mit Nav1.9-kodierender DNA, in Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung.

*Kinetik der Kanalaktivierung und -inaktivierung:* Um Spannungsabhängigkeiten der Kanalaktivierungs- und Inaktivierungskinetik zu analysieren, wurden Stromantworten, wie in Abb. 9B mit nachfolgendem Formalismus angefitet:

$$I(t) = I_o \cdot m^1 \cdot h^1 \quad (2.2)$$

Für die Kanalaktivierung gilt:

$$m(t) = 1 - e^{-\frac{t}{\tau_m}} \quad (2.3)$$

Für die Kanalinaktivierung gilt:

$$h(t) = h_{\infty} + (1 - h_{\infty}) \cdot \left( e^{-\frac{t}{\tau_{inact}}} \right) \quad (2.4)$$

Dabei entspricht  $I_o$  der Stromamplitude,  $\tau_m$  der Zeitkonstante der Aktivierung,  $h_{\infty}$  dem Anteil an nicht inaktivierenden Kanälen und  $\tau_{inact}$  der Inaktivierungszeitkonstante. Die Stromantworten von Nav1.8 wurden unter der Annahme von drei Aktivierungstoren ( $m^3$ ) ausgewertet.

*Ganzzelleitfähigkeit:* Die Leitfähigkeit  $G$  wurde aus den Peakströmen (Abb. 9) und dem Umkehrpotential entsprechend der folgenden Formel berechnet und auf die maximale Leitfähigkeit normiert:

$$G(V) = \frac{I(V)}{V - E_{rev}} \quad (2.5)$$

Dabei entspricht  $I(V)$  der Peakstromamplitude,  $V$  der Testpulsspannung und  $E_{rev}$  dem Umkehrpotential. Es erfolgte eine Normalisierung auf  $G_{max}$  und das Anfitzen der Datenpunkte mit einer Boltzmann-Funktion:

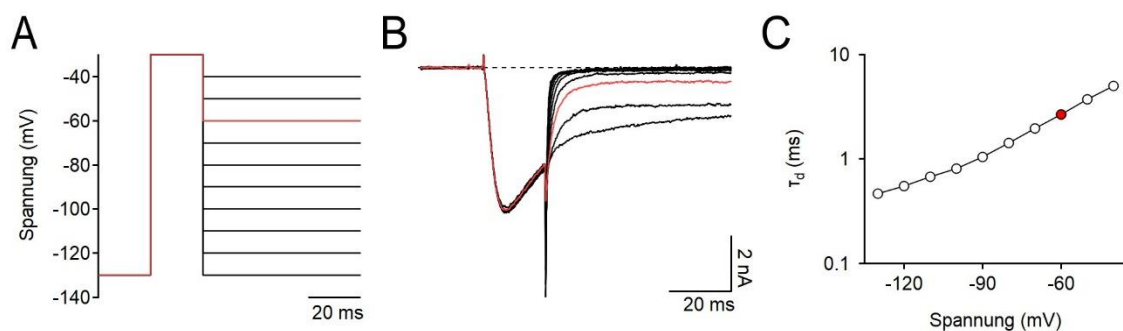
$$\frac{G(V)}{G_{max}} = \frac{G_{amp}}{\left(1 + e^{-\frac{V_m - V}{k_m}}\right)} \quad (2.6)$$

Dabei entspricht  $G_{amp}$  der maximalen relativen Membranleitfähigkeit,  $V_m$  der halbmaximalen Aktivierungsspannung pro Aktivierungstor und  $k_m$  dem zugehörigen Steigungsfaktor.

*Kanaldeaktivierung:* Die Kanaldeaktivierung wurde mithilfe von Tailstrom-Protokollen untersucht (Abb. 10). Dazu wurden die Kanäle ausgehend von einem Haltepotential von -130 mV mit einem 20 ms andauernden Testpuls auf -30 mV aktiviert. Durch hyperpolarisierende Pulse, die von -130 mV in 10 mV-Schritten auf -40 mV erhöht wurden, erfolgte die Einleitung der Kanaldeaktivierung. Das Pulsintervall betrug 10 s. Um die Deaktivierungszeitkonstante  $\tau_d$  zu ermitteln, wurde die Deaktivierungsphase mit einer einfachexponentiellen Funktion beschrieben:

$$I(t) = (I_0 - I_\infty) \cdot \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_d}}\right) \quad (2.7)$$

Dabei entspricht  $I_0$  der maximalen Tailstromamplitude,  $I_\infty$  dem Strom im Gleichgewicht und  $\tau_d$  der Deaktivierungszeitkonstante.



**Abbildung 10: Untersuchung des Deaktivierungsverhaltens von Nav-Kanälen.** (A) Pulsprotokoll. (B) Stromantworten auf Stimulationen, wie in A gezeigt. Die Stromantwort bei einer Deaktivierungsspannung von -60 mV ist rot hervorgehoben. (C) Deaktivierungszeitkonstante  $\tau_d$  in Abhängigkeit von der Membranspannung. Durch Anfitzen der Deaktivierungsphase der in B gezeigten Stromspuren mit Gleichung 2.7 wurde die Deaktivierungszeitkonstante ermittelt. Die Datenpunkte wurden durch Linien miteinander verbunden und der Datenpunkt bei einer Deaktivierungsspannung von -60 mV rot hervorgehoben. Die Aufnahme erfolgte in einem kleinen dKO-DRG-Neuron, transfiziert mit Nav1.9-kodierender DNA. Die Messung erfolgte in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung.

*Spannungsabhängigkeit von Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik:* Die Spannungsabhängigkeit der Zeitkonstanten für Aktivierung und Deaktivierung wurden unter der Annahme eines einstufigen Aktivierungs- Deaktivierungsprozesses analysiert.

$$\tau(V) = \tau_0 + \frac{1}{a_0 + \left( e^{\frac{(V-V_m) \cdot q \cdot \delta}{kT}} + e^{\frac{(V-V_m) \cdot q \cdot (1-\delta)}{kT}} \right)} \quad (2.8)$$

Hier entspricht  $\tau_0$  der spannungsunabhängigen limitierenden Geschwindigkeit der Deaktivierung,  $a_0$  der Rate bei der Gleichgewichtsspannung  $V_m$ ,  $kT$  der thermischen Energie,  $q$  charakterisiert die an der Aktivierung und Deaktivierung beteiligten Ladungsequivalente und  $\delta$  ist der zugehörige Symmetriefaktor, der den mit der Kanalaktivierung assoziierten Anteil der Schaltladungen beschreibt.

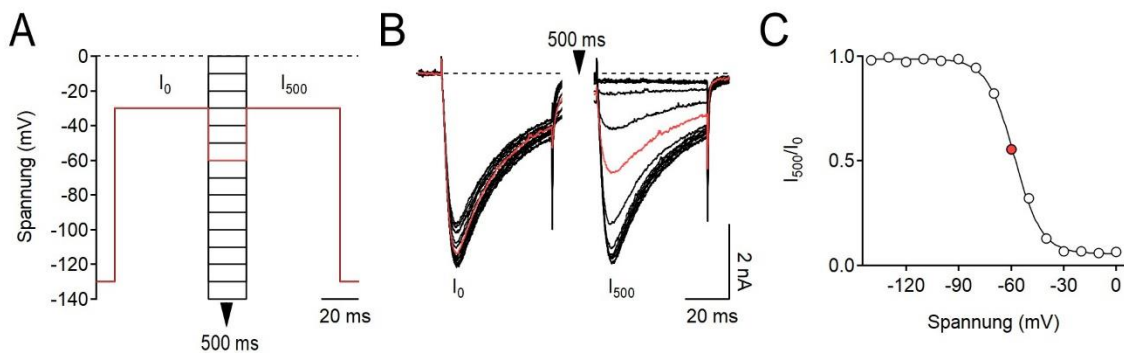
*Gleichgewichtsinaktivierung:* Zur Ermittlung der Gleichgewichtsinaktivierung von Nav1.9, nach Überexpression in dKO-DRG-Neuronen, wurden die Kanäle zunächst mit einem ersten 50 ms Testpuls ( $I_0$ ) auf -30 mV aktiviert. Im Anschluss erfolgte eine Konditionierung für 500 ms bei Membranspannungen, die von -140 mV bis 0 mV in 10 mV-Schritten anstiegen. Peakströme nicht inaktivierter Kanäle wurden anschließend mit einem zweiten Testpuls ( $I_{500}$ ) auf -30 mV ermittelt. Das Pulsintervall betrug 10 s. Das Verhältnis der Stromamplituden  $I_{500}/I_0$  wurde als Funktion der Konditionierungsspannung ausgewertet. Die Daten wurden mit einer Boltzmann-Funktion beschrieben.

$$\frac{I_{500}(V)}{I_0} = h_{max} - (h_{max} - h_{min}) \cdot \left( \frac{1}{1 + e^{\frac{V-V_h}{k_h}}} \right) \quad (2.9)$$

Dabei entspricht  $h_{max}$  der maximalen und  $h_{min}$  der minimalen Kanalverfügbarkeit,  $V_h$  der halb-maximalen Inaktivierungsspannung und  $k_h$  der zugehörigen Spannungsabhängigkeit. Die Überexpression von Nav1.9-L396P-Kanälen in enterischen Wildtyp-Neuronen führte zu einem biphasischen Verlauf der spannungsabhängigen Gleichgewichtsinaktivierung mit zwei klar erkennbaren Komponenten (Abschnitt 3.3.4). Diese Daten wurden deshalb als Summe zweier Boltzmann-Funktionen beschrieben, wobei die erste Komponente die spannungsabhängige Inaktivierung schnell inaktivierender endogener TTXr-Kanäle der Neurone beschreibt und die zweite Komponente die Inaktivierungseigenschaften der überexprimierten inaktivierungsdefizienten Nav1.9-L396P-Kanäle:

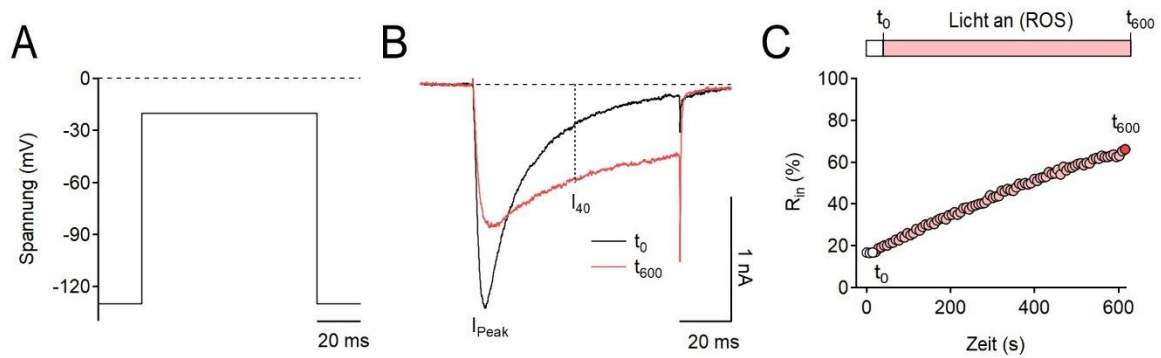
$$\frac{I_{500}(V)}{I_0} = h_{max} - (h_{max} - h_{min}) \cdot \left( \frac{1 - P}{1 + e^{-\frac{V - V_{hf}}{k_{hf}}}} + \frac{P}{1 + e^{-\frac{V - V_{hs}}{k_{hs}}}} \right) \quad (2.10)$$

Analog zu Gleichung 2.9 entsprechen  $h_{min}$  und  $h_{max}$  der minimalen bzw. maximalen Kanalverfügbarkeit.  $V_{hf}$  charakterisiert die Spannungen bei halbmaximaler Inaktivierung der schnell inaktivierenden, endogenen TTXr-Kanäle und  $V_{hs}$  die Spannungen bei halbmaximaler Inaktivierung der inaktivierungsdefizienten  $Na_v1.9$ -L396P-Kanäle;  $k_{hf}$  und  $k_{hs}$  sind die zugehörigen Steigungsfaktoren. In Experimenten, in denen entweder nur schnell inaktivierende oder nur inaktivierungsdefiziente Stromkomponenten vorhanden waren, wurde  $P$  auf 0 bzw. 1 gesetzt.



**Abbildung 11: Untersuchung der Gleichgewichtsinaktivierung von Nav-Kanälen.** (A) Pulsprotokoll. (B) Repräsentative Stromantworten auf das Stimulationsprotokoll, gezeigt in A. Der Testpuls bei einer Konditionierungsspannung von -60 mV ist rot hervorgehoben. (C) Verhältnis der Stromamplituden nach und vor Konditionierung ( $I_{500}/I_0$ ) als Funktion der Konditionierungsspannung. Die Datenbasis sind die Stromantworten in B. Die Kurve beschreibt die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung (1 = keine Inaktivierung, 0 = vollständige Inaktivierung). Rot hervorgehoben ist der Datenpunkt bei einer Konditionierungsspannung von -60 mV. Die Aufnahme erfolgte in einem kleinen dKO-DRG-Neuron, transfiziert mit  $Na_v1.9$ -kodierender DNA. Die Messung erfolgte in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung.

**ROS-Applikation:** Zur Untersuchung der Oxidationssensitivität von  $Na_v$ -Kanälen in DRG-Neuronen wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer Yellow* (LY) als schaltbare ROS-Quelle genutzt, indem dieser über die Patchpipette in die Zellen eingebracht wurde. Bei der Anregung mit blauem Licht (452-487 nm) werden Superoxidradikale freigesetzt, die die Makromoleküle in der Zelle, wie z.B.  $Na_v$ -Kanäle, oxidieren (Takeuchi & Yoshii, 2008).



**Abbildung 12: Untersuchung der ROS-Sensitivität von Nav-Kanälen mittels LY als schaltbare ROS-Quelle.** (A) Pulsprotokoll. (B) Stromantworten von Nav<sub>v</sub>1.9 bei einer Depolarisation auf -20 mV vor ROS-Exposition ( $t_0$ , schwarze Stromspur) und nach 10 min ROS-Exposition ( $t_{600}$ , rote Stromspur).  $I_{40}$  markiert den verbleibenden Strom 40 ms nach Testpulsbeginn (C) Inaktivierungsindex  $R_{in}$  ( $I_{40}/I_{Peak}$ ) als Funktion der Zeit. Als Kontrolle wurden Messungen unter gleichen Bedingungen, aber ohne Lichtexposition, durchgeführt. Die Aufnahme erfolgte in einem kleinen dKO-DRG-Neuron, transfiziert mit Nav<sub>v</sub>1.9-kodierender DNA, in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung.

Es wurden repetitive Testpulse auf -20 mV für mindestens 10 min appliziert. Das Interpulsintervall betrug 7 s für Nav<sub>v</sub>1.9 bzw. 5 s für Nav<sub>v</sub>1.8. Nach einer kurzen Kontrollphase (Licht aus) wurden die Zellen für 10 min bestrahlt (Licht an), und die Auswirkungen von ROS auf die Kanalfunktion aufgezeichnet. Für alle Versuche kam ein 10x-Luftobjektiv ( $A_N$ : 0.25) zum Einsatz. Die Stromamplitude und der Inaktivierungsindex  $R_{in}$  ( $I_{40}/I_{Peak}$ : Verhältnis des nicht inaktivierenden Stroms, 40 ms nach Start der Depolarisation, zum Peakstrom) wurden ausgewertet und als Funktion der Zeit aufgetragen (Abb. 12C).  $\Delta R_{in}$  diente dazu, die Auswirkungen von ROS auf die Inaktivierungskinetik zu quantifizieren.

### 2.8.5 Untersuchung von Aktionspotentialen in *Current-Clamp-Experimenten*

Die Messung von Aktionspotentialen in DRG-Neuronen erfolgte in der *Whole-Cell-Current-Clamp*-Konfiguration. Das RMP der transfizierten Neurone wurde direkt nach dem Erreichen der *Whole-Cell*-Konfiguration gemessen. Einzelaktionspotentiale wurden ausgelöst, indem für 10 ms Strominjektionen von 100 bzw. 200 pA appliziert wurden. Das Sampling-Interval betrug 50  $\mu$ s. Parameter zur Charakterisierung der Form von Einzelaktionspotentialen, wie die Breite am Schwellenwert ( $Breite_{th}$ ) und die Peakspannung ( $AP_{Peak}$ ), wurden mit IgorPro und Labor-internen Skripten ausgewertet. Zur Untersuchung des repetitiven Feuerverhaltens der DRG-Neurone wurden Strompulse von 0 bis 180 pA in 20 pA-Schritten für jeweils 2 s appliziert und die generierten APs aufgezeichnet. Die Detektionsschwelle für APs betrug 0 mV.

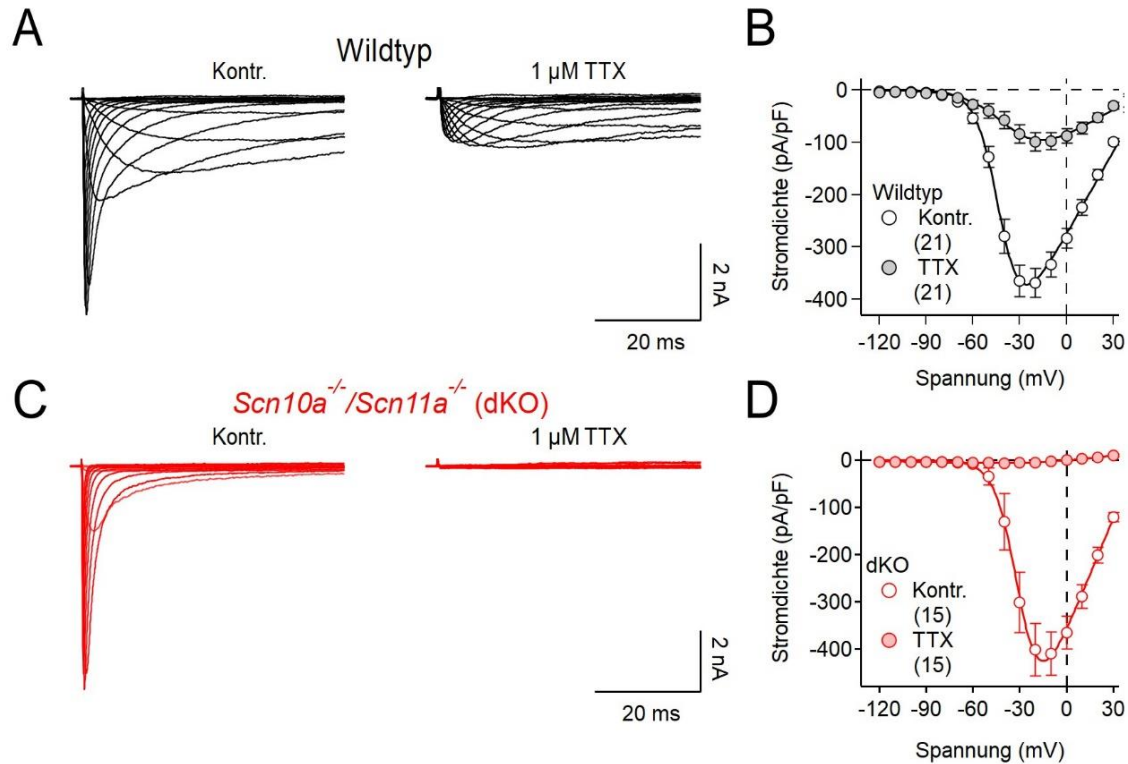
### 2.8.6 Datenanalyse

*Patch-Clamp*-Daten wurden mit der Software PatchMaster (HEKA-Elektronik, Lambrecht/Pfalz, Deutschland) aufgezeichnet, die Daten mittels FitMaster (HEKA-Elektronik, Lambrecht, Deutschland) und IgorPro (WaveMetrics, Lake Oswego, OR, USA) ausgewertet und grafisch dargestellt. Eine Korrektur für das *Liquid-junction*-Potential wurde nicht durchgeführt. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. (*standard error of the mean*, Standardfehler des Mittelwertes) abgebildet und die Anzahl der durchgeführten unabhängigen Experimente (n) angegeben. Für statistische Vergleiche der Mittelwerte zweier Datenpopulationen diente der *Student's t*-Test mit folgenden Signifikanzschwellen: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 dKO-DRG-Neurone als Expressionssystem für humane Nav1.9-Kanäle

Untersuchungen des Nav1.9-Kanals sind schwierig und seine heterologe Expression in nicht neuronalen Zellen nur mit großem Aufwand möglich. Die heterologe Expression des Kanals resultiert zudem in nur geringen Stromdichten, was detaillierte Analysen erschwert und oftmals auch unmöglich macht (Goral et al., 2015; Vanoye et al., 2013). Die Expression in primären Neuronen ist erfolgsversprechender, insbesondere in primären DRG-Neuronen, die die natürliche Umgebung von Nav1.9 darstellen und die für dessen Funktion notwendigen Faktoren bereitstellen. Jedoch besteht hier die Limitierung, dass die Aktivität heterolog exprimierter Nav1.9-Kanäle von endogenen TTXr Nav1.8- und Nav1.9-Strömen überlagert wird. Eine pharmakologische Differenzierung zwischen Nav1.8 und Nav1.9 ist aufgrund fehlender spezifischer Inhibitoren nicht möglich, weshalb auch Nav1.9-KO-DRG-Neurone (Amaya et al., 2006) kein ideales System zur funktionellen Untersuchung überexprimierter Nav1.9-Kanäle darstellen. Um die Problematik der endogenen Nav1.8- und Nav1.9-Kanäle zu überwinden, wurden DRG-Neurone aus Nav1.8- und Nav1.9-defizienten Mäusen (AG: Prof. Dr. Ingo Kurth, Institut für Humangenetik, RWTH Aachen) verwendet. Die Neurone dieser Tiere exprimieren weder Nav1.8- noch Nav1.9-Kanäle, da die Kanal-kodierenden Gene *Scn10a* und *Scn11a* mittels CRISPR/Cas-Verfahren ausgeschaltet wurden (Alves-Simões et al., 2024). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden die Neurone dieser Tiere als dKO-DRG-Neurone bezeichnet. Abb. 13 zeigt exemplarische Nav-assoziierte Stromantworten von Wildtyp-DRG-Neuronen und dKO-DRG-Neuronen aus *Scn10a<sup>-/-</sup>/Scn11a<sup>-/-</sup>*-Mäusen.

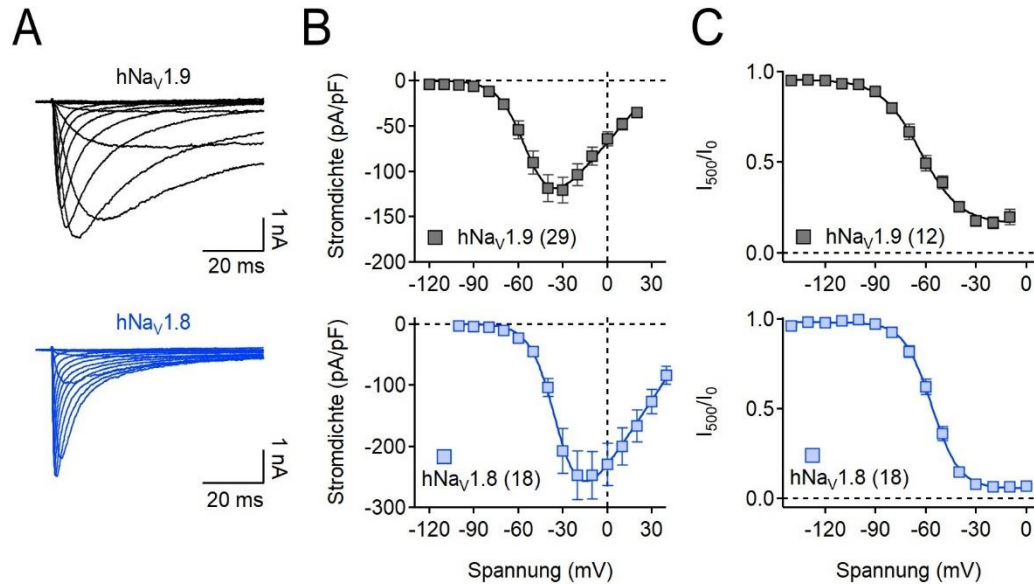


**Abbildung 13: Endogene Natriumströme in murinen Wildtyp- und *Scn10a*<sup>-/-</sup>/*Scn11a*<sup>-/-</sup>-DRG-Neuronen.** (A) Repräsentative Stromspuren, aufgenommen in Wildtyp-DRG-Neuronen als Antwort auf Spannungspulse von -130 mV bis 30 mV (10 mV Schritte) vor (links, Kontrolle) und nach (rechts, 1  $\mu$ M TTX) Applikation von 1  $\mu$ M TTX. (B) Gemittelte Peakstromdichten aus Experimenten wie in A gezeigt, vor und nach TTX-Applikation als Funktion der Testpulsspannung. Die durchgehenden Kurven sind Datenfits nach Gleichung 2.1. (C, D) Datensatz wie in A und B, gemessen in DRG-Neuronen aus *Scn10a*<sup>-/-</sup>/*Scn11a*<sup>-/-</sup>-Mäusen (dKO). Im Gegensatz zu Wildtyp-Neuronen weisen dKO-DRG-Neurone keine detektierbaren TTXr Na<sup>+</sup>-Ströme auf. Die Daten in B und D sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben. Die Wildtyp-Daten in A und B wurden von Frau Laura Teege (AG: Prof. Leipold) erhoben.

Zunächst wurden *Voltage-Clamp*-Experimente durchgeführt, um endogene Na<sub>v</sub>-abhängige Ströme aufzuzeichnen. Um zwischen TTXs und TTXr Na<sup>+</sup>-Strömen zu differenzieren, wurden die Messungen zunächst in Abwesenheit von TTX durchgeführt und anschließend, während fokaler Applikation von 1  $\mu$ M TTX, wiederholt. Die Wildtypneurone zeigten unter Kontrollbedingungen zwei Stromkomponenten. Niedrige Spannungen evozierten langsam aktivierende und inaktivierende Ströme, wie sie für Nav1.8 und Nav1.9 typisch sind. Bei höheren Spannungen wurden zusätzlich schnell aktivierende und inaktivierende Ströme generiert (Abb. 13A, links). Die maximale Peakstromdichte betrug  $-368 \pm 27.4$  pA/pF und wurde bei -20 mV erreicht. Die Na<sub>v</sub>-vermittelten Na<sup>+</sup>-Ströme aktivierten mit einer halbmaximalen Spannung ( $V_m$ ) von  $-40.5 \pm 1.2$  mV und einer Spannungsabhängigkeit ( $k_m$ ) von  $7.3 \pm 0.7$  mV. Durch die Applikation von 1  $\mu$ M TTX wurde selektiv die schnell aktivierende und inaktivierende Stromkomponente inhibiert und die maximale Peakstromdichte auf  $-98.4 \pm 17$  pA/pF reduziert. Damit lag die Reduktion des Na<sup>+</sup>-Stroms

durch TTX bei  $74.0 \pm 0.1$  %. Die verbleibende langsame Stromkomponente, die durch Nav1.8 und Nav1.9 vermittelt wird, zeigte eine halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) von  $-30.0 \pm 2.8$  mV und eine Spannungsabhängigkeit ( $k_m$ ) von  $12.6 \pm 1.4$  mV. Im Gegensatz dazu generierten die dKO-DRG-Neurone unter Kontrollbedingungen (kein TTX) ausschließlich schnell aktivierende und schnell inaktivierende Stromantworten im gesamten untersuchten Spannungsbereich (Abb. 13C, links). Die maximale Peakstromdichte betrug  $-409.8 \pm 42.8$  pA/pF bei -10 mV und war damit vergleichbar mit der Stromdichte in Wildtypneuronen. Die Nav<sub>v</sub>-vermittelten Na<sup>+</sup>-Ströme in dKO-DRG-Neuronen aktivierten mit einer halbmaximalen Spannung von  $-28.1 \pm 1.5$  mV und einer Spannungsabhängigkeit  $k_m$  von  $6.2 \pm 0.3$  mV. Kompatibel mit der Abwesenheit funktioneller Nav1.8- und Nav1.9-Kanäle, konnten die Stromantworten der dKO-DRG-Neurone durch Applikation von 1  $\mu$ M TTX quantitativ inhibiert werden.

In einer weiteren Versuchsreihe sollte die Eignung der dKO-DRG-Neurone zur Expression und funktionellen Analyse humaner Nav-Kanäle überprüft werden. Dazu wurden dKO-DRG-Neurone mit Nav1.9- oder Nav1.8-kodierenden DNA-Plasmiden transfiziert und die funktionellen Eigenschaften der Kanäle untersucht. Um die Stromantworten der überexprimierten Kanäle von den endogenen TTXs-Na<sup>+</sup>-Strömen zu isolieren, wurden die *Voltage-Clamp*-Experimente unter dem Einfluss von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung durchgeführt.



**Abbildung 14: dKO-DRG-Neurone aus *Scn10a<sup>-/-</sup>/Scn11a<sup>-/-</sup>*-Mäusen sind ein effizientes Expressionssystem für humane Nav1.8- und Nav1.9-Kanäle.** (A) Repräsentative Stromspuren von Nav1.9 und Nav1.8 nach Überexpression in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte) für Nav1.9 bzw. -110 mV bis 40 mV (10 mV Schritte) für Nav1.8. Die Messungen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX. (B) Gemittelte Peakstromdichten aus Experimenten wie in A, als Funktion der Testpulsspannung zur Bestimmung der spannungsabhängigen Kanalaktivierung. (C) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung von Nav1.9 und Nav1.8. Die Datenpunkte in B und C sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben.

Wie in Abb. 14 zu erkennen ist, ließen sich die humanen Kanäle Nav1.8 und Nav1.9 erfolgreich funktionell in dKO-DRG-Neuronen exprimieren. Die Stromantworten zeigten die kanal-typischen Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften. Nav1.9-Kanäle öffneten bereits bei niedrigen Spannungen ab ca. -80 mV, wohingegen Nav1.8-Kanäle erst bei höheren Spannungen aktiviert wurden (Abb. 14B). Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) von Nav1.9 lag bei  $-55.0 \pm 2.2$  mV und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung  $k_m$  betrug  $8.0 \pm 0.4$  mV. Die halbmaximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) von Nav1.9 lag bei  $-63.2 \pm 2.8$  mV und die zugehörige Spannungsabhängigkeit ( $k_h$ ) betrug  $9.9 \pm 0.5$  mV. Damit lagen die Parameter im Einklang mit den Beobachtungen anderer Studien zu Nav1.9 (Leipold et al., 2013; X. Zhou et al., 2017). Auch Nav1.8 ließ sich erfolgreich in dKO-DRG-Neuronen rekonstituieren. Nav1.8-Kanäle aktivierten mit einem  $V_m$  von  $-46.8 \pm 1.3$  mV und einer Spannungsabhängigkeit ( $k_m$ ) von  $14.4 \pm 1.7$  mV.  $V_h$  betrug  $-57.5 \pm 1.5$  mV und  $k_h$   $7.6 \pm 0.4$  mV. Eine detaillierte Auflistung der Parameter zur Charakterisierung der Schalteigenschaften der Kanäle ist im Anhang (Tabelle 5 und 6) zu finden.

Zusammenfassend zeigen die Daten, dass humane TTXr Nav-Subtypen effizient in dKO-DRG-Neuronen exprimiert und funktionell untersucht werden können. Mit diesen

Neuronen steht somit ein effizientes Expressionssystem zur Verfügung, das systematische funktionelle Analysen der üblicherweise nur schwer handhabbaren humanen Nav1.9-Kanäle ermöglicht.

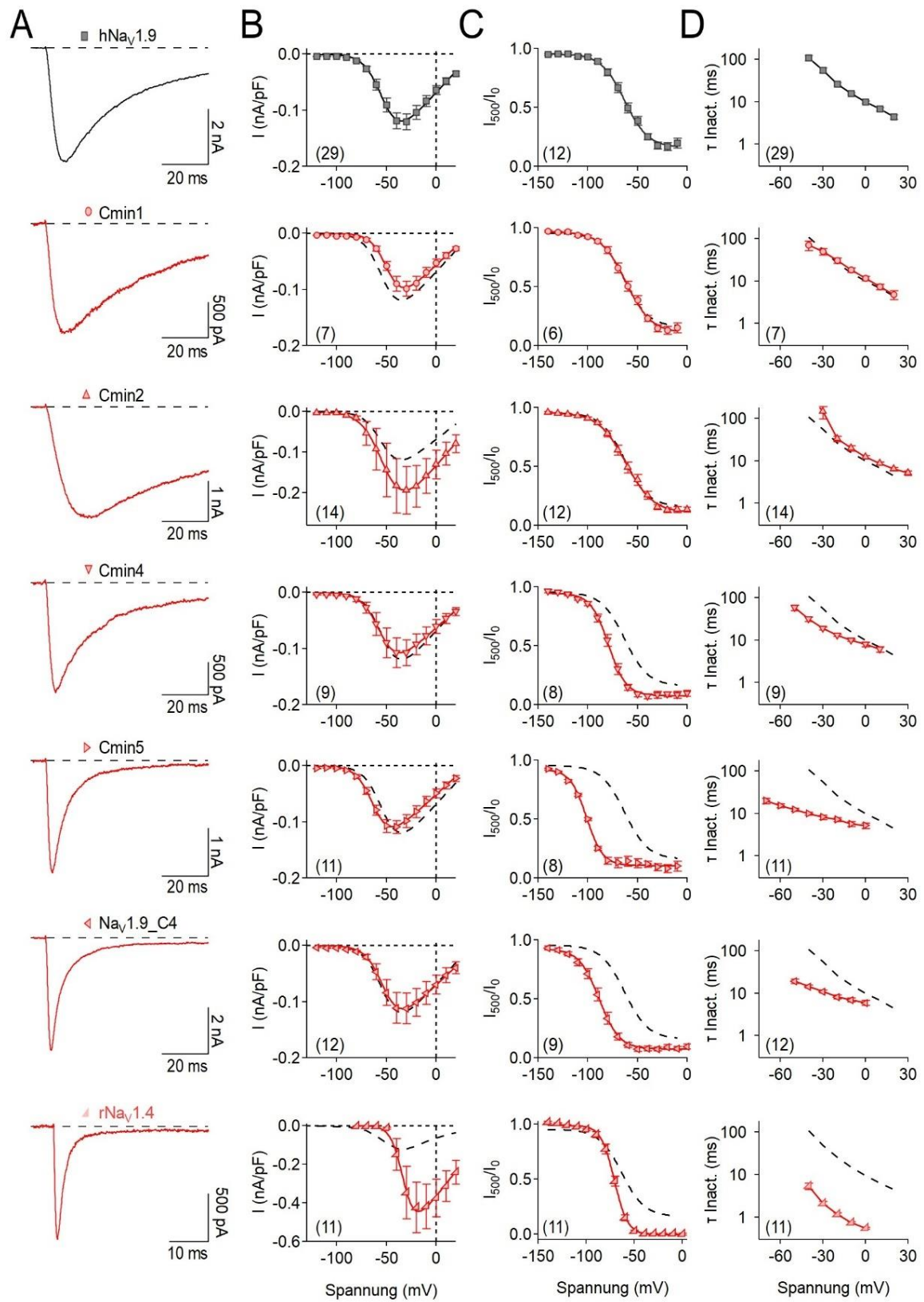
### **3.2 Molekulare Determinanten der besonderen Schalteigenschaften von Nav1.9**

Nav1.9 hebt sich mit seiner langsamen Schaltkinetik deutlich von den restlichen Nav-Subtypen ab. Während andere Nav-Subtypen innerhalb weniger Millisekunden aktivieren und inaktivieren, ist dieser Vorgang bei Nav1.9 um ein Vielfaches verlangsamt (S. Dib-Hajj et al., 2002). Inaktivierungseigenschaften von Nav-Kanälen sind komplex und involvieren eine Reihe unterschiedlicher Epitope, die zu den Konformationsänderungen während des Inaktivierungsvorgangs beitragen (Catterall, 2000). Die schnelle Kanalinaktivierung wird zu einem großen Teil durch das IFM-Motiv vermittelt, welches sich im DIII/DIV-Linker der Nav-Kanäle befindet (West et al., 1992). Eine weitere wichtige Struktur stellt der Rezeptor für das IFM-Motiv dar, mit dem der IFM-Linker während des Inaktivierungsvorgangs interagiert und so den Verschluss der Kanalpore initiiert. Studien deuten darauf hin, dass es sich bei den Interaktionsstellen für das IFM-Motiv um die S4-S5-Linker der Domänen III (M. R. Smith & Goldin, 1997) und IV handelt (Filatov et al., 1998; Lerche et al., 1997; McPhee et al., 1998; Tang et al., 1998). Andere Untersuchungen zeigten, dass die intrazellulären Enden der S6-Segmente an der schnellen Kanalinaktivierung mitwirken (McPhee et al., 1995; Yarov-Yarovoy et al., 2002). Der Beitrag der S6-Segmente zum Inaktivierungsvorgang wird durch Mutationen in *SCN11A* bekräftigt, die zu einer Beeinträchtigung der schnellen Inaktivierung von Nav1.9 führen und sich bei den Patienten in *CIP* manifestieren (Huang et al., 2017; King et al., 2017; Leipold et al., 2013). Eine Reihe von Untersuchungen an unterschiedlichen Nav-Subtypen weist zudem auf eine Beteiligung des C-Terminus am Inaktivierungsvorgang der Nav-Kanäle hin (Choi et al., 2004; Goral et al., 2015; A. Lee & Goldin, 2008; Mantegazza et al., 2001). Auch der N-Terminus scheint an der Kanalinaktivierung mitzuwirken und zudem die Aktivierungseigenschaften der Kanäle zu beeinflussen (Angus et al., 2019; Gütter et al., 2013; Hu et al., 2014; A. Lee & Goldin, 2008). Weiterhin deuten Untersuchungen auf eine Interaktion des N-Terminus mit dem C-Terminus der Nav-Kanäle hin (Sun et al., 1995; H. Zhang et al., 2000).

Die Identifizierung der molekularen Faktoren für die besonders langsamen Schalteigenschaften von Nav<sub>v</sub>1.9 sind noch nicht abschließend geklärt und Gegenstand der folgenden drei Kapitel. Bei den nachfolgenden Untersuchungen liegt der Fokus auf dem C-Terminus von Nav<sub>v</sub>1.9, da dieser bereits in vorangegangenen Arbeiten mit der schnellen Inaktivierung sowie der funktionellen Expression der Kanäle in Verbindung gebracht wurde (Choi et al., 2004; Goral et al., 2015; Mantegazza et al., 2001). Weiterhin sollen die Relevanz des N-Terminus, sowie die Bedeutung der S4-S5-Linker in DIII und DIV für das Schaltverhalten von Nav<sub>v</sub>1.9 beleuchtet werden.

### **3.2.1 Rolle des C-Terminus für das Inaktivierungsverhalten von Nav<sub>v</sub>1.9**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Einbau des C-Terminus von Nav<sub>v</sub>1.9 in Nav<sub>v</sub>1.4 die Inaktivierungskinetik der Nav<sub>v</sub>1.4-Kanäle verlangsamt (Goral et al., 2015). Umgekehrt führt der C-Terminus von Nav<sub>v</sub>1.4 im Hintergrund von Nav<sub>v</sub>1.9 zu einer beschleunigten Inaktivierung von Nav<sub>v</sub>1.9 (Goral et al., 2015). Auf letztere Resultate wurde in der vorliegenden Arbeit aufgebaut mit dem Ziel, den für die Inaktivierung relevanten Abschnitt im C-Terminus zu identifizieren. Dazu wurden systematisch Segmente des C-Terminus von Nav<sub>v</sub>1.9 durch homologe Bereiche aus Nav<sub>v</sub>1.4 ausgetauscht und die generierten Kanalchimären in dKO-DRG-Neuronen exprimiert. Abb. 15 und Abb. 16 geben einen Überblick über die Funktionseigenschaften der erzeugten Kanalchimären.



**Abbildung 15: Der Kanal-C-Terminus determiniert die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9.** (A) Repräsentative Stromspuren von hNav1.9 (oben) und rNav1.4 (unten, TTX-resistente Variante Y401S), sowie der Nav1.9/Nav1.4-Chimären (Material und Methoden 2.2.2), bei einer Membranspannung von -30 mV. Größe und Lokalisation der Nav1.4-spezifischen Anteile in den C-Termini der Nav1.9/Nav1.4-Chimären sind in Abb. 16 dargestellt. (B) Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung. Dargestellt ist die Peakstromdichte als Funktion der Testpulsspannung. Die Datenpunkte beziehen sich jeweils auf das in A angegebene Kanalkonstrukt. (C) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung für die in A angegebenen Kanalkonstrukte. (D) Zeitkonstante  $\tau_{Inact}$  der schnellen Inaktivierung als Funktion der Testpulsspannung, jeweils für die in A angegebenen Kanalkonstrukte. Die Datenpunkte in D sind durch Geraden miteinander verbunden. Gestrichelte Kurven in B, C und D entsprechen den hNav1.9-Wildtyp-Daten. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in B, C und D sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben.

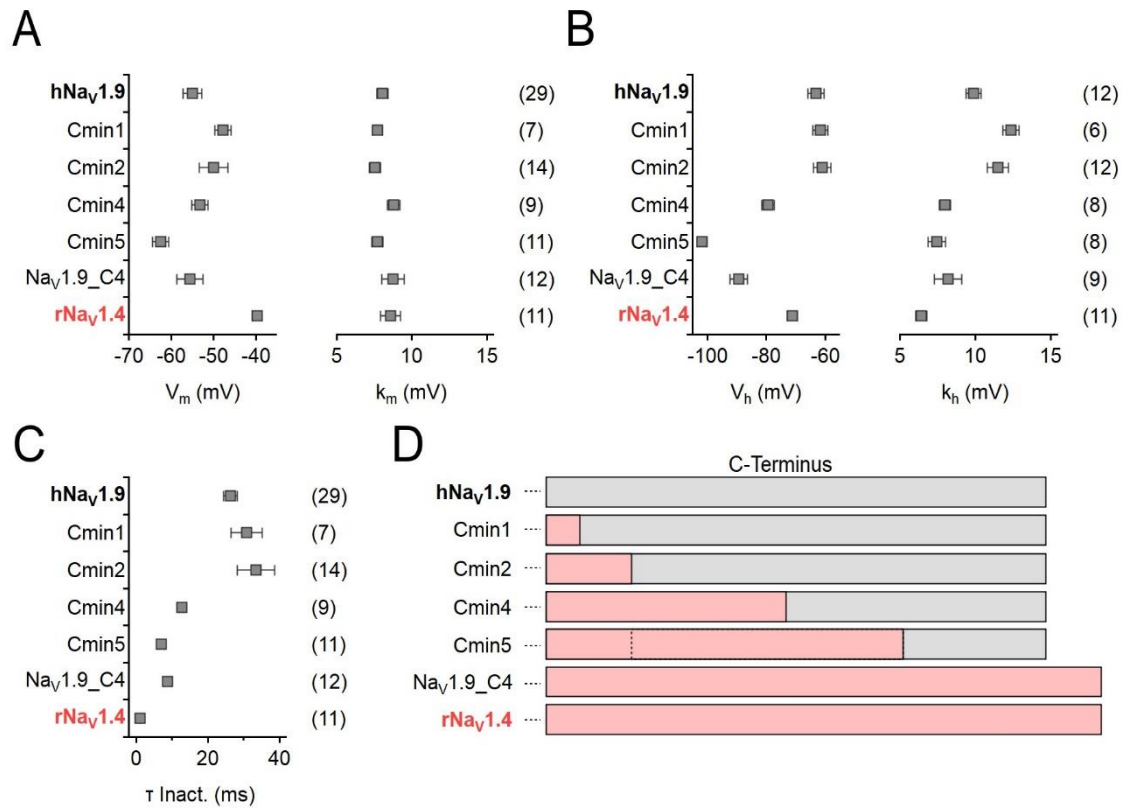
Wie bereits Goral et al. (2015) zeigten, bewirkt der Austausch des C-Terminus in Nav1.9 gegen den C-Terminus aus Nav1.4 eine Beschleunigung der Inaktivierungskinetik von Nav1.9. Dieses Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit reproduziert werden (Abb. 15, Nav1.9\_C4). Weiterhin bewirkte der Austausch des C-Terminus einen Shift der Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung ( $V_h$ ) um -26.1 mV hin zu hyperpolarisierten Potentialen (Nav1.9:  $-63.2 \pm 2.8$  mV, Nav1.9\_C4:  $-89.3 \pm 2.9$  mV,  $p < 0.001$ ). Die Aktivierungseigenschaften von Nav1.9\_C4 unterschieden sich hingegen nicht vom Nav1.9-Wildtyp (siehe Abb. 15B und Abb. 16A). Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) betrug für den Wildtyp  $-55 \pm 2.2$  mV und für Nav1.9\_C4  $-55.5 \pm 3.1$  mV ( $p > 0.05$ ). Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung  $k_m$  lag für den Wildtyp bei  $8.0 \pm 0.4$  mV und für Nav1.9\_C4 bei  $8.8 \pm 0.7$  mV ( $p > 0.05$ ).

Um die für die Kanalaktivierung relevanten Bereiche im C-Terminus zu identifizieren, wurden weitere Nav1.9-Chimären erzeugt, in denen kleinere Bereiche des C-Terminus – beginnend am proximalen Ende – durch die entsprechenden homologen Abschnitte aus Nav1.4 ersetzt wurden (Abb. 16D). Insgesamt wurden fünf weitere Nav1.9-Chimären (Cmin1-Cmin5) mit unterschiedlichen Nav1.4-Anteilen im Kanal-C-Terminus erzeugt. Eine detaillierte Auflistung der Schaltparameter aller Chimären ist im Anhang in den Tabellen 5 und 6 zu finden.

Wie in Abb. 15 zu sehen, bewirkte der Einbau kurzer proximaler C-terminaler Abschnitte aus Nav1.4 in Nav1.9 (Cmin1 und Cmin2) kaum Veränderungen im Schaltverhalten der Kanäle. Hinsichtlich spannungsabhängiger Aktivierung, Inaktivierung und Inaktivierungskinetik waren keine Unterschiede zu Nav1.9-Wildtyp-Kanälen zu erkennen. Die einzige Ausnahme bildete der Steigungsfaktor ( $k_h$ ) von Cmin1, der im Vergleich zum Nav1.9-Wildtyp mit 12.4 mV um 2.5 mV größer war ( $p < 0.01$ ). Diese Daten sprechen dafür, dass der Bereich des proximalen C-Terminus (proximale 42 AS) von untergeordneter Bedeutung für die Inaktivierung von Nav1.9 ist.

In einer weiteren Chimäre (Cmin3) wurde der proximale Nav1.4-Anteil um 20 AS ausgeweitet. Jedoch ließen sich für dieses Konstrukt aufgrund fehlender funktioneller Expression keine Daten erheben. Möglicherweise ist dieser chimäre C-Terminus mit der restlichen Nav1.9-Kanalstruktur inkompatibel oder triggert die Degradierung des Proteins.

Bei einer weiteren Vergrößerung des proximalen Nav1.4-Anteils im C-Terminus um 42 AS (Cmin4) waren deutliche Veränderungen hinsichtlich der Inaktivierungseigenschaften sichtbar. Die halbmaximale Inaktivierungsspannung verschob sich um 16.3 mV hin zu hyperpolarisierten Potentialen ( $p < 0.001$ ) und die Kinetik der Kanäle beschleunigte sich ebenfalls. Bei einer Spannung von -20 mV halbierte sich die Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung ( $\tau_{\text{Inact.}}$ ) von  $26 \pm 1.8$  ms (Wildtyp) auf  $13 \pm 0.7$  ms (Cmin4,  $p < 0.001$ ). Beim Austausch eines noch größeren Abschnitts des proximalen C-Terminus (Cmin5), verschob sich die Gleichgewichtsinaktivierung um -38.7 mV hin zu hyperpolarisierten Potentialen und auch die Inaktivierungszeitkonstante wurde um weitere 6 ms geringer ( $p < 0.001$ ). Der Effekt auf die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung war damit sogar deutlich ausgeprägter als bei Nav1.9\_C4. Dennoch erreichte die beschleunigte Inaktivierungskinetik der Chimäre Cmin5 nicht das Niveau von Nav1.4, was darauf hindeutet, dass neben dem C-Terminus noch weitere inaktivierungsrelevante Epitope in der Kanalstruktur existieren. Allerdings lassen die Daten darauf schließen, dass sich der die Kanalinaktivierung modulierende Bereich im medialen C-Terminus von Nav1.9 befindet.



**Abbildung 16: Schaltparameter der untersuchten Kanalchimären im Vergleich.** (A) Schaltparameter zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung, wie der Aktivierungsspannung  $V_m$  und des Steigungsfaktors  $k_m$ . Die Reihenfolge der Kanalchimären entspricht der Anordnung in Abb. 15 (von oben nach unten). (B) Schaltparameter zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung  $V_h$  und des zugehörigen Steigungsfaktors  $k_h$ . (C) Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung ( $\tau$  Inact.) bei -20 mV. (D) Schematische Repräsentation der C-Termini der Kanalchimären aus Bestandteilen von Nav1.9 (grau) und Nav1.4 (rot). Der für die schnelle Inaktivierung identifizierte relevante Abschnitt ist in der schematischen Darstellung der Cmin5-Chimäre durch eine gestrichelte Linie angedeutet. Alle Datenpunkte sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahl der Experimente ist in Klammern angegeben. Eine Übersicht der zugehörigen Statistik ist im Anhang (Tabelle 5 und 6) zu finden.

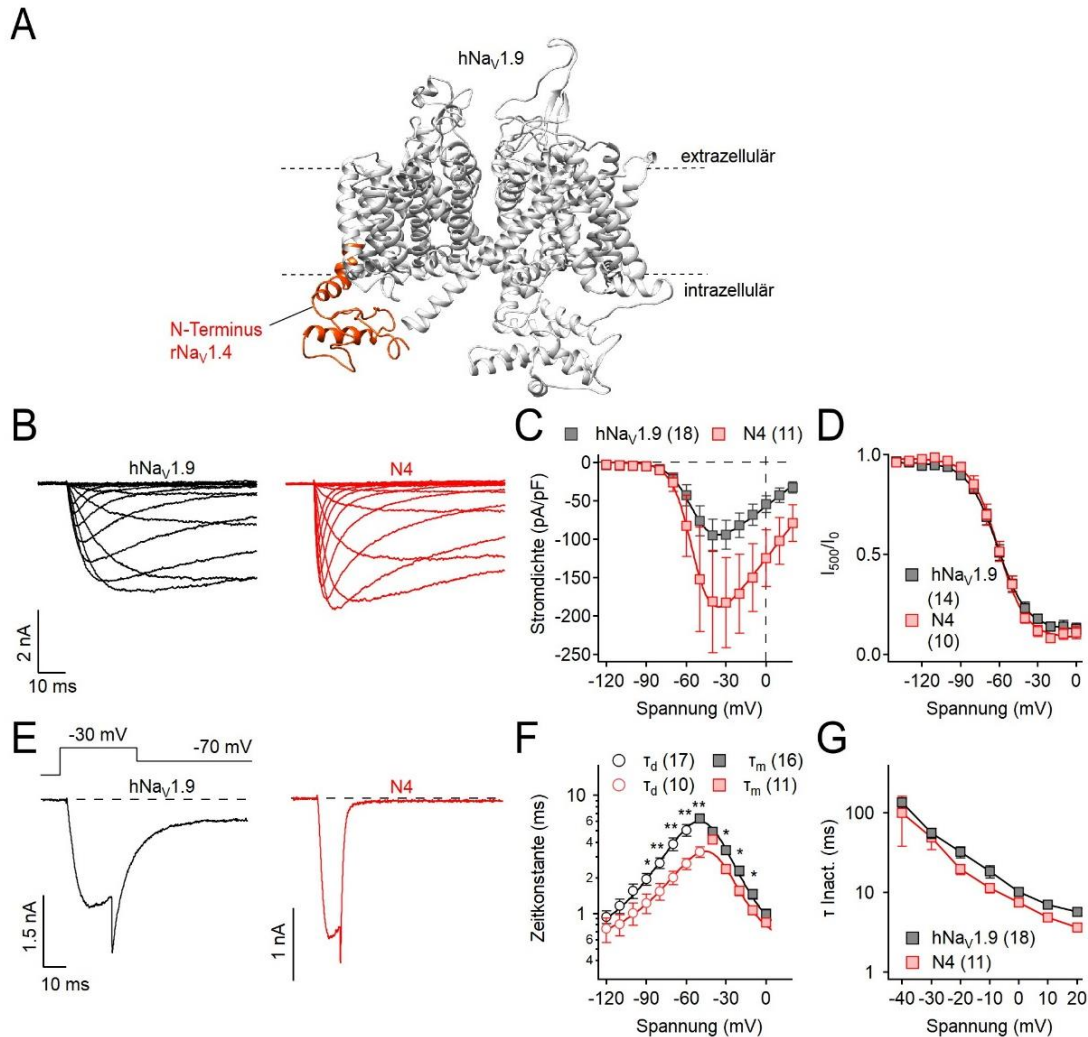
Basierend auf den erhobenen Daten kann geschlossen werden, dass der für die Inaktivierung relevante Bereich innerhalb von 100 AS im medialen C-Terminus zu finden ist, nämlich im Bereich von AS 1644-1744 (Abb. 16D Cmin5, gestrichelte Linie). Jedoch wird auch klar, dass noch zusätzliche Epitope im Kanalprotein existieren müssen, die die Inaktivierung von Nav1.9 modulieren.

### 3.2.2 Bedeutung des N-Terminus für das Schaltverhalten von Nav1.9

Neben dem C-Terminus scheint auch der N-Terminus Schalteigenschaften von Nav-Kanälen zu beeinflussen. Es wurde bereits gezeigt, dass der Einbau des N-Terminus von Nav1.2 in Nav1.6 zu einem Shift der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung in Richtung höherer Potentiale führt (A. Lee & Goldin, 2008). Daneben wurde auch ein Shift der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu höheren Potentialen beobachtet (A. Lee &

Goldin, 2008). Die Bedeutung des N-terminus für das Schaltverhalten von Nav-Kanälen wird weiterhin durch eine Reihe N-terminaler Kanalvarianten unterstützt, die das Aktivierungs- und Inaktivierungsverhalten der Kanäle, sowie deren Membranlokalisation beeinflussen. So manifestierte sich die mit dem Dravet-Syndrom in Verbindung gebrachte N-terminale Kanalvariante M72dup in Nav1.1, in einer zu hyperpolarisierten Spannungen verschobenen Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung und einer verminderten Stromdichte (Angus et al., 2019). Die Studie zeigt zudem, dass die verminderte Stromdichte in einer reduzierten Membranexpression des Kanalproteins begründet ist (Angus et al., 2019). Die Relevanz des Kanal-N-Terminus für die Membranexpression wird weiter gestützt durch eine N-terminale Variante (S21P) in Nav1.6, die den Transport des Kanals zur Membran stört und damit zu einer verminderten Membranlokalisation der Kanäle führt (Sharkey et al., 2009). Die mit Brugada-Syndrom in Verbindung gebrachte N-terminale Variante Nav1.8-R14L wies ebenfalls eine verminderte Stromdichte und eine zu depolarisierten Potentialen verschobene Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung auf (Hu et al., 2014). Untersuchungen an Nav1.5 deuten zudem darauf hin, dass der N-Terminus eine Schlüsselrolle für die Kinetik und Stabilität des Kanals spielt (Gütter et al., 2013). Mit Brugada- und Long-QT-Syndrom in Verbindung stehende N-terminale Varianten verändern sowohl Aktivierungs- als auch Inaktivierungseigenschaften und übertragen damit sowohl *loss-of-function* (LOF)- als auch *gain-of-function* (GOF)-Eigenschaften auf Nav1.5-Kanäle (Gütter et al., 2013). Beispielsweise zeigten die N-terminalen Kanalvarianten Nav1.5-V125L und -K126E einen Shift der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu höheren Potentialen (Gütter et al., 2013). Es ist auch bekannt, dass C- und N-Terminus von rNav1.4 (vormals rSkM1) miteinander interagieren (Sun et al., 1995; H. Zhang et al., 2000). Ob dies für Nav1.9 ebenfalls der Fall ist, ist unbekannt.

Aufgrund dieser Studienlage erschien der N-Terminus als ein interessantes potenzielles Epitop hinsichtlich der Modulation der Schalteigenschaften von Nav1.9. In einer weiteren Versuchsreihe wurde deshalb der N-Terminus des hNav1.9-Kanals durch das entsprechende homologe Fragment des rNav1.4-Kanals ersetzt und die generierte Kanalchimäre in dKO-DRG-Neuronen funktionell untersucht. Abb. 17 zeigt die Ergebnisse der *Voltage-Clamp*-Untersuchungen.



**Abbildung 17: N-terminaler Austausch durch homologes Nav1.4-Fragment beschleunigt die Kinetik von Nav1.9.** (A) Strukturmodell von Nav<sub>v</sub>1.9 (Seitenansicht). Der N-Terminus ist farblich hervorgehoben. (B) Repräsentative Stromspuren von Nav<sub>v</sub>1.9 und Nav<sub>v</sub>1.9-N4, aufgenommen in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte) in der Gegenwart von 1 μM TTX. (C) Gemittelte Peakstromdichten als Funktion der Testpulsspannung. (D) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung. (E) Repräsentative Stromspuren bei einer Deaktivierungsspannung von -70 mV. Das Pulsprotokoll ist links oben dargestellt. (F) Zeitkonstanten der Deaktivierung ( $\tau_d$ ) und Aktivierung ( $\tau_m$ ) als Funktion der Testpulsspannung für Nav<sub>v</sub>1.9 (schwarz) und Nav<sub>v</sub>1.9-N4 (rot). (G) Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung ( $\tau_{\text{Inact}}$ ) als Funktion der Membranspannung. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1 μM TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in C, D, F und G sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t*-Test getestet. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

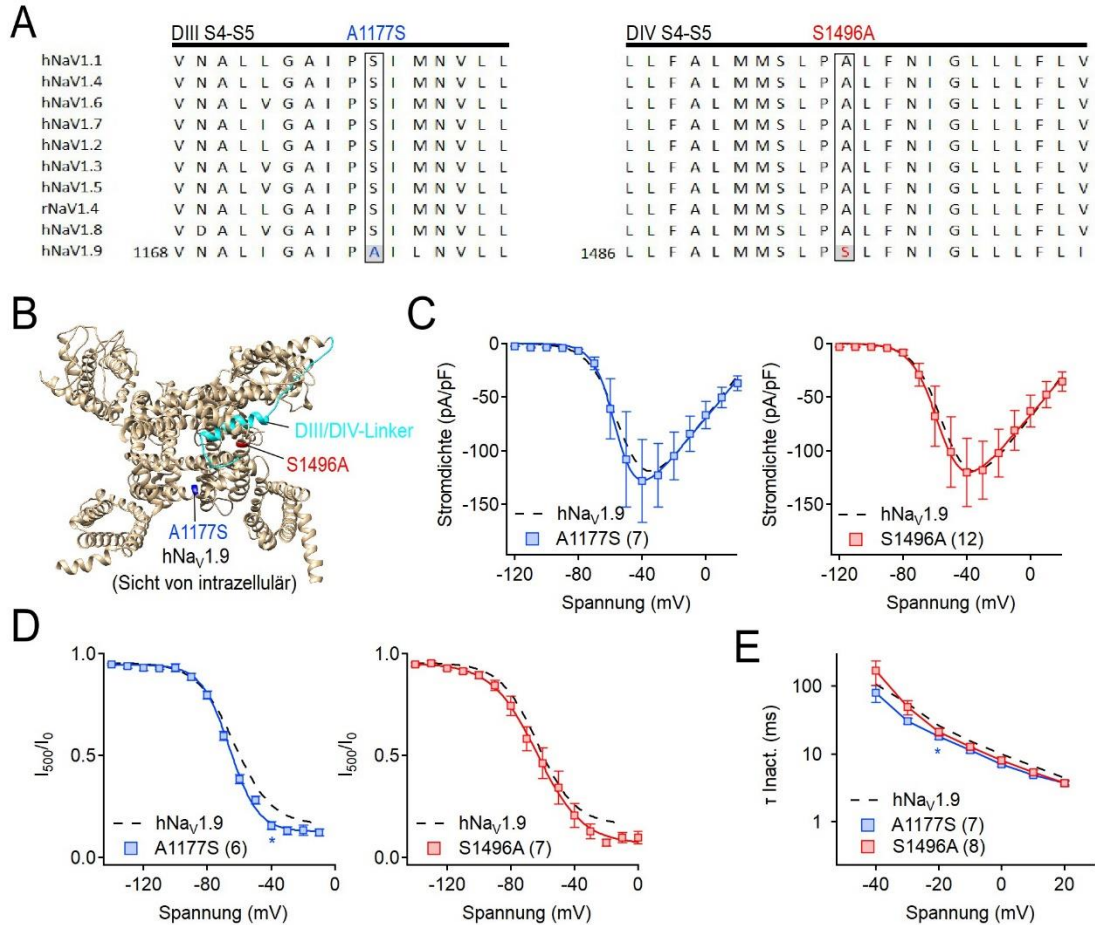
Die elektrophysiologische Analyse zeigte, dass Nav<sub>v</sub>1.9-N4-Kanäle ähnliche funktionelle Eigenschaften aufweisen, wie der Nav<sub>v</sub>1.9-Wildtyp. Die maximale Peakstromdichte der N4-Chimäre war mit  $-183.1 \pm 58.8$  pA/pF gegenüber dem Wildtyp um den Faktor  $\sim 2$  erhöht. Aufgrund hoher Variabilität erreichte dieser Unterschied jedoch nicht das Signifikanzniveau ( $p > 0.05$ ).  $V_m$  war tendenziell höher als beim Wildtyp, wenn auch nicht signifikant verschieden (Nav<sub>v</sub>1.9:  $-52.9 \pm 2.1$  mV, N4-Chimäre:  $-47.9 \pm 2.3$  mV,  $p > 0.05$ ). Kompatibel damit war die Deaktivierungskinetik der Chimäre um ca. Faktor 2 verlangsamt (Abb. 17F).

Die Aktivierungskinetik der Chimäre war ebenfalls verlangsamt, wenn auch etwas weniger ausgeprägt ( $p < 0.05$ ). Die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9-N4 unterschieden sich nicht vom Wildtyp. Die halbmaximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) betrug für Nav1.9-N4  $-61.1 \pm 2.5$  mV und  $-61.6 \pm 2.3$  mV für den Wildtyp ( $p > 0.05$ ). Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung ( $k_h$ ) zeigte ebenfalls keinen Unterschied (Nav1.9-N4:  $9.5 \pm 0.3$  mV, Nav1.9-Wildtyp:  $9.8 \pm 0.5$  mV,  $p > 0.05$ ). Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass der N-Terminus milde Auswirkungen auf das Schaltverhalten von Nav1.9 hat, indem er die Aktivierungs- und Deaktivierungskinetik der Kanäle beeinflusst.

### **3.2.3 Relevanz nicht konservierter Reste in DIII S4-S5 und DIV S4-S5 für das Schaltverhalten von Nav1.9**

Neben den Kanaltermini wurden weitere Epitope der Kanalstruktur mit dem Inaktivierungsvorgang der Nav-Kanäle in Verbindung gebracht, wie die S4-S5-Segmente in DIII und DIV, die vermutlich als Rezeptorstellen für das IFM-Inaktivierungsmotiv fungieren (Filatov et al., 1998; Lerche et al., 1997; McPhee et al., 1998; M. R. Smith & Goldin, 1997; Tang et al., 1998). Untersuchungen an Nav-Kanälen zeigten, dass der Austausch einzelner AS in diesen Bereichen veränderte Schalteigenschaften der Kanäle zur Folge hat und die schnelle Kanalinaktivierung maßgeblich beeinflusst werden kann (McPhee et al., 1998; M. R. Smith & Goldin, 1997).

Um weitere Faktoren für die charakteristisch langsame Schaltkinetik von Nav1.9 zu identifizieren, wurde die AS-Sequenz von Nav1.9 mit den Sequenzen anderer humaner Nav-Kanäle verglichen. Dabei wurden in den Regionen DIII S4-S5 und DIV S4-S5 zwei AS identifiziert, die mit Ausnahme von Nav1.9 in allen humanen Nav-Subtypen konserviert vorliegen. Da angenommen wird, dass diese S4-S5-Bereiche als Rezeptorstelle für das IFM-Motiv fungieren, könnten AS-Austausche in diesen Regionen zu dem besonderen Schaltverhalten von Nav1.9 beitragen. Diese Hypothese sollte im folgenden Abschnitt geprüft werden. Bei den AS handelt es sich um ein Alanin anstelle eines Serins an der Position 1177 (DIII S4-S5) und um ein Serin anstelle eines Alanins an der Position 1496 (DIV S4-S5). Die Ergebnisse der *Voltage-Clamp*-Untersuchungen sind in Abb. 18 dargestellt.



**Abbildung 18: Nav1.9-S1496A unterscheidet sich nicht vom Wildtyp und Nav1.9-A1177S zeigt marginale Funktionsveränderungen.** Sequenzvergleich humaner Nav-Kanäle in den Bereichen DIII S4-S5 und DIV S4-S5. Die jeweilige Position der ausgetauschten AS in Nav1.9 wurde umrahmt. Die Ziffer zu Beginn des Alignments bezeichnet die Position der ersten AS im gezeigten Sequenzabschnitt von Nav1.9. (B) Strukturmodell von Nav1.9 (Sicht von intrazellulär) mit dem DIII/DIV-Linker (cyan) und den Positionen der AS-Austausche A1177S (blau) und S1496A (rot). (C) Gemittelte Peakstromdichten als Funktion der Testpulsspannung. (D) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung. (E) Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung ( $\tau_{\text{Inact.}}$ ) als Funktion der Testpulsspannung. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von  $1 \mu\text{M}$  TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in C-E sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Der Datenfit der Mittelwerte von Nav1.9 aus Abb. 15 wurde zum Vergleich als gestrichelte Linie in C-E eingefügt. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t-Test* getestet. \* $p < 0.05$ .

Die Ergebnisse der *Voltage-Clamp*-Untersuchungen zeigten, dass sich die Variante Nav1.9-S1496A nicht vom Wildtyp unterscheidet und Nav1.9-A1177S nur zu geringfügigen Funktionsveränderungen führt. Die maximale Peakstromdichte von Nav1.9-A1177S lag bei  $-128 \pm 38$  pA/pF und wurde bei  $-40$  mV erreicht. Damit war die maximale Peakstromdichte weder vom Wildtyp ( $-121 \pm 14$  pA/pF) noch von der S1496A-Variante ( $-118 \pm 27$  pA/pF) zu unterscheiden (beide  $p > 0.05$ ). Auch die Parameter zur Charakterisierung der Kanalaktivierung ähnelten stark dem Wildtyp und zeigten keine signifikanten Unterschiede.  $V_m$  war bei A1177S leicht erhöht, wenn auch nicht signifikant verschieden (A1177S:  $-51.2 \pm 3.0$  mV, Nav1.9:  $-55.0 \pm 2.2$  mV,  $p > 0.05$ ). Die  $k_m$ -Werte unterschieden sich nicht und

betragen  $8.0 \pm 0.4$  mV für den Wildtyp und  $6.8 \pm 0.6$  mV für A1177S ( $p > 0.05$ ). Ähnliches war für die Variante S1496A zu beobachten.  $V_m$  und  $k_m$  unterschieden sich nicht signifikant vom Wildtyp ( $V_m$ :  $-50.3 \pm 3.2$  mV,  $k_m$ :  $7.4 \pm 0.5$  mV,  $p > 0.05$ ). Die Parameter der Gleichgewichtsinaktivierung zeigten weder für A1177S ( $V_h$  A1177S:  $-67.1 \pm 1.3$  mV,  $k_h$  A1177S:  $8.8 \pm 0.5$  mV,  $p > 0.05$ ), noch für S1496A ( $V_h$  S1496A:  $-62.8 \pm 5.0$  mV,  $k_h$  S1496A:  $10.7 \pm 0.9$  mV,  $p > 0.05$ ) signifikante Unterschiede zum Wildtyp ( $V_h$  Wildtyp:  $-63.2 \pm 2.8$  mV;  $k_h$  Wildtyp:  $9.9 \pm 0.5$ ). Erwähnenswert ist jedoch, dass die Kanalverfügbarkeit bei Nav1.9-A1177S bei einer Spannung von -40 mV leicht reduziert war ( $p < 0.05$ ). Hinsichtlich der Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung ( $\tau$  Inact) ließen sich mit Ausnahme für die A1177S-Variante ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp erkennen. Bei einer Spannung von -20 mV war die schnelle Inaktivierung der A1177S-Variante mit  $18 \pm 1.6$  ms verglichen mit dem Wildtyp ( $26 \pm 1.8$  ms) signifikant verlangsamt ( $p < 0.05$ ). In der Summe legen die Daten nahe, dass Serin an Position 1496 keine Bedeutung für das Schaltverhalten von Nav1.9 hat und Alanin an Position 1177 möglicherweise einen marginalen Beitrag zu den Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9 leistet.

### **3.3 Krankheitsassoziierte Nav1.9-Varianten**

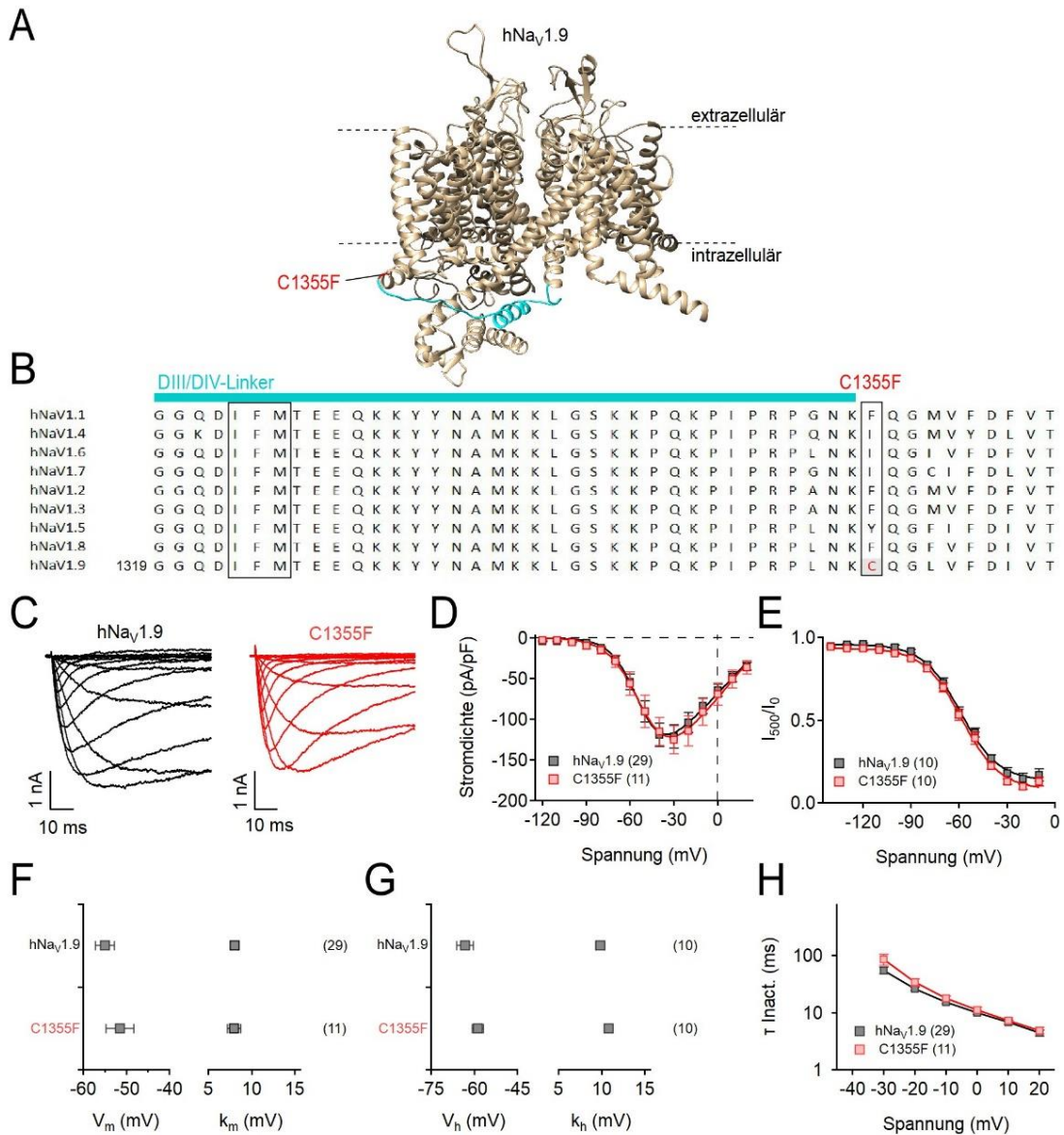
Mutationen im Nav1.9-kodierenden *SCN11A*-Gen werden mit einem breiten Spektrum an Schmerzerkrankungen in Verbindung gebracht, das von Analgesie bis hin zu schweren neuropathischen Schmerzen reicht und häufig von gastrointestinaler Symptomatik begleitet wird. Die Untersuchung humaner Nav1.9-Kanäle, sowie pathologischer Varianten, gestaltet sich schwierig, da die heterologe Expression der Kanäle in immortalisierten Standardzelllinien nur sporadisch und mit hohem Aufwand gelingt und die erzielbaren Stromdichten für detaillierte Funktionsanalysen oftmals zu gering sind. Mit den in Abschnitt 3.1 vorgestellten dKO-DRG-Neuronen werden diese Limitationen umgangen und die robuste Expression, sowie die systematische Untersuchung pathogener Nav1.9-Varianten, ermöglicht. Im Folgenden werden murine dKO-DRG-Neurone als Expressionssystem genutzt, um neue, in Patienten mit pathologischer Schmerzwahrnehmung identifizierte, Nav1.9-Varianten, funktionell zu charakterisieren und basierend darauf ihre Krankheitsrelevanz einzuschätzen.

### 3.3.1 Funktionelle Eigenschaften potenziell Analgesie-auslösender

#### Nav1.9-C1355F-Kanäle

Bisher untersuchte Analgesie-assoziierte Nav1.9-Varianten betreffen stark konservierte Bereiche in den S6-Segmenten der Kanalstruktur und sind durch eine gesteigerte Kanalaktivierung und eine beeinträchtigte schnelle Inaktivierung gekennzeichnet (Huang et al., 2017; King et al., 2017; Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016). Mitte 2020 wurde eine neue potenziell Analgesie-auslösende Nav1.9-Variante (C1355F) beschrieben, jedoch ohne funktionelle Charakterisierung. Die Studie präsentiert zwei Schwestern (6 Jahre und 3 Jahre), die seit Geburt von Analgesie und Anhidrose betroffen sind (Poojary et al., 2020). Interessanterweise zeigten die Patienten trotz eines fehlenden Schmerzempfindens keine selbst zugeführten Hautläsionen, Bisse in Zunge und Lippe, oder Fehlstellungen der Gliedmaßen aufgrund unbemerkter Frakturen, wie sie sonst häufig für andere Fälle von *CIP* beschrieben wurden (King et al., 2017; Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016). Das Berührungs-, Temperatur-, Druck- und Vibrationsempfinden war bei beiden Patienten unauffällig. Untersuchungen mittels Elektromyographie (EMG) und die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit zeigten sowohl in Händen als auch in den Füßen Beeinträchtigungen und waren richtungsweisend für eine *SFN* oder autonome Dysfunktion. Durch Sequenzierung einer nicht näher spezifizierten Auswahl an Genen bei der älteren Schwester wurde eine heterozygote Mutation in *SCN11A* identifiziert, die zu der Kanalvariante Nav1.9-C1355F führt (Poojary et al., 2020). Der AS-Austausch ist, anders als bei den bereits beschriebenen Analgesie-assoziierten Nav1.9-Varianten, am Ende des DIII/DIV-Linkers lokalisiert (Abb. 19A, B). Diese Position ist interessant, da der DIII/DIV-Linker das für die schnelle Kanalinaktivierung wichtige IFM-Motiv enthält. Die betroffene AS C1355 ist in den humanen Nav-Kanälen allerdings nicht konserviert. Während Nav1.1-Nav1.4 und Nav1.7-Nav1.8 dort einen hydrophoben Rest aufweisen (Phenylalanin (F) oder Isoleucin (I)), besitzt Nav1.5 dort ein polares Threonin (T). Die jüngere Schwester, sowie der Vater waren ebenfalls Träger der Mutation, wobei der Vater interessanterweise asymptomatisch war und auch die Untersuchungen mittels EMG und hinsichtlich Nervenleitgeschwindigkeit unauffällig waren. Die Mutter war keine Trägerin der Mutation. Bislang sind 8 Formen hereditärer sensorischer und autonomer Neuropathie (HSAN) beschrieben worden, die mit Fehlfunktionen unterschiedlicher Gene assoziiert sind (Dyck, 1982; Poojary et al., 2020). In der Studie wurde postuliert, dass die C1355F-Variante ursächlich für das klinische Bild ist und die Erkrankung in der Folge als eine neue Form von

HSAN (Typ IX) klassifiziert. Eine elektrophysiologische Analyse der Kanalvariante, die einen Zusammenhang zwischen Nav1.9-C1355F und Analgesie der Patienten bekräftigen könnte, wurde nicht erhoben. Um diese Lücke zu schließen, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Funktionseigenschaften von Nav1.9-C1355F, nach Expression in dKO-DRG-Neuronen, untersucht. In Abb. 19 sind die Ergebnisse aus den *Voltage-Clamp*-Untersuchungen der C1355F-Variante und des Nav1.9-Wildtyps gezeigt.



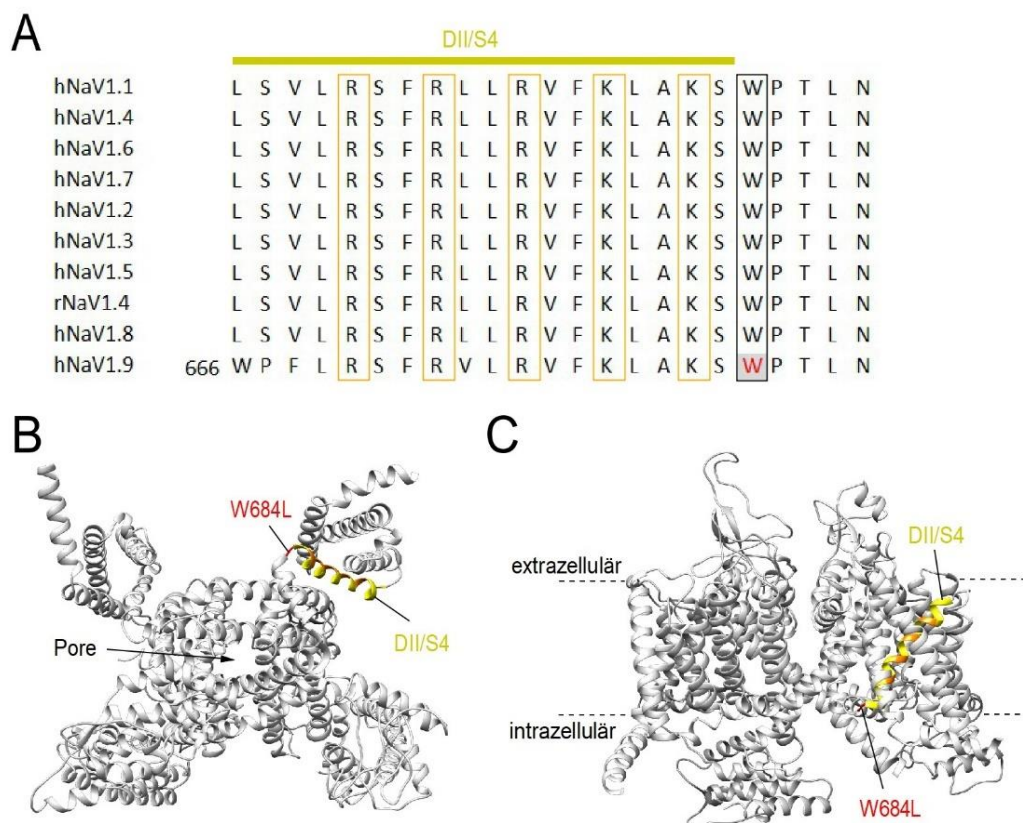
**Abbildung 19: hNav1.9-C1355F-Kanäle unterscheiden sich funktionell nicht vom Wildtyp.** (A) Strukturmodell von Nav1.9 (Seitenansicht) mit dem DIII/DIV-Linker (cyan) und der Position des AS-Austausches C1355F (rot). (B) Sequenzvergleich der humanen Nav-Kanäle im Bereich des DIII/DIV-Linkers. Der AS-Austausch befindet sich am Ende des DIII/DIV-Linkers, der das für die Inaktivierung relevante IFM-Motiv enthält (schwarze Umrandung). Die Position der ersten dargestellten AS im Sequenzabschnitt von Nav1.9 ist durch die Ziffer am Anfang des Alignments gekennzeichnet. (C) Repräsentative Stromspuren von Nav1.9 und Nav1.9-C1355F, aufgenommen in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte). (D) Mittlere Peakstromdichten aus Experimenten wie in C, als Funktion der Testpulsspannung. Die Linien sind Datenfits nach Gleichung 2.1. (E) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung. Die Daten wurden nach Gleichung 2.9 angefitet (F) Halbmaximale Aktivierungsspannung  $V_m$  und Spannungsabhängigkeit der Aktivierung  $k_m$  (G) Inaktivierungsspannung  $V_h$  und Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung  $k_h$ . (H) Inaktivierungszeitkonstante ( $\tau$  Inact.) als Funktion der Testpulsspannung. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in D-H sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben.

Beide Kanäle exprimierten in dKO-DRG-Neuronen ähnlich gut. Die maximalen Stromdichten wurden bei -30 mV erreicht und betragen für Nav1.9-Wildtypkanäle  $-121 \pm 14$  pA/pF und für die Variante C1355F  $-125 \pm 17.1$  pA/pF. Damit waren die Stromdichten der beiden Gruppen nicht voneinander zu unterscheiden. Die Spannungsabhängigkeiten der Kanalaktivierung der beiden Kanäle zeigten keinen signifikanten Unterschied ( $V_m$  Wildtyp:  $-55 \pm 2.2$  mV,  $V_m$  C1355F:  $-51.5 \pm 3.3$  mV,  $p > 0.05$ ). Auch die dazugehörigen Steigungsfaktoren waren nicht verschieden ( $k_m$  Wildtyp:  $8.0 \pm 0.4$  mV,  $k_m$  C1355F:  $8.0 \pm 0.8$  mV). Die halbmaximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) war für die C1355F-Variante etwas negativer verglichen mit dem Wildtyp, wenn auch nicht signifikant ( $V_h$  C1355F:  $-63.2 \pm 2.8$  mV,  $V_h$  Wildtyp:  $-58.7 \pm 2.0$  mV,  $p > 0.05$ ). Hinsichtlich der Spannungsabhängigkeit der schnellen Inaktivierung ( $k_h$ ) war zwischen den Gruppen kein Unterschied detektierbar ( $k_h$  Wildtyp:  $9.9 \pm 0.5$  mV,  $k_h$  C1355F:  $10.8 \pm 0.5$  mV,  $p > 0.05$ ). Auch die Inaktivierungskinetik von C1355F war im gesamten untersuchten Spannungsfenster von -30 bis 30 mV nicht verändert ( $p > 0.05$ ). Zusammengefasst bewirkte die Variante C1355F keine messbaren Funktionsveränderungen in Nav1.9, was suggeriert, dass C1355F sehr wahrscheinlich nicht die Ursache der Erkrankung darstellt.

### 3.3.2 Funktionelle Untersuchung von Nav1.9-W684L-Kanälen

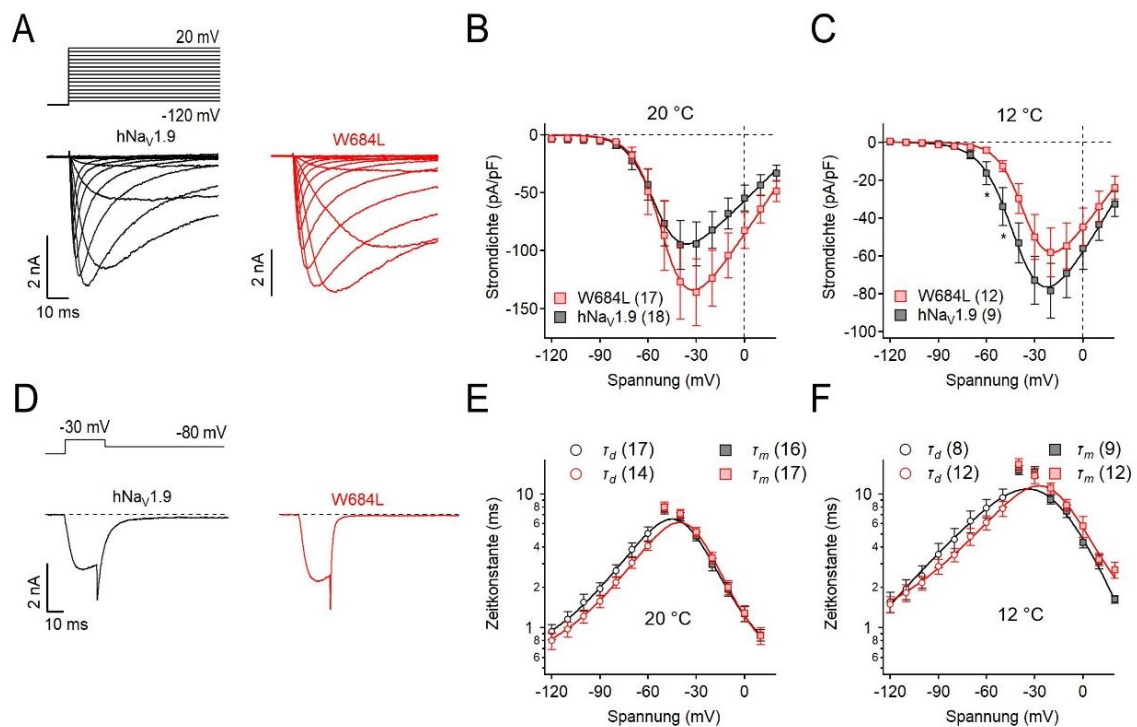
Von Kollaborationspartnern der Uniklinik Aachen wurde in Zusammenarbeit mit Neurologen der Universität Istanbul ein neuer Fall potenziell Schmerz-auslösender Nav1.9-Kanäle identifiziert. Dabei handelt es sich um einen 48-jährigen männlichen Patienten, der unter kälte-induzierten Schmerzattacken leidet. Die Symptome begannen im Jahr 2019 mit stechenden und brennenden Schmerzen in den Füßen, die durch Kälte getriggert wurden und sich dann schrittweise bis zu den Händen ausbreiteten. Die behandelnden Ärzte berichteten

davon, dass der Patient keine autonomen Symptome zeige. Weiterhin habe der Patient sieben Geschwister, wobei eine Schwester von Amyotropher Lateralsklerose (ALS) betroffen sei. Die Eltern des Patienten seien nicht blutsverwandt. Es wird außerdem davon berichtet, dass die bereits verstorbene Mutter des Patienten an denselben Beschwerden gelitten habe. Im Rahmen der neurologischen Untersuchungen fanden die Ärzte keine Auffälligkeiten, mit Ausnahme eines eingeschränkten Vibrationsempfindens in den Füßen. Zudem wurde eine bilaterale Abwesenheit des Achillessehnen-Reflexes diagnostiziert. Untersuchungen der Nervenfunktion zeigten eine geringfügige Reduktion der Signalamplitude im *Nervus suralis*. Die Symptome des Patienten sprachen auf 200 mg Lacosamid/Tag an. Mittels Exomsequenzierung wurde eine heterozygote Mutation im *SCN11A*-Gen identifiziert, die zu dem AS-Austausch W684L in Nav1.9 führt. Weitere genetische Veränderungen wurden nicht gefunden.



**Abbildung 20: Lokalisation von W684L in Nav1.9.** (A) Sequenzvergleich humaner Nav-Kanäle. Das relevante Tryptophan (W684 in Nav1.9, rote Markierung) ist in allen humanen Nav-Kanälen konserviert und befindet sich unmittelbar hinter dem Spannungssensor DII/S4. Die positiv-geladenen Reste im DII/S4-Spannungssensor sind gelb umrandet. Die Ziffer zu Beginn des Alignments bezeichnet die Position der ersten AS im Sequenzabschnitt von Nav1.9. (B) Sicht von unten (intrazellulär) auf den Nav-Kanal. Der AS-Austausch W684L, sowie die DII/S4-Helix sind farblich hervorgehoben (C) Seitenansicht auf den Nav-Kanal mit Farbkodierung wie in B.

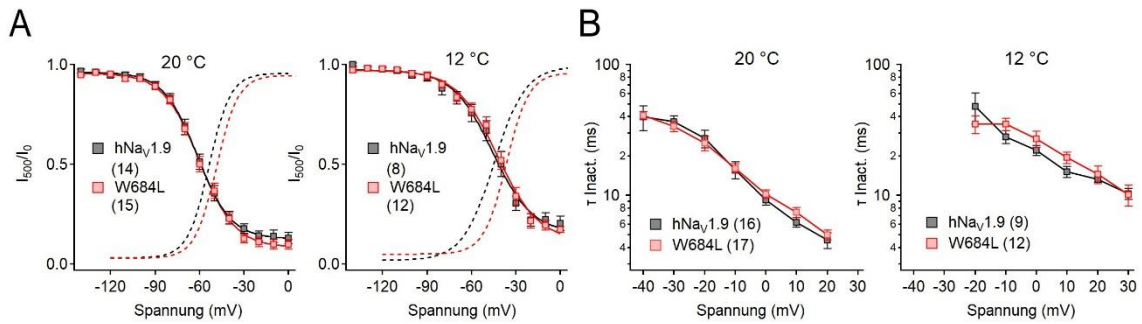
Im Rahmen einer Kollaboration wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der Nav1.9-W684L-Kanäle untersucht. Der AS-Austausch W684L ist am intrazellulären Ende des Spannungssensors DII/S4 lokalisiert (Abb. 20). Diese Position ist interessant, da DII/S4 maßgeblich am Aktivierungsvorgang der Nav-Kanäle beteiligt ist (Bezanilla, 2000; Han et al., 2015). Dies wird z.B. durch toxikologische Studien belegt, die zeigen, dass dieser Spannungssensor durch Peptidtoxine fixiert werden kann und dadurch die Kanalaktivierung verstärkt oder vermindert wird (Cestèle et al., 1998; Leipold et al., 2012). Da sich W684L unmittelbar hinter dem Spannungssensor befindet, liegt die Vermutung nahe, dass die Schalteigenschaften der Kanäle durch den AS-Austausch beeinflusst werden könnten. Um die Auswirkungen von W684L auf die Kanalfunktion zu untersuchen, wurden die Kanäle in dKO-DRG-Neuronen zur Expression gebracht und mittels *Patch-Clamp*-Technik Schalteigenschaften und Auswirkungen auf die neuronale Erregbarkeit untersucht. Um den Temperatureinfluss zu untersuchen, wurden die Experimente sowohl bei 20 °C als auch bei 12 °C durchgeführt. Die Experimente bei niedrigen Temperaturen simulierten die Bedingungen, unter denen die Schmerzepisoden ausgelöst werden. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen sind in Abb. 21-23 dargestellt.



**Abbildung 21: W684L hat milde Auswirkungen auf die Kanalaktivierung.** (A) Repräsentative Stromspuren von Nav1.9 und Nav1.9-W684L, aufgenommen in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte). (B) Mittlere Peakstromdichten aus Experimenten wie in A, als Funktion der Testpulsspannung, gemessen bei 20 °C. (C) Daten wie in A, erhoben bei 12°C. (D) Repräsentative Stromspuren bei einer Deaktivierungsspannung von -80 mV. (E) Zeitkonstanten der Deaktivierung ( $\tau_d$ ) und Aktivierung ( $\tau_m$ ) als Funktion der Testpulsspannung für Nav1.9 (schwarz) und Nav1.9-W684L (rot), gemessen bei 20 °C. (F) Daten wie in E, gemessen bei 12 °C. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in B, C, E und F sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben.

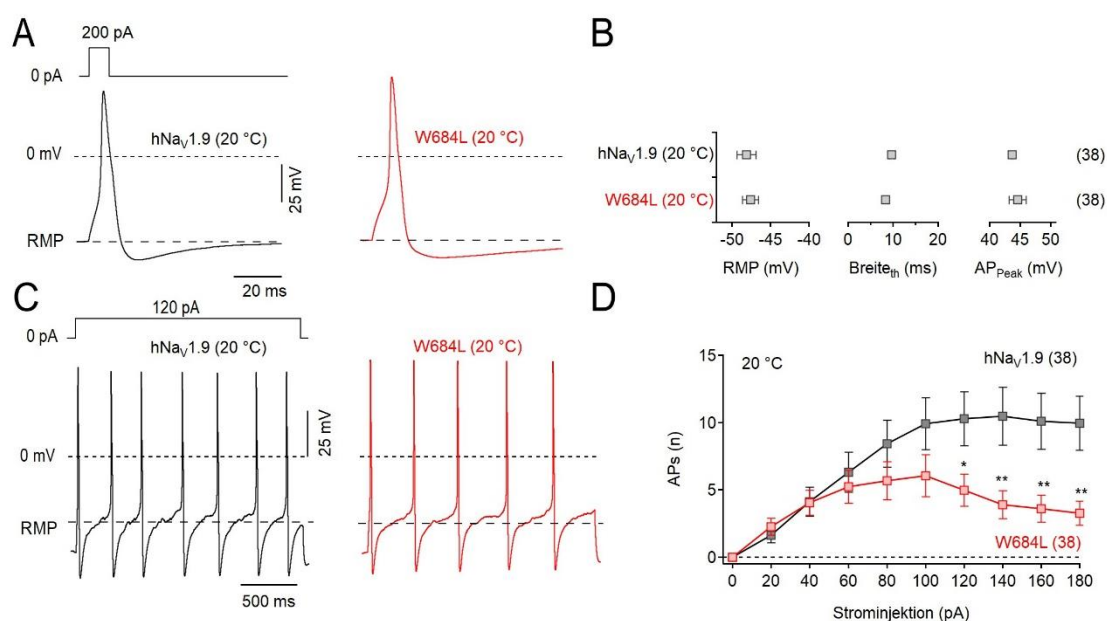
Die Kanalvariante Nav1.9-W684L zeigte eine solide funktionelle Expression. Im Vergleich zum Nav1.9-Wildtyp war die Stromdichte bei Nav1.9-W684L bei 20 °C leicht erhöht (Abb. 21B). Für den Wildtyp wurde eine maximale Peakstromdichte von  $-95 \pm 21.0$  pA/pF bei -40 mV gemessen und für W684L eine maximale Peakstromdichte in Höhe von  $-136.3 \pm 28.9$  pA/pF bei -30 mV. Allerdings wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) war bei der Variante W684L im Vergleich zum Wildtyp um 4 mV zu depolarisierten Potentialen verschoben ( $p > 0.05$ ). Für den Wildtyp betrug  $V_m$   $-52.9 \pm 2.1$  mV und für W684L  $-48.8 \pm 1.9$  mV. Die dazugehörigen  $k_m$ -Werte, die die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung charakterisieren, betragen  $8.1 \pm 0.8$  mV für den Wildtyp und  $7.5 \pm 0.7$  mV für W684L ( $p > 0.05$ ).

Bei Absenkung der Temperatur auf 12 °C war die Peakstromdichte für beide Kanäle reduziert. Für W684L zeigte sich im Spannungsfenster von -50 bis -20 mV eine signifikante Reduktion des Peakstroms ( $p < 0.05$ ). Für den Wildtyp hingegen war die Peakstromreduktion nicht signifikant ( $p > 0.05$ ). Beim Vergleich der Stromdichten von Wildtyp und W684L bei 12 °C (Abb. 21C) war eine signifikant verminderte Peakstromdichte im Spannungsfenster von -60 bis -50 mV bei der Mutante erkennbar (Abb. 21C,  $p < 0.05$ ). Zudem waren bei niedrigeren Temperaturen Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik zu höheren Potentialen verschoben. Bei Nav1.9-Wildtypkanälen verschob sich die halbmaximale Aktivierungsspannung um 8.1 mV und bei der Variante W684L um 12.4 mV zu höheren Potentialen. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) betrug für den Wildtyp  $-44.8 \pm 4.2$  mV und für W684L  $-36.4 \pm 1.9$  mV ( $p > 0.05$ ). Dabei war die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung von W684L mit  $9.9 \pm 0.8$  mV um 2.1 mV höher als die des Wildtyps mit  $7.8 \pm 1.2$  mV ( $p > 0.05$ ). Die Kinetik ließ zudem eine leicht beschleunigte Deaktivierung bei W684L-Kanälen erkennen (Abb. 21D-F), wobei jedoch nicht das Signifikanzniveau von  $p < 0.05$  erreicht wurde.



**Abbildung 22: Die Kanalaktivierung wird durch W684L nicht beeinflusst.** (A) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung ( $I_{500}/I_0$ ) als Funktion der Konditionierungsspannung, gemessen bei 20 °C und 12 °C. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung ( $G/G_{max}$ ) ist als gestrichelte Linie dargestellt. (B) Zeitkonstanten der schnellen Inaktivierung ( $\tau_{inact}$ ) bei 20 °C und bei 12 °C. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben.

Bei einer Reduktion der Temperatur auf 12 °C verschob sich die halbmaximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) für den Wildtyp um 12.6 mV hin zu höheren Potentialen ( $V_h$  20 °C Nav1.9:  $-61.61 \pm 2.3$  mV;  $V_h$  12°C Nav1.9:  $-49.02 \pm 4.3$  mV). Die Spannungsabhängigkeit  $k_h$  blieb unverändert und betrug bei 20 °C für den Wildtyp  $9.8 \pm 0.5$  mV und bei 12 °C  $10.5 \pm 1$  mV. Mit 17.3 mV war der Einfluss der Temperaturreduktion auf die halbmaximale Inaktivierungsspannung der W684L-Mutante etwas stärker ( $V_h$  20 °C W684L:  $-60.5 \pm 2.1$  mV;  $V_h$  12°C W684L:  $-43.18 \pm 2.6$  mV). Die Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung der W684L-Kanäle war temperaturunabhängig (20 °C:  $10.6 \pm 0.6$  mV, 12 °C:  $11.6 \pm 0.7$  mV). Wie in Abb. 22B zu sehen, verlangsamte die Temperaturabsenkung die Inaktivierungskinetik beider Kanäle jeweils um den Faktor von ca. 2. Sowohl bei 20 °C als auch bei 12 °C war die Inaktivierungskinetik von Wildtyp und Mutante nicht signifikant verschieden. Somit waren Nav1.9-Wildtyp und Nav1.9-W684L hinsichtlich ihrer Inaktivierungseigenschaften im gesamten analysierten Spannungsbereich ununterscheidbar.



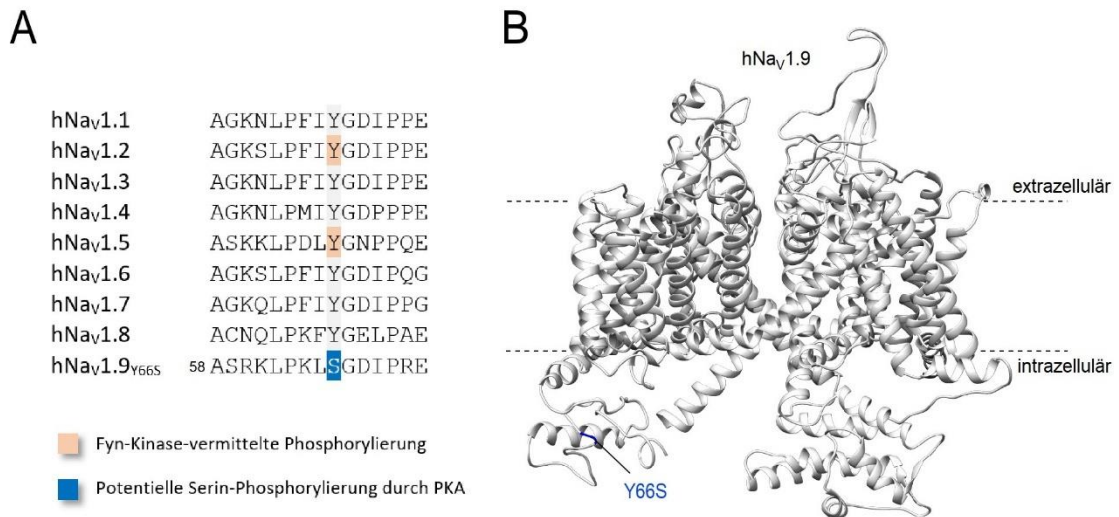
**Abbildung 23: W684L-Kanäle vermindern die Erregbarkeit muriner DRG-Neurone.** (A) Repräsentative Einzelaktionspotentiale als Antwort auf eine Strominjektion von 200 pA für 10 ms, gemessen in einem Wildtyp-DRG-Neuron, das entweder mit Nav1.9 oder W684L-kodierenden Plasmiden transfiziert wurde. (B) Charakteristika einzelner Aktionspotentiale, wie in A gezeigt. RMP: Ruhemembranpotential; Breite<sub>th</sub>: Breite am Schwellenwert; AP<sub>Peak</sub>: AP-Peakspannung (C) Repräsentative Trains repetitiver Aktionspotentiale als Antwort auf eine Strominjektion von 120 pA für 2 s. (D) Anzahl gefeuerter Aktionspotentiale aus Experimenten wie in C, als Funktion des injizierten Stroms. Die Datenpunkte in B und D sind Mittelwerte ± s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben. Alle Experimente wurden bei einer Temperatur von 20 °C durchgeführt. Die Signifikanzindikatoren beziehen sich auf einen zweiseitigen Student's t-Test. \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Um die Auswirkungen von W684L auf die neuronale Erregbarkeit zu untersuchen, wurden die Kanäle in Wildtyp-DRG-Neuronen exprimiert und *Current-Clamp*-Experimente durchgeführt. Als Kontrolle dienten Neurone, die mit Nav1.9-kodierenden Plasmiden transfiziert wurden. Zunächst wurden Einzel-APs evoziert und deren Form analysiert. Die Ergebnisse in Abb. 23 lassen erkennen, dass die Variante Nav1.9-W684L weder die AP-Breite am Schwellenwert (Breite<sub>th</sub>), die AP-Peakspannung (AP<sub>Peak</sub>) noch das Ruhemembranpotential (RMP) signifikant beeinflusst ( $p > 0.05$ ). Um den Einfluss der Variante auf die Erregbarkeit zu untersuchen, wurden systematisch repetitive APs durch kontinuierlich ansteigende Strominjektionen ausgelöst. Bei Stromstärken von 0-100 pA nahm die Feuerfrequenz der Nav1.9-exprimierenden Neurone kontinuierlich zu. Ab 120 pA setzte eine Sättigung der Feuerfrequenz ein (Abb. 23D). Die Feuerfrequenz der W684L-exprimierenden Neurone war bis zu Reizstärken von 60 pA mit denen der Kontrollgruppe vergleichbar. Bei höheren Stimulationsstromstärken sank die Feuerfrequenz hingegen deutlich unter die der Kontrollgruppe ab ( $p < 0.01$ ).

Zusammengefasst zeigen die elektrophysiologischen Daten, dass die Kinetik von Nav1.9 und der Variante Nav1.9-W684L, bei einem Absenken der Temperatur verlangsamt wird. Weiterhin ist ersichtlich, dass W684L-Kanäle im Vergleich zum Wildtyp bei geringfügig höheren Spannungen aktivieren, was eine milde *LOF*-Eigenschaft darstellt. Im Einklang damit feuerten W684L-exprimierende DRG-Neurone APs mit geringerer Frequenz.

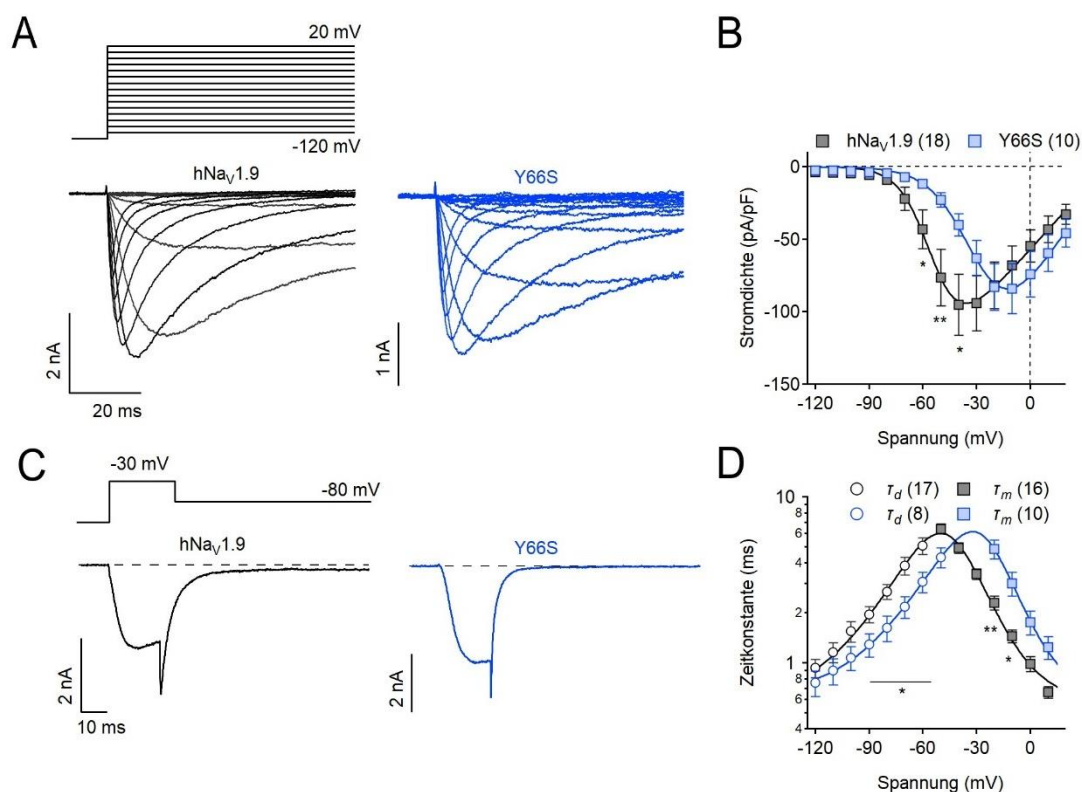
### **3.3.3 Charakterisierung potenziell Schmerz-auslösender Nav1.9-Y66S-Kanäle**

Eine weitere potenziell Schmerz-auslösende Nav1.9-Variante wurde in zwei Schmerzpatienten der Uniklinik Aachen in Kooperation mit Dr. Maike Dohrn identifiziert. Betroffen ist eine Mutter (59 J) und ihr Sohn (36 J), die beide mit einer *SFN* mit führend neuropathischer Schmerzsymptomatik diagnostiziert wurden. Es wurden keine relevanten autonomen Symptome beschrieben. Die Mutter berichtet von seit 8 Jahren andauernden brennenden und stechenden Schmerzattacken in der Peripherie ihres Körpers. Darüber hinaus leidet sie unter einer Thermhypästhesie der Füße und leichtgradigen sudomotorischen Funktionsstörungen. Auf der PainDETECT Skala erreichte die Mutter im Jahr 2019 einen Score von 21/38. Mittels Hautbiopsie wurde bei der Mutter eine reduzierte intraepidermale Faserdichte nachgewiesen, bei dem Sohn jedoch nicht. Bei ihrem Sohn setzten die Symptome vor ca. 9 Jahren ein. Zu den Leitsymptomen zählen Taubheits- und Kältegefühl an den Händen und Füßen, eine Überempfindlichkeit gegenüber Wärme sowie eine Hypästhesie der Füße für leichte Berührung und Kälte. Die Symptome verschlechterten sich tendenziell zwischen 2019 und 2021. Auf der PainDETECT Skala erreichte der Sohn einen Score von 8/38. Die quantitativ sensorische Testung war bei Mutter und Sohn wegweisend für eine A $\delta$ - und C-Faser-Dysfunktion (*SFN*). Mittels Neurographie konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden und eine (bekannte) erworbene Ursache für die Neuropathie ausgeschlossen werden. Durch Exomsequenzierung konnte eine Mutation im *SCN11A*-Gen identifiziert werden, die zu dem Austausch eines Tyrosins durch ein Serin an der Position 66 im N-Terminus von Nav1.9 führt.



**Abbildung 24: Lokalisation von Y66S in Nav1.9.** (A) AS-Sequenzen humaner Nav<sub>v</sub>-Kanäle im Bereich des N-Terminus. Das relevante Tyrosin (Y66 in hNav<sub>v</sub>1.9) ist in allen humanen Nav<sub>v</sub>-Kanälen konserviert. Basierend auf Untersuchungen an Nav<sub>v</sub>1.2 und Nav<sub>v</sub>1.5 ist das konservierte Y (rot) ein Target der Fyn-Kinase (Beacham et al., 2007; Iqbal et al., 2018). *In-silico*-Analysen legen zudem nahe, dass 66S in Nav<sub>v</sub>1.9 ein potenzielles Target für PKA (blau) ist. Die Ziffer vor dem Alignment entspricht der Position der ersten gezeigten AS in der Sequenz von hNav<sub>v</sub>1.9. (B) Seitenansicht auf ein Strukturmodell von Nav<sub>v</sub>1.9 mit Markierung der Position von Y66S im N-Terminus des Kanals.

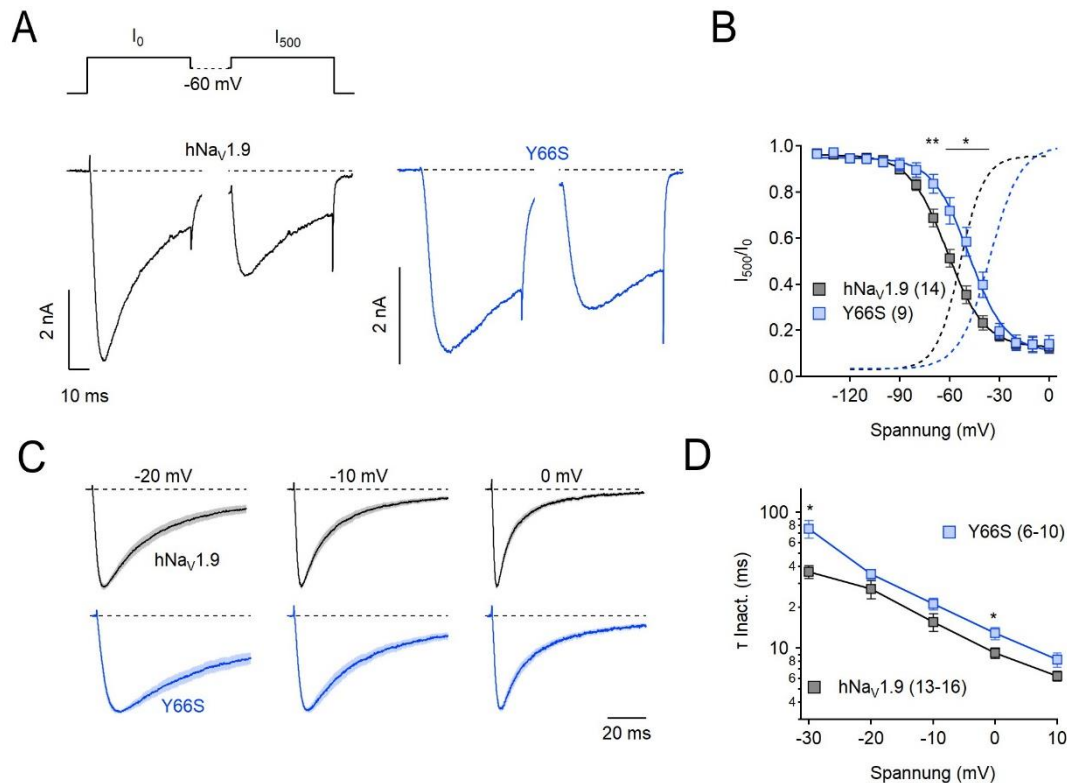
Das relevante Tyrosin (Y66 in hNav<sub>v</sub>1.9) ist in allen humanen Nav<sub>v</sub>-Kanälen konserviert (Abb. 24A). Funktionelle Untersuchungen der Kanalsubtypen Nav<sub>v</sub>1.2 und Nav<sub>v</sub>1.5 konnten bereits zeigen, dass an der homologen Position eine Fyn-Kinase-vermittelte Phosphorylierung erfolgt und durch einen AS-Austausch des Tyrosins zu Phenylalanin die Gleichgewichtsinaktivierung der Kanäle zu depolarisierten Potentialen verschoben wird (Beacham et al., 2007; Iqbal et al., 2018). Basierend auf prädiktiven Algorithmen (NetPhos 3.1) entsteht durch Y66S in Nav<sub>v</sub>1.9 zudem eine potenzielle Phosphorylierungsstelle für PKA. Die Klinik und die Genetik lassen vermuten, dass Y66S krankheitsauslösend ist. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde eine funktionelle Analyse der Variante Nav<sub>v</sub>1.9-Y66S durchgeführt. Analog zu vorangegangenen Abschnitten wurden hierfür Nav<sub>v</sub>1.9-Y66S-Kanäle in dKO-DRG-Neuronen exprimiert und daraufhin in *Voltage-Clamp*-Experimenten untersucht. Als Kontrolle diente Nav<sub>v</sub>1.9-Wildtyp. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 25-26 dargestellt.



**Abbildung 25: Nav1.9-Y66S-Kanäle zeigen eine verlangsamte Aktivierung und eine beschleunigte Deaktivierung.** (A) Repräsentative Stromspuren von Nav1.9-Wildtyp und Nav1.9-Y66S, aufgenommen in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte, oben) in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX. (B) Gemittelte Peakstromdichten aus Experimenten wie in A, als Funktion der Testpulsspannung. (C) Repräsentative Stromspuren während hyperpolarisierenden Pulsen von -30 mV auf -80 mV zur Auslösung der Kanaldeaktivierung. Das Pulsprotokoll ist links oben dargestellt. (D) Zeitkonstanten der Deaktivierung ( $\tau_d$ ) und Aktivierung ( $\tau_m$ ) als Funktion der Testpulsspannung für Nav1.9 (schwarz) und Nav1.9-Y66S (blau). Die Datenpunkte in B und D sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t-Test* getestet. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Verglichen mit Nav1.9-Wildtyp erwies sich die funktionelle Expression der Y66S-Kanäle als schwieriger, da die Mehrzahl der getesteten Neurone nur sehr geringe Stromdichten aufwiesen und somit keine detaillierte Analyse zuließen. Nur wenige Y66S-exprimierende Neurone generierten vergleichbar hohe Stromamplituden wie Neurone, die den Wildtyp exprimierten. Die Analyse der Y66S-exprimierenden Neurone lieferte eine mögliche Erklärung. Wie in Abb. 25B gezeigt, waren die Peakstromdichten der Y66S-Kanäle bei niedrigen Spannungen deutlich geringer als die der Wildtyp-Kanäle. Für Y66S-Kanäle war die Spannung bei halbmaximaler Kanalaktivierung ( $V_m$ ) um mehr als 15 mV zu positiven Potentialen verschoben. Für den Wildtyp betrug  $V_m$   $-52.9 \pm 2.1$  mV und für Y66S  $-36.5 \pm 2.8$  mV ( $p < 0.001$ ). Die dazugehörigen  $k_m$ -Werte, die die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung charakterisieren, waren nicht verändert (Y66S:  $9.2 \pm 0.6$  mV, Wildtyp:  $8.1 \pm 0.8$  mV,  $p > 0.05$ ). Kompatibel mit der Verschiebung der

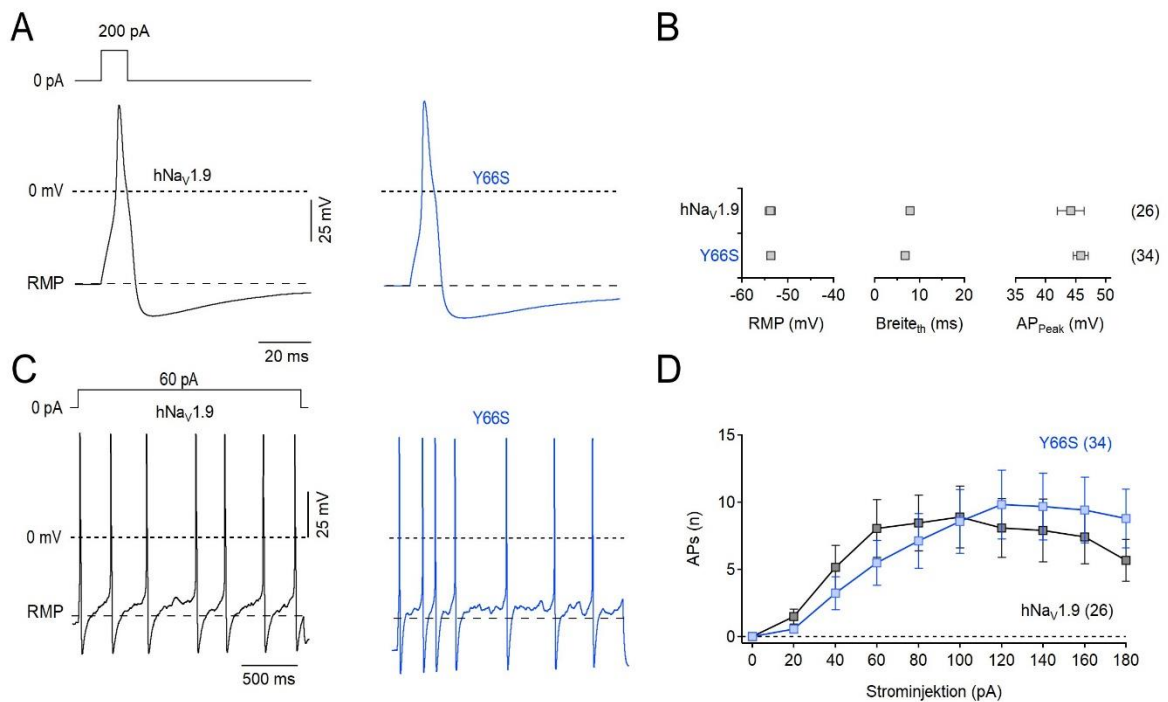
Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu höheren Membranpotentialen, wiesen Y66S-Kanäle eine verlangsamte Aktivierungskinetik sowie eine signifikant beschleunigte Deaktivierung auf (Abb. 25D).



**Abbildung 26: Y66S beeinflusst die Inaktivierung von Nav1.9.** (A) Repräsentative Stromspuren von Nav<sub>v</sub>1.9 und Nav<sub>v</sub>1.9-Y66S, aufgenommen in dKO-DRG-Neuronen als Antwort auf depolarisierende Spannungspulse vor (I<sub>0</sub>, links) und nach (I<sub>500</sub>, rechts) Konditionierung bei -60 mV. (B) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsinaktivierung (I<sub>500</sub>/I<sub>0</sub>) als Funktion der Konditionierungsspannung (durchgezogene Kurve). Die gestrichelten Kurven zeigen die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung (G/G<sub>max</sub>) und wurden aus den in Abb. 25B gezeigten Daten berechnet. (C) Gemittelte, Peak-normierte Stromantworten von Nav1.9 und Nav1.9-Y66S bei den angegebenen Membranspannungen, jeweils ± s.e.m. (schattierte Bereiche). Die Datenbasis waren Stromspuren wie in Abb. 25A gezeigt. Zu sehen ist eine verlangsamte Inaktivierung der Nav<sub>v</sub>1.9-Y66S-Kanäle. (D) Einfachexponentielle Zeitkonstante der schnellen Inaktivierung (τ<sub>inact</sub>) als Funktion der Testpulsspannung. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1 μM TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in B und D sind Mittelwerte ± s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t*-Test getestet: \*\**p* < 0.01, \**p* < 0.05.

Ähnlich wie die Aktivierungseigenschaften beeinflusste Y66S auch die Inaktivierungseigenschaften der Nav1.9-Kanäle. Die halbmaximale Spannung der Gleichgewichtsinaktivierung (V<sub>h</sub>) war um ca. 12 mV hin zu höheren Potentialen verschoben (Wildtyp: -61.6 ± 2.3 mV, Y66S: -49.3 ± 3.0 mV, *p* < 0.01). Der dazugehörige Steigungsfaktor wurde durch die Mutation nicht verändert (Nav1.9: 9.8 ± 0.5 mV, Y66S: 9.5 ± 0.5 mV). Die schnelle IFM-vermittelte Inaktivierung der Y66S-Kanäle war über den gesamten untersuchten Spannungsbereich verlangsamt (Abb. 26D). Bei -30 mV und 0 mV war der Effekt signifikant (*p* < 0.05). Zusammenfassend zeigen die Daten der

Voltage-Clamp-Experimente, dass  $\text{Na}_v1.9$ -Y66S-Kanäle sowohl *LOF*- (Kanalaktivierung) als auch *GOF*-Eigenschaften (Kanalinaktivierung) aufweisen.



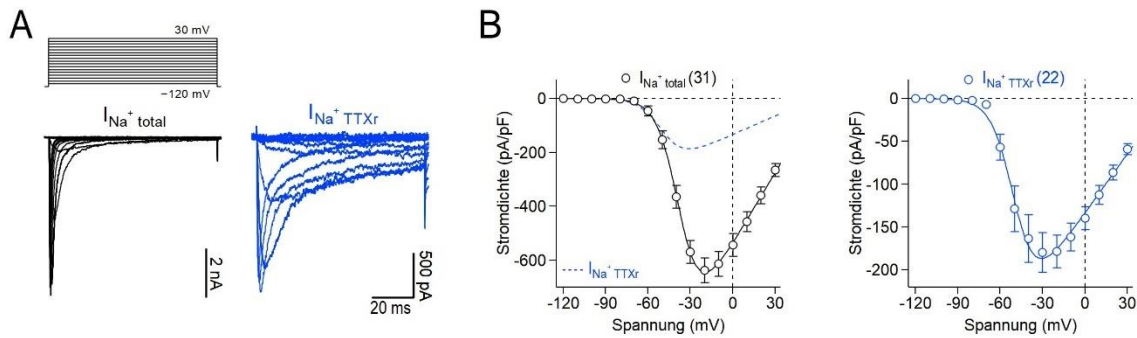
**Abbildung 27: Y66S-Kanäle wirken sich nicht auf das Feuerverhalten transfizierter DRG-Neurone aus.** (A) Repräsentative Einzelaktionspotentiale als Antwort auf eine Strominjektion von 200 pA für 10 ms, gemessen in Wildtyp-DRG-Neuronen, die entweder mit  $\text{Na}_v1.9$ -Wildtyp-kodierender (links) oder Y66S-kodierender DNA (rechts) transfiziert wurden. (B) Parameter zur Charakterisierung einzelner Aktionspotentiale. RMP: Ruhemembranpotential; Brei<sub>th</sub>: Breite am Schwellenwert; AP<sub>peak</sub>: AP-Peakspannung (C) Repräsentative Trains repetitiver Aktionspotentiale als Antwort auf eine Strominjektion von 60 pA für 2 s. (D) Anzahl gefeuerter Aktionspotentiale aus Experimenten wie in C, als Funktion des injizierten Stroms. Die Datenpunkte in B und D sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben.

Wie sich diese Eigenschaften auf die AP-Charakteristika transfizierter DRG-Neurone auswirken, wurde in *Current-Clamp*-Experimenten untersucht. Die Ergebnisse dazu sind in Abb. 27 dargestellt. Zunächst wurden einzelne APs ausgelöst und deren Form analysiert. Anders als die *Voltage-Clamp*-Daten vermuten lassen, beeinflusste die Anwesenheit von Y66S in den DRG-Neuronen weder das RMP noch die Breite oder die maximale Spannung des AP-Peaks. Repetitives Feuern wurde mit zwei-sekündlichen, systematisch ansteigenden Strominjektionen ausgelöst. Im Vergleich zur Kontrollgruppe feuerten Y66S-exprimierende Neurone zwar tendenziell weniger APs bei geringen Reizstärken ( $< 100$  pA) und mehr bei höheren Reizstärken ( $> 100$  pA), doch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ( $p > 0.05$ ). Insgesamt zeigen die Daten, dass der Austausch Y66S sowohl die Aktivierung als auch die Inaktivierung der  $\text{Na}_v1.9$ -Kanäle deutlich beeinträchtigt und ihnen damit sowohl *LOF*- als auch *GOF*-Eigenschaften verleiht. Weiterhin zeigen die Daten, dass sich diese physiologisch

entgegengesetzt wirkenden Funktionsveränderungen kaum auf die Erregbarkeit transfizierter DRG-Neurone auswirken.

### **3.3.4 Analyse Analgesie- und Obstipation-assoziiertes Nav1.9-L396P-Kanäle in murinen enterischen Neuronen**

Genetisch bedingte Nav1.9-assoziierte Schmerzerkrankungen werden häufig von gastrointestinalen Beschwerden, wie Obstipation oder Diarrhö begleitet (Huang et al., 2014; King et al., 2017; Leipold et al., 2013, 2015; Okuda et al., 2016; Phatarakijirund et al., 2016; Zhao et al., 2022). Vor allem die Analgesie-auslösenden Varianten gehen mit intensiver Darmproblematik einher, was in einigen Fällen eine phasenweise parenterale Ernährung erforderlich macht (Leipold et al., 2013). Der Zusammenhang der Mutationen mit Schmerz und Analgesie wurde bereits für viele der bekannten *SCN11A*-Mutationen untersucht – oft unter der Nutzung isolierter DRG-Neurone für die Kanalexpression (Han et al., 2015; Huang et al., 2014; King et al., 2017; Leipold et al., 2013, 2015). Allerdings existieren keine Daten zur Funktionsweise der Mutanten in enterischen Neuronen bzw. dazu, wie sie sich auf die Erregbarkeit enterischer Neurone auswirken. Der primäre Grund dafür ist die aufwendige und oft nur unzureichende Gewinnung enterischer Neurone aus Versuchstieren, wie etwa Mäusen. Um die Untersuchung der Kanäle in enterischen Neuronen zu ermöglichen, wurde deshalb eine Methodik entwickelt, die die Isolation viabler enterischer Neurone aus Mausgewebe und ihre transiente Transfektion sowie elektrophysiologische Untersuchung ermöglicht (Kuehs et al., 2022). Diese Methode wurde zunächst dazu eingesetzt, enterische Neurone von Wildtypmäusen hinsichtlich ihrer endogenen Nav-vermittelten Stromantworten zu untersuchen. Um zwischen TTXr und TTXs Na<sup>+</sup>-Strömen differenzieren zu können, erfolgten zunächst *Voltage-Clamp*-Experimente in der Abwesenheit und anschließend in der Gegenwart von 1 µM TTX. Eine repräsentative Darstellung der endogenen Nav-vermittelten Stromantworten muriner enterischer Wildtypneurone ist in Abb. 28 zu sehen.

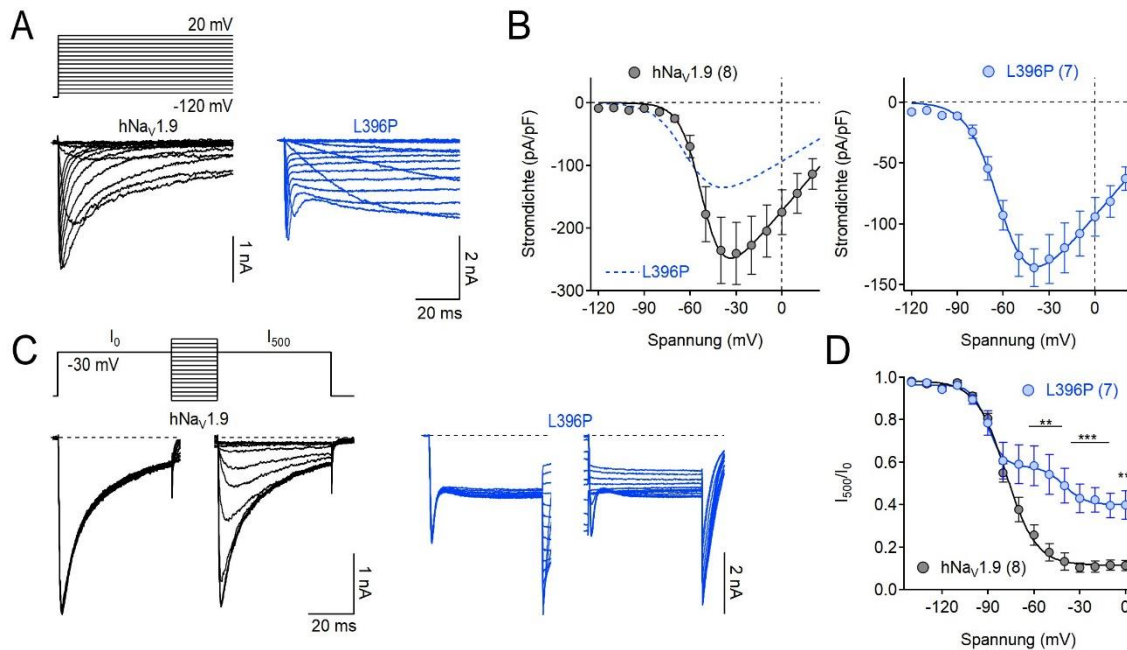


**Abbildung 28: Endogene Nav-vermittelte Na<sup>+</sup>-Ströme in murinen enterischen Wildtyp-Neuronen.** (A) Repräsentative Stromspuren muriner enterischer Wildtyp-Neurone als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -120 mV bis 30 mV (10 mV Schritte) ohne (links, total) und in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX (rechts, TTXr). (B) Gemittelte Peakstromdichten aus Experimenten wie in A gezeigt, ohne (links) und mit TTX-Applikation (rechts) als Funktion der Testpulsspannung. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Datenfit der TTXr-Ströme ( $I_{Na^+ TTXr}$ ) dem Datenfit der Gesamtströme ( $I_{Na^+ total}$ ) als gestrichelte Kurve überlagert (links, blau). Die Daten in B sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben.

Unter Kontrollbedingungen waren mehrheitlich schnell aktivierende Na<sup>+</sup>-Ströme messbar, die eine maximale Peakstromdichte von  $-637.0 \pm 46.2$  pA/pF bei -20 mV erreichten. Durch die Applikation von 1  $\mu$ M TTX wurde spezifisch die schnell inaktivierende Stromkomponente inhibiert und die maximale Peakstromdichte auf  $-191.6 \pm 27.3$  pA/pF reduziert. Die TTXr Stromantworten wiesen zwei klar unterscheidbare Komponenten auf: Bei den Untersuchungen war eine schnell aktivierende, schnell inaktivierende Komponente sichtbar, die von einer weiteren, für Nav1.9 typischen, sehr langsam inaktivierenden Komponente überlagert wurde. Enterische Neurone unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Ausstattung an TTXr Nav-Kanälen deutlich von DRG-Neuronen. Anders als DRG-Neurone exprimieren sie keine Nav1.8-Kanäle, jedoch exprimieren sie den langsam schaltenden Nav1.9- sowie den ebenfalls TTX-resistenten Kanal Nav1.5 (Osorio et al., 2014). Letzterer ist durch eine schnelle Aktivierungs- und Inaktivierungskinetik gekennzeichnet (Osorio et al., 2014). Die beiden Komponenten der TTXr Ströme repräsentieren somit die Beiträge von Nav1.5 und Nav1.9.

In einem nächsten Schritt wurde die Methode dazu eingesetzt, die Kanalvariante Nav1.9-L396P zu untersuchen. Diese Variante wurde bei einem 16 Monate alten Jungen identifiziert, der an Analgesie und schwerer Obstipation leidet (King et al., 2017). Die vorangegangenen Untersuchungen von King et al. erfolgten in Nav1.9-KO-DRG-Neuronen als Expressionssystem und wurden in einem begrenzten Spannungsfenster durchgeführt. Aufgrund von geringen Stromamplituden konnten keine Aussagen zu der schnellen Kanalinaktivierung gemacht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde die Funktion von L396P-Kanälen nun erstmals in murinen enterischen Neuronen untersucht. Dazu wurden

enterische Neurone nach Isolation mit Kanal-kodierender DNA für Nav<sub>v</sub>1.9-Wildtyp oder Nav<sub>v</sub>1.9-L396P transfiziert und anschließend in *Voltage-Clamp*-Experimenten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX untersucht.



**Abbildung 29: Funktionelle Expression von Nav<sub>v</sub>1.9-L396P-Kanälen in murinen enterischen Neuronen.** (A) Repräsentative Stromantworten von enterischen Wildtyp-Neuronen transfiziert mit DNA-Konstrukten, kodierend für Nav<sub>v</sub>1.9- oder Nav<sub>v</sub>1.9-L396P-Kanäle als Antwort auf repetitive Spannungspulse von -130 mV bis 20 mV (10 mV Schritte, oben). (B) Gemittelte Peakstromdichten aus Experimenten wie in A, als Funktion der Testpulsspannung. Zum besseren Vergleich wurde der L396P-Datenfit (gestrichelte Linie) den Wildtyp-Daten überlagert. (C) Repräsentative Stromantworten von Nav<sub>v</sub>1.9 und Nav<sub>v</sub>1.9-L396P-Kanälen, aufgenommen in Wildtyp-Darmneuronen als Antwort auf -30 mV Testpulse vor ( $I_0$ ) und nach ( $I_{500}$ ) einem 500 ms andauernden Konditionierungsintervall von -140 bis 0 mV (10 mV Schritte). (D) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichts-inaktivierung als Funktion der Konditionierungsspannung, erhalten aus Experimenten wie in C gezeigt. Die Datenfits erfolgten mit Boltzmann-Funktionen nach Gleichung 2.10. Hervorzuheben ist, dass die Ströme der L396P-exprimierenden Neurone neben einer biphasischen Spannungsabhängigkeit der Kanal-inaktivierung eine ausgeprägte nicht inaktivierende Stromkomponente aufweisen. Alle Aufnahmen erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in B und D sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t*-Test ermittelt. \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Mit Nav<sub>v</sub>1.9-kodierender DNA transfizierte enterische Neurone (Abb. 29A, links) zeigten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX, ähnlich wie nicht-transfizierte Neurone (Abb. 28A, rechts), zwei Stromkomponenten. Erwartungsgemäß verstärkte die Überexpression von Nav<sub>v</sub>1.9 in enterischen Neuronen die langsam inaktivierende Nav<sub>v</sub>1.9-spezifische Stromkomponente. Die maximale Peakstromdichte lag bei  $-230 \pm 51.5$  pA/pF und wurde bei -30 mV erreicht. Die halbmaximale Aktivierungsspannung der Nav<sub>v</sub>-vermittelten Na<sup>+</sup>-Ströme lag bei  $-64.2 \pm 1.5$  mV. Der dazugehörige Steigungsfaktor zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung betrug  $10.5 \pm 0.8$  mV. Darmneurone, die mit L396P-Kanal-kodierender DNA transfiziert wurden, zeigten zusätzlich zu den schnell

aktivierenden und inaktivierenden Strömen eine ausgeprägte nicht inaktivierende Stromkomponente (Abb. 29A, rechts). Dies zeigt klar, dass L396P-Kanäle nahezu inaktivierungsdefizient sind. Die Stromdichte der L396P-exprimierenden Neurone war mit  $-99 \pm 18.7$  pA/pF im Vergleich zum Wildtyp vermindert. Zusätzlich war die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) um ca. 15 mV hin zu hyperpolarisierten Potentialen verschoben ( $-78.9 \pm 2.3$  mV,  $p < 0.001$ ). Die Analyse der Gleichgewichtsinaktivierung zeigte für Nav1.9-Wildtyp-exprimierenden Darmneuronen eine halb-maximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) von  $-77.3 \pm 2.6$  mV mit einem Steigungsfaktor von  $10.0 \pm 0.4$  mV. Demgegenüber wiesen Darmneurone, die die L396P-Variante exprimierten, zwei klar unterscheidbare Stromkomponenten auf (Abb. 29D). Von diesen beiden Komponenten kann eine den endogenen TTXr Kanälen Nav1.5 und Nav1.9 zugeordnet werden ( $V_{h1}$ :  $-90.6 \pm 3.9$  mV) und die zweite Komponente den inaktivierungsdefizienten L396P-Kanälen ( $V_{h2}$ :  $-39.0 \pm 3.4$  mV).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse eine erfolgreiche Überexpression humaner Nav1.9-Kanäle in isolierten murinen enterischen Neuronen. Die Resultate bestätigen, dass L396P den Nav1.9-Kanälen *GOF*-Eigenschaften verleiht (King et al., 2017) und zeigen zudem erstmals, dass L396P zu einem nahezu vollständigen Inaktivierungsverlust der Nav1.9-Kanäle führt.

### **3.4 Analyse der ROS-Sensitivität Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle**

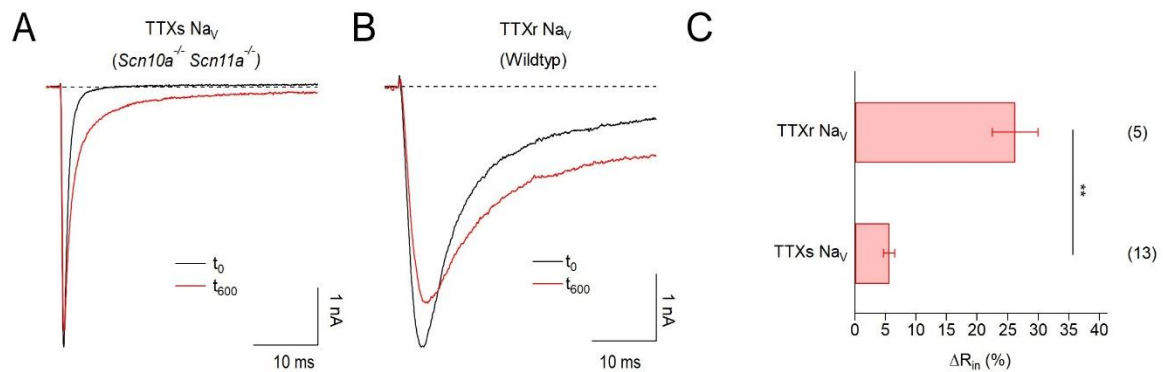
Nicht nur Mutationen in den Kanal-kodierenden Genen beeinflussen die Funktionsweise Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle, sondern auch posttranslationale Prozesse, wie etwa die Oxidation vulnerabler AS-Ketten durch ROS, können die Funktionsweise der Kanäle modulieren (Schink et al., 2016; B. J. Smith et al., 2023). Inwieweit sich ROS-abhängige Funktionsveränderungen der Nav-Kanäle auf die Nozizeptoren auswirken, ist noch nicht abschließend geklärt. Jedoch scheinen erhöhte ROS-Level mit Schmerzkrankungen unterschiedlicher Ätiologie in Verbindung zu stehen (Janes et al., 2012; Ndengele et al., 2008; Salvemini et al., 2011). In diesem Zusammenhang sind Superoxid und dessen Folgeprodukt Peroxynitrit von besonderer Bedeutung (Janes et al., 2012; Salvemini et al., 2011). In Proteinen greift diese Spezies bevorzugt die schwefelhaltigen AS Methionin und Cystein an (Hoshi & Heinemann, 2001). Davon sind auch Nav-Kanäle betroffen, denn sie besitzen zahlreiche Methionine, unter anderem auch in den inaktivierungsrelevanten Bereichen, wie z.B. dem IFM-Motiv (Kassmann et al., 2008). Diese AS-Reste machen die

Nav-Kanäle empfindlich gegenüber ROS, was sich vor allem in zwei prominenten Effekten äußert: Zum einen kommt es zu einem Verlust der schnellen IFM-vermittelten Kanalinaktivierung und zum anderen zu einer Reduktion der Na<sup>+</sup>-Stromamplitude (Higure et al., 2003; Kassmann et al., 2008). In DRG-Neuronen wurde Nav1.8 bereits als wichtiges ROS-Target identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Kanal im Vergleich zu den dort exprimierten TTXs-Nav-Kanälen eine deutlich höhere Empfindlichkeit gegenüber ROS aufweist (Schink et al., 2016; Schlüter & Leffler, 2016). Weiterhin ist bekannt, dass erhöhte ROS-Level die Erregbarkeit von DRG-Neuronen beeinflussen und dass diese Veränderungen zu einem großen Teil auf die ROS-abhängige Modulation von Nav1.8 zurückzuführen ist (Schink et al., 2016). Welche Rolle Nav1.9 in diesem Kontext spielt, ist unklar. Aufgrund seiner schwierigen Handhabbarkeit existieren bislang keine Daten zur ROS-Sensitivität von Nav1.9. Mit Hilfe der dKO-DRG-Neurone als Expressionssystem wurden nun erstmals die Auswirkungen von ROS auf Nav1.9 untersucht. Als schaltbare ROS-Quelle wurde der Fluoreszenzfarbstoff *Lucifer Yellow* (LY) genutzt, der über die Patchpipette in die zu untersuchenden Neurone eingebracht und anschließend durch Bestrahlung mit Licht niedriger Wellenlänge zur Produktion von Superoxid angeregt wurde (Higure et al., 2003; Kassmann et al., 2008; Takeuchi & Yoshii, 2008). Die Auswirkungen der erzeugten Radikale auf die Funktionsweise der Kanäle wurde anschließend in *Voltage-Clamp*-Experimenten untersucht.

### **3.4.1 TTX-resistente Nav-Kanäle zeigen eine höhere ROS-Sensitivität als TTX-sensitive Nav-Kanäle**

Zunächst wurden die Auswirkungen von ROS auf die endogene Population DRG-spezifischer Nav-Kanäle untersucht. Um zwischen endogenen TTXs und TTXr-Kanälen zu unterscheiden, kamen DRG-Neurone aus dKO- bzw. Wildtyp-Mäusen zum Einsatz. Die dKO-DRG-Neurone wurden verwendet, da sie ausschließlich TTXs Nav-Kanäle exprimieren. Im Gegensatz dazu ermöglichten die Wildtyp-DRG-Neurone die gezielte Analyse von TTXr Nav-vermittelten Na<sup>+</sup>-Strömen, die auf die Aktivität endogener Nav1.8- und Nav1.9-Kanäle zurückzuführen sind (Tate et al., 1998). Die Neurone wurden über die Patchpipette mit LY beladen. Da LY bei fehlender Lichtanregung inert ist, wurden Kontrollexperimente ohne Bestrahlung durchgeführt. Die Generierung von Superoxid wurde durch das Bestrahlen mit blauem Licht (452-487 nm) gestartet (Takeuchi & Yoshii, 2008) und die Kanalaktivität parallel dazu aufgezeichnet. Wie in Abb. 30 dargestellt ist, führte die

Erzeugung LY-vermittelter ROS sowohl bei TTXs als auch bei TTXr Na<sub>V</sub>-Subtypen zu funktionellen Veränderungen, die sich primär in einer Verlangsamung der Inaktivierungskinetik der Kanäle manifestierten. Der Inaktivierungsindex R<sub>in</sub>, der den Anteil nicht inaktivierender Na<sub>V</sub>-Kanäle widerspiegelt, wurde vor und nach 10-minütiger ROS-Exposition bestimmt und daraus der ROS-abhängige Inaktivierungsverlust der Kanäle ( $\Delta R_{in}$ ) ermittelt.



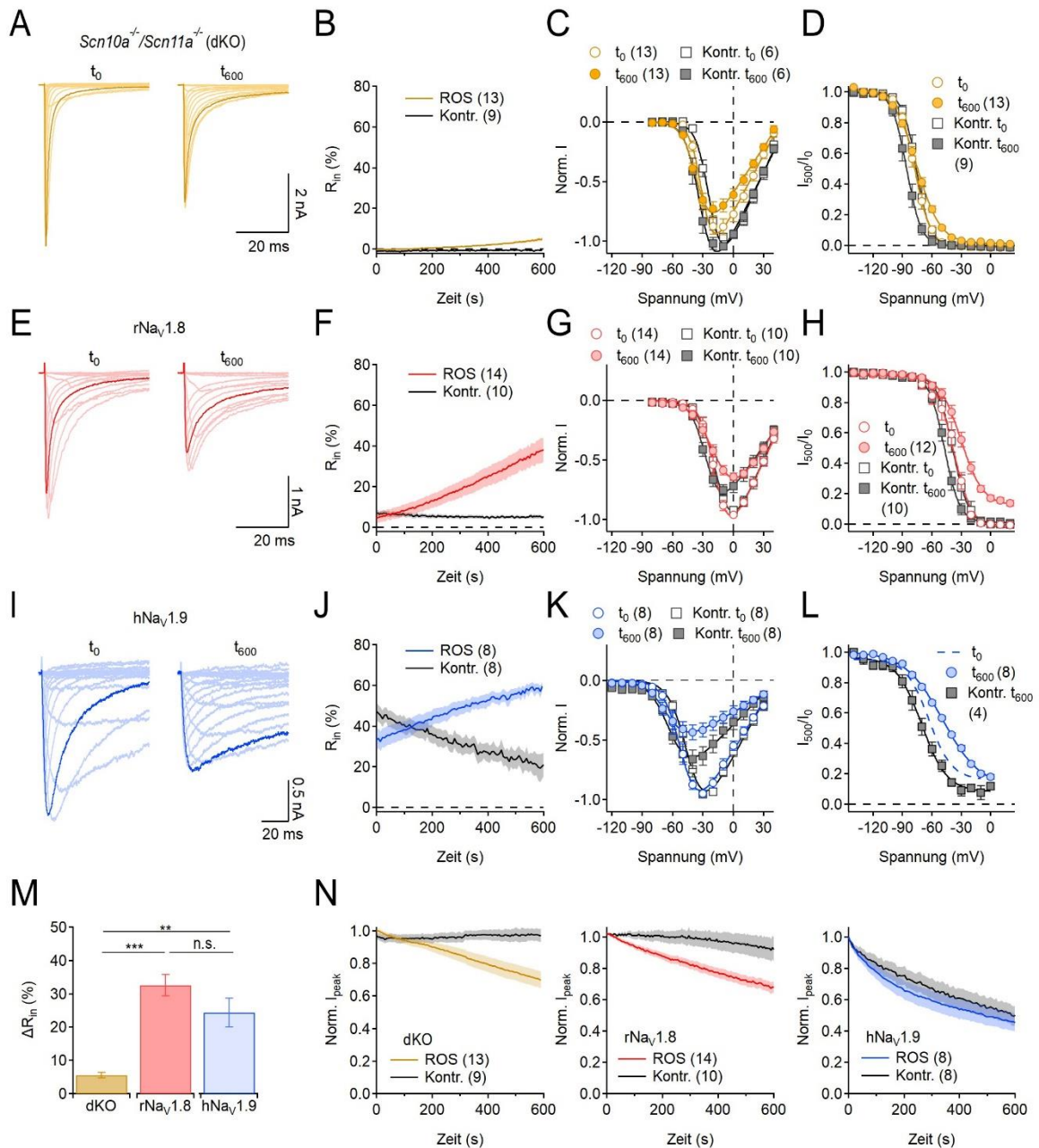
**Abbildung 30: DRG-spezifische TTXr Na<sub>V</sub>-Kanäle weisen eine höhere ROS-Sensitivität auf als TTXs Na<sub>V</sub>-Kanäle.** (A) Repräsentative Stromspuren endogener TTXs Na<sub>V</sub>-Ströme, gemessen in einem *Scn10a*<sup>-/-</sup>/*Scn11a*<sup>-/-</sup>-DRG-Neuron, vor (schwarz) und nach (rot) 10-minütiger ROS-Exposition. Als ROS-Quelle dienten 100  $\mu$ M LY in der Patchpipette, das durch Bestrahlung mit blauem Licht (452-487 nm) dazu angeregt wurde, Superoxid freizusetzen. (B) Experiment wie in A, mit einem Wildtyp-DRG-Neuron in Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX. (C) ROS-abhängiger Verlust der schnellen Kanalinaktivierung  $\Delta R_{in}$  in Prozent, basierend auf Daten wie in A und B gezeigt. Die Datenbalken in C sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen analysierter Neurone sind in Klammern angegeben. Die Signifikanz zwischen den Datengruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t*-Test getestet: **\*\**p* < 0.01**.

Beim Vergleich der TTXs und TTXr Na<sub>V</sub>-vermittelten Na<sup>+</sup>-Ströme wurde beobachtet, dass infolge einer 10-minütigen ROS-Exposition, TTXr Kanäle einen stärkeren Inaktivierungsverlust erleiden als TTXs Kanäle. Der Verlust der Kanalinaktivierung, ausgedrückt durch  $\Delta R_{in}$ , betrug für TTXr Kanäle  $26.2 \pm 3.8$  % und für TTXs Kanäle  $5.6 \pm 0.9$  % ( $p < 0.01$ ). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit früheren Untersuchungen, in denen gezeigt wurde, dass Na<sub>V</sub>1.8, der den Großteil der TTXr Na<sub>V</sub>-Kanäle in DRG-Neuronen ausmacht, besonders sensitiv für eine Modulation durch ROS ist (Schink et al., 2016). Ob und in welchem Ausmaß auch Na<sub>V</sub>1.9 durch ROS moduliert wird, lässt sich aus den Daten nicht ableiten, da der Na<sub>V</sub>1.9-Anteil am TTXr-Strom in den Neuronen einerseits variabel ist und andererseits nicht präzise ermittelt werden kann.

### 3.4.2 Intrazelluläre ROS beeinträchtigen die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9-Kanälen

Nachdem die unterschiedlichen ROS-Sensitivitäten von TTXs und TTXr Nav-Kanälen in DRG-Neuronen grundsätzlich bestätigt werden konnten, wurden nun die Auswirkungen von ROS auf die Schalteigenschaften von TTXs Nav-Kanälen sowie Nav1.8 und Nav1.9 im Detail untersucht. Dazu wurden Experimente sowohl mit nicht transfizierten als auch mit Nav1.8- bzw. Nav1.9-transfizierten dKO-DRG-Neuronen durchgeführt. Zusätzlich wurden die Schalteigenschaften der Kanäle vor ( $t_0$ ) und nach ( $t_{600}$ ) 10-minütiger ROS-Exposition analysiert. Um zwischen ROS-abhängigen und -unabhängigen Effekten unterscheiden zu können, wurde zudem ein identischer Datensatz in Abwesenheit von ROS erhoben. Bei diesen Kontrollmessungen wurde die 10-minütige ROS-Exposition durch eine Dunkelphase ersetzt, in der keine ROS generiert wurden.

Im Hinblick auf die TTXs Nav-Kanäle bewirkte die ROS-Exposition einen Verlust der schnellen Kanalinaktivierung ( $\Delta R_{in}$ ) um  $5.6 \pm 0.9 \%$ , begleitet von einer Peakstromreduktion von  $\sim 30 \%$ . Beides wurde in den Kontrollexperimenten (ohne ROS) nicht beobachtet. Die halbmaximale Aktivierungsspannung lag zum Zeitpunkt  $t_0$  bei  $-39.2 \pm 1.1$  mV und sank nach ROS-Exposition ( $t_{600}$ ) auf  $-47.5 \pm 1.2$  mV ( $p < 0.001$ ). Eine vergleichbare Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung konnte unter Kontrollbedingungen in Abwesenheit von ROS beobachtet werden ( $t_0$ :  $-37.7 \pm 2.4$  mV,  $t_{600}$ :  $-48.5 \pm 3.0$  mV,  $p < 0.001$ ), was darauf hindeutet, dass der Effekt rein zeitabhängig und damit unabhängig von ROS war. Die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung ( $k_m$ ) blieb unter Kontrollbedingungen unverändert ( $t_0$ :  $7.3 \pm 0.8$  mV,  $t_{600}$ :  $7.2 \pm 0.9$  mV,  $p > 0.05$ ), erhöhte sich jedoch leicht nach ROS-Exposition ( $t_0$ :  $6.9 \pm 0.4$  mV,  $t_{600}$ :  $8.8 \pm 0.5$  mV,  $p < 0.01$ ). Während die halbmaximale Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) unter Kontrollbedingungen zu niedrigeren Potentialen verschoben wurde ( $t_0$ :  $-75.8 \pm 2.2$  mV,  $t_{600}$ :  $-85.8 \pm 2.4$  mV,  $p < 0.001$ ), bewirkte die ROS-Applikation eine Verschiebung von  $V_h$  zu höheren Potentialen ( $t_0$ :  $-77.6 \pm 1.6$  mV,  $t_{600}$ :  $-75.3 \pm 1.7$  mV,  $p > 0.05$ ) und führte damit zu einer gesteigerten Kanalverfügbarkeit. Nach 10-minütiger ROS-Exposition war die Spannungsabhängigkeit der Kanalinaktivierung ( $k_h$ ) zudem erhöht ( $t_0$ :  $7.2 \pm 0.4$  mV,  $t_{600}$ :  $11.4 \pm 0.3$  mV,  $p < 0.001$ ). In der Summe zeigte sich für TTXs Nav-Kanäle, dass LY-abhängige ROS den Kanalstrom reduzieren, die Kanalinaktivierung beeinträchtigen und die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung geringfügig erhöhen.



**Abbildung 31: Nav1.9 besitzt eine ähnlich hohe ROS-Sensitivität wie Nav1.8.** (A) Repräsentative Stromspuren von TTXs  $Na_V$ -Strömen, gemessen in einem dKO-DRG-Neuron, vor ( $t_0$ ) und nach 10-minütiger ROS-Exposition ( $t_{600}$ ). (B) Entwicklung des Inaktivierungsindex  $R_{in}$  (%) während einer 10-minütigen Aufzeichnung ohne (Kontr.) und mit (ROS) Applikation LY-vermittelter ROS. (C) Normierte, gemittelte Peakstromamplituden aus Experimenten wie in A gezeigt, als Funktion der Testpulsspannung. Die Messungen erfolgten vor ( $t_0$ ) und nach ( $t_{600}$ ) 10-minütiger ROS-Exposition (gelb) bzw. analog dazu ohne ROS-Exposition unter Kontrollbedingungen (Kontr., grau). (D) Spannungsabhängigkeit der Gleichgewichtsaktivierung. Analog zu C erfolgten die Messungen vor ( $t_0$ ) und nach ( $t_{600}$ ) 10-minütiger ROS-Exposition (gelb) bzw. in Abwesenheit von ROS (Kontr., grau). (E-H) Identische Experimente wie in A-D wurden mit transfizierten dKO-DRG-Neuronen durchgeführt, die entweder *rNav1.8* (E-H) oder *hNav1.9* (I-L) exprimierten. Um endogene TTXs  $Na_V$ -Ströme in den dKO-DRG-Neuronen zu inhibieren, wurde der Badlösung 1  $\mu$ M TTX zugesetzt (M)  $\Delta R_{in}$  endogener TTXs  $Na_V$ -Kanäle, sowie heterolog exprimierter *rNav1.8*- und *hNav1.9*-Kanäle, basierend auf Experimenten wie in B, F und J gezeigt. (N) Normierte Peakstromantworten während ROS-Applikation (ROS) sowie unter Kontrollbedingungen (Kontr.). Die Aufnahmen in E-L erfolgten in der Gegenwart von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung. Die Datenpunkte in B-D, F-H und J-N sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m. Die Anzahlen der analysierten Neurone sind in Klammern angegeben. Signifikanzindikatoren: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Nav1.8-Kanäle zeigten qualitativ ähnliche Veränderungen bei ROS-Exposition, wobei die Auswirkungen auf die Kanalinaktivierung deutlich stärker ausgeprägt waren. Während die Reduktion des Peakstroms mit ~30 % ähnlich hoch wie bei den TTXs Nav-Kanälen war, fiel der Inaktivierungsverlust  $\Delta R_{in}$  mit  $32.9 \pm 3.3$  % um ein Vielfaches höher aus ( $p < 0.001$ ). Auf die Aktivierungsparameter hatte die ROS-Exposition nur geringe Auswirkungen. Die halbmaximale Aktivierungsspannung ( $V_m$ ) war nach ROS-Exposition zu niedrigeren Potentialen verschoben ( $t_0$ :  $-27.5 \pm 2.2$  mV,  $t_{600}$ :  $-35.1 \pm 2.8$  mV,  $p < 0.001$ ), was jedoch auch unter Kontrollbedingungen (ohne ROS) beobachtet werden konnte ( $t_0$ :  $-26.0 \pm 2.7$  mV,  $t_{600}$ :  $-37.4 \pm 2.2$  mV,  $p < 0.001$ ). Wie bei den TTXs Nav-Kanälen deutet diese Beobachtung darauf hin, dass der Effekt zeitabhängig ist und nicht mit der ROS-Exposition im Zusammenhang steht. Die Spannungsabhängigkeit der Aktivierung änderte sich unter Kontrollbedingungen nicht ( $t_0$ :  $7.0 \pm 0.6$  mV,  $t_{600}$ :  $7.6 \pm 0.4$  mV), war jedoch nach ROS-Exposition erhöht ( $t_0$ :  $7.1 \pm 0.6$  mV,  $t_{600}$ :  $13.5 \pm 1.2$  mV,  $p < 0.001$ ). Ausgeprägtere Veränderungen waren bei der Kanalinaktivierung zu beobachten. Nach 10-minütiger ROS-Exposition zeigte sich eine Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierungsspannung ( $V_h$ ) um ca. 8 mV zu höheren Potentialen ( $t_0$ :  $-39.1 \pm 3.1$  mV,  $t_{600}$ :  $-31.4 \pm 2.4$  mV,  $p > 0.05$ ) und damit eine gesteigerte Kanalverfügbarkeit. Im Vergleich dazu war  $V_h$  unter Kontrollbedingungen zu niedrigeren Potentialen verschoben ( $t_0$ :  $-36.9 \pm 2.7$  mV,  $t_{600}$ :  $-46.8 \pm 2.0$  mV,  $p < 0.001$ ). Während die Spannungsabhängigkeit der Kanalinaktivierung unter Kontrollbedingungen nur leicht erhöht war ( $t_0$ :  $6.3 \pm 0.4$  mV,  $t_{600}$ :  $-7.0 \pm 0.4$  mV,  $p < 0.05$ ), stieg sie bei ROS-Exposition deutlich stärker an ( $t_0$ :  $7.1 \pm 0.6$  mV,  $t_{600}$ :  $13.5 \pm 1.2$  mV,  $p < 0.001$ ). Insgesamt wurden bei Nav1.8 sehr ähnliche Effekte wie bei den TTXs Nav-Kanälen beobachtet. Allerdings waren die Auswirkungen von ROS auf die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.8 deutlich stärker. Basierend auf den Daten  $\Delta R_{in}$  fällt der ROS-induzierte Inaktivierungsverlust für Nav1.8 um den Faktor ~6 stärker aus als für die TTXs Nav-Kanäle. Die Ergebnisse stehen damit im Einklang mit vorangegangenen Untersuchungen, die zeigen, dass Nav1.8 im Vergleich zu TTXs-Nav-Kanälen sensitiver gegenüber ROS ist (Schink et al., 2016; Schlüter & Leffler, 2016).

Auch bei Nav1.9 wurden deutliche funktionelle Veränderungen nach ROS-Exposition beobachtet. Mit  $26.4 \pm 4.3$  % lag der Verlust der Inaktivierung in einer ähnlichen Größenordnung wie der beobachtete Inaktivierungsverlust bei Nav1.8. Zusätzlich war für Nav1.9 ein starker Peakstromverlust von ~50 % zu erkennen (Abb. 31N, rechts). Ein etwas

schwächer ausgeprägter Verlust des Peakstroms zeigte sich unter Kontrollbedingungen. Dieser sog. *Rundown* des Stroms ist ein bekanntes Phänomen bei Nav1.9 und reduziert die Erfolgsquote derart zeitintensiver Messreihen (Coste et al., 2004; Marler et al., 2018). Um dem Problem zu begegnen, wurde auf die Messung der Gleichgewichtsinaktivierung zum Zeitpunkt  $t_0$  (vor ROS-Exposition) verzichtet und die Werte aus vorangegangenen Experimenten zum Vergleich herangezogen (Abb. 31L, gestrichelte Kurve). Qualitativ ähnlich zu Nav1.8 und TTXs Nav-Kanälen wurde für Nav1.9 ein ROS-unabhängiger Linksshift der Kanalaktivierung beobachtet ( $t_0$ :  $-51.6 \pm 2.7$  mV,  $t_{600}$ :  $-65.4 \pm 3.2$  mV,  $p < 0.01$ ), der sich auch unter Kontrollbedingungen zeigte ( $t_0$ :  $-44.9 \pm 2.6$  mV,  $t_{600}$ :  $-61.5 \pm 3.4$  mV,  $p < 0.01$ ). Während die Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung unter Kontrollbedingungen nicht verändert wurde ( $t_0$ :  $6.6 \pm 0.5$  mV,  $t_{600}$ :  $7.5 \pm 1.1$  mV,  $p > 0.05$ ), war diese nach 10-minütiger ROS-Exposition leicht erhöht ( $t_0$ :  $6.2 \pm 0.8$  mV,  $t_{600}$ :  $8.5 \pm 0.7$  mV,  $p < 0.05$ ). Die ROS-Exposition hatte ähnliche Auswirkungen auf die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9, wie für Nav1.8. Während die halbmaximale Inaktivierungsspannung  $V_h$  unter Kontrollbedingungen zu niedrigeren Potentialen verschoben wurde ( $t_0$ :  $-63.2 \pm 2.8$  mV,  $t_{600}$ :  $-70.1 \pm 3.9$  mV), war  $V_h$  nach ROS-Exposition ( $t_{600}$ ) um 11.5 mV zu höheren Potentialen verschoben ( $t_0$ :  $-63.2 \pm 2.8$  mV,  $t_{600}$ :  $-51.7 \pm 2.1$  mV).

In der Summe zeigen die Daten, dass LY-abhängige ROS mehrere Funktionsparameter Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle beeinflussen. Zum einen bewirken ROS eine Peakstromreduktion, die als teilweiser Funktionsverlust der Kanäle gewertet werden kann. Zum anderen verstärken ROS aber auch die Aktivität der Kanäle, indem sie die Kanalinaktivierung verlangsamen und die Kanalverfügbarkeit steigern. Die Daten bestätigen die im Vergleich zu den TTXs Nav-Kanälen deutlich erhöhte ROS-Sensitivität von Nav1.8 und zeigen weiterhin, dass Nav1.9 eine vergleichbar hohe ROS-Sensitivität wie Nav1.8 aufweist.

## 4 Diskussion

Die elektrische Erregbarkeit sensorischer Neurone wird maßgeblich durch spannungsgesteuerte Na<sup>+</sup>-selektive Ionenkanäle moduliert, denn sie initiieren APs und sind an deren gerichteten Weiterleitung beteiligt. Nav1.9 spielt eine zentrale Rolle in nozizeptiven DRG-Neuronen und in enterischen Neuronen. Funktionsveränderungen von Nav1.9 gehen beim Menschen mit einem breiten Spektrum an Schmerzerkrankungen einher, das von *CIP* bis hin zu schweren Schmerzattacken reicht und häufig von gastrointestinalen Beschwerden begleitet wird. Limitiert wird die funktionelle Untersuchung von Nav1.9 durch seine schwierige Expression in heterologen Systemen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Nav1.9-Kanal hinsichtlich seiner Expressionsproblematik, seinen charakteristischen Schalteigenschaften, krankheitsrelevanten Funktionsveränderungen sowie seiner Modulation durch ROS, untersucht. Diese Aspekte werden nachfolgend diskutiert und in Bezug zur relevanten Literatur gesetzt.

### 4.1 dKO-DRG-Neurone sind ein effizientes Expressionssystem zur Untersuchung von Nav1.9-Kanälen

Die Expression von Nav1.9-Kanälen in nichtneuronalen Zellen, z.B. in HEK-293-Zellen, wie man sie sonst für andere Nav-Subtypen erfolgreich verwendet, ist kaum oder nur schwer möglich (Goral et al., 2015; Lin et al., 2016). Auch die Expression in immortalisierten neuronalen Zellen, wie ND7-23-Zellen, gestaltet sich schwierig, da die Stromamplituden sehr klein und die Erfolgsquoten der Experimente gering sind (Vanoye et al., 2013). Versuche, die Expression von Nav1.9 in diesen Zelllinien zu steigern, bestehen in Manipulationen des C-Terminus, z.B. durch die Fusion mit GFP (X. Zhou et al., 2017) oder in der Verwendung von chimären Nav1.9-Kanälen, die den C-Terminus von Nav1.4 enthalten (Goral et al., 2015). Zwar lässt sich Nav1.9 mithilfe dieser Manipulationen besser exprimieren, jedoch stellen die verwendeten Zelllinien nicht die physiologische Umgebung von Nav1.9 dar und die modifizierten Kanalkonstrukte weichen hinsichtlich ihrer Funktionseigenschaften zum Teil deutlich von nativen Wildtypkanälen ab. Nav1.9 wird nativ in sensorischen Neuronen (z.B. DRGs) zusammen mit dem TTXr Kanal Nav1.8 und mehreren TTXs Nav-Kanälen exprimiert (Tate et al., 1998). Da DRG-Neurone den physiologisch relevanten Hintergrund der Kanäle darstellen, bieten diese Neurone ein besser geeignetes System zur Untersuchung der Auswirkungen von Fehlfunktionen von Nav1.9.

Bei der Überexpression von Nav1.9 in Wildtyp-DRG-Neuronen besteht allerdings die Problematik, dass die Stromantworten von endogenen TTXr-Kanälen mit der Stromantwort der überexprimierten Kanäle überlappen. Die Unterscheidung zwischen endogenen und überexprimierten Nav1.9-Kanälen ist kaum möglich. Es wurden bereits DRG-Neurone aus Nav1.9-KO-Mäusen eingesetzt, und darin Nav1.9-Kanäle überexprimiert (King et al., 2017). In diesen Zellen sind funktionelle Untersuchungen überexprimierter Nav1.9-Kanäle jedoch nur in einem kleinen Spannungsfenster möglich, da endogene Nav1.8-Ströme die Stromantworten ab ca. -50 mV und darüber überlagern. Unter Ausnutzung der Fluoridabhängigkeit der Nav1.9-Kanäle lässt sich das nutzbare Spannungsfenster jedoch geringfügig vergrößern. Durch das Verwenden von Fluorid in der Patchpipette verschiebt sich die Aktivierung von Nav1.9 zu niedrigeren Potentialen, jedoch nicht die Aktivierung von Nav1.8 (Coste et al., 2004). Dies ermöglicht Nav1.9-spezifische Analysen in einem breiteren Spannungsfenster, allerdings nicht im gesamten physiologisch relevanten Spannungsbereich. Eine weitere Möglichkeit besteht darin, zunächst den Gesamtstrom der TTXr-Nav-Kanäle zu messen. Anschließend werden durch Anhebung des Haltepotentials während der Messungen Nav1.9-Kanäle inaktiviert und selektiv die endogenen Nav1.8-vermittelten Ströme gemessen (Huang et al., 2019). Durch anschließende Subtraktion der Nav1.8-vermittelten Ströme vom Gesamtstrom kann die Nav1.9-spezifische Stromkomponente ermittelt werden (Huang et al., 2019). Als alternatives Expressionssystem wurden auch Neurone aus den Zervikalganglien verwendet, da diese keine endogenen TTXr Kanäle exprimieren (Han et al., 2015). Jedoch ist die Zellausbeute bei einer Präparation sehr gering und es sind viele Versuchstiere für die Untersuchungen erforderlich. Außerdem stellen die Zervikalganglien nicht den physiologischen Hintergrund von Nav1.9 dar.

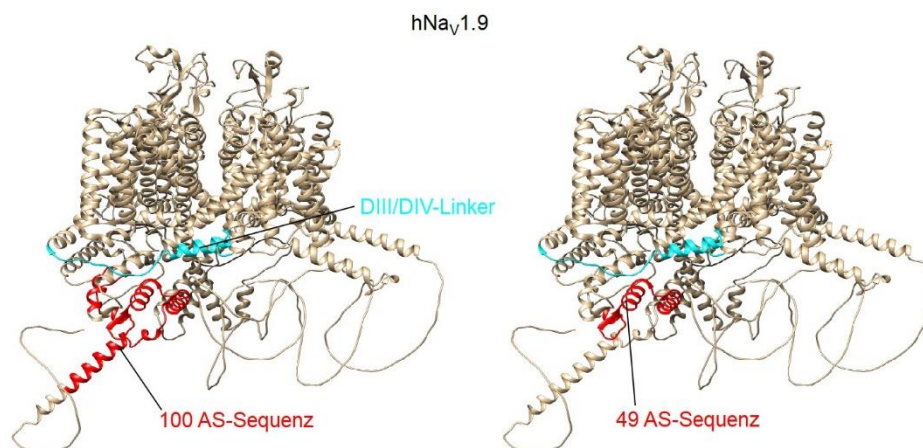
Um diese Limitationen zu umgehen, wurde in der vorliegenden Arbeit ein Mausmodell mit einem Knockout der Gene *Scn10a* und *Scn11a*, kodierend für Nav1.8 bzw. Nav1.9, eingesetzt und ausführlich charakterisiert (Alves-Simões et al., 2024). Die Daten zeigen, dass die endogenen Nav-Ströme in den dKO-DRG-Neuronen vollständig unter Verwendung von 1  $\mu$ M TTX in der Badlösung inhibiert werden können. DRG-Neurone aus diesen Mäusen können mit Nav1.8 bzw. Nav1.9-kodierender DNA transfiziert und in Gegenwart von TTX selektiv Stromantworten des transfizierten Kanals ohne interferierende endogene Ströme gemessen werden. DKO-DRG-Neurone lösen somit die Expressionsproblematik humaner Nav1.9-Kanäle und ermöglichen zeiteffiziente systematische Analysen dieser Kanäle. Darüber hinaus erleichtern sie die Struktur-Funktionsanalyse pathogener

Kanalvarianten und bieten damit ein nützliches Werkzeug zur Untersuchung von Erkrankungen, insbesondere im Zusammenhang mit Fehlfunktionen von Nav1.8 und Nav1.9.

## **4.2 Der mediale C-Terminus beeinflusst die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9-Kanälen**

Die schnelle Inaktivierung von Nav-Kanälen ist physiologisch von großer Bedeutung, denn sie begrenzt den Na<sup>+</sup>-Einstrom und sichert die gerichtete AP-Ausbreitung entlang der Plasmamembran elektrisch erregbarer Zellen. Nav1.9 stellt eine Besonderheit dar, denn er inaktiviert deutlich langsamer als andere Nav-Subtypen. Es ist bekannt, dass der IFM-Linker maßgeblich an der schnellen Inaktivierung der Nav-Kanäle beteiligt ist (Kellenberger et al., 1996, 1997; West et al., 1992). Diese Struktur ist in allen Nav-Kanälen, inklusive Nav1.9, hoch konserviert, was nahelegt, dass noch weitere Strukturen die Inaktivierungseigenschaften von Nav1.9 beeinflussen. Untersuchungen an den Nav-Kanälen Nav1.2, Nav1.4, Nav1.5, Nav1.6 und Nav1.8 zeigten bereits, dass der C-Terminus am Inaktivierungsvorgang der Kanäle beteiligt ist (Choi et al., 2004; Goral et al., 2015; A. Lee & Goldin, 2008; Mantegazza et al., 2001). Dies wurde auch für Nav1.9 nachgewiesen (Goral et al., 2015). In der Studie von Goral et al. wurde der C-Terminus des schnell inaktivierenden Nav1.4-Kanals in den langsam inaktivierenden Nav1.9-Kanal eingebaut, was zu einer beschleunigten Kanalinaktivierung und Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalinaktivierung zu niedrigeren Potentialen führte (Goral et al., 2015). Ebenso förderte das Einsetzen des C-Terminus von Nav1.4 in Nav1.9 die funktionelle Kanalexpression in nichtneuronalen Zellen, wie HEK-293-Zellen und *Xenopus* Oozyten (Goral et al., 2015), was nahelegt, dass der C-Terminus auch das Trafficking der Kanäle in die Membran mitreguliert. Qualitativ entgegengesetzte Veränderungen wurden in der Reversechimäre beobachtet, bei der der C-Terminus von Nav1.9 in Nav1.4 eingesetzt wurde. Die Ergebnisse zeigten eine Verlangsamung der Inaktivierung und einen Shift der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu höheren Potentialen, sowie eine geringere funktionelle Kanalexpression (Goral et al., 2015). In der vorliegenden Arbeit wurden systematisch C-Terminus-Chimären aus Nav1.9 und Nav1.4 erzeugt und diese hinsichtlich ihrer Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften untersucht, mit dem Ziel das inaktivierungsrelevante Epitop weiter einzugrenzen. Mithilfe dieser Strategie konnte das inaktivierungsrelevante Epitop auf

100 AS im medialen C-Terminus eingegrenzt werden. Während der laufenden Arbeiten erschien eine Studie mit dem Ziel, das Expression-limitierende Epitop im C-Terminus von Nav1.9 zu identifizieren (Sizova et al., 2020). Es wurde ein ähnlicher experimenteller Ansatz verfolgt und C-Terminus-Chimären aus Nav1.9 und Nav1.7 hergestellt, die hinsichtlich funktioneller Expression und Membranlokalisation untersucht wurden. Dabei wurde ein 49 AS-Motiv im C-Terminus von Nav1.9 identifiziert, das die Kanalexpression in HEK-293-Zellen limitiert und mit dem in der vorliegenden Arbeit identifizierten 100 AS umfassenden Epitop überlappt bzw. darin enthalten ist. Die Ergebnisse von Sizova et al. zeigten auch, dass das 49 AS-Motiv die Inaktivierungseigenschaften der Kanäle beeinflusst. Abgeschlossen wird die Diskussion mit einem Verweis auf eine modellierte 3D-Struktur des Kanals, die eine einfache zytosolische Zugänglichkeit der Sequenz für Protein-Protein-Interaktionen nahelegt. Details über mögliche Interaktionen innerhalb der Kanalstruktur und damit verbundene Ursachen für die veränderten Inaktivierungseigenschaften der Kanäle konnten nicht abgeleitet werden. Im Folgenden soll ein möglicher Erklärungsversuch für die langsamen Inaktivierungseigenschaften der Nav1.9-Kanäle auf struktureller Ebene gegeben werden:



**Abbildung 32: Inaktivierungsrelevante Strukturen im C-Terminus von Nav1.9.** Links: Strukturmodell von Nav<sub>v</sub>1.9 (AlphaFold, UniProt: Q9UI33) mit dem die Inaktivierung beeinflussenden Bereich im Kanal-C-Terminus (diese Arbeit). Rechts: Trafficking-relevanter Bereich (Sizova et al., 2020). Zusätzlich ist der DIII/DIV-Linker hervorgehoben (cyan). Die relevanten AS-Reste wurden mit UCSF Chimera 1.14 (Pettersen et al., 2004) farblich abgesetzt.

In der Struktur von Nav<sub>v</sub>1.9 ist zu erkennen, dass der identifizierte, 100 AS-umfassende inaktivierungsrelevante Abschnitt im medialen C-Terminus (Abb. 32, links, rote Markierung) zwei  $\alpha$ -helikale Strukturen umfasst, die sich in der Nähe des DIII/DIV-Linkers befinden. Dieser Linker beinhaltet das für die schnelle Inaktivierung wichtige IFM-Motiv.

Die exponierte Lage des Motivs lässt eine Interaktion des medialen C-Terminus mit dem DIII/DIV-Linker vermuten, was eine mögliche Erklärung für die veränderten Inaktivierungseigenschaften der Kanalchimären darstellen könnte. Diese Vermutung wird durch ein atomares Modell basierend auf Cryo-Elektronmikroskopischen Daten von Nav<sub>v</sub>PaS gestützt, welches auf umfangreiche Interaktionen des C-Terminus mit dem DIII/DIV-Linker hindeutet (Shen et al., 2017). Weiterhin zeigten Untersuchungen an Nav1.5, dass der C-Terminus mit dem Inaktivierungsgate intramolekular interagiert und damit eine Wiedereröffnung der Kanalpore bei wiederholter Depolarisation minimiert wird (Kass, 2006). Störungen dieser Interaktion führen zu anhaltendem Na<sup>+</sup>-Einstrom und einer Verlängerung von Aktionspotentialen (Kass, 2006). Zusätzlich können die Inaktivierungseigenschaften der Kanäle durch eine Vielzahl von Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst werden, wie es z.B. bei der Interaktion von Contactin, sowie dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor FHF1B mit dem C-Terminus von Nav1.9 beschrieben wurde (Liu, Dib-Hajj, Black, et al., 2001; Liu, Dib-Hajj, & Waxman, 2001). In diesem Zusammenhang ist auch interessant, dass die Fusion von GFP an den C-Terminus von Nav1.9 die Expression des Kanals in heterologen Systemen erhöht (X. Zhou et al., 2017).

Die dargelegten Zusammenhänge zeigen, dass die charakteristisch langsame Inaktivierung der Nav1.9-Kanäle nicht auf ein einzelnes Epitop, wie dem IFM-Motiv im DIII/DIV-Linker, begrenzt werden kann und dass auch zytosolische Faktoren das Schaltverhalten der Kanäle beeinflussen. Jedoch wird deutlich, dass der mediale C-Terminus einen entscheidenden Beitrag zur Kanalinaktivierung leistet. Aus der Kombination der Daten von Sizova et al. und den Daten der vorliegenden Arbeit ergibt sich die Schlussfolgerung, dass der identifizierte 100-AS-Abschnitt im C-Terminus von Nav1.9 maßgeblich an der Expression beteiligt und gleichzeitig für die Inaktivierungseigenschaften der Kanäle wichtig ist.

### **4.3 Der N-Terminus beeinflusst die Aktivierung und Deaktivierung von Nav1.9-Kanälen**

Neben dem C-Terminus wurde auch der N-Terminus mit dem Schaltverhalten von Nav-Kanälen in Verbindung gebracht (A. Lee & Goldin, 2008). Inwieweit der N-Terminus eine Rolle für das Schaltverhalten von Nav1.9 spielt, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht. Der Einbau des N-Terminus von Nav1.4 in Nav1.9 bewirkte eine beschleunigte Aktivierung und Deaktivierung der Kanäle, während die anderen Schaltparameter

unverändert blieben. Es wird deutlich, dass der Einfluss des N-Terminus auf das Kanalschaltverhalten komplexer zu sein scheint als der des C-Terminus. Denn eine ähnliche Untersuchung, in der der N-Terminus von Nav1.2 in Nav1.6 eingesetzt wurde, führte zu einem signifikanten Shift der Spannungsabhängigkeit von Aktivierung und Inaktivierung (A. Lee & Goldin, 2008). Interessanterweise zeigte die Reversechimäre (N-Terminus von Nav1.6 in Nav1.2), nur einen sehr geringen Shift der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung, aber einen ausgeprägten Shift in der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung (A. Lee & Goldin, 2008). Die unterschiedlichen Auswirkungen der N-Termini auf das Schaltverhalten der Kanäle deuten in ihrer Summe auf Subtyp-spezifische Funktionen des N-Terminus hin, was auch bereits die schwache Konservierung der N-Terminale Nav-Sequenzen vermuten lässt.

#### **4.4 Nav1.9-Varianten sind mit komplexen Krankheitsbildern korreliert**

Mutationen im Nav1.9 kodierenden Gen *SCN11A* können zu Fehlfunktionen des Kanalproteins führen und mit schweren Erkrankungen wie *CIP*, episodischen Schmerzen und Darmfunktionsstörungen in Verbindung stehen. Wie die funktionellen Veränderungen in Nav1.9 im Einzelnen die komplexen Krankheitsbilder verursachen bzw. begünstigen, ist Gegenstand aktueller Forschung. In der vorliegenden Arbeit wurden vier potenziell krankheits-assoziierte Nav1.9-Varianten funktionell untersucht. Die Ergebnisse der funktionellen Untersuchungen werden im Folgenden für jede Kanalvariante im Zusammenhang mit dem klinischen Bild diskutiert.

##### *Nav1.9-C1355F:*

Bei zwei Geschwistern ohne Schmerzwahrnehmung wurde durch Sequenzierung einer nicht näher spezifizierten Gruppe von Genen eine Mutation in *SCN11A* identifiziert, die zu der Kanalvariante Nav1.9-C1355F führt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine funktionelle Analyse der Schalteigenschaften dieser vermeintlich Analgesie-auslösenden Kanalvariante durchgeführt. Interessanterweise zeigte die Variante keinerlei Auffälligkeiten. Die bis heute identifizierten und elektrophysiologisch untersuchten Analgesie-assoziierten Varianten zeigen hingegen deutliche *GOF*-Eigenschaften in Form einer verstärkten Aktivierung und beeinträchtigten Inaktivierung (Huang et al., 2017; King et al., 2017; Kuehs et al., 2022; Leipold et al., 2013). Nav1.9-C1355F zeigte jedoch keine Abweichungen hinsichtlich Aktivierungs- und Inaktivierungseigenschaften und war vom

Wildtyp diesbezüglich ununterscheidbar. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass Nav1.9-C1355F ursächlich für die Erkrankung ist. Zudem findet sich die Variante Nav1.9-C1355F in der südasiatischen Bevölkerung vergleichsweise häufig (siehe Anhang Tabelle 9). Bislang wurde die Variante 32-mal unter 25.444 Allelen, also bei 12.722 Personen, identifiziert. Dies ist häufiger als man für eine derart seltene Erkrankung erwarten würde. Außerdem ist der Vater der beiden Geschwister ebenfalls Träger der Mutation, jedoch symptomfrei. Erwähnenswert ist zudem, dass die Geschwister keinerlei gastrointestinale Beschwerden und auch keine Frakturen aufgrund von unbemerkten Verletzungen aufweisen, wie es bei Trägern anderer Nav1.9-abhängigen Analgesie-assoziierten Varianten bekannt ist (Huang et al., 2017; King et al., 2017; Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016). Die Symptomatik der Geschwister beinhaltet neben Analgesie auch Hypohidrose. Andere bekannte Nav1.9-abhängige Analgesie-assoziierte Varianten gehen jedoch mit gegenteiliger Symptomatik in Form von Hyperhidrose einher (Leipold et al., 2013; Phatarakijirund et al., 2016). *CIP* und Hypohidrose sind hingegen typisch für HSAN Typ IV, auch bekannt als *Congenital Insensitivity to Pain and Anhidrosis (CIPA)* und werden mit Mutationen im *NTRK1*-Gen, das den Neurotrophen Tyrosin Kinase Rezeptor Typ 1 kodiert, in Verbindung gebracht (Wang et al., 2018). Zusammenfassend lassen die Daten der vorliegenden Arbeit keinen kausalen Zusammenhang zwischen der Erkrankung beider Geschwister und der Nav1.9-Variante C1355F erkennen und legen somit nahe, dass andere Ursachen, wie z.B. Mutationen in *NTRK1* in Erwägung gezogen werden sollten.

#### *Nav1.9-Y66S:*

Bei zwei Patienten mit episodischen Schmerzen wurde mittels Exomsequenzierung eine Mutation in *SCN11A* identifiziert, die zu der Kanalvariante Nav1.9-Y66S führt. Die funktionelle Untersuchung zeigte, dass Nav1.9-Y66S-Kanäle sowohl *GOF*- als auch *LOF*-Eigenschaften aufweisen. Sowohl die spannungsabhängige Kanalaktivierung als auch die spannungsabhängige Inaktivierung von Nav1.9-Y66S waren gleichermaßen zu signifikant höheren Membranspannungen verschoben. Während die verringerte Kanalaktivierung bei niedrigen Membranspannungen als *LOF*-Eigenschaft interpretiert werden kann, erhöht die Verschiebung der Kanalinaktivierung zu höheren Spannungen die funktionelle Kanalverfügbarkeit und stellt somit eine *GOF*-Eigenschaft dar. Weiterhin war die Inaktivierungskinetik von Nav1.9-Y66S im Vergleich zum Wildtyp verlangsamt, was ebenfalls eine *GOF*-Eigenschaft darstellt. In der Summe verringert der Austausch Y66S also die Aktivität von Nav1.9 bei niedrigen Membranspannungen, bewirkt aber eine erhöhte

Kanalaktivität bei hohen Membranspannungen. Geht man davon aus, dass Nav1.9-Y66S die Krankheitsursache ist, würde man proexzitatorische Eigenschaften, also eine Dominanz der *GOF*-Eigenschaften vermuten. Die Ergebnisse der *Current-Clamp*-Experimente zeigen zwar keine signifikanten Veränderungen, doch in der Tendenz weniger APs bei kleinen Reizstärken und mehr bei Höheren, was mit den beobachteten Funktionsveränderungen der Variante kompatibel ist.

Es ist außerdem möglich, dass weitere Faktoren eine Rolle spielen, die in ihrer Gänze durch die Experimente nicht abgebildet werden können. Eine Limitierung der Experimente besteht darin, dass transfizierte Wildtypneurone aus Mäusen und keine Patienten-spezifischen Neurone untersucht wurden. Derartige Untersuchungen an transfizierten DRG-Neuronen sind auf wenige Tage nach der Transfektion beschränkt. Kompensatorische Effekte, die möglicherweise ebenso eine Rolle spielen, entwickeln sich mitunter erst nach längeren Zeiträumen, die mit derartigen Kurzzeitkulturen nicht abgebildet werden können. Die chronische Expression der Variante, wie es im Patienten der Fall ist, könnte kompensatorische Effekte nach sich ziehen, die ggf. die Erregbarkeit der Neurone beeinflussen. Es wurde bereits gezeigt, dass sich das Gen-Expressionsmuster von DRG-Neuronen abhängig von den eingehenden elektrischen Signalen verändert (P. R. Lee & Fields, 2021). Eine veränderte Expression von Kanal-kodierenden Genen wurde auch für Nav1.8-KO-Mäuse beschrieben, in deren Neuronen TTXs Kanäle, wie Nav1.7, als Folge des Knockouts von Nav1.8 hochreguliert wurden (Akopian et al., 1999). Denkbar ist also auch, dass die *LOF*-Eigenschaften von Nav1.9-Y66S ebenfalls genetische kompensatorische Mechanismen anstoßen könnten, die das Expressionsmuster und damit auch die Erregbarkeit der Neurone beeinflussen.

Einen weiteren potentiellen Einflussfaktor stellt die geringe Expression der Mutante dar. Nur wenige der transfizierten Neurone generierten messbare Stromantworten in den *Voltage-Clamp*-Experimenten. Möglicherweise war dies auch in den *Current-Clamp*-Experimenten der Fall, was sich dort jedoch kaum quantifizieren lässt. Ähnliche Beobachtungen wurden in einer Studie gemacht, in der die N-terminale Kanalvariante S21P im Nav1.6-Kanal mit Ataxie, Tremor und Letalität bei juvenilen Mäusen in Verbindung gebracht wurde (Sharkey et al., 2009). Dort wurde beobachtet, dass nur eine von 20 Zellen funktionelle Kanalexpression aufwies bzw. zwei von 14 Zellen, wenn  $\beta$ -Untereinheiten zusätzlich exprimiert wurden (Sharkey et al., 2009). In weiteren Untersuchungen konnten die Autoren zeigen, dass vermutlich ein eingeschränkter Transport zur Plasmamembran für die reduzierte

funktionelle Expression verantwortlich ist, da die Kanäle im Golgi-Komplex zurückgehalten werden (Sharkey et al., 2009). Basierend auf den Beobachtungen wäre ein ähnlicher Zusammenhang für Nav1.9-Y66S denkbar. Somit könnte eine geringe Expression der Mutante eine weitere Erklärung für die Abwesenheit einer signifikant veränderten Erregbarkeit transfizierter Neurone sein.

Auch denkbar ist, dass die *Voltage-Clamp*-Daten der Variante Nav1.9-Y66S nur bedingt mit denen des Wildtyps vergleichbar sind, weil die Fluoridabhängigkeit der Schaltparameter berücksichtigt werden muss. Bei Nav1.9-Wildtypkanälen werden sowohl die Kanalaktivierung als auch die Inaktivierung durch Fluorid zu niedrigen Potentialen verschoben (Coste et al., 2004). Dies gilt für Nav1.9, jedoch nicht für Nav1.8 (Coste et al., 2004). Interessanterweise liegt der Shift von Kanalaktivierung und Inaktivierung bei Nav1.9-Y66S in einer ähnlichen Größenordnung, wie er auch bei Nav1.9-Wildtypkanälen in der Abwesenheit von Fluorid beobachtet werden konnte (Coste et al., 2004). Auch wenn die Daten keine abschließende Aussage dazu erlauben, wäre es denkbar, dass Y66S anders als der Wildtyp keiner Regulation durch Fluorid unterliegt. Experimente ohne Fluorid wie in Coste et al. wären nötig, um dies zu prüfen. Allerdings sind solche Experimente schwierig, da Fluorid den Seal, d.h. die mechanische Verbindung zwischen Patchpipette und Zellmembran, stabilisiert und ohne Fluorid kaum langanhaltende stabile *Voltage-Clamp*-Bedingungen zu erreichen sind. Der Mechanismus der Fluoridsensitivität von Nav1.9 ist nicht bekannt, es wird aber eine Wechselwirkung von Fluorid mit dem Phosphorylierungsstatus des Kanals vermutet (Coste et al., 2004). Dabei ist wichtig zu erwähnen, dass Fluorid ein Inhibitor vieler Phosphatasen ist (Pinkse et al., 1999). Der Phosphorylierungsstatus des Kanalproteins ist ein nicht zu vernachlässigender Aspekt. Y66 ist in allen Nav-Kanälen konserviert und in den Kanälen Nav1.2 und Nav1.5 für eine Interaktion mit der Fyn-Kinase und damit verbundener Phosphorylierung bekannt (Beacham et al., 2007; Iqbal et al., 2018). Während in Gegenwart von Fyn-Kinase bei Nav1.5-Wildtypkanälen ein Shift der Inaktivierung zu höheren Potentialen erfolgt, wird die Kanalvariante Nav1.5-Y68F (homologe Position zu Y66S in Nav1.9) nicht durch Fyn-Kinase beeinflusst (Iqbal et al., 2018). Allerdings zeigte sich bereits allein durch den Austausch von Tyrosin (Y) durch Phenylalanin (F) ein Shift der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu höheren Potentialen (Iqbal et al., 2018). Auch bei Nav1.2 zeigte die Variante Y66F (identisch zu Y66S in Nav1.9) einen Shift der Spannungsabhängigkeit der Inaktivierung zu höheren Potentialen und eine verlangsamte schnelle Inaktivierung

(Beacham et al., 2007). Die Größenordnung war ähnlich, verglichen mit dem beobachteten Effekt bei Nav1.9-Y66S. Im Zusammenhang mit Nav1.9-Y66S müssen allerdings noch weitere Aspekte berücksichtigt werden. Prädiktive Algorithmen (NetPhos 3.1) sagen voraus, dass in Nav1.9 durch den Austausch Y66S eine potenzielle Phosphorylierungsstelle für PKA entsteht. PKA ist an Entzündungsreaktionen beteiligt und reguliert die Funktion von Nav-Kanälen (Aley & Levine, 1999; Kakimura et al., 2010; Kerth et al., 2021; R. D. Smith & Goldin, 1997). Die in den elektrophysiologischen Untersuchungen beobachtete Verschiebung der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung könnte somit auch durch Phosphorylierungsereignisse verursacht oder mit beeinflusst worden sein. Weitere Experimente müssen zeigen, ob Y66S tatsächlich PKA-abhängig phosphoryliert wird und welche Auswirkungen solch eine PKA-abhängige Regulation auf die Kanalfunktionen und die Erregbarkeit der Nozizeptoren hat.

#### *Nav1.9-W684L:*

Alle bisher in der Literatur beschriebenen und funktionell untersuchten Schmerz-assoziierten Nav1.9-Varianten zeigen *GOF*-Eigenschaften und lassen sich intuitiv mit dem zugehörigen klinischen Phänotyp in Verbindung bringen. Die *GOF*-Eigenschaften dieser Varianten manifestieren sich in einer verstärkten Kanalaktivierung, einer beeinträchtigten Kanalinaktivierung oder einer Kombination beider Eigenschaften, die sich proexzitatorisch auf die Erregbarkeit sensorischer Neurone auswirken. Anders ist es bei der hier untersuchten Variante Nav1.9-W684L, die bei einem Patienten identifiziert wurde, der unter kälte-induzierten Schmerzattacken leidet. Die funktionelle Untersuchung von Nav1.9-W684L offenbarte milde *LOF*-Eigenschaften, die sich in den *Voltage-Clamp*-Experimenten in einem Shift der Spannungsabhängigkeit der Kanalaktivierung zu höheren Potentialen äußerten. Kompatibel dazu zeigten *Current-Clamp*-Experimente eine verminderte Erregbarkeit von W684L-exprimierenden Neuronen bei höheren Strominjektionen. Die funktionellen Daten von Nav1.9-W684L passen nur zu einem Teil der klinischen Symptomatik des Patienten, etwa dem eingeschränkten Vibrationsempfinden in den Füßen oder der geringfügig reduzierten Signalamplitude im *Nervus suralis*. Obwohl die hier gezeigten elektrophysiologischen Daten in sich konsistent sind, stellt sich die Frage, wie *LOF*-Eigenschaften von Nav1.9 zu Schmerzen führen können. Intuitiv ist ein Zusammenhang zwischen der Variante W684L mit erhöhter Aktivierungsschwelle einerseits und Schmerzsymptomatik andererseits nicht herzustellen. Dennoch sind die Funktionsveränderungen deutlich und signifikant. Im Folgenden werden dazu deshalb einige

Erklärungsversuche aufgezeigt. *LOF*-Varianten wurden bereits bei Nav<sub>v</sub>1.8-Kanälen beschrieben und mit Schmerzen in Verbindung gebracht (Kaluza et al., 2018; Kist et al., 2016). In einer dieser Studien wird ein Patient beschrieben, der unter starken chronischen Schmerzen leidet und mit *SFN* diagnostiziert wurde (Kaluza et al., 2018). Der Patient ist Träger der Kanalvariante Nav<sub>v</sub>1.8-D1639N und seine Symptome begannen im Erwachsenenalter. Damit ähnelt das klinische Bild dem des Trägers der Nav<sub>v</sub>1.9-W684L-Variante. Die funktionelle Untersuchung der Kanalvariante Nav<sub>v</sub>1.8-D1639N ergab, dass die biophysikalischen Eigenschaften der Kanäle unverändert blieben, lediglich die Stromdichte bei Nav<sub>v</sub>1.8-D1639N verglichen mit dem Wildtyp reduziert war (Kaluza et al., 2018). Weiterhin deuteten immunzytochemische und biochemische Untersuchungen darauf hin, dass der Transport der Variante D1639N zur Plasmamembran beeinträchtigt war (Kaluza et al., 2018). Dies stellt ebenfalls einen *LOF* dar, der ähnlich wie W684L in Nav<sub>v</sub>1.9 nicht intuitiv mit dem klinischen Bild „Schmerz“ vereinbar ist. Es wurde argumentiert, dass durch die Kanalvariante möglicherweise andere Nav<sub>v</sub>-Subtypen im selben Nozizeptor hochreguliert werden und dies Auswirkungen auf die Erregbarkeit der Neurone haben könnte (Kaluza et al., 2018). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass die TTXs-Ströme in Nav<sub>v</sub>1.8-KO-DRG-Neuronen als Folge des Knockouts hochreguliert werden (Akopian et al., 1999). Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für Nav<sub>v</sub>1.9-W684L denkbar. Die durch W684L hervorgerufenen Funktionsveränderungen in Nav<sub>v</sub>1.9 könnten kompensatorische Effekte anstoßen, die die Erregbarkeit der Neurone beeinflussen. Allerdings können derartige Effekte, wie sie möglicherweise bei dem Patienten auftreten, nicht mit den hier verwendeten transient transfizierten Kurzzeit-DRG-Kulturen abgebildet werden. Eine weitere bereits beschriebene Schmerz-assoziierte *LOF*-Variante ist Nav<sub>v</sub>1.8-M650K. Diese Variante wurde bei einem Patienten mit Erythromelalgie identifiziert und funktionell charakterisiert (Kist et al., 2016). Die Untersuchungen zeigten eine Verschiebung der halbmaximalen Inaktivierungsspannung von ca. -7 mV zu hyperpolarisierten Potentialen, sowie eine verminderte Erregbarkeit von Neuronen, in denen die Variante Nav<sub>v</sub>1.8-M650K exprimiert wurde. Diese Eigenschaften entsprechen ebenfalls einem *LOF* und sind zumindest qualitativ mit denen der Kanalvariante Nav<sub>v</sub>1.9-W684L vergleichbar. Es wurde zwar spekuliert, dass Nav<sub>v</sub>1.8-M650K möglicherweise protektiv wirkt und die Schmerzsymptomatik des Patienten sogar abmildert (Kist et al., 2016), doch der genaue Zusammenhang zwischen Kanalvariante und Patientensymptomatik bleibt vorerst ungeklärt.

### *Nav1.9-L396P:*

Bislang sind drei Analgesie-assoziierte Nav1.9-Varianten beschrieben und elektrophysiologisch untersucht worden (Huang et al., 2017; King et al., 2017, S. 20; Leipold et al., 2013). Die Träger dieser Varianten leiden neben einem Verlust der Schmerzwahrnehmung unter einer teils schweren Darmsymptomatik. Eine dieser Analgesie-assoziierten Varianten ist Nav1.9-L396P, die das distale S6-Segment in DI von Nav1.9 betrifft (King et al., 2017). Nav1.9-L396P wurde bereits in Nav1.9-KO-DRG-Neuronen untersucht. Allerdings waren die Untersuchungen aufgrund überlappender Stromantworten endogener Nav1.8-Kanäle auf ein eng begrenztes Spannungsfenster limitiert. Aufgrund dessen und der allgemein geringen Stromamplituden der transfizierten Kanäle, waren keine verlässlichen Aussagen in Bezug auf die schnelle Kanalinaktivierung möglich (King et al., 2017). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Expression von Nav1.9-L396P erstmals in murinen Darmneuronen. Dies war von besonderem Interesse, da die Variante mit schwerer gastrointestinaler Symptomatik assoziiert ist und Darmneurone Nav1.9 nativ exprimieren (Rugiero et al., 2003). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ließen neben einer gesteigerten Kanalaktivierung auch eine zu höheren Spannungen verschobene Spannungsabhängigkeit der Kanalinaktivierung von Nav1.9-L396P-Kanälen erkennen. In der Folge ergibt sich eine erhöhte Basalaktivität (erhöhter *Window-Current*) der Kanäle, die proexzitatorische Eigenschaften dieser Variante vermuten lässt. Zusätzlich war ein nahezu vollständiger Verlust der schnellen Inaktivierung sichtbar, der mit einem verstärkten Einstrom von Na<sup>+</sup>-Ionen im gesamten physiologisch relevanten Spannungsbereich einhergeht. Die verstärkte Aktivierung und beeinträchtigte Inaktivierung von L396P-Kanälen deckt sich qualitativ mit den Daten der anderen beiden Analgesie-assoziierten Varianten L811P und L1302F (Huang et al., 2017; Leipold et al., 2013). Beim Vergleich der Funktionsveränderungen Schmerz- und Analgesie-assoziiierter Nav1.9-Varianten ist zu erkennen, dass die *GOF*-Eigenschaften bei Analgesie-assoziierten Varianten stärker ausgeprägt sind als es bei den Schmerz-assoziierten Varianten der Fall ist. Zudem weisen die Analgesie-assoziierten Varianten eine Kombination aus verstärkter Aktivierung und beeinträchtigter Inaktivierung auf (Huang et al., 2017; King et al., 2017; Kuehs et al., 2022; Leipold et al., 2013), während mit Schmerz assoziierte Nav1.9-Varianten mildere Effekte zeigen, die entweder in einer verstärkten Aktivierung (Huang et al., 2014), einer beeinträchtigten Inaktivierung (X. Zhou et al., 2017), oder der Kombination beider Effekte (Han et al., 2015; Huang et al., 2014; Leipold et al., 2015) bestehen. Möglicherweise ist die

Kombination beider Effekte sowie eine starke Ausprägung davon ein entscheidendes Merkmal für Nav1.9-abhängige Analgesie.

Wie L396P-Kanäle zu Darmfunktionsstörungen in Form von Obstipation führen, ist eine weitere wichtige Frage. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen eine vergrößerte *Window-Current* auf Kanalebene. In der Studie von King et al. 2017 wurde beobachtet, dass die Variante L396P das RMP transfizierter DRG-Neurone um ca. 5 mV anhebt, was ebenfalls eine proexzitatorische Eigenschaft darstellt. Eine höhere Erregbarkeit in Nav1.9-exprimierenden enterischen Neuronen (IPANs), könnte in der vermehrten Freisetzung von Neuropeptiden resultieren, die in der Folge auf weitere Nervenzellen oder sekretorische Zellen wirken. Weiterhin würde die Kommunikation der IPANs mit anderen Motoneuronen und Interneuronen beeinflusst werden, was Auswirkungen auf den Transport der Nahrung durch den Darmtrakt haben und damit gastrointestinale Beschwerden hervorrufen könnte. Untersuchungen deuten interessanterweise darauf hin, dass *LOF*-Varianten von Nav1.9 die intestinale Motilität bei Mäusen erhöhen, während *GOF*-Varianten von Nav1.9 die intestinale Motilität reduzieren (Zhao et al., 2023). Studien mit Nav1.9-KO-Mäusen zeigten zudem eine erhöhte Darmmotilität der Tiere im Vergleich zum Wildtyp (Copel et al., 2013). Knock-in-Mäuse hingegen, die die Variante Nav1.9-L799P (homolog zur humanen Analgesie-assoziierten Variante L811P) trugen, wiesen eine leicht verminderte intestinale Peristaltik auf (Ebbinghaus et al., 2020). Allerdings war dieser Unterschied nicht signifikant. Studien mit Knock-in-Mäusen, die die *GOF*-Variante Nav1.9-R222S trugen, konnten ebenfalls im Vergleich zum Wildtyp eine verminderte intestinale Motilität zeigen (Zhao et al., 2022). Denkbar wäre, dass eine erhöhte Aktivität der IPANs durch Nav1.9-*GOF*-Varianten die Aktivität anderer verknüpfter Neurone im Gastrointestinaltrakt beeinflusst und damit zu einer verminderten intestinalen Funktion beiträgt (Zhao et al., 2023). Dies wäre auch eine mögliche Erklärung für die Obstipation beim Träger der Variante Nav1.9-L396P. Weitere Experimente sind nötig, um die Auswirkungen pathologischer Nav1.9-Varianten auf enterische Neurone im Detail zu verstehen.

## 4.5 Isolation enterischer Neurone

Die Gewinnung viabler Darmneurone für systematische elektrophysiologische Untersuchungen ist schwierig, da sie in dicken Muskelschichten eingebettet sind und weitverzweigte Netzwerke (sog. Plexi) bilden. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, Darmneurone aus dem *Plexus myentericus* von Mäusen (C57BL/6JRj) zu isolieren, anschließend mit DNA-Plasmiden zu transfizieren und mit der *Patch-Clamp*-Technik elektrophysiologisch zu untersuchen (Kuehs et al., 2022). Die Methode wurde dazu genutzt, die mit *CIP* und schwerer gastrointestinaler Symptomatik assoziierte Kanalvariante Nav1.9-L396P in Darmneuronen zur Expression zu bringen und anschließend funktionell zu untersuchen, wie es bereits im vorherigen Abschnitt 4.4 erläutert wurde. Die Methode wurde für die Isolation enterischer Neurone von Wildtyp-Mäusen (C57BL/6JRj) optimiert, jedoch kann die Technik auch an genetisch modifizierte Mauslinien oder Darmgewebe anderer Kleintiere angepasst werden, was das Anwendungsspektrum deutlich erweitert (Kuehs et al., 2022). Je nach Fragestellung ist es außerdem möglich, die Isolation von Neuronen auf einen spezifischen Darmabschnitt zu begrenzen. Ein wesentlicher Unterschied im Vergleich zu anderen Isolationsmethoden (Hao et al., 2012; T. H. Smith et al., 2013) besteht darin, eine besonders schonende enzymatische Behandlung des Gewebes mit der gezielten Anreicherung enterischer Neurone zu kombinieren (Kuehs et al., 2022). Limitierungen der Methode bestehen zum einen in der Desintegration der ursprünglichen neuronalen Netzwerke und zum anderen im Fehlen neuronaler Subtypen aus den Gewebeschichten der Mukosa und Submukosa (Kuehs et al., 2022). Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht alle neuronalen Subtypen aus dem *Plexus myentericus* in der finalen Zellkultur erhalten bleiben (Kuehs et al., 2022). Weiterhin ist es möglich, dass sich die Neurone aufgrund der Zellkulturbedingungen hinsichtlich ihres physiologischen Profils über die Zeit verändern, wie es beispielsweise in Kulturen von DRG-Neuronen beschrieben wurde (Fjell et al., 1999; Leffler et al., 2002). Perspektivisch bietet die etablierte Isolationsmethode eine solide Grundlage für weiterführende Untersuchungen physiologischer und pathophysiologischer Zustände der Neurone im ENS, insbesondere im Zusammenhang mit Nav1.9.

#### **4.6 Nav1.9-Kanäle werden funktionell durch ROS moduliert**

ROS stehen mit Schmerzen unterschiedlicher Ätiologie in Verbindung (Salvemini et al., 2011). Dabei spielen erhöhte ROS-Level vor allem bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle (Ndengele et al., 2008). Im Tiermodell ist die Rolle von ROS bereits gut belegt, da antioxidative Maßnahmen dort die Schmerzreaktionen verringern (Hacimuftuoglu et al., 2006; Janes et al., 2012; Kallenborn-Gerhardt et al., 2013; Khattab, 2006; H. K. Kim et al., 2004; I. Lee et al., 2007). Auch bei Schmerzpatienten konnte gezeigt werden, dass antioxidative Maßnahmen, z.B. die Verabreichung von Vitamin C und E oder Coenzym Q10, die Schmerzreaktionen verringern (Fernández-Araque et al., 2022; D. Zhou et al., 2015). Nav-Kanäle sind ein bekanntes ROS-Target in Nozizeptoren. Vor allem Nav1.8 sticht hier mit seiner hohen ROS-Sensitivität hervor (Schink et al., 2016; Schlüter & Leffler, 2016). Neben einer Reduktion des Peakstroms, wurde als Folge der Applikation von ROS eine Verlangsamung der Kinetik sowie ein Shift der Gleichgewichtsinaktivierung zu höheren Potentialen beobachtet. Als Folge davon zeigte sich eine Verbreiterung der APs, sowie eine verminderte Erregbarkeit der Neurone (Schink et al., 2016). Weiterhin waren die Effekte in Nav1.8-KO-DRG-Neuronen deutlich geringer als in Wildtyp-DRG-Neuronen (Schink et al., 2016), was die Besonderheit von Nav1.8 als ROS-Target betont. Die ROS-Sensitivität von Nav1.9 ist aufgrund der schwierigen Handhabung des Kanals unbekannt. Ebenso ist nicht bekannt, welche Bedeutung die Oxidation von Nav1.9 durch ROS an der Schmerzentstehung hat. Experimente deuten darauf hin, dass durch inflammatorische Prozesse freigesetzte ROS über verminderte Cholesterol-Level auf Nav1.9-Kanäle wirken und dadurch das Schmerzempfinden beeinflusst wird (Amsalem et al., 2018). Ob Nav1.9-Kanäle direkt durch ROS oxidiert werden war allerdings unbekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden Daten zur ROS-Sensitivität von DRG-spezifischen TTXs Nav-Kanälen sowie für die TTXr Kanäle Nav1.8 und Nav1.9 unter identischen experimentellen Bedingungen erhoben. Die Ergebnisse zeigen, dass sowohl TTXs-Nav-Kanäle als auch die TTXr-Kanäle Nav1.8 und Nav1.9 in Nozizeptoren durch ROS funktionell beeinflusst werden. Dabei ist zu erkennen, dass die ROS-spezifische Modifikation Subtyp-spezifisch verläuft und TTXs-Kanäle im Vergleich zu den TTXr-Kanälen funktionell weniger stark durch ROS beeinflusst werden. Damit wurden frühere Studien bestätigt, die zeigen, dass Nav1.8 sensitiver gegenüber ROS ist, als die TTXs-Nav-Kanäle (Schink et al., 2016). Es zeigten sich drei ROS-abhängige Effekte: Eine Reduktion des Peakstroms, eine Erhöhung der funktionellen Kanalverfügbarkeit sowie ein teilweiser Verlust der schnellen Kanalinaktivierung. Vor

allem der ROS-induzierte Inaktivierungsverlust war bei Nav<sub>v</sub>1.8 deutlich stärker ausgeprägt als bei den TTXs Nav<sub>v</sub>-Kanälen. Bei Nav<sub>v</sub>1.9 war die ROS-abhängige Verlangsamung der Kanalinaktivierung auf einem ähnlich hohen Niveau wie bei Nav<sub>v</sub>1.8. Somit ist auch Nav<sub>v</sub>1.9 deutlich ROS-sensitiver als die TTXs Nav<sub>v</sub>-Kanäle. Eine ROS-spezifische Reduktion des Peakstroms wurde bei Nav<sub>v</sub>1.9 nicht gefunden, stattdessen ein rein zeitabhängiger ROS-unabhängiger *Rundown*, der wahrscheinlich dem invasiven Charakter der *Patch-Clamp*-Technik geschuldet ist. Durch das Aufbrechen der Zellmembran und die Diffusion der Pipettenlösung in das Zellinnere, kommt es zur Verarmung an zytosolischen Faktoren. Dieser *Rundown* ist ein bekanntes Phänomen (Coste et al., 2004; Marler et al., 2018), das auch andere stark durch zytosolische Prozesse regulierte Kanäle, wie z.B. Kaliumkanäle, betrifft (Proks et al., 2016). Eine Limitierung besteht darin, dass der *Rundown* die ROS-abhängige Regulation des Nav<sub>v</sub>1.9-Peakstroms teilweise maskieren könnte, was die Interpretation der Daten erschwert. Es muss an dieser Stelle auch erwähnt werden, dass die hier mittels Licht-vermittelte Dekomposition von LY und die damit erzeugte ROS-Konzentration wahrscheinlich deutlich über den physiologisch zu erwartenden ROS-Konzentrationen liegt, die im Bereich von wenigen nanomolar oder pikomolar vermutet werden (Chance et al., 1979). Pathophysiologische Prozesse, die oxidativen Stress induzieren, lassen einen Anstieg der ROS-Konzentration erwarten, jedoch sind weder die exakten Konzentrationen noch die beteiligten ROS-Spezies und deren Lebensdauer bekannt. Bei den durchgeführten Experimenten handelt es sich zudem um Kurzzeitexperimente, wohingegen Erkrankungen, die mit ROS in Verbindung stehen, durch chronisch erhöhte ROS-Level gekennzeichnet sind und durch unterschiedliche Faktoren wie Alterungsprozesse und Erkrankungen, wie z.B. Diabetes mellitus, mitbeeinflusst werden (Finkel & Holbrook, 2000; Volpe et al., 2018). In der vorliegenden Arbeit lag der Fokus auf der akuten Modulation von Nozizeptor-spezifischen Nav<sub>v</sub>-Kanälen durch ROS. Dabei wurde eine funktionelle Modulation der endogenen TTXs Kanäle, sowie von Nav<sub>v</sub>1.8 durch ROS beobachtet. Erstmals konnte zudem gezeigt werden, dass auch Nav<sub>v</sub>1.9 einer ROS-abhängigen Modulation unterliegt und zusammen mit Nav<sub>v</sub>1.8 zur Gruppe der besonders ROS-sensitiven Nav<sub>v</sub>-Kanäle gehört. Somit sollte die Interaktion von ROS mit Nav<sub>v</sub>1.9 bei der Interpretation von ROS-Auswirkungen auf die Erregbarkeit der Neurone berücksichtigt werden.

## 5 Zusammenfassung

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle (Navs) sind von entscheidender Bedeutung für die Signalübertragung in elektrisch erregbaren Zellen, wie Muskel- und Nervenzellen. Im Menschen kodieren neun Gene (*SCN1A-SCN5A*, *SCN8A-SCN11A*) für die Nav-Subtypen Nav1.1-Nav1.9. Nav1.9 ist neben Nav1.7 und Nav1.8 einer der wesentlichen Nav-Kanäle in sensorischen Afferenzen und nimmt hinsichtlich seiner Funktionseigenschaften eine Sonderstellung innerhalb der Nav-Kanalfamilie ein. Anders als die übrigen Nav-Subtypen sind Nav1.9-Kanäle bereits beim Ruhemembranpotential aktiv und generieren aufgrund ihrer ausgeprägt langsamen Inaktivierungskinetik persistente Na<sup>+</sup>-Ströme. Die physiologische Relevanz der Nav1.9-Kanäle wird durch zahlreiche Mutationen im dafür kodierenden *SCN11A*-Gen unterstrichen, die beim Menschen kongenitale Analgesie oder periphere Schmerzattacken auslösen können und oftmals mit ausgeprägten gastrointestinalen Beschwerden einhergehen. Interessanterweise steigern die bekannten und funktionell charakterisierten pathogenen Nav1.9-Varianten die Kanalaktivität und zeigen damit *gain-of-function*-Eigenschaften. Die Zunahme der Kanalaktivität beruht dabei entweder auf einer verstärkten Kanalaktivierung, einer eingeschränkten Kanalinaktivierung oder der Kombination beider Funktionsveränderungen. Die Datenlage suggeriert, dass insbesondere das Inaktivierungsverhalten der Nav1.9-Varianten entscheidend an der Ausprägung des klinischen Phänotyps beteiligt ist. Die vorliegende Dissertationsschrift ist in drei Themenkomplexe gegliedert, in denen verschiedene Aspekte der Modulation von Nav1.9 untersucht werden.

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des Nav1.9-C-Terminus für die Kanalinaktivierung. Mittels systematisch erzeugter Kanalchimären und deren detaillierter Analyse in *Patch-Clamp*-Experimenten wurde ein 100-Aminosäuren-umfassender Abschnitt im C-Terminus identifiziert, der die Inaktivierungseigenschaften der Kanäle maßgeblich mitbestimmt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die Funktionseigenschaften mehrerer potenziell pathogener Nav1.9-Varianten untersucht, die bei Patienten mit veränderter Schmerzwahrnehmung identifiziert wurden, und die Varianten hinsichtlich ihrer Krankheitsrelevanz bewertet. Zusätzlich zu einer veränderten Schmerzwahrnehmung gehen pathogene Nav1.9-Varianten beim Menschen regelhaft mit gastrointestinalen Beschwerden einher. Dieser Zusammenhang ist zwar bekannt, doch aufgrund der schwierigen

experimentellen Zugänglichkeit enterischer Neurone, kaum untersucht. Um die Auswirkungen krankheitsassoziierter Varianten auf enterische Neurone systematisch untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Verfahren entwickelt, das die Isolation, Transfektion und systematische elektrophysiologische Analyse enterischer Neurone ermöglicht. Mit Hilfe dieser Methodik wurde die mit Analgesie- und Obstipation assoziierte Variante Nav1.9-L396P erstmals in enterische Neurone eingebracht und funktionell charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Nav1.9-L396P-Kanäle nahezu vollständig inaktivierungsdefizient und somit vermutlich entscheidend an der Ausprägung des klinischen Phänotyps beteiligt sind.

Im dritten Teil der Arbeit wurden die Auswirkungen reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die mit Schmerzen unterschiedlichster Ätiologie in Verbindung stehen, auf die Funktion Nozizeptor-spezifischer Nav-Kanäle untersucht. Einerseits bewirken ROS eine Reduktion des Na<sup>+</sup>-Peakstroms. Andererseits verzögern sie aber auch die physiologisch wichtige Kanalinaktivierung. Diese potenziell proexzitatorische Funktionsveränderung ist bei Nav1.8 besonders stark ausgeprägt, weshalb dieser Kanal lange Zeit als ROS-sensitivster Nav-Subtyp galt. Daten zur ROS-Sensitivität der Nav1.9-Kanäle existieren bislang nicht. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals Nav1.9 hinsichtlich seiner ROS-Sensitivität analysiert und gezeigt, dass er eine ähnlich hohe ROS-Sensitivität wie Nav1.8 aufweist und somit ebenfalls zu den stark ROS-regulierten Nav-Kanälen gezählt werden muss.

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahern, C. A., Payandeh, J., Bosmans, F., & Chanda, B. (2016). The hitchhiker's guide to the voltage-gated sodium channel galaxy. *Journal of General Physiology*, *147*(1), 1-24. <https://doi.org/10.1085/jgp.201511492>
- Akopian, A. N., Sivilotti, L., & Wood, J. N. (1996). A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature*, *379*, 257–262. <https://doi.org/10.1038/379257a0>
- Akopian, A. N., Souslova, V., England, S., Okuse, K., Ogata, N., Ure, J., Smith, A., Kerr, B. J., McMahon, S. B., Boyce, S., Hill, R., Stanfa, L. C., Dickenson, A. H., & Wood, J. N. (1999). The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nature Neuroscience*, *2*(6), 541–548. <https://doi.org/10.1038/9195>
- Aley, K. O., & Levine, J. D. (1999). Role of Protein Kinase A in the Maintenance of Inflammatory Pain. *The Journal of Neuroscience*, *19*(6), 2181-2186. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-06-02181.1999>
- Alves-Simões, M., Tomni, C., Teege, L., Schmidt, A., Lürkens, M., Iseppon, F., Millet, Q., Kühns, S., Katona, I., Weis, J., Heinemann, S., Huebner, C. A., Wood, J., Leipold, E., Kurth, I., & Haag, N. (2024). Nav1.8/Nav1.9 double deletion mildly affects nociception/acute pain behavior. *Pain*. Epub ahead of print. PMID: 39382328. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000003411>. online veröffentlicht
- Amaya, F., Wang, H., Costigan, M., Allchorne, A. J., Hatcher, J. P., Egerton, J., Stean, T., Morisset, V., Grose, D., Gunthorpe, M. J., Chessell, I. P., Tate, S., Green, P. J., & Woolf, C. J. (2006). The Voltage-Gated Sodium Channel Nav1.9 Is an Effector of Peripheral Inflammatory Pain Hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience*, *26*(50), 12852–12860. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4015-06.2006>
- Amsalem, M., Poilbout, C., Ferracci, G., Delmas, P., & Padilla, F. (2018). Membrane cholesterol depletion as a trigger of Nav1.9 channel-mediated inflammatory pain. *The EMBO Journal*, *37*(8), e97349. <https://doi.org/10.15252/embj.201797349>
- Angus, M., Peters, C. H., Poburko, D., Brimble, E., Spelbrink, E. M., & Ruben, P. C. (2019). Case studies in neuroscience: A novel amino acid duplication in the NH<sub>2</sub>-terminus of the brain sodium channel Nav1.1 underlying Dravet syndrome. *Journal of Neurophysiology*, *122*(5), 1975-1980. <https://doi.org/10.1152/jn.00491.2019>
- Bai, Q., Shao, J., Cao, J., Ren, X., Cai, W., Su, S., George, S., Tan, Z., Zang, W., & Dong, T. (2020). Protein kinase C- $\alpha$  upregulates sodium channel Nav1.9 in nociceptive dorsal root ganglion neurons in an inflammatory arthritis pain model of rat. *Journal of Cellular Biochemistry*, *121*(1), 768–778. <https://doi.org/10.1002/jcb.29322>
- Baker, M. D., Chandra, S. Y., Ding, Y., Waxman, S. G., & Wood, J. N. (2003). GTP-induced tetrodotoxin-resistant Na<sup>+</sup> current regulates excitability in mouse and rat small diameter sensoryneurons. *The Journal of Physiology*, *548*(2), 373–382.
- Baker, M. D., & Nassar, M. A. (2020). Painful and painless mutations of SCN9A and SCN11A voltage-gated sodium channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *472*(7), 865-880. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02419-9>

- Beacham, D., Ahn, M., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2007). Sites and Molecular Mechanisms of Modulation of Nav1.2 Channels by Fyn Tyrosine Kinase. *Journal of Neuroscience*, 27(43), 11543-11551. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1743-07.2007>
- Bennett, D. L., Clark, A. J., Huang, J., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiological Reviews*, 99(2), 1079-1151. <https://doi.org/10.1152/physrev.00052.2017>
- Bennett, D. L. H., & Woods, C. G. (2014). Painful and painless channelopathies. *The Lancet Neurology*, 13(6), 587–599. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70024-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70024-9)
- Bezánilla, F. (2000). The Voltage Sensor in Voltage-Dependent Ion Channels. *Physiological Reviews*, 80(2), 555–592. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.2.555>
- Black, J. A., Vasylyev, D., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2014). Nav1.9 expression in magnocellular neurosecretory cells of supraoptic nucleus. *Experimental Neurology*, 253, 174–179.
- Bouza, A. A., & Isom, L. L. (2017). Voltage-Gated Sodium Channel  $\beta$  Subunits and Their Related Diseases. In M. Chahine (Hrsg.), *Voltage-gated Sodium Channels: Structure, Function and Channelopathies* (Bd. 246, S. 423–450). Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_48](https://doi.org/10.1007/164_2017_48)
- Cai, T., Jen, H.-I., Kang, H., Klisch, T. J., Zoghbi, H. Y., & Groves, A. K. (2015). Characterization of the Transcriptome of Nascent Hair Cells and Identification of Direct Targets of the Atoh1 Transcription Factor. *The Journal of Neuroscience*, 35(14), 5870–5883. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5083-14.2015>
- Catterall, W. A. (2000). From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, 26(1), 13–25.
- Catterall, W. A., Goldin, A. L., & Waxman, S. G. (2005). International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Sodium Channels. *Pharmacological Reviews*, 57(4), 397–409. <https://doi.org/10.1124/pr.57.4.4>
- Cestèle, S., Qu, Y., Rogers, J. C., Rochat, H., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). Voltage Sensor–Trapping: Enhanced Activation of Sodium Channels by  $\beta$ -Scorpion Toxin Bound to the S3–S4 Loop in Domain II. *Neuron*, 21(4), 919–931. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80606-6](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80606-6)
- Chance, B., Sies, H., & Boveris, A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), 527–605. <https://doi.org/10.1152/physrev.1979.59.3.527>
- Cheng, X., Choi, J.-S., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2021). Mini-review - Sodium channels and beyond in peripheral nerve disease: Modulation by cytokines and their effector protein kinases. *Neuroscience Letters*, 741, 135446. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.135446>
- Choi, J.-S., Hudmon, A., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2006). Calmodulin Regulates Current Density and Frequency-Dependent Inhibition of Sodium Channel Nav1.8 in DRG Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 96(1), 97–108. <https://doi.org/10.1152/jn.00854.2005>

- Choi, J.-S., Tyrrell, L., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2004). Functional role of the C-terminus of voltage-gated sodium channel Nav1.8. *FEBS Letters*, 572(1–3), 256–260. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.047>
- Clatot, J., Hoshi, M., Wan, X., Liu, H., Jain, A., Shinlapawittayatorn, K., Marionneau, C., Ficker, E., Ha, T., & Deschênes, I. (2017). Voltage-gated sodium channels assemble and gate as dimers. *Nature Communications*, 8(1), 2077. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02262-0>
- Copel, C., Clerc, N., Osorio, N., Delmas, P., & Mazet, B. (2013). The Nav1.9 channel regulates colonic motility in mice. *Frontiers in Neuroscience*, 7, Article 58. <https://doi.org/10.3389/fnins.2013.00058>
- Copel, C., Osorio, N., Crest, M., Gola, M., Delmas, P., & Clerc, N. (2009). Activation of neurokinin 3 receptor increases Nav1.9 current in enteric neurons: Activation of NK3r increases Nav 1.9 current in enteric neurons. *The Journal of Physiology*, 587(7), 1461–1479. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2009.169409>
- Coste, B., Osorio, N., Padilla, F., Crest, M., & Delmas, P. (2004). Gating and modulation of presumptive Nav1.9 channels in enteric and spinal sensory neurons. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 26(1), 123–134. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2004.01.015>
- Dib-Hajj, S., Black, J. A., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2002). Na<sub>v</sub>1.9: A sodium channel with unique properties. *Trends in Neurosciences*, 25(5), 253–259. [https://doi.org/10.1016/S0166-2236\(02\)02150-1](https://doi.org/10.1016/S0166-2236(02)02150-1)
- Dib-Hajj, S. D., Choi, J. S., Macala, L. J., Tyrrell, L., Black, J. A., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2009). Transfection of rat or mouse neurons by biolistics or electroporation. *Nature Protocols*, 4(8), Article 8. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.90>
- Dib-Hajj, S., Tyrrell, L., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1998). Na<sub>v</sub>1.9, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(15), 8963–8968. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.15.8963>
- Dubin, A. E., & Patapoutian, A. (2010). Nociceptors: The sensors of the pain pathway. *Journal of Clinical Investigation*, 120(11), 3760–3772. <https://doi.org/10.1172/JCI42843>
- Dyck, P. J. (1982). The Causes, Classification, and Treatment of Peripheral Neuropathy. *New England Journal of Medicine*, 307(5), 283–286. <https://doi.org/10.1056/NEJM198207293070504>
- Ebbinghaus, M., Tuchscher, L., Segond von Banchet, G., Liebmann, L., Adams, V., Gajda, M., Hübner, C. A., Kurth, I., & Schaible, H.-G. (2020). Gain-of-function mutation in SCN11A causes itch and affects neurogenic inflammation and muscle function in Scn11a+/L799P mice. *PLOS ONE*, 15(8), Article 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0237101>
- Fernández-Araque, A., Verde, Z., Torres-Ortega, C., Sainz-Gil, M., Velasco-Gonzalez, V., González-Bernal, J. J., & Mielgo-Ayuso, J. (2022). Effects of Antioxidants on Pain Perception in Patients with Fibromyalgia—A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 11(9), 2462. <https://doi.org/10.3390/jcm11092462>

- Filatov, G. N., Nguyen, T. P., Kraner, S. D., & Barchi, R. L. (1998). Inactivation and Secondary Structure in the D4/S4-5 Region of the SkM1 Sodium Channel. *Journal of General Physiology*, *111*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1085/jgp.111.6.703>
- Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, *408*(6809), 239–247. <https://doi.org/10.1038/35041687>
- Fjell, J., Cummins, T. R., Dib-Hajj, S. D., Fried, K., Black, J. A., & Waxman, S. G. (1999). Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Molecular Brain Research*, *67*(2), 267–282. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(99\)00070-4](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(99)00070-4)
- Furness, J. (1998). Intrinsic primary afferent neurons of the intestine. *Progress in Neurobiology*, *54*(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(97\)00051-8](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(97)00051-8)
- Ginanneschi, F., Rubegni, A., Moro, F., Volpi, N., Santorelli, F. M., & Rossi, A. (2019). SCN11A variant as possible pain generator in sensory axonal neuropathy. *Neurological Sciences*, *40*(6), 1295–1297. <https://doi.org/10.1007/s10072-019-3703-4>
- Gold, M. S., Levine, J. D., & Correa, A. M. (1998). Modulation of TTX-R INa by PKC and PKA and Their Role in PGE<sub>2</sub>-Induced Sensitization of Rat Sensory Neurons In Vitro. *The Journal of Neuroscience*, *18*(24), 10345–10355. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.18-24-10345.1998>
- Goldin, A. L. (2001). Resurgence of Sodium Channel Research. *Annual Review of Physiology*, *63*(1), 871–894. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.63.1.871>
- Goldin, A. L., Barchi, R. L., Caldwell, J. H., Hofmann, F., Howe, J. R., Hunter, J. C., Kallen, R. G., Mandel, G., Meisler, M. H., Netter, Y. B., Noda, M., Tamkun, M. M., Waxman, S. G., Wood, J. N., & Catterall, W. A. (2000). Nomenclature of Voltage-Gated Sodium Channels. *Neuron*, *28*(2), 365–368. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)00116-1](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)00116-1)
- Goral, R. O., Leipold, E., Nematian-Ardestani, E., & Heinemann, S. H. (2015). Heterologous expression of Nav1.9 chimeras in various cell systems. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *467*(12), 2423–2435. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1709-1>
- Grundy, D., Al-Chaer, E. D., Aziz, Q., Collins, S. M., Ke, M., Taché, Y., & Wood, J. D. (2006). Fundamentals of Neurogastroenterology: Basic Science. *Gastroenterology*, *130*(5), 1391–1411. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.060>
- Gütter, C., Benndorf, K., & Zimmer, T. (2013). Characterization of N-terminally mutated cardiac Na<sup>+</sup> channels associated with long QT syndrome 3 and Brugada syndrome. *Frontiers in Physiology*, *4*. Article 153. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00153>
- Hacimuftuoglu, A., Handy, C. R., Goettl, V. M., Lin, C. G., Dane, S., & Stephens, R. L. (2006). Antioxidants attenuate multiple phases of formalin-induced nociceptive response in mice. *Behavioural Brain Research*, *173*(2), 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2006.06.030>
- Han, C., Yang, Y., de Greef, B. T. A., Hoeijmakers, J. G. J., Gerrits, M. M., Verhamme, C., Qu, J., Lauria, G., Merkies, I. S. J., Faber, C. G., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2015). The Domain II S4-S5 Linker in Nav1.9: A Missense Mutation Enhances Activation, Impairs Fast Inactivation, and Produces Human Painful Neuropathy.

*NeuroMolecular Medicine*, 17(2), 158–169. <https://doi.org/10.1007/s12017-015-8347-9>

- Han, C., Yang, Y., Morsche, R. H. te, Drenth, J. P. H., Politei, J. M., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2017). Familial gain-of-function Nav1.9 mutation in a painful channelopathy. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 88(3), 233–240. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-313804>
- Hao, M. M., Lomax, A. E., McKeown, S. J., Reid, C. A., Young, H. M., & Bornstein, J. C. (2012). Early Development of Electrical Excitability in the Mouse Enteric Nervous System. *Journal of Neuroscience*, 32(32), Article 32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1426-12.2012>
- Heinemann, S. H., Terlau, H., Stühmer, W., Imoto, K., & Numa, S. (1992). Calcium channel characteristics conferred on the sodium channel by single mutations. *Nature*, 356(6368), 441–443. <https://doi.org/10.1038/356441a0>
- Herzog, R. I., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Persistent TTX-Resistant Na<sup>+</sup> Current Affects Resting Potential and Response to Depolarization in Simulated Spinal Sensory Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 86(3), 1351–1364. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.3.1351>
- Higure, Y., Katayama, Y., Takeuchi, K., Ohtubo, Y., & Yoshii, K. (2003). Lucifer Yellow Slows Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Current Inactivation in a Light-Dependent Manner in Mice. *The Journal of Physiology*, 550(1), Article 1. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2003.040733>
- Hiyama, T. Y., Watanabe, E., Ono, K., Inenaga, K., Tamkun, M. M., Yoshida, S., & Noda, M. (2002). Na<sub>x</sub> channel involved in CNS sodium-level sensing. *Nature Neuroscience*, 5(6), 511–512. <https://doi.org/10.1038/nn0602-856>
- Hockley, J. R. F., Boundouki, G., Cibert-Goton, V., McGuire, C., Yip, P. K., Chan, C., Tranter, M., Wood, J. N., Nassar, M. A., Blackshaw, A. L., Aziz, Q., Michael, G. J., Baker, M. D., Winchester, W. J., Knowles, C. H., & Bulmer, D. C. (2014). Multiple roles for Nav1.9 in the activation of visceral afferents by noxious inflammatory, mechanical, and human disease-derived stimuli. *Pain*, 155(10), 1962–1975. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2014.06.015>
- Hoffmann, T., Kistner, K., Carr, R. W., Nassar, M. A., Reeh, P. W., & Weidner, C. (2017). Reduced excitability and impaired nociception in peripheral unmyelinated fibers from Nav1.9-null mice. *Pain*, 158(1), 58–67. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000000723>
- Hoshi, T., & Heinemann, S. H. (2001). Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction. *The Journal of Physiology*, 531(1), 1–11. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.2001.0001j.x>
- Hu, D., Barajas-Martínez, H., Pfeiffer, R., Dezi, F., Pfeiffer, J., Buch, T., Betzenhauser, M. J., Belardinelli, L., Kahlig, K. M., Rajamani, S., DeAntonio, H. J., Myerburg, R. J., Ito, H., Deshmukh, P., Marieb, M., Nam, G.-B., Bhatia, A., Hasdemir, C., Haïssaguerre, M., ... Antzelevitch, C. (2014). Mutations in SCN10A Are Responsible for a Large Fraction of Cases of Brugada Syndrome. *Journal of the American College of Cardiology*, 64(1), Article 1. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2014.04.032>

- Huang, J., Estacion, M., Zhao, P., Dib-Hajj, F. B., Schulman, B., Abicht, A., Kurth, I., Brockmann, K., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2019). A Novel Gain-of-Function Nav1.9 Mutation in a Child With Episodic Pain. *Frontiers in Neuroscience*, *13*, 918. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.00918>
- Huang, J., Han, C., Estacion, M., Vasylyev, D., Hoeijmakers, J. G. J., Gerrits, M. M., Tyrrell, L., Lauria, G., Faber, C. G., Dib-Hajj, S. D., Merkies, I. S. J., & Waxman, S. G. (2014). Gain-of-function mutations in sodium channel Nav1.9 in painful neuropathy. *Brain*, *137*(6), 1627–1642. <https://doi.org/10.1093/brain/awu079>
- Huang, J., Vanoye, C. G., Cutts, A., Goldberg, Y. P., Dib-Hajj, S. D., Cohen, C. J., Waxman, S. G., & George, A. L. (2017). Sodium channel Nav1.9 mutations associated with insensitivity to pain dampen neuronal excitability. *Journal of Clinical Investigation*, *127*(7), Article 7. <https://doi.org/10.1172/JCI92373>
- Iqbal, S. M., Aufy, M., Shabbir, W., & Lemmens-Gruber, R. (2018). Identification of phosphorylation sites and binding pockets for modulation of Nav1.5 channel by Fyn tyrosine kinase. *The FEBS Journal*, *285*(13), Article 13. <https://doi.org/10.1111/febs.14496>
- Janes, K., Neumann, W. L., & Salvemini, D. (2012). Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, *1822*(5), 815–821. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2011.12.008>
- Kakimura, J., Zheng, T., Uryu, N., & Ogata, N. (2010). Regulation of the Spontaneous Augmentation of Nav1.9 in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons: Effect of PKA and PKC Pathways. *Marine Drugs*, *8*(3), 728–740. <https://doi.org/10.3390/md8030728>
- Kallenborn-Gerhardt, W., Schröder, K., Geisslinger, G., & Schmidtko, A. (2013). NOXious signaling in pain processing. *Pharmacology & Therapeutics*, *137*(3), 309–317. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.11.001>
- Kaluza, L., Meents, J. E., Hampl, M., Rösseler, C., Hautvast, P. A. I., Detro-Dassen, S., Hausmann, R., Schmalzing, G., & Lampert, A. (2018). Loss-of-function of Nav1.8/D1639N linked to human pain can be rescued by lidocaine. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *470*(12), 1787–1801. <https://doi.org/10.1007/s00424-018-2189-x>
- Kass, R. S. (2006). Sodium channel inactivation in heart: A novel role of the carboxy-terminal domain. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, *17* Suppl 1, S21–S25. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8167.2006.00381.x>
- Kassmann, M., Hansel, A., Leipold, E., Birkenbeil, J., Lu, S.-Q., Hoshi, T., & Heinemann, S. H. (2008). Oxidation of multiple methionine residues impairs rapid sodium channel inactivation. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *456*(6), 1085–1095. <https://doi.org/10.1007/s00424-008-0477-6>
- Kellenberger, S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1996). Movement of the Na<sup>+</sup> Channel Inactivation Gate during Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, *271*(48), 30971–30979. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.48.30971>
- Kellenberger, S., West, J., Scheuer, T., & Catterall, W. (1997). Molecular analysis of the putative inactivation particle in the inactivation gate of brain type IIA Na<sup>+</sup> channels.

- The Journal of general physiology*, 109(5), 589–605.  
<https://doi.org/10.1085/jgp.109.5.589>
- Kerth, C. M., Hautvast, P., Körner, J., Lampert, A., & Meents, J. E. (2021). Phosphorylation of a chronic pain mutation in the voltage-gated sodium channel Nav1.7 increases voltage sensitivity. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100227.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.014288>
- Khattab, M. M. (2006). TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates peroxynitrite- and superoxide anion-enhanced carrageenan-induced paw edema and hyperalgesia: A key role for superoxide anion. *European Journal of Pharmacology*, 548(1), 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2006.08.007>
- Kim, H. K., Park, S. K., Zhou, J.-L., Tagliabatella, G., Chung, K., Coggeshall, R. E., & Chung, J. M. (2004). Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain*, 111(1), 116–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2004.06.008>
- Kim, J. S., Sun, H., Meeker, S., & Udem, B. J. (2023). Role of Nav1.9 in inflammatory mediator-induced activation of mouse airway vagal C-fibres. *The Journal of Physiology*, 601(6), 1139–1150.
- King, M. K., Leipold, E., Goehringer, J. M., Kurth, I., & Challman, T. D. (2017). Pain insensitivity: Distal S6-segment mutations in Nav1.9 emerge as critical hotspot. *Neurogenetics*, 18(3), 179–181. <https://doi.org/10.1007/s10048-017-0513-9>
- Kist, A. M., Sagafos, D., Rush, A. M., Neacsu, C., Eberhardt, E., Schmidt, R., Lunden, L. K., Ørstavik, K., Kaluza, L., Meents, J., Zhang, Z., Carr, T. H., Salter, H., Malinowsky, D., Wollberg, P., Krupp, J., Kleggetveit, I. P., Schmelz, M., Jørum, E., ... Namer, B. (2016). SCN10A Mutation in a Patient with Erythromelalgia Enhances C-Fiber Activity Dependent Slowing. *PLOS ONE*, 11(9), Article 9.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161789>
- Kuehs, S., Teege, L., Hellberg, A.-K., Stanke, C., Haag, N., Kurth, I., Blum, R., Nau, C., & Leipold, E. (2022). Isolation and transfection of myenteric neurons from mice for patch-clamp applications. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1076187.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1076187>
- Laedermann, C. J., Abriel, H., & Decosterd, I. (2015). Post-translational modifications of voltage-gated sodium channels in chronic pain syndromes. *Frontiers in Pharmacology*, 6, 263. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00263>
- Lee, A., & Goldin, A. L. (2008). Role of the amino and carboxy termini in isoform-specific sodium channel variation: Sodium channel termini and isoform variation. *The Journal of Physiology*, 586(16), Article 16.  
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2008.156299>
- Lee, I., Kim, H. K., Kim, J. H., Chung, K., & Chung, J. M. (2007). The role of reactive oxygen species in capsaicin-induced mechanical hyperalgesia and in the activities of dorsal horn neurons. *PAIN®*, 133(1), 9–17.  
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2007.01.035>
- Lee, P. R., & Fields, R. D. (2021). Activity-Dependent Gene Expression in Neurons. *The Neuroscientist*, 27(4), 355–366. <https://doi.org/10.1177/1073858420943515>

- Leffler, A., Cummins, T. R., Dib-Hajj, S. D., Hormuzdiar, W. N., Black, J. A., & Waxman, S. G. (2002). GDNF and NGF Reverse Changes in Repriming of TTX-Sensitive Na<sup>+</sup> Currents Following Axotomy of Dorsal Root Ganglion Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 88(2), 650–658. <https://doi.org/10.1152/jn.2002.88.2.650>
- Leipold, E., Borges, A., & Heinemann, S. H. (2012). Scorpion  $\beta$ -toxin interference with Nav channel voltage sensor gives rise to excitatory and depressant modes. *Journal of General Physiology*, 139(4), 305–319. <https://doi.org/10.1085/jgp.201110720>
- Leipold, E., Hanson-Kahn, A., Frick, M., Gong, P., Bernstein, J. A., Voigt, M., Katona, I., Oliver Goral, R., Altmüller, J., Nürnberg, P., Weis, J., Hübner, C. A., Heinemann, S. H., & Kurth, I. (2015). Cold-aggravated pain in humans caused by a hyperactive Nav1.9 channel mutant. *Nature Communications*, 6(1), 10049. <https://doi.org/10.1038/ncomms10049>
- Leipold, E., Liebmann, L., Korenke, G. C., Heinrich, T., Gießelmann, S., Baets, J., Ebbinghaus, M., Goral, R. O., Stöberg, T., Hennings, J. C., Bergmann, M., Altmüller, J., Thiele, H., Wetzel, A., Nürnberg, P., Timmerman, V., De Jonghe, P., Blum, R., Schaible, H.-G., ... Kurth, I. (2013). A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nature Genetics*, 45(11), 1399–1404. <https://doi.org/10.1038/ng.2767>
- Leng, X.-R., Qi, X.-H., Zhou, Y.-T., & Wang, Y.-P. (2017). Gain-of-function mutation p.Arg225Cys in SCN11A causes familial episodic pain and contributes to essential tremor. *Journal of Human Genetics*, 62(6), 641–646. <https://doi.org/10.1038/jhg.2017.21>
- Lerche, H., Peter, W., Fleischhauer, R., Pika-Hartlaub, U., Malina, T., Mitrovic, N., & Lehmann-Horn, F. (1997). Role in fast inactivation of the IV/S4–S5 loop of the human muscle Na<sup>+</sup> channel probed by cysteine mutagenesis. *The Journal of Physiology*, 505(2), 345–352. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7793.1997.345bb.x>
- Lin, Z., Santos, S., Padilla, K., Printzenhoff, D., & Castle, N. A. (2016). Biophysical and Pharmacological Characterization of Nav1.9 Voltage Dependent Sodium Channels Stably Expressed in HEK-293 Cells. *PLOS ONE*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161450>
- Liu, C., Dib-Hajj, S. D., Black, J. A., Greenwood, J., Lian, Z., & Waxman, S. G. (2001). Direct Interaction with Contactin Targets Voltage-gated Sodium Channel Nav1.9/NaN to the Cell Membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 276(49), 46553–46561. <https://doi.org/10.1074/jbc.M108699200>
- Liu, C., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2001). Fibroblast Growth Factor Homologous Factor 1B Binds to the C Terminus of the Tetrodotoxin-resistant Sodium Channel rNav1.9a (NaN). *Journal of Biological Chemistry*, 276(22), 18925–18933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M101606200>
- Lolignier, S., Amsalem, M., Maingret, F., Padilla, F., Gabriac, M., Chapuy, E., Eschalièr, A., Delmas, P., & Busserolles, J. (2011). Nav1.9 Channel Contributes to Mechanical and Heat Pain Hypersensitivity Induced by Subacute and Chronic Inflammation. *PLoS ONE*, 6(8), e23083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023083>
- Lolignier, S., Bonnet, C., Gaudio, C., Noël, J., Ruel, J., Amsalem, M., Ferrier, J., Rodat-Despoix, L., Bouvier, V., Aissouni, Y., Prival, L., Chapuy, E., Padilla, F., Eschalièr,

- A., Delmas, P., & Busserolles, J. (2015). The Nav1.9 Channel Is a Key Determinant of Cold Pain Sensation and Cold Allodynia. *Cell Reports*, *11*(7), 1067–1078. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.04.027>
- Loose, S., Lischka, A., Kuehs, S., Nau, C., Heinemann, S. H., Kurth, I., & Leipold, E. (2023). Peripheral temperature dysregulation associated with functionally altered Nav1.8 channels. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, *475*(11), 1343–1355. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02856-2>
- Maingret, F., Coste, B., Padilla, F., Clerc, N., Crest, M., Korogod, S. M., & Delmas, P. (2008). Inflammatory Mediators Increase Nav1.9 Current and Excitability in Nociceptors through a Coincident Detection Mechanism. *Journal of General Physiology*, *131*(3), 211–225. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709935>
- Mantegazza, M., Yu, F. H., Catterall, W. A., & Scheuer, T. (2001). Role of the C-terminal domain in inactivation of brain and cardiac sodium channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *98*(26), 15348–15353. <https://doi.org/10.1073/pnas.211563298>
- Marler, T. L., Wright, A. B., Elmslie, K. L., Heier, A. K., Remily, E., Kim-Han, J. S., Ramachandra, R., & Elmslie, K. S. (2018). Nav1.9 channels in muscle afferent neurons and axons. *Journal of Neurophysiology*, *120*(3), 1032–1044. <https://doi.org/10.1152/jn.00573.2017>
- Martinez, V., & Melgar, S. (2008). Lack of colonic inflammation-induced acute visceral hypersensitivity to colorectal distension in Nav1.9 knockout mice. *European Journal of Pain*, *12*, 934–944.
- Matsubara, Y., Okuda, H., Harada, K. H., Youssefian, S., & Koizumi, A. (2021). Mechanical allodynia triggered by cold exposure in mice with the Scn11a p.R222S mutation: A novel model of drug therapy for neuropathic pain related to Nav1.9. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, *394*(2), Article 2. <https://doi.org/10.1007/s00210-020-01978-z>
- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., Reisbig, M. D., & Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: A pharmacologic perspective. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, *9*(8), 1069–1080. <https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1183481>
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1995). A Critical Role for Transmembrane Segment IVS6 of the Sodium Channel  $\alpha$  Subunit in Fast Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(20), 12025–12034. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.20.12025>
- McPhee, J. C., Ragsdale, D. S., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (1998). A Critical Role for the S4-S5 Intracellular Loop in Domain IV of the Sodium Channel  $\alpha$ -Subunit in Fast Inactivation. *Journal of Biological Chemistry*, *273*(2), 1121–1129. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.2.1121>
- Morarach, K., Mikhailova, A., Knoflach, V., Memic, F., Kumar, R., Li, W., Ernfors, P., & Marklund, U. (2021). Diversification of molecularly defined myenteric neuron classes revealed by single-cell RNA sequencing. *Nature Neuroscience*, *24*(1), 34–46. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00736-x>

- Ndengele, M. M., Cuzzocrea, S., Esposito, E., Mazzon, E., Di Paola, R., Matuschak, G. M., & Salvemini, D. (2008). Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(9), 3154–3164. <https://doi.org/10.1096/fj.08-108159>
- Nobel Prize Outreach AB. (2023a). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1963*. NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1963/summary/>
- Nobel Prize Outreach AB. (2023b). *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1991*. NobelPrize.Org. <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1991/summary/>
- Noland, C. L., Chua, H. C., Kschonsak, M., Heusser, S. A., Braun, N., Chang, T., Tam, C., Tang, J., Arthur, C. P., Ciferri, C., Pless, S. A., & Payandeh, J. (2022). Structure-guided unlocking of Na<sub>x</sub> reveals a non-selective tetrodotoxin-sensitive cation channel. *Nature Communications*, 13(1), 1416. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-28984-4>
- Numa, S., & Noda, M. (1986). Molecular Structure of Sodium Channels. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 479(1), 338–355. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1986.tb15580.x>
- O'Brien, B. J., Caldwell, John H., Ehring, G. R., O'Brien, K. M. B., Luo, S., & Levinson, S. R. (2008). Tetrodotoxin-Resistant Voltage-Gated Sodium Channels Nav1.8 and Nav1.9 Are Expressed in the Retina. *Journal of Comparative Neurology*, 508(6), 940–951.
- O'Donnell, A.-M., Coyle, D., & Puri, P. (2016). Decreased Nav1.9 channel expression in Hirschsprung's disease. *Journal of Pediatric Surgery*, 51(9), 1458–1461. <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2016.05.007>
- Okuda, H., Noguchi, A., Kobayashi, H., Kondo, D., Harada, K. H., Youssefian, S., Shioi, H., Kabata, R., Domon, Y., Kubota, K., Kitano, Y., Takayama, Y., Hitomi, T., Ohno, K., Saito, Y., Asano, T., Tominaga, M., Takahashi, T., & Koizumi, A. (2016). Infantile Pain Episodes Associated with Novel Nav1.9 Mutations in Familial Episodic Pain Syndrome in Japanese Families. *PLOS ONE*, 11(5), e0154827. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154827>
- Okuse, K., Malik-Hall, M., Baker, M. D., Poon, W.-Y. L., Kong, H., Chao, M. V., & Wood, J. N. (2002). Annexin II light chain regulates sensory neuron-specific sodium channel expression. *Nature*, 417(6889), 653–656. <https://doi.org/10.1038/nature00781>
- O'Malley, H. A., & Isom, L. L. (2015). Sodium Channel  $\beta$  Subunits: Emerging Targets in Channelopathies. *Annual Review of Physiology*, 77(1), 481–504. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071846>
- Osorio, N., Korogod, S., & Delmas, P. (2014). Specialized Functions of Nav1.5 and Nav1.9 Channels in Electrogenesis of Myenteric Neurons in Intact Mouse Ganglia. *Journal of Neuroscience*, 34(15), 5233–5244. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0057-14.2014>
- Östman, J. A. R., Nassar, M. A., Wood, J. N., & Baker, M. D. (2008). GTP up-regulated persistent Na<sup>+</sup> current and enhanced nociceptor excitability require Nav1.9. *The Journal of Physiology*, 586(4), 1077–1087.

- Padilla, F., Couble, M.-L., Coste, B., Maingret, F., Clerc, N., Crest, M., Ritter, A. M., Magloire, H., & Delmas, P. (2007). Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: Implication for intestinal reflex function and orofacial pain. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 35(1), 138–152. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2007.02.008>
- Pape, H.-C., Kurtz, A., & Silbernagl, S. (2019). *Physiologie* (9. Aufl.). Thieme.
- Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., & Catterall, W. A. (2011). The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, 475(7356), 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature10238>
- Pei, Z., Pan, Y., & Cummins, T. R. (2018). Posttranslational Modification of Sodium Channels. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 246, 101–124. [https://doi.org/10.1007/164\\_2017\\_69](https://doi.org/10.1007/164_2017_69)
- Petterson, E., Goddard, T., Huang, C., Couch, G., Greenblatt, D., Meng, E., & Ferrin, T. (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 13, 1605–1612.
- Phatarakijnrund, V., Mumm, S., McAlister, W. H., Novack, D. V., Wenkert, D., Clements, K. L., & Whyte, M. P. (2016). Congenital insensitivity to pain: Fracturing without apparent skeletal pathobiology caused by an autosomal dominant, second mutation in SCN11A encoding voltage-gated sodium channel 1.9. *Bone*, 84, 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.022>
- Pinkse, M. W., Merckx, M., & Averill, B. A. (1999). Fluoride inhibition of bovine spleen purple acid phosphatase: Characterization of a ternary enzyme-phosphate-fluoride complex as a model for the active enzyme-substrate-hydroxide complex. *Biochemistry*, 38(31), 9926–9936. <https://doi.org/10.1021/bi990446w>
- Platzer, W. (2013). *Bewegungsapparat. Taschenatlas Anatomie* (11. Aufl., Bd. 1). Thieme, Stuttgart.
- Poojary, S., Jaiswal, S., Shah, K. S., & Bhalala, K. B. (2020). Sisters with No Pain, No Tears: A Report of a New Variant of Hereditary Sensory and Autonomic Neuropathy (Type IX) Caused by a Novel SCN11A Mutation. *Indian Journal of Dermatology*, 65(4), 299–303. [https://doi.org/10.4103/ijd.IJD\\_416\\_18](https://doi.org/10.4103/ijd.IJD_416_18)
- Priest, B. T., Murphy, B. A., Lindia, J. A., Diaz, C., Abbadie, C., Ritter, A. M., Liberator, P., Iyer, L. M., Kash, S. F., Kohler, M. G., Kaczorowski, G. J., MacIntyre, D. E., & Martin, W. J. (2005). Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel Nav1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(26), Article 26. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501549102>
- Pristerà, A., Baker, M. D., & Okuse, K. (2012). Association between Tetrodotoxin Resistant Channels and Lipid Rafts Regulates Sensory Neuron Excitability. *PLoS ONE*, 7(8), e40079. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040079>
- Proks, P., Puljung, M. C., Vedovato, N., Sachse, G., Mulvaney, R., & Ashcroft, F. M. (2016). Running out of time: The decline of channel activity and nucleotide activation in adenosine triphosphate-sensitive K-channels. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 371(1700). <https://doi.org/10.1098/rstb.2015.0426>

- Renganathan, M., Cummins, T. R., & Waxman, S. G. (2001). Contribution of Nav1.8 Sodium Channels to Action Potential Electrogenesis in DRG Neurons. *Journal of Neurophysiology*, 86(2), 629–640. <https://doi.org/10.1152/jn.2001.86.2.629>
- Ritter, A. M., Martin, W. J., & Thorneloe, K. S. (2009). The voltage-gated sodium channel Nav1.9 is required for inflammation-based urinary bladder dysfunction. *Neuroscience Letters*, 452(1), 28–32.
- Roth, F. C., Numberger, M., & Draguhn, A. (2023). *Patch-Clamp-Technik*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-66053-9>
- Rugiero, F., Mistry, M., Sage, D., Black, J. A., Waxman, S. G., Crest, M., Clerc, N., Delmas, P., & Gola, M. (2003). Selective Expression of a Persistent Tetrodotoxin-Resistant Na<sup>+</sup> Current and Nav1.9 Subunit in Myenteric Sensory Neurons. *The Journal of Neuroscience*, 23(7), 2715–2725.
- Rush, A. M., & Waxman, S. G. (2004). PGE2 increases the tetrodotoxin-resistant Nav1.9 sodium current in mouse DRG neurons via G-proteins. *Brain research*, 1023(2), 264–271.
- Sage, D., Salin, P., Alcaraz, G., Castets, F., Giraud, P., Crest, M., Mazet, B., & Clerc, N. (2007). Nav1.7 and Nav1.3 are the only tetrodotoxin-sensitive sodium channels expressed by the adult guinea pig enteric nervous system. *The Journal of Comparative Neurology*, 504(4), 363–378. <https://doi.org/10.1002/cne.21450>
- Salvemini, D., Little, J. W., Doyle, T., & Neumann, W. L. (2011). Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. *Free Radical Biology and Medicine*, 51(5), 951–966. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.01.026>
- Sanger, G. J. (2004). Neurokinin NK1 and NK3 receptors as targets for drugs to treat gastrointestinal motility disorders and pain. *British Journal of Pharmacology*, 141(8), 1303–1312. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705742>
- Schink, M., Leipold, E., Schirmeyer, J., Schönherr, R., Hoshi, T., & Heinemann, S. H. (2016). Reactive species modify Nav1.8 channels and affect action potentials in murine dorsal root ganglion neurons. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 468(1), 99–110. <https://doi.org/10.1007/s00424-015-1735-z>
- Schlüter, F., & Leffler, A. (2016). Oxidation differentially modulates the recombinant voltage-gated Na<sup>+</sup> channel  $\alpha$ -subunits Nav1.7 and Nav1.8. *Brain Research*, 1648, 127–135. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.07.031>
- Scroggs, R. S. (2012). The distribution of low-threshold TTX-resistant Na<sup>+</sup> currents in rat trigeminal ganglion cells. *Neuroscience*, 222, 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.07.012>
- Sharkey, L. M., Cheng, X., Drews, V., Buchner, D. A., Jones, J. M., Justice, M. J., Waxman, S. G., Dib-Hajj, S. D., & Meisler, M. H. (2009). The ataxia3 Mutation in the N-Terminal Cytoplasmic Domain of Sodium Channel Nav1.6 Disrupts Intracellular Trafficking. *Journal of Neuroscience*, 29(9), Article 9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6026-08.2009>
- Sharma, N., Flaherty, K., Lezgiyeva, K., Wagner, D. E., Klein, A. M., & Ginty, D. D. (2020). The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature*, 577(7790), 392–398. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1900-1>

- Shen, H., Zhou, Q., Pan, X., Li, Z., Wu, J., & Yan, N. (2017). Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution. *Science*, *355*(6328), eaal4326. <https://doi.org/10.1126/science.aal4326>
- Shirahata, E., Iwasaki, H., Takagi, M., Lin, C., Bennett, V., Okamura, Y., & Hayasaka, K. (2006). Ankyrin-G Regulates Inactivation Gating of the Neuronal Sodium Channel, Nav1.6. *Journal of Neurophysiology*, *96*(3), 1347–1357. <https://doi.org/10.1152/jn.01264.2005>
- Sizova, D. V., Huang, J., Akin, E. J., Estacion, M., Gomis-Perez, C., Waxman, S. G., & Dib-Hajj, S. D. (2020). A 49-residue sequence motif in the C terminus of Nav1.9 regulates trafficking of the channel to the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, *295*(4), 1077–1090. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)49917-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)49917-0)
- Smith, B. J., McHugh, C. F., Hirano, A. A., Brecha, N. C., & Barnes, S. (2023). Transient and Sustained Ganglion Cell Light Responses Are Differentially Modulated by Intrinsically Produced Reactive Oxygen Species Acting upon Specific Voltage-Gated Na<sup>+</sup> Channel Isoforms. *The Journal of Neuroscience*, *43*(13), 2291–2304. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1723-22.2023>
- Smith, M. R., & Goldin, A. L. (1997). Interaction between the sodium channel inactivation linker and domain III S4-S5. *Biophysical Journal*, *73*(4), 1885–1895. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(97\)78219-5](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(97)78219-5)
- Smith, R. D., & Goldin, A. L. (1997). Phosphorylation at a Single Site in the Rat Brain Sodium Channel Is Necessary and Sufficient for Current Reduction by Protein Kinase A. *The Journal of Neuroscience*, *17*(16), Article 16. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-16-06086.1997>
- Smith, T. H., Ngwainmbi, J., Grider, J. R., Dewey, W. L., & Akbarali, H. I. (2013). An In-vitro Preparation of Isolated Enteric Neurons and Glia from the Myenteric Plexus of the Adult Mouse. *Journal of Visualized Experiments*, *78*, Article 78. <https://doi.org/10.3791/50688>
- Subramanian, N., Wetzel, A., Dombert, B., Yadav, P., Havlicek, S., Jablonka, S., Nassar, M. A., Blum, R., & Sendtner, M. (2012). Role of Nav1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Human Molecular Genetics*, *21*(16), 3655–3667. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds195>
- Sun, W., Barchi, R. L., & Cohen, S. A. (1995). Probing Sodium Channel Cytoplasmic Domain Structure. *Journal of Biological Chemistry*, *270*(38), Article 38. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22271>
- Takeuchi, K., & Yoshii, K. (2008). Effect of Superoxide Derived from Lucifer Yellow CH on Voltage-Gated Currents of Mouse Taste Bud Cells. *Chemical Senses*, *33*(5), 425–432. <https://doi.org/10.1093/chemse/bjn009>
- Tang, L., Chehab, N., Wieland, S. J., & Kallen, R. G. (1998). Glutamine Substitution at Alanine1649 in the S4–S5 Cytoplasmic Loop of Domain 4 Removes the Voltage Sensitivity of Fast Inactivation in the Human Heart Sodium Channel. *The Journal of General Physiology*, *111*(5), 639–652. <https://doi.org/10.1085/jgp.111.5.639>
- Tate, S., Benn, S., Hick, C., Trezise, D., John, V., Mannion, R. J., Costigan, M., Plumpton, C., Grose, D., Gladwell, Z., Kendall, G., Dale, K., Bountra, C., & Woolf, C. J. (1998).

- Two sodium channels contribute to the TTX-R sodium current in primary sensory neurons. *Nature Neuroscience*, 1(8), 653–655. <https://doi.org/10.1038/3652>
- Tracey, I., & Mantyh, P. W. (2007). The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *Neuron*, 55(3), 377–391. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.07.012>
- Tyrrell, L., Renganathan, M., Dib-Hajj, S. D., & Waxman, S. G. (2001). Glycosylation Alters Steady-State Inactivation of Sodium Channel Nav1.9/NaN in Dorsal Root Ganglion Neurons and Is Developmentally Regulated. *The Journal of Neuroscience*, 21(24), 9629–9637. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.21-24-09629.2001>
- Vanoye, C. G., Kunic, J. D., Ehring, G. R., & George, A. L. (2013). Mechanism of sodium channel Nav1.9 potentiation by G-protein signaling. *Journal of General Physiology*, 141(2), 193–202. <https://doi.org/10.1085/jgp.201210919>
- Volpe, C. M. O., Villar-Delfino, P. H., Dos Anjos, P. M. F., & Nogueira-Machado, J. A. (2018). Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease*, 9(2), 119. <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>
- Wang, W.-B., Cao, Y.-J., Lyu, S.-S., Zuo, R.-T., Zhang, Z.-L., & Kang, Q.-L. (2018). Identification of a novel mutation of the NTRK1 gene in patients with congenital insensitivity to pain with anhidrosis (CIPA). *Gene*, 679, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.09.009>
- West, J. W., Patton, D. E., Scheuer, T., Wang, Y., Goldin, A. L., & Catterall, W. A. (1992). A cluster of hydrophobic amino acid residues required for fast Na<sup>+</sup>-channel inactivation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(22), 10910–10914. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.22.10910>
- Woods, C. G., Babiker, M. O. E., Horrocks, I., Tolmie, J., & Kurth, I. (2015). The phenotype of congenital insensitivity to pain due to the Nav1.9 variant p.L811P. *European Journal of Human Genetics*, 23(5), 561–563. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.166>
- Yarov-Yarovoy, V., McPhee, J. C., Idsvoog, D., Pate, C., Scheuer, T., & Catterall, W. A. (2002). Role of Amino Acid Residues in Transmembrane Segments IS6 and IIS6 of the Na<sup>+</sup> Channel  $\alpha$  Subunit in Voltage-dependent Gating and Drug Block. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 35393–35401.
- Zhang, H., Kolibal, S., Vanderkooi, J. M., Cohen, S. A., & Kallen, R. G. (2000). A carboxy-terminal  $\alpha$ -helical segment in the rat skeletal muscle voltage-dependent Na<sup>+</sup> channel is responsible for its interaction with the amino-terminus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1467, 406–418.
- Zhang, X. Y., Wen, J., Yang, W., Wang, C., Gao, L., Zheng, L. H., Wang, T., Ran, K., Li, Y., Li, X., Xu, M., Luo, J., Feng, S., Ma, X., Ma, H., Chai, Z., Zhou, Z., Yao, J., Zhang, X., & Liu, J. Y. (2013). Gain-of-Function Mutations in SCN11A Cause Familial Episodic Pain. *The American Journal of Human Genetics*, 93(5), 957–966. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.09.016>
- Zhao, C., Jin, J., Hu, H., Zhou, X., & Shi, X. (2022). The Gain-of-Function R222S Variant in Scn11a Contributes to Visceral Hyperalgesia and Intestinal Dysmotility in Scn11aR222S/R222S Mice. *Frontiers in Neurology*, 13, 856459. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.856459>

- Zhao, C., Zhou, X., & Shi, X. (2023). The influence of Nav1.9 channels on intestinal hyperpathia and dysmotility. *Channels*, 17(1), 2212350. <https://doi.org/10.1080/19336950.2023.2212350>
- Zhou, D., Wang, W., Cheng, X., Wei, J., & Zheng, S. (2015). Antioxidant therapy for patients with chronic pancreatitis: A systematic review and meta-analysis. *Clinical Nutrition*, 34(4), 627–634. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2014.07.003>
- Zhou, X., Xiao, Z., Xu, Y., Zhang, Y., Tang, D., Wu, X., Tang, C., Chen, M., Shi, X., Chen, P., Liang, S., & Liu, Z. (2017). Electrophysiological and Pharmacological Analyses of Nav1.9 Voltage-Gated Sodium Channel by Establishing a Heterologous Expression System. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 852. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00852>
- Zu, M., Guo, W.-W., Cong, T., Ji, F., Zhang, S.-L., Zhang, Y., Song, X., Sun, W., He, D. Z. Z., Shi, W.-G., & Yang, S.-M. (2021). SCN11A gene deletion causes sensorineural hearing loss by impairing the ribbon synapses and auditory nerves. *BMC Neuroscience*, 22(1), 18. <https://doi.org/10.1186/s12868-021-00613-8>

## 7 Anhang

**Tabelle 5: Übersicht der Schaltparameter zur Beschreibung der Kanalaktivierung.** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m von n unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t*-Test getestet. Die Ergebnisse der Testung gegen Nav1.4 Wildtyp sind in rot und die Ergebnisse der Testung gegen Nav1.9 Wildtyp sind in schwarz angegeben: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Kanal	Aktivierung			n
	$V_m$ (mV)		$k_m$ (mV)	
Wildtyp-DRG endogen	-40.5 $\pm$ 1.2		7.3 $\pm$ 0.7	21
Wildtyp-DRG-endogen TTXr	-30.0 $\pm$ 2.8		12.6 $\pm$ 1.4	21
dKO-DRG-endogen	-28.1 $\pm$ 1.5		6.2 $\pm$ 0.3	15
dKO-DRG-endogen TTXr	- - -		- - -	
Nav1.9	-55.0 $\pm$ 2.2 (***)		8.0 $\pm$ 0.4 (n.s.)	29
Cmin1	-47.9 $\pm$ 1.9 (**/n.s.)		7.7 $\pm$ 0.3 (n.s./n.s.)	7
Cmin2	-50.0 $\pm$ 3.4 (*/n.s.)		7.5 $\pm$ 0.4 (n.s./n.s.)	14
Cmin3	- - -		- - -	
Cmin4	-53.2 $\pm$ 1.9 (***/n.s.)		8.8 $\pm$ 0.4 (n.s./n.s.)	9
Cmin5	-62.5 $\pm$ 1.9 (***/*)		7.7 $\pm$ 0.4 (n.s./n.s.)	11
Nav1.9_C4	-55.5 $\pm$ 3.1 (***/n.s.)		8.8 $\pm$ 0.7 (n.s./n.s.)	
A1177S	-51.2 $\pm$ 3.0 (n.s.)		6.8 $\pm$ 0.6 (n.s.)	7
S1496A	-50.3 $\pm$ 3.2 (n.s.)		7.4 $\pm$ 0.5 (n.s.)	12
N4	-47.9 $\pm$ 2.3 (**/n.s.)		8.0 $\pm$ 0.7 (n.s./n.s.)	11
rNav1.4	-39.7 $\pm$ 1.1 (***)		8.6 $\pm$ 0.7 (n.s.)	11
hNav1.8	-46.8 $\pm$ 1.3		14.4 $\pm$ 1.7	18
C1355F	-51.5 $\pm$ 3.3 (n.s.)		8.0 $\pm$ 0.8 (n.s.)	11
Nav1.9 20°C	-52.9 $\pm$ 2.1		8.1 $\pm$ 0.8	18
W684L 20°C	-48.8 $\pm$ 1.9 (n.s.)		7.5 $\pm$ 0.7 (n.s.)	17
Nav1.9 12°C	-44.8 $\pm$ 4.2		7.8 $\pm$ 1.2	8
W684L 12°C	-36.4 $\pm$ 1.9 (n.s.)		9.9 $\pm$ 0.8 (n.s.)	12
Y66S	-36.5 $\pm$ 2.8 (***)		9.2 $\pm$ 0.6 (n.s.)	10
Nav1.9 (Darm)	-64.2 $\pm$ 1.5		10.5 $\pm$ 0.8	8
L396P (Darm)	-78.9 $\pm$ 2.3 (***)		14.4 $\pm$ 2.0 (n.s.)	7

**Tabelle 6: Schaltparameter zur Beschreibung der Kanalinaktivierung.** Angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m von n unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz zwischen den Gruppen wurde mit einem zweiseitigen *Student's t-Test* getestet. Die Ergebnisse der Testung gegen Nav1.4 Wildtyp sind in rot und die Ergebnisse der Testung gegen Nav1.9 Wildtyp sind in schwarz angegeben: \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

Kanal	Inaktivierung													
	$V_h$ (mV)				$k_h$ (mV)				n	$\tau$ Inact -20 mV (s)			n	
Nav1.9	-63.2	$\pm$	2.8	(*)	9.9	$\pm$	0.5	(***)	12	0.026	$\pm$	0.0018	(***)	29
Cmin1	-61.8	$\pm$	2.5	(**/n.s.)	12.4	$\pm$	0.5	(***/**)	6	0.031	$\pm$	0.0044	(***/n.s.)	7
Cmin2	-61.1	$\pm$	2.9	(**/n.s.)	11.5	$\pm$	0.7	(***/n.s.)	12	0.033	$\pm$	0.0052	(***/n.s.)	14
Cmin3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cmin4	-79.5	$\pm$	2.1	(**/***)	8.0	$\pm$	0.4	(*/*)	8	0.013	$\pm$	0.0007	(***/***)	9
Cmin5	-101.9	$\pm$	1.7	(***/***)	7.4	$\pm$	0.6	(n.s./**)	8	0.007	$\pm$	0.0008	(***/***)	10
Nav1.9_C4	-89.3	$\pm$	2.9	(***/***)	8.2	$\pm$	0.9	(n.s./n.s.)	9	0.009	$\pm$	0.0009	(***/***)	9
A1177S	-67.1	$\pm$	1.3	(n.s.)	8.8	$\pm$	0.5	(n.s.)	6	0.018	$\pm$	0.0016	(*)	7
S1496A	-62.8	$\pm$	5.0	(n.s.)	10.7	$\pm$	0.9	(n.s.)	7	0.021	$\pm$	0.0026	(n.s.)	12
N4	-61.1	$\pm$	2.5	(**/n.s.)	9.5	$\pm$	0.3	(***/n.s.)	10	0.02	$\pm$	0.0028	(***/n.s.)	11
rNav1.4	-71.3	$\pm$	1.7	(*)	6.4	$\pm$	0.4	(***)	11	0.001	$\pm$	0.0001	(***)	10
hNav1.8	-57.5	$\pm$	1.5		7.6	$\pm$	0.4		18					
C1355F	-58.7	$\pm$	2.0	(n.s.)	10.8	$\pm$	0.5	(n.s.)	10	0.034	$\pm$	0.0047	(n.s.)	11
Nav1.9 20°C W684L	-61.6	$\pm$	2.3		9.8	$\pm$	0.5		14	0.027	$\pm$	0.0042		16
Nav1.9 12°C W684L	-60.5	$\pm$	2.1	(n.s.)	10.6	$\pm$	0.6	(n.s.)	15	0.025	$\pm$	0.0031		17
Nav1.9 12°C W684L	-49	$\pm$	4.3		10.5	$\pm$	1.0		7	0.048	$\pm$	0.0128		9
Y66S	-43.2	$\pm$	2.6	(n.s.)	11.6	$\pm$	0.7	(n.s.)	12	0.035	$\pm$	0.0055		12
Y66S	-49.3	$\pm$	3.0	(**)	9.5	$\pm$	0.5	(n.s.)	9	0.035	$\pm$	0.0862		10
Nav1.9 (Darm)	-77.3	$\pm$	2.6		9.3	$\pm$	0.5		8					
L396P (Darm)	1: -90.6	$\pm$	3.9		5.4	$\pm$	1.5							
	2: -39.0	$\pm$	3.4		7.0	$\pm$	4.0		7					

**Tabelle 7: Schaltparameter zur Beschreibung der Kanalaktivierung und Kanalinaktivierung für die Kontrollen.** Angegeben sind die Werte zum Zeitpunkt  $t_0$  und  $t_{600}$ . Aufgelistet sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m von n Experimenten.

<b>Kontrollen</b>			
	<b><math>V_m</math> (mV)</b>	<b><math>k_m</math> (mV)</b>	<b>n</b>
dKO Kontr. $t_0$	-37.7 $\pm$ 2.4	7.3 $\pm$ 0.8	9
dKO Kontr. $t_{600}$	-48.5 $\pm$ 3.1	7.2 $\pm$ 0.9	9
rNav1.8 Kontr. $t_0$	-26.0 $\pm$ 2.7	7.0 $\pm$ 0.6	10
rNav1.8 Kontr. $t_{600}$	-37.4 $\pm$ 2.2	7.6 $\pm$ 0.4	10
hNav1.9 Kontr. $t_0$	-44.9 $\pm$ 2.5	6.6 $\pm$ 0.5	9
hNav1.9 Kontr. $t_{600}$	-61.5 $\pm$ 3.4	7.6 $\pm$ 1.1	8

	<b><math>V_h</math> (mV)</b>	<b><math>k_h</math> (mV)</b>	<b>n</b>
dKO Kontr. $t_0$	-75.8 $\pm$ 2.2	5.7 $\pm$ 0.2	9
dKO Kontr. $t_{600}$	-85.8 $\pm$ 2.4	5.8 $\pm$ 0.2	9
rNav1.8 Kontr. $t_0$	-36.9 $\pm$ 2.7	6.3 $\pm$ 0.4	10
rNav1.8 Kontr. $t_{600}$	-46.8 $\pm$ 2.0	7.0 $\pm$ 0.4	10
hNav1.9 Kontr. $t_0$	-63.2 $\pm$ 2.8	9.9 $\pm$ 0.5	12
hNav1.9 Kontr. $t_{600}$	-70.1 $\pm$ 4.0	10.8 $\pm$ 0.8	6

**Tabelle 8: Schaltparameter zur Beschreibung der Kanalaktivierung und Kanalinaktivierung vor und nach ROS-Exposition.** Angegeben sind die Parameter vor ( $t_0$ ) und nach ( $t_{600}$ ) ROS-Applikation. Zusätzlich ist der ROS-abhängige Inaktivierungsverlust  $\Delta R_{in}$  zum Zeitpunkt  $t_{600}$  gezeigt. Aufgelistet sind Mittelwerte  $\pm$  s.e.m von n Experimenten.

<b>ROS (100 <math>\mu</math>M LY)</b>					
	<b><math>V_m</math> (mV)</b>	<b><math>k_m</math> (mV)</b>	<b>n</b>		
dKO $t_0$	-39.2 $\pm$ 1.1	6.9 $\pm$ 0.4	13		
dKO $t_{600}$	-47.5 $\pm$ 1.2	8.8 $\pm$ 0.5	13		
rNav1.8 $t_0$	-27.5 $\pm$ 2.2	7.1 $\pm$ 0.6	14		
rNav1.8 $t_{600}$	-35.1 $\pm$ 2.8	13.5 $\pm$ 1.2	14		
hNav1.9 $t_0$	-51.6 $\pm$ 2.7	6.2 $\pm$ 0.8	8		
hNav1.9 $t_{600}$	-65.4 $\pm$ 3.2	8.5 $\pm$ 0.7	8		

	<b><math>V_h</math> (mV)</b>	<b><math>k_h</math> (mV)</b>	<b>n</b>	<b><math>\Delta R_{in}</math> (%)</b>	<b>n</b>
dKO $t_0$	-77.6 $\pm$ 1.6	7.2 $\pm$ 0.4	13		
dKO $t_{600}$	-75.3 $\pm$ 1.7	11.4 $\pm$ 0.3	12	5.57 $\pm$ 0.9	13
rNav1.8 $t_0$	-39.1 $\pm$ 3.1	6.2 $\pm$ 0.5	14		
rNav1.8 $t_{600}$	-31.4 $\pm$ 2.4	9.8 $\pm$ 0.6	12	32.91 $\pm$ 3.3	14
hNav1.9 $t_0$	-63.2 $\pm$ 2.8	9.9 $\pm$ 0.5	12		
hNav1.9 $t_{600}$	-51.7 $\pm$ 2.1	18.4 $\pm$ 1.7	8	26.41 $\pm$ 4.3	8

**Tabelle 9: Populations-Frequenzen der Variante Nav1.9-C1355F.** Quelle: <https://gnomad.broadinstitute.org/variant/3-38892235-C-A>; Stand 2023-10-16.

<b>Population</b>	<b>Allele Count</b>	<b>Allele Number</b>	<b>Number of Homozygotes</b>	<b>Allele Frequency</b>
South Asian	32	25444	0	0.001258
East Asian	1	17330	0	0.00005770
European (non-Finnish)	1	107244	0	0.000009325
African	0	15724	0	0.000
Latino	0	28768	0	0.000
Ashkenazi Jewish	0	8820	0	0.000
European (Finnish)	0	21022	0	0.000
Other	0	5492	0	0.000
Male	23	124276	0	0.0001851
Female	11	105568	0	0.0001042
<b>Total</b>	<b>34</b>	<b>229844</b>	<b>0</b>	<b>0.0001479</b>

## 8 Eigene Publikationen

### Publikationen:

1. Alves-Simões M., Tomni C., Teege L., Schmidt A., Lürkens M., Iseppon F., Millet Q., **Kuehs S.**, Katona I., Weis J., Heinemann S., Huebner C. A., Wood J., Leipold E., Kurth I., & Haag N. (2024). Nav<sub>v</sub>1.8/Nav<sub>v</sub>1.9 double deletion mildly affects nociception/acute pain behavior. *Pain*. 39382328. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000003411>. Epub ahead of print. **Online veröffentlicht**
2. van den Braak N. W. M., **Kuehs S.**, Peschke G. Z., Namer B., Lischka A., Eggermann K., Dumke C., Eswaran V. S. B., Nikolin S., Schulz J. B., Lampert A., Kurth I., Rolke R., Leipold E., Dohrn M. F. (2024). Altered Nav<sub>v</sub>1.9 channel activity in two Tyr66Ser variant carriers with small fiber dysfunction. *Journal of General Physiology*. **Manuskript in Vorbereitung**
3. Loose S., Lischka A., **Kuehs S.**, Nau C., Heinemann S. H., Kurth I., & Leipold E. (2023). Peripheral temperature dysregulation associated with functionally altered Nav<sub>v</sub>1.8 channels. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 475(11), 1343-1355. <https://doi.org/10.1007/s00424-023-02856-2>.
4. **Kuehs S.**, Teege L., Hellberg A.-K., Stanke C., Haag N., Kurth I., Blum R., Nau C., & Leipold E. (2022). Isolation and transfection of myenteric neurons from mice for patch-clamp applications. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 15, 1076187. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1076187>

### Vorträge:

1. **Kuehs S.**, Kremer L., Wegerbauer L., Nau C., Leipold E. (2023). Reaktive Sauerstoffspezies modulieren die Funktion Nozizeptor-spezifischer Nav<sub>v</sub>1.8-Kanäle. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, Würzburg 2023
2. **Kuehs S.**, Dohrn M., Dumke C., Kurth I., Nau C., Leipold E. (2022) N-terminale Mutation in Nav<sub>v</sub>1.9 mit kombinierter gain-of-function-/ loss-of-function-Charakteristik verursacht neuropathische Schmerzen. *Wissenschaftliche Arbeitstage der DGAI*, online 2022

## 9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz besonders bei Herrn Prof. Dr. Enrico Leipold für die umfangreiche Betreuung dieser Dissertation bedanken. Ich möchte außerdem allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe „Neurowissenschaften in der Anästhesiologie“ am CBBM in Lübeck für die freundliche Arbeitsatmosphäre und das kollegiale Miteinander während der Promotionsphase danken. Ich danke insbesondere Ann-Kathrin Hellberg für die tatkräftige, geduldige und stets hilfsbereite Unterstützung im Labor.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder, die mich während meines gesamten Studiums aber auch darüber hinaus unterstützt haben. Auch Danken möchte ich meinen Freunden und meiner Kirchengemeinde für alle Ermutigung, gerade in den schwierigen Zeiten. Mein größter Dank gilt meinem Herrn und Retter Jesus Christus, der mir das Leben geschenkt und für diese Arbeit Kraft und Gelingen gegeben hat.

*Soli Deo gloria!*