

Natrium-abhängige Kaliumkanäle im sensorischen System

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Cathrin Flauaus

aus Groß-Umstadt, Deutschland

Frankfurt 2022

(D 30)

Vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Clemens Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtko

Prof. Dr. Eugen Proschak

Datum der Disputation: 04. November 2022

In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

*„The most exciting phrase to hear in science, the one that heralds new discoveries, is not
‘Eureka!’ but ‘That’s funny...’”*

Isaac Asimov

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
1.1 Schmerz.....	1
1.1.1 Nozizeption.....	4
1.1.2 Neuronale Subpopulationen in den Spinalganglien.....	5
1.1.3 Neuronale Subpopulationen im Dorsalhorn des Rückenmarks.....	8
1.1.4 Periphere und zentrale Sensibilisierung.....	10
1.2 Pruritus	15
1.2.1 Periphere und zentrale Mechanismen der Juckreiz-Verarbeitung.....	16
1.3 Kaliumkanäle im sensorischen System	19
1.3.1 Topologie und Struktur der Kaliumkanäle	20
1.3.2 Die Natrium-abhängigen Kaliumkanäle Slack und Slick	22
1.4 Zielsetzung.....	29
2 Material und Methoden	30
2.1 Material.....	30
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	30
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und <i>in vivo</i> Applikationen.....	32
2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterialien	33
2.1.4 Größenstandards	34
2.1.5 Oligonukleotide	34
2.1.6 Polymerasen.....	35
2.1.7 In-situ-Hybridisierungssonden	35
2.1.8 Antikörper	35
2.1.9 Lösungen und Puffer.....	36
2.1.10 Geräte und Instrumente	38
2.2 Molekularbiologische Methoden	39
2.2.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	39
2.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR.....	41
2.2.3 In-situ-Hybridisierung	44
2.2.4 Immunfluoreszenz-Färbung an Gefrierschnitten	45
2.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen.....	46

2.2.6	Analytische Auswertung der ISH und Immunfluoreszenzfärbung	46
2.3	Zellkultur	46
2.3.1	Kultivierung und Ernten der Zellen.....	47
2.3.2	Kryokonservierung	47
2.3.3	Beschichtung von 96-Well-Platten.....	48
2.3.4	Quantifizierung und Aussäen der Zellen	48
2.3.5	FluxOR™ Kaliumkanal-Assay.....	49
2.4	Bestimmung der Bindungsaffinitäten ausgewählter Slack-Aktivatoren an dopaminerge Rezeptoren	51
2.5	Tierexperimentelle Methoden	52
2.5.1	Versuchstiere	52
2.5.2	Genotypisierung.....	53
2.5.3	Verhaltenstests	55
2.5.4	Gewebeentnahme.....	63
2.6	Statistik	64
3	<u>Ergebnisse.....</u>	66
3.1	Slack-Aktivatoren	66
3.1.1	Testung neuer potenzieller Slack-Aktivatoren <i>in vitro</i>	66
3.1.2	Testung ausgewählter Slack-Aktivatoren in Maus-Modellen <i>in vivo</i>	77
3.1.3	Wirkung von Loxapin und Olanzapin im Chloroquin-induzierten Juckreiz-Modell.....	81
3.2	Wirkung von Clofilium im Formalin-Test.....	83
3.3	Charakterisierung der Expression und Funktion von Slick im schmerzverarbeitenden System	85
3.3.1	Zelluläre Lokalisation von Slick im Rückenmark.....	85
3.3.2	Zelluläre Lokalisation von Slick in den Spinalganglien	87
3.3.3	Basale Charakterisierung von Slick ^{-/-} -Mäusen.....	88
3.3.4	Nozizeptives Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen	94
3.4	Zucht der Lbx1-Slick ^{-/-} -Mäuse.....	104
4	<u>Diskussion</u>	111
4.1	Neue Slack-Aktivatoren zur Therapie von neuropathischen Schmerzen.....	111
4.1.1	Juckreizmindernder Effekt von Loxapin bei akutem Juckreiz.....	114
4.2	Schwierigkeiten in der Zucht gewebsspezifischer Slick ^{-/-} -Mäuse	115

4.3	Expressionsanalysen von Slick in schmerzrelevanten Geweben.....	116
4.4	Funktionelle Beteiligung von Slick an akuten, entzündlichen und neuropathischen Schmerzen.....	117
4.4.1	Rolle von Slick bei der Verarbeitung akuter thermischer Stimuli.....	118
4.4.2	Untersuchung möglicher Interaktionspartner.....	121
4.4.3	Rolle von Slick bei neuropathischen Schmerzen.....	128
4.5	Slack und Slick als potenzielle Targets in der Schmerztherapie	129
5	<u>Zusammenfassung</u>	<u>131</u>
6	<u>Abkürzungsverzeichnis.....</u>	<u>132</u>
7	<u>Literaturverzeichnis.....</u>	<u>138</u>
8	<u>Abbildungsverzeichnis.....</u>	<u>154</u>
9	<u>Tabellenverzeichnis.....</u>	<u>157</u>
10	<u>Wesentliche Kooperationspartner.....</u>	<u>158</u>
11	<u>Danksagung.....</u>	<u>159</u>
12	<u>Lebenslauf, Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge.....</u>	<u>160</u>

Einleitung

1.1 Schmerz

Schmerzen haben eine wesentliche biologische Schutzfunktion, die zum Überleben unerlässlich ist. Bei chronischen Schmerzen dagegen wird der Schmerz selbst zur Krankheit, die therapiert werden muss und Einfluss auf die Lebensqualität der Betroffenen nimmt (Holmes 2016). Laut der *International Association for the Study of Pain* (IASP) wird die Empfindung Schmerz als „unangenehme sensorische und gefühlsmäßige Erfahrung, die mit einer tatsächlichen oder potenziellen Gewebeschädigung einhergeht oder dieser ähnelt“ definiert. Diese von der IASP im Jahr 1979 eingeführte Definition wurde im Juli 2020 erweitert. Punkte, die zur Definition hinzugefügt wurden, sind z.B., dass das Gefühl Schmerz, welches „Individuen durch ihre Lebenserfahrung kennenlernen“, „immer eine persönliche Erfahrung“ darstellt, „die in unterschiedlichem Maße von biologischen, psychologischen und sozialen Faktoren beeinflusst wird“. Weiter „kann Schmerz nicht allein aus der Aktivität der sensorischen Neurone abgeleitet werden“ und „der Bericht einer Person über eine Erfahrung als Schmerz sollte respektiert werden“.

Schmerzen können sich sowohl in unterschiedlichen Qualitäten wie z.B. als Stechen oder Brennen als auch in verschiedenen Intensitäten manifestieren (Peirs and Seal 2016; Woolf 2004). Die IASP unterscheidet weiter zwischen nozizeptiven, neuropathischen und noziplastischen Schmerzen. Während akute nozizeptive Schmerzen auf die Aktivierung von Nozizeptoren zurückzuführen sind, welche den Organismus vor potenzieller Gewebeschädigung schützen, sind chronische Schmerzen nicht mehr an nozizeptive Stimuli gekoppelt und verlieren somit ihre Funktion als Warnsystem (Basbaum et al. 2009; Crofford 2015). Das Einsetzen von Schmerzen beim akuten nozizeptiven Schmerz minimiert nicht nur Gewebe- und Zellschäden und sichert somit das Überleben, sondern führt auch zu Verhaltensweisen, die eine Gewebereparatur ermöglichen, wie z.B. die Ruhigstellung gebrochener Gliedmaßen, welche die Neubildung des Knochens sicherstellt.

Das SCN9A-Gen (*Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9*) kodiert für die α -Untereinheit des in nozizeptiven Neuronen stark exprimierten spannungsabhängigen Natriumkanals $Na_v1.7$. Durch Mutationen im SCN9A-Gen kommt es zum Funktionsverlust von $Na_v1.7$ und folglich zur vollständigen Unfähigkeit, Schmerzen wahrzunehmen (Cox et al. 2006). Menschen mit einer solchen Mutation können weder die Hitze einer offenen Flamme noch Schmerzen im Zusammenhang mit inneren Verletzungen, wie z.B. einem Knochenbruch, empfinden. Infolgedessen können sie nicht angemessen auf nozizeptive

Reize reagieren, was zu einer reduzierten Lebenserwartung führt (Basbaum et al. 2009; Peirs and Seal 2016).

Chronische Schmerzen in Form von Dauerschmerzen oder immer wiederkehrenden Schmerzen werden gewöhnlich als Schmerzen definiert, die länger als drei Monate persistieren (Crofford 2015). Bedingt durch Modifikationen in den schmerzverarbeitenden Bahnen und einer Hyperaktivität des nozizeptiven Systems können Reize, die normalerweise keine Schmerzen auslösen, als schmerzhaft empfunden werden (Allodynie). Nozizeptive Stimuli können zu einem verstärkten und langanhaltenden Schmerzempfinden führen (Hyperalgesie) und auch das Auftreten von Spontanschmerzen ist möglich (Costigan et al. 2009; Finnerup and Jensen 2006). Mindestens 20 % der Bevölkerung in Europa und den USA leiden unter chronischen Schmerzzuständen, was neben der physischen auch eine psychische Belastung für die Betroffenen darstellt und deren Lebensqualität enorm einschränken kann (Alexandre et al. 2017; Breivik et al. 2006). Anhand des zugrundeliegenden Pathomechanismus und den Therapiemöglichkeiten werden pathologische Schmerzen in nozizeptive Entzündungsschmerzen (inflammatorische Schmerzen), neuropathische Schmerzen und nozioplastische Schmerzen unterteilt.

Inflammatorische Schmerzen entstehen als Antwort auf eine Gewebeverletzung und die anschließende Entzündungsreaktion. Im Rahmen der Entzündung werden endogene proinflammatorische Mediatoren freigesetzt, die Entzündungskaskaden fördern. Dabei werden Nozizeptoren aktiviert, was z.B. eine erhöhte Berührungs- und Temperaturempfindlichkeit mit sich bringen kann (Basbaum et al. 2009; Costigan et al. 2009). Nach Auflösung der Gewebeverletzung verschwindet typischerweise auch der akute Entzündungsschmerz. Bei chronischen Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis ist dies allerdings nicht der Fall (Costigan et al. 2009).

Neuropathische Schmerzen dagegen resultieren aus einer Verletzung der Nerven selbst. Neuropathien können durch direkte Schädigung der Nerven, aber auch indirekt durch Virus-Infektionen, Stoffwechselerkrankungen wie bspw. Diabetes mellitus, Tumorerkrankungen, neurotoxische Chemikalien, Zytostatika-Therapien oder einen Schlaganfall entstehen (Costigan et al. 2009). Weiter wird zwischen peripheren und zentralen neuropathischen Schmerzen unterschieden. Trigeminusneuralgien, Verletzungen peripherer Nerven, schmerzhafte Polyneuropathien oder postherpetische Neuralgien stellen Beispiele peripherer neuropathischer Schmerzen dar, während Schmerzen, die durch eine Rückenmarks- oder Hirnverletzung verursacht werden, Schmerzen nach einem Schlaganfall und Schmerzen, die im Zusammenhang mit Multipler Sklerose auftreten, zu zentralen neuropathischen Schmerzen zählen.

Nozioplastische Schmerzen werden laut IASP als Schmerzen definiert, die auf eine „veränderte Nozizeption zurückzuführen sind, obwohl es keine eindeutigen Hinweise auf eine tatsächliche oder potenzielle Gewebeschädigung oder Erkrankung bzw. Läsion des somatosensorischen Systems gibt, die den Schmerz bedingen könnten“. Fibromyalgie-Patienten sind z.B. eine Patientengruppe, die an nozioplastischen Schmerzen leiden (Eva Kosek et al. 2016; Freynhagen et al. 2019). Bereits 2004 wurde in einem Review zur Einteilung der Schmerztypen die Kategorie der funktionalen Schmerzen hinzugefügt. Entsprechend der Form des nozioplastischen Schmerzes liegen diesem Schmerzsyndrom keine neurologischen Defizite bzw. periphere Abnormalitäten zugrunde und entstehen durch eine Überempfindlichkeit des nozizeptiven Systems. Neben dem Erkrankungsbild der Fibromyalgie ist auch das Reizdarmsyndrom oder Kopfschmerzen vom Spannungstyp dieser Schmerzkategorie zuzuordnen (Woolf 2004). Beim Mischschmerz überschneiden sich die von der IASP klassifizierten Schmerzarten nozizeptiver, neuropathischer und nozioplastischer Schmerz. Von der IASP wird die Form des gemischten Schmerzes allerdings noch nicht als eigene Schmerzart definiert (Abb. 1).

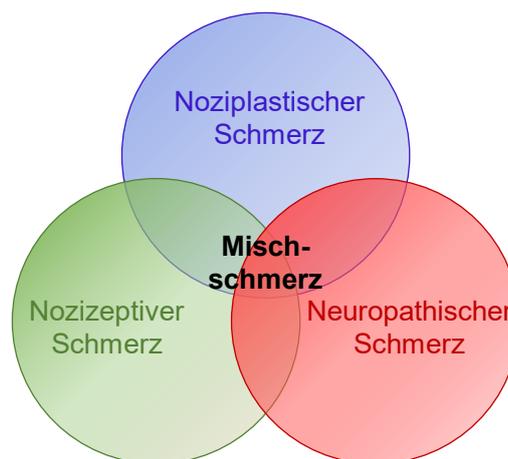


Abb. 1. Die drei von der IASP definierten Schmerztypen nozizeptive, neuropathische und nozioplastische Schmerzen führen zu Überschneidungen, die in der Literatur als Mischschmerz bezeichnet werden. Verändert nach Freynhagen et al. 2019.

Um eine Chronifizierung des Schmerzes zu verhindern, sollten die verschiedenen Schmerzformen früh, konsequent und zielgerichtet behandelt werden, wobei es für die Therapie nozioplastischer Schmerzen derzeit noch keine Leitlinien gibt. Die Therapieentscheidung kann letztlich nur aus Behandlungsempfehlungen zum Management neuropathischer Schmerzen abgeleitet werden (Freynhagen et al. 2019). Ansatz der Therapie von Entzündungsschmerzen ist die Hemmung der Synthese proinflammatorischer Faktoren. So kann bspw. die Prostaglandin-Bildung durch Blockade der Cyclooxygenasen durch Wirkstoffe aus der Gruppe der klassischen Nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR)

reduziert werden (Basbaum et al. 2009). Zur Behandlung neuropathischer Schmerzen werden als Therapeutika der ersten Wahl trizyklische Antidepressiva, Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer sowie die Gabapentinoide Gabapentin und Pregabalin eingesetzt (Basbaum and Bráz 2016; Finnerup and Attal 2016). Laut einer von der „*Special Interest Group on Neuropathic Pain*“ (NeuPSIG) der IASP durchgeführten Metaanalyse wird die Anwendung von Tramadol und starken Opioiden als Zweit- bzw. Drittlinien-Therapie bei einem entsprechend günstigen Nutzen-Risiko-Profil empfohlen. Topische Behandlungen wie 5%ige Lidocain- und 8%ige Capsaicin-Pflaster und subkutane Botulinumtoxin Typ A-Injektionen werden als Zweit- bzw. Drittlinien-Therapie zur Behandlung peripherer neuropathischer Schmerzen eingesetzt. Vorteil dieser meist nur mäßig wirksamen Therapien ist, dass sie topisch bzw. lokal appliziert werden und somit keine oder nur wenige systemische Nebenwirkungen mit sich bringen (Finnerup and Attal 2016). Die vorhandenen Behandlungsoptionen zum Management neuropathischer Schmerzen zeigen allerdings nur bei weniger als 50 % der Schmerzpatienten Wirksamkeit (Basbaum and Bráz 2016; Scholz et al. 2019; van Hecke et al. 2014). Bei diesen Patienten konnte mit den verfügbaren Therapien eine Schmerzlinderung von weniger als 50 % erreicht werden (Basbaum and Bráz 2016). Hierbei stellt die Sensibilisierung des nozizeptiven Systems im Rahmen von neuropathischen Schmerzen ein großes therapeutisches Problem dar (Chen et al. 2013; Cohen and Mao 2014; Finnerup et al. 2015). Um die Therapie nachhaltig zu verbessern, ist die Aufklärung neuronaler Schaltkreise infolge von Sensibilisierungsprozessen und die Identifizierung neuer Zielstrukturen von großer Bedeutung. Darüber hinaus sind die indizierten Wirkstoffe oft mit Therapie-limitierenden unerwünschten Arzneimittelwirkungen behaftet (Gao and Ji 2010). Dies unterstreicht die Notwendigkeit zur Optimierung der Behandlungsmöglichkeiten und somit zur Entwicklung neuer, innovativer und effektiver Analgetika.

1.1.1 Nozizeption

Als Nozizeption versteht man den Prozess der Schmerzwahrnehmung, durch den periphere Reize in Form von intensiven thermischen, mechanischen oder chemischen Stimuli von Nozizeptoren, einer Subpopulation primär afferenter Neuronen, detektiert und weitergeleitet werden (Abb. 2). Eine Erregung erfolgt nur dann, wenn die Reize einen bestimmten Schwellenwert überschreiten. Die Zellkörper der Nozizeptoren liegen in den Spinalganglien (Hinterwurzelganglien, *Dorsal Root Ganglia*, DRG). Ihre primär afferenten nozizeptiven Fasern innervieren sowohl die Haut als auch tiefere Gewebe und innere Organe (Basbaum et al. 2009). Da Nozizeptoren sowohl periphere als auch zentrale Reize verarbeiten können, werden sie auch als pseudo-unipolare Nervenzellen bezeichnet. Bei ausreichender Stimulation wird der Schmerzreiz nach Erregung von primär afferenten Neuronen in Form

von Aktionspotenzialen weiter zum Dorsalhorn des Rückenmarks geleitet. Hier findet die erste synaptische Verschaltung statt. Anatomisch, elektrophysiologisch und neurochemisch ist das Dorsalhorn in sechs verschiedenen Abschnitten, die als Laminae bezeichnet werden und in die die Nozizeptoren terminieren, organisiert (Basbaum et al. 2009; Todd 2017). Die eingehenden elektrischen Signale der sensorischen Neuronen werden in Schaltkreisen, bestehend aus Projektionsneuronen und erregenden (exzitatorischen) und hemmenden (inhibitorischen) Interneuronen, verarbeitet und an höhere Gehirnregionen gesendet. Dabei werden verschiedene exzitatorisch bzw. inhibitorisch wirkende Neurotransmitter wie Glutamat und γ -Aminobuttersäure (GABA) ausgeschüttet, sodass die eingehenden Informationen weiter prozessiert werden können. Vom Dorsalhorn des Rückenmarks wird das Schmerzsignal u.a. weiter zur Amygdala, dem Thalamus und dem cerebralen Cortex, wo ein diverses Set an Emotionen, Aktionen und Sinnesempfindungen auf nozizeptive Stimuli produziert wird, geleitet (Basbaum et al. 2009; Häring et al. 2018; Peirs and Seal 2016).

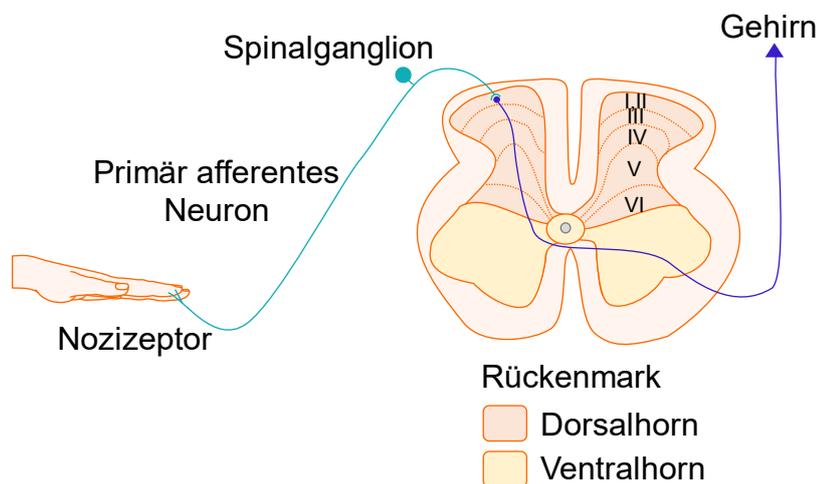


Abb. 2. Vereinfachte schematische Darstellung des schmerzerregenden Systems. Primär afferente Neurone der Nozizeptoren projizieren ins Dorsalhorn des Rückenmarks, Ort der ersten synaptischen Verschaltung. Von hier wird das Signal über Projektionsneurone weiter an höhere Zentren des Gehirns geleitet. Das Dorsalhorn des Rückenmarks ist in sechs Laminae (Lamina I-VI) organisiert. Verändert nach Schmidtke et al. 2009.

1.1.2 Neuronale Subpopulationen in den Spinalganglien

Primär afferente nozizeptive Fasern werden grundsätzlich in zwei Hauptgruppen unterteilt. Zum einen gibt es dünn-myelinisierte Nozizeptoren mittleren Durchmessers ($A\delta$) und zum anderen nicht-myelinisierte C-Fasern mit einem kleinen Durchmesser (Basbaum et al. 2009; Lechner 2017; Peirs and Seal 2016). Während $A\delta$ -Fasern mit einer mittleren bis schnellen Reizantwort (5-30 m/s) den ersten oder schnellen Schmerz vermitteln, weisen C-Fasern deutlich langsamere Leitungsgeschwindigkeiten (0,4-1,4 m/s) auf (Dubin and Patapoutian 2010).

Anhand elektrophysiologischer Studien können A δ -Fasern weiter in zwei Hauptklassen unterteilt werden. A δ -Nozizeptoren vom Typ I nehmen sowohl mechanische als auch chemische Reize wahr, weisen allerdings hohe Schmerzschwellen für thermische Reize (> 50 °C) auf. Wird der Wärmereiz jedoch aufrechterhalten, wird auch bei niedrigeren Temperaturen ein Signal gesendet. Diese Afferenzen sind maßgeblich an der Verarbeitung intensiver mechanischer Stimulation, wie sie bspw. durch Nadelstiche ausgelöst wird, beteiligt. Typ II A δ -Fasern dagegen haben eine niedrigere Schmerzschwelle für thermische Reize, eine höhere Schwelle für mechanische Stimuli und vermitteln die erste akute Schmerzreaktion auf schädliche Hitze (Basbaum et al. 2009).

Die meisten der C-Faser Nozizeptoren reagieren auf thermische, mechanische und chemische Stimuli und sind somit polymodal (Basbaum et al. 2009; Peirs and Seal 2016). Von besonderem Interesse sind die wärmeempfindlichen, aber mechanisch unempfindlichen C-Faser Nozizeptoren, die erst im Zuge einer Verletzung eine mechanische Sensibilität entwickeln (Basbaum et al. 2009; Schmidt et al. 1995). Diese sogenannten stillen Nozizeptoren sprechen besser auf chemische Reize wie z.B. Capsaicin an. Untergruppen dieser primär afferenten Neuronen reagieren auch auf eine Vielzahl von Pruritogenen. Nach ihren neuroanatomischen und molekularen Eigenschaften können C-Fasern weiter in peptiderge und nicht-peptiderge Subpopulationen unterteilt werden. Peptiderge Neurone setzen Neuropeptide wie Substanz P und *Calcitonin Gene-Related Peptide* (CGRP) frei und exprimieren weiter den Neurotrophin-Rezeptor Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), sodass sie sensitiv für dessen Liganden, den Nervenwachstumsfaktor (*Nerve Growth Factor*, NGF) sind. Im Gegensatz dazu exprimieren nicht-peptiderge Neurone den Neurotrophin-Rezeptor c-Ret, zu dessen Liganden der neurotrophe Faktor der Gliazellen (*Glial Cell-derived Neurotrophic Factor*, GDNF) sowie Neuroturin und Artemin zählen. Ein Großteil der c-Ret-positiven Neuronen bindet ebenso das Isolektin B4 (IB4) und zeigt eine Expression von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren der Mrgpr-Familie (*Mas-related G-Protein-gekoppelte Rezeptoren*) sowie von spezifischen purinergen Rezeptor-Subtypen, insbesondere P2X3. Nozizeptoren können auch anhand ihres Expressionsprofils von Kanälen unterschieden werden, die sie empfindlich gegenüber Wärme (TRPV1; *Transient Receptor Potential*, TRP-), Kälte (TRPM8), saurem Milieu (*Acid Sensing Ion Channels*, ASICs) und einer Vielzahl von chemischen Substanzen (TRPA1) machen (Basbaum et al. 2009; Peirs and Seal 2016). Allerdings sind nicht alle C-Fasern Nozizeptoren. Einige werden bspw. durch harmloses Streicheln der behaarten Haut erregt. Neurone, die auf nicht schmerzhaft stimuli reagieren, werden als niedrigschwellige Mechanorezeptoren (*Low-threshold Mechanoreceptors*, LTMRs) bezeichnet. Ihnen werden auch die myelinisierten A β -Fasern zugeordnet. Diese sind abhängig von ihrem Durchmesser, Myelinisierungsgrad und Leitungseigenschaften nur in

einem geringen Ausmaß an der Prozessierung von Schmerzen beteiligt (Basbaum et al. 2009; Peirs and Seal 2016).

Während A δ -Fasern in Lamina I und V projizieren, enden die für die Verarbeitung von Berührungseizen zuständigen A β -Fasern in Lamina III, IV und V (Basbaum et al. 2009). C-Faser-Nozizeptoren dagegen werden in den oberen Laminae I und II verschaltet, wobei die meisten peptidergen C-Fasern in Lamina I und den oberen Bereich der Lamina II (II₀) terminieren (Abb. 3). Nicht-peptiderge IB4-bindende und MrgprD-positive C-Fasern dagegen münden in die mittlere Region der Lamina II (Basbaum et al. 2009; Todd 2017).

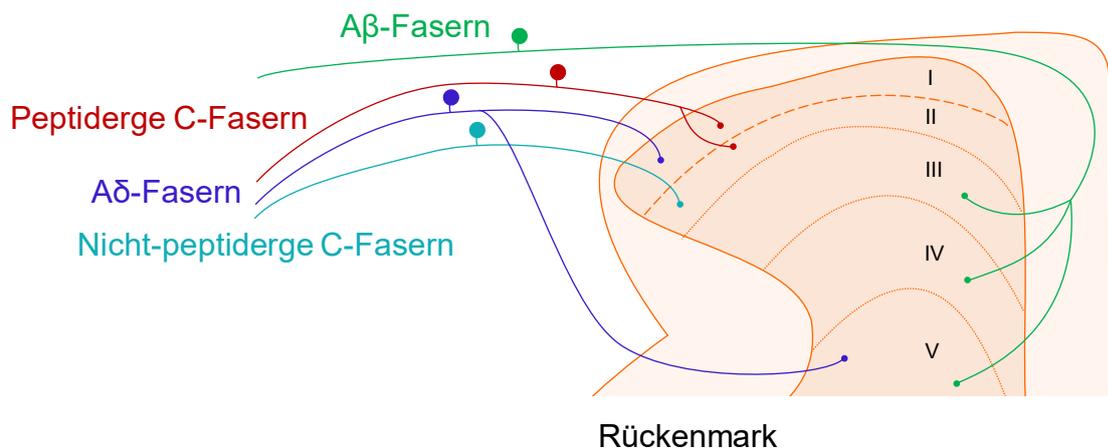


Abb. 3. Vereinfachte schematische Darstellung des schmerzerregenden Systems. Verschaltung der primär afferenten Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks. Peptiderge (rot) und nicht-peptiderge (türkis) C-Fasern projizieren in Laminae I-II, A δ -Fasern (blau) werden in Lamina I und V verschaltet und die für die Verarbeitung von Berührungseizen zuständigen A β -Fasern (grün) enden in Lamina III, IV und V. Verändert nach Schmidtke et al. 2009.

Im Jahr 2015 konnte mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung eine Klassifizierung der primär afferenten Neuronen in elf neuronale Subpopulationen vorgenommen werden. Dabei wurden drei verschiedene niedrighschwellige A β -Mechanorezeptoren (NF1-3), zwei verschiedene Propriozeptoren (NF4 und NF5) und sechs Haupttypen von thermo-, juckreiz- und mechanosensitiven Neuronen (PEP1-2, NP1-3, TH) identifiziert. Das NF-Cluster zeichnet sich z.B. durch Expression des Neurofilaments *Heavy Chain* (*Nefh*) und des Calciumbindenden Proteins Parvalbumin aus, repräsentiert myelinisierte Fasern und kann basierend auf der Expression von Markern weiter in fünf Subgruppen unterteilt werden. Neurone des PEP-Clusters sind peptiderg, exprimieren bspw. Substanz P, TrkA und CGRP und können weiter in zwei Untergruppen kategorisiert werden. Dabei stellen Neurone der PEP1-Gruppe peptiderge C-Fasern dar, die an der Verarbeitung thermischer Stimuli beteiligt sind (Hitze- und Kältereize), während Neurone des PEP2-Clusters peptiderge A δ -Nozizeptoren repräsentieren. In der Klasse der NP-Neuronen wurde MrgprD und P2X3 mRNA detektiert und Neuronen des TH-Clusters zeigen eine Expression der Tyrosinhydrolase (TH). Die NP-

Gruppe kann weiter in die Untergruppen NP1, NP2 und NP3 unterteilt werden. Primär afferente Fasern der NP1-Klasse scheinen an der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen beteiligt zu sein, während den Neuronen der NP1-3 Subpopulation eine Bedeutung bei der Verarbeitung pruritogener Stimuli zugeschrieben wird. Insgesamt ermöglicht diese Einteilung eine bessere Beurteilung der neuronalen Funktionen der jeweiligen Untergruppen bei der Wahrnehmung und Verarbeitung von Stimuli unterschiedlicher Natur (Usoskin et al. 2015).

Mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung unterteilte eine weitere Studie DRG-Neurone in drei Klassen, darunter in peptiderge und nicht-peptiderge Subpopulationen und in solche, die eine Neurofilament-Expression zeigen. Die primär afferenten Fasern können weiter in jeweils acht, sechs und drei Untergruppen zugeordnet werden. Diese Kategorisierung der neuronalen Subpopulationen aus dem Jahr 2018 entspricht der zuvor beschriebenen Einteilung der DRG-Neurone nach Usoskin et al., 2015 (Usoskin et al. 2015; Zeisel et al. 2018). Zeisel et al., 2018, identifizierten allerdings drei weitere Untergruppen der peptidergen Afferenzen, die an der Verarbeitung von harmlosen und noxischen Kältestimuli beteiligt zu sein scheinen (Zeisel et al. 2018). Eine Untersuchung, die erst in jüngster Zeit veröffentlicht wurde, klassifizierte die DRG-Neurone basierend auf der Expression von Transkriptionsfaktoren in 14 Subpopulationen. Hierbei wurden LTMRs vom A β -, A δ - und C-Typ, Propriozeptoren, sechs Untergruppen CGRP-positiver DRG-Neurone, MrgprD-positive polymodale Nozizeptoren, Somatostatin-positive Pruritozeptoren und Kälte-sensitive Thermorezeptoren sowie Endothel- und Schwanzzellen identifiziert (Sharma et al. 2020).

1.1.3 Neuronale Subpopulationen im Dorsalhorn des Rückenmarks

Primär afferente Neurone münden in verschiedene Laminae des Dorsalhorns des Rückenmarks, welches der Hauptort der Verschaltung peripheren sensorischen Inputs und absteigender supraspinaler Modulation darstellt (Peirs and Seal 2016). Dorsalhornneurone lassen sich in zwei Hauptklassen einteilen. Zum einen gibt es Projektionsneurone, deren Axone in höhere Gehirnregionen projizieren. Zum anderen gibt es Interneurone, deren Axone im Rückenmark verbleiben und dort die von den primär afferenten Fasern eingehende Signale modulieren (Peirs and Seal 2016; Todd 2017). Die Projektionsneurone leiten die Informationen der Peripherie weiter zu zahlreichen supraspinalen Regionen, die qualitative und affektive Aspekte der Schmerz Wahrnehmung auslösen (Peirs and Seal 2016). Die für die Verarbeitung von Schmerzen und Juckreiz wichtigen Projektionsneurone sind vor allem in Lamina I, verstreut jedoch auch in Laminae III-VI, lokalisiert. Die Projektionsneurone sind glutamaterg und tragen zu spinalen exzitatorischen synaptischen Schaltkreisen bei (Cameron et al. 2015; Szucs et al. 2010; Todd 2017). Die große Mehrheit der Neuronen in Laminae I-III sind allerdings Interneurone. Dies gilt für 90 % bis 95 % der Dorsalhornneurone in Lamina I und für fast alle Neurone der Lamina II. Funktionell lassen sich Interneurone in

exzitatorische (glutamaterge) und inhibitorische Interneurone einteilen. Letztere wirken hemmend auf Signalkaskaden und nutzen die Neurotransmitter GABA und/ oder Glycin. GABAerge und glycinerge Interneurone zeigen ebenso eine Expression des GABA-synthetisierenden Enzyms Glutamat-Decarboxylase (GAD) bzw. des neuronalen Glycin-Transporters GlyT2 (Polgár et al. 2013; Todd 2017; Yasaka et al. 2010).

Anhand ihrer neurochemischen Charakteristika können Dorsalhornneurone in verschiedene Subpopulationen unterteilt werden. Diese Klassifizierung wird allerdings dadurch erschwert, dass einige dieser Marker ebenso in primär afferenten Fasern exprimiert werden (Todd 2017). Während das Neuropeptid Y (NPY), Galanin und Nozizeptin in inhibitorischen Interneuronen nachgewiesen werden können, zeigen exzitatorische Interneurone eine Expression von Somatostatin (SST), Neurotensin, *Gastrin Releasing Peptide* (GRP), Neurokinin B (NKB), Substanz P und Cholecystokinin. Die Opioidpeptide Enkephalin und Dynorphin werden sowohl in exzitatorischen als auch inhibitorischen Interneuronen exprimiert (Bröhl et al. 2008; Duan et al. 2014; Gutierrez-Mecinas et al. 2014; Huang et al. 2008; Polgár et al. 2006; Proudlock et al. 1993; Rowan et al. 1993; Sardella et al. 2011a; Simmons et al. 1995; Todd 2017; Todd et al. 2003; Todd et al. 1994; Xu et al. 2008; Xu et al. 2013). Die Marker unterscheiden sich zudem in ihrer laminaren Verteilung. Der Neurokinin 1-Rezeptor (NK1-), an den Substanz P bindet, wird z.B. in Projektionsneuronen und in exzitatorischen Interneuronen der Lamina I exprimiert (Cameron et al. 2015; Todd 2017). Der Rezeptor für GRP (GRPR), dem eine Bedeutung in der Prozessierung von Pruritus zugeschrieben wird, lässt sich in erregenden Interneuronen der Laminae I-II₀ nachweisen (Sun and Chen 2007; Sun et al. 2009; Todd 2017; Xu et al. 2013). Der ventrale Bereich der Lamina II (II_i) ist gekennzeichnet durch die Expression von exzitatorischen Interneuronen, welche die γ -Isoform der Proteinkinase C (PKC γ) exprimieren. Diese Zellen sind an der Prozessierung von chronischen Schmerzen und der Entwicklung einer taktilen Allodynie beteiligt (Basbaum et al. 2009; Lu et al. 2013; Malmberg et al. 1997; Miraucourt et al. 2007; Miraucourt et al. 2009; Todd 2017).

Um spezifische funktionelle Subpopulationen identifizieren zu können, wurde nach Markern gesucht, die eine nicht-überlappende Expression innerhalb der exzitatorischen und inhibitorischen Interneurone aufweisen. Dabei wurden im Rückenmark der Ratte jeweils vier nicht-überlappende exzitatorische sowie inhibitorische neuronale Populationen identifiziert (Todd 2017). Zu den nicht-überlappenden exzitatorischen Interneuronen-Marker zählen Substanz P, GRP, Neurotensin und NKB. Diese neuronalen Subpopulationen stellen mehr als die Hälfte der exzitatorischen Interneurone in Laminae I-II dar und unterscheiden sich in ihrer laminaren Distribution (Gutierrez-Mecinas et al. 2017; Gutierrez-Mecinas et al. 2016; Todd 2017). Der vesikuläre Glutamatttransporter 3 (VGLUT3) findet sich außerdem in

exzitatorischen Interneuronen in Lamina III und IV (Peirs and Seal 2016). Die inhibitorischen Subpopulationen konnten anhand ihrer Expression von NPY, Galanin, neuronaler NO-Synthase (nNOS) und Parvalbumin identifiziert werden und repräsentieren mehr als die Hälfte der inhibitorischen Interneurone in Laminae I-II (Polgár et al. 2013; Sardella et al. 2011b; Tiong et al. 2011; Todd 2017). Außerdem exprimieren etwa die Hälfte der inhibitorischen Interneurone in Laminae I-II den Somatostatin-Rezeptor (SST_{2A}) und sind abhängig vom Transkriptionsfaktor *Helix-loop-helix Family Member B5* (Bhlhb5) (Todd 2017). Bhlhb5-positive Interneurone nehmen eine Rolle im chronischen Juckreizgeschehen ein (Chiang et al. 2016; Kardon et al. 2014; Ross et al. 2010; Todd 2017). Ein größtenteils vergleichbares Expressionsmuster der Marker wurde auch im Rückenmark der Maus gefunden. Diese Einteilung der Interneurone in funktionelle Subpopulationen erfordert oftmals mehrere Marker. Außerdem stellt die transiente Expression der neurochemischen Marker, vor allem von Neuropeptiden, eine Schwierigkeit dar (Todd 2017).

Mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung wurden Neurone im Dorsalhorn der Maus erst in jüngster Zeit in Subpopulationen klassifiziert. Außerdem konnte gezeigt werden, dass Hitze- und Kältestimuli spezifische Subpopulationen erregender und hemmender Neurone aktivieren. Die Untersuchung ergab, dass neuronale Zellen entweder *SLC17A6* (*Vesicular Glutamate Transporter*, VGLUT2) oder aber *SLC32A1* (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT) exprimieren und somit glutamaterge exzitatorische bzw. GABAerge inhibitorische Neurone darstellen. Schließlich wurden 15 glutamaterge und 15 GABAerge Neuronenpopulationen identifiziert und als Glut1-15 bzw. Gaba1-15 bezeichnet. Unter allen untersuchten Neuronen sind 45,2 % der Neurone glutamaterg und 54,8 % der neuronalen Zellen GABAerg. Die einzelnen neuronalen Subpopulationen unterscheiden sich zum einen in der Expression von Transkriptionsfaktoren, Neuropeptiden, Rezeptoren, Ionenkanälen oder Transportproteinen, zum anderen aber auch in ihrer laminaren Verteilung (Häring et al. 2018). In einer weiteren Studie wurden ebenfalls mit Hilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierungen 22 Zelltypen im gesamten Rückenmark der Maus identifiziert, die ebenso in exzitatorische (glutamaterg/VGLUT2-positiv) und inhibitorische (GABAerg oder glycinerg) Populationen kategorisiert wurden (Zeisel et al. 2018).

1.1.4 Periphere und zentrale Sensibilisierung

Die Entstehung chronischer Schmerzzustände beruht auf chemischen, strukturellen oder funktionalen Modifikationen im nozizeptiven System. Je nach Lokalisation dieser Veränderungen, handelt es von einer peripheren bzw. zentralen Sensibilisierung (Basbaum et al. 2009; Woolf 2004). Infolge von Nervenschädigungen kann es zu einer Verstärkung spontaner Feuerungsraten, Alterationen der Leitfähigkeit, Änderungen in den Neurotransmitter-Eigenschaften der geschädigten Nervenfasern oder einem vermehrten

Einbau von Kanälen in die Nervenendigungen kommen (Basbaum et al. 2009). Pathophysiologisch resultiert eine periphere Sensibilisierung häufig aus einem veränderten, das die Nervenfasern umgebenden, chemischen Milieus infolge von Gewebeerkrankungen oder Entzündungen (Basbaum et al. 2009; Peirs and Seal 2016; Woolf 2004). Bei Gewebeerkrankung werden endogene Schmerz- und Entzündungsfaktoren aus aktivierten Nozizeptoren oder nicht-neuronalen Zellen (z.B. Mastzellen, Keratinozyten, Fibroblasten), die zum Ort der Entzündung oder Verletzung infiltrieren, freigesetzt. Die proinflammatorischen Mediatoren umfassen Neurotransmitter, Peptide wie Substanz P, CGRP, Bradykinin, Eicosanoide und die dazugehörigen Lipide (Prostaglandine, Thromboxane, Leukotriene, Endocannabinoide), Neutrophine (NGF), Zytokine und Chemokine sowie extrazelluläre Proteasen und Protonen und schaffen ein inflammatorisches Umfeld (Basbaum et al. 2009). Einige dieser Faktoren können die Nozizeptoren direkt aktivieren, andere dagegen sensibilisieren die Nervenendigungen, sodass diese empfindlicher auf nachfolgende Stimuli reagieren (Woolf 2004). Diese „Nozizeptor-Sensibilisatoren“ binden an ihre jeweiligen Rezeptoren auf der Membran der Nervenendigungen und aktivieren verschiedene intrazelluläre Signalwege. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC), Proteinkinase A (PKA), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) und die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), ERK (*Extracellular-Signal Regulated Kinases*), p38 und JNK (*c-Jun N-Terminal Kinase*). Durch Induktion der Signalkaskaden kommt es vor allem zu Phosphorylierungen von TRP-Kanälen und spannungsabhängigen Natriumkanälen, die von den Nozizeptoren exprimiert werden. Dies führt zu Änderungen in der Aktivierungsschwelle und der Kinetik der Nozizeptoren. Außerdem steigt die Synthese von TRPV1-Kanälen und es werden vermehrt TRPV1-Kanäle in die Membran der Nervenendigungen eingebaut, wodurch die Sensitivität gegenüber peripheren Stimuli erhöht wird (Woolf 2004; Woolf and Ma 2007). TRPV1, TPRA1 sowie Na_v1.7, Na_v1.8 und Na_v1.9 sind wesentlich an peripheren Sensibilisierungsprozessen beteiligt. Im Allgemeinen führen Entzündungen zu einer gesteigerten Expression von spezifischen nozizeptiven Ionenkanälen bzw. Rezeptoren. Bei axonaler Schädigung kann es zu einer veränderten Transkription von mehr als 1.000 Genen kommen. Viele dieser transkriptionellen Änderungen sind maladaptiv und können zu funktionalen Abwandlungen der Nozizeptoren und schließlich zur Entwicklung neuropathischer Schmerzen führen (Woolf and Ma 2007).

Neben der peripheren Sensibilisierung gibt es auch zentrale Mechanismen, die zu Sensibilisierungsprozessen führen. Darunter zählen z.B. Alterationen der glutamatergen Neurotransmission/ N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptor vermittelte Hypersensitivität, Verlust der inhibitorischen Kontrollmechanismen (Disinhibition), Glia-Neuron-Interaktionen,

neurochemische Ungleichgewichte und Änderungen in der neuronalen Plastizität im Rahmen struktureller Umgestaltung und Reorganisation von Synapsen, Zellen und Schaltkreisen sowie Mechanismen der kortikalen Reorganisation (Basbaum et al. 2009; Kuner and Flor 2016; Steven E. Harte et al. 2018; Woolf 2004). Diese Veränderungen im Dorsalhorn des Rückenmarks tragen zur Entstehung von chronischen Schmerzzuständen bei und sind denen ähnlich, die eine Sensibilisierung in der Peripherie bewirken (Todd 2017; Woolf 2004). Bei akutem Schmerz wird der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat aus den zentralen Endigungen der Nozizeptoren freigesetzt. Glutamat erzeugt vor allem durch postsynaptische Bindung an ionotrope Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure- (AMPA-) und Kainat-Rezeptoren exzitatorische postsynaptische Potenziale (EPSP) an Projektions- und Interneuronen des Dorsalhorns. Die Summation mehrerer unterschwelliger EPSPs führt schließlich zu einem Aktionspotenzial, sodass das Schmerzsignal in höhere Gehirnregionen weitergeleitet wird. Hierbei ist der NMDA-Rezeptor durch ein in der Kanalpore sitzendes Magnesium-Ion geschlossen. Kommt es allerdings zur anhaltenden Freisetzung von Glutamat und den Neuropeptiden Substanz P und CGRP aus den Nozizeptoren, wird die postsynaptische Membran ausreichend depolarisiert und die Magnesium-Blockade des NMDA-Rezeptors gelöst. Dieser wird nun aktiviert und es kommt zu einem verstärkten Calcium-Einstrom in die Zelle und zur Aktivierung intrazellulärer Signalwegen, die zur Aufrechterhaltung der zentralen Sensibilisierung beitragen (Basbaum et al. 2009; Latremoliere and Woolf 2009). Die Calcium-induzierte Aktivierung intrazellulärer Kinasen (z.B. PKA, PKC, Tyrosinkinasen) führt zur Phosphorylierung der Reste am C-terminalen Ende der NMDA- und AMPA-Rezeptoren (Basbaum et al. 2009; Latremoliere and Woolf 2009). Diese posttranslationalen Modifikationen ändern sowohl die Aktivität der Rezeptoren als auch deren Dichte in der Plasmamembran und erhöhen somit die Sensitivität gegenüber Glutamat. Dies bewirkt zusammen mit weiteren Prozessen eine Manifestation der zentralen Sensibilisierung. Substanz P wird in nicht-myelinisierten C-Faser Nozizeptoren zusammen mit Glutamat ausgeschüttet und bewirkt nach Bindung an seinen Rezeptor eine langanhaltende Depolarisierung der postsynaptischen Membran. CGRP verstärkt den durch Substanz P vermittelten Effekt, aktiviert Proteinkinasen und fördert zudem die Freisetzung des im Nozizeptor synthetisierten neutrophilen Faktors BDNF (*Brain-derived Neurotrophic Factor*) ins Rückenmark. Letzteres führt zur Aktivierung von PKC und ERK. Auch Bradykinin, welches im Rückenmark als Antwort auf intensive schädliche Stimuli synthetisiert wird, aktiviert sowohl Proteinkinasen als auch ERK. Die Aktivierung von ERK führt zu translationalen und posttranslationalen Modifikationen, die an der Aufrechterhaltung der Sensibilisierung im Rückenmark beteiligt sind. Zu den posttranslationalen Veränderungen zählen bspw. eine Verstärkung der Funktion des NMDA-Rezeptors, ein vermehrter Einbau von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran sowie eine Verringerung der

Kalium-Ströme, was mit einer erhöhten Erregung der Membran einhergeht. Modifikationen auf Transkriptionsebene können über das *cAMP Response Element-binding Protein* (CREB) vermittelt werden, aber auch über andere Transkriptionsfaktoren, welche einen Einfluss auf die Expression verschiedener Gene wie c-Fos, NK1, Tropomyosinrezeptorkinase B (TrkB) und Cyclooxygenase 2 (Cox-2) nehmen (Latremoliere and Woolf 2009).

GABAerge und glycinerge inhibitorische Interneurone werden in den oberen Laminae im Dorsalhorn des Rückenmarks stark exprimiert und kontrollieren mittels hemmender Mechanismen den sensorischen Input. Ein Funktionsverlust dieser Interneuronen-Population und somit ein Verlust der Hemmung (Disinhibition) führt zu einer Hypersensitivität (Basbaum et al. 2009; Woolf 2004). Verletzungen in der Peripherie bewirken eine Reduktion inhibitorischer postsynaptischer Potenziale in den oberen Laminae des Rückenmarks. Hierbei wird das Prostaglandin E₂ (PGE₂) im Rückenmark freigesetzt. Dieses führt über die Aktivierung des zyklischen Adenosinmonophosphat- (cAMP-) PKA-Signalwegs zur Phosphorylierung des Glycin-Rezeptors $\alpha 3$, welcher daraufhin seine Empfindlichkeit gegenüber Glycin verliert (Basbaum et al. 2009; Latremoliere and Woolf 2009). Das durch die induzierbare Cox-2 gebildete PGE₂ aktiviert außerdem nicht-selektive Kationenkanäle und bewirkt über präsynaptische Bindung an EP4-Rezeptoren eine verstärkte Neurotransmitter-Freisetzung (Latremoliere and Woolf 2009). Auch Veränderungen im Projektionsneuron selbst können zur Disinhibition beitragen. So kann es zur Herunterregulation des Kalium-Chlorid-Ko-Transporters KCC2 (*SLC1A5*) und somit zu einer Verschiebung des Chlorid-Gradienten kommen. Infolgedessen löst die Aktivierung der GABA-Rezeptoren keine Hyperpolarisation mehr aus, sondern bewirkt vielmehr eine Depolarisation der Plasmamembran (Basbaum et al. 2009; Kuner and Flor 2016). Die Runterregulation der Expression von KCC2 kann eine Antwort auf BDNF, welches von Mikroglia im Rahmen von Nervenverletzungen freigesetzt wird, darstellen (Kuner and Flor 2016; Latremoliere and Woolf 2009).

Glia-Neuron-Interaktionen sind weitere Mechanismen, die zur zentralen Sensibilisierung beitragen. Nach peripherer Nervenverletzung kommt es zur Aktivierung und Akkumulation von Mikroglia in den oberen Laminae im Dorsalhorn sowie im Ventralhorn und zur Infiltration peripherer Immunzellen wie Makrophagen und T-Zellen ins Rückenmark. Aktivierte Mikroglia setzen eine Reihe von Signalmolekülen, darunter Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β und Interleukin-6, neutrophile Faktoren, Neurotransmitter und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei und fördern durch ihre Interaktion mit Neuronen zentrale Sensibilisierungsprozesse sowie die Entwicklung von Schmerzen (Basbaum et al. 2009; Latremoliere and Woolf 2009). Adenosintriphosphat (ATP), Stickstoffmonoxid (NO), Neuropeptide, *Colony Stimulating Factor 1* (CSF1), Zytokine und Chemokine, die entweder

aus den verletzten sensorischen Neuronen oder aus Mikrogliazellen, Astrozyten und T-Zellen ausgeschüttet werden, bewirken die mikrogliale Aktivierung und Rekrutierung. Dies führt u.a. zur Aktivierung von intrazellulären Signalkaskaden, vor allem zur Aktivierung des MAPK-Signalwegs und so zur Aktivierung von ERK, p38 und JNK. Weiter kann der zelluläre Transkriptionsfaktor CREB aktiviert, die Disinhibition u.a. über die Freisetzung von BDNF gefördert oder bspw. durch eine verminderte Glutamat-Aufnahme Apoptose induziert werden (Ji et al. 2018; Latremoliere and Woolf 2009).

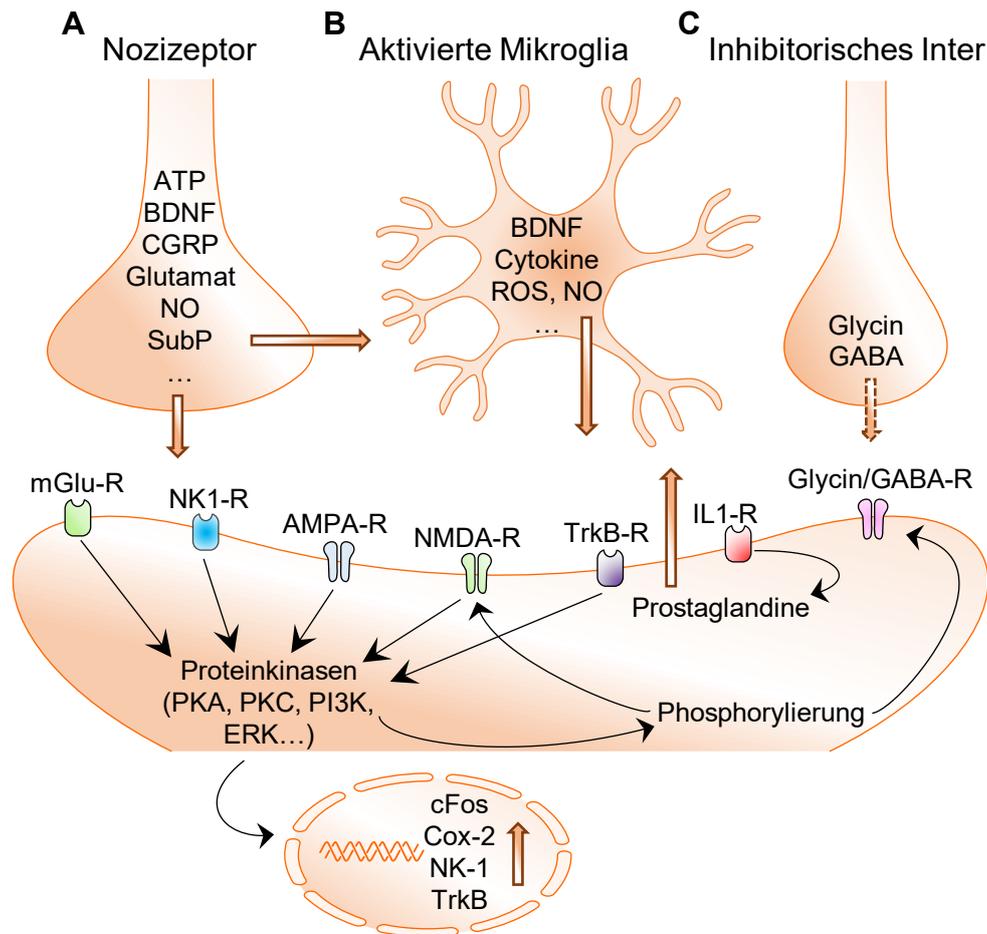


Abb. 4. Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung im Dorsalhorn des Rückenmarks. (A) Die Aktivierung primär afferenter Neurone führt zur verstärkten Neurotransmitter-Freisetzung und Ausschüttung von Botenstoffen, die an ihre entsprechenden Rezeptoren binden. So kommt es postsynaptisch zur Aktivierung von diversen Proteinkinasen, wodurch die Transkription schmerzrelevanter Gene induziert wird. Gleichzeitig kommt es zur Phosphorylierung und zu einer gesteigerten Sensitivität der Neurotransmitter-Rezeptoren. (B) Signalmoleküle, die aus primär afferenten Neuronen bzw. Projektionsneuronen freigesetzt werden, bewirken eine Aktivierung der Gliazellen. Dies führt zur Ausschüttung weiterer Botenstoffe aus den aktivierten Gliazellen, die verschiedene Signalkaskaden ansteuern und die Schmerzantwort verstärken. (C) Durch Hemmung inhibitorischer Interneurone bzw. deren Rezeptoren wird ihr abschwächender Effekt auf die nozizeptive Antwort vermindert und infolgedessen die Schmerzantwort verstärkt.

Insgesamt lässt sich festhalten, dass die Veränderungen der peripheren und zentralen somatosensorischen Schaltkreise, die im Rahmen einer Dauerstimulation entstehen,

vielschichtig sind und somit eine Herausforderung für die Therapie chronischer Schmerzzustände darstellen (Peirs and Seal 2016).

1.2 Pruritus

Pruritus (Juckreiz), der als unangenehmes Gefühl, welches den Wunsch zum Kratzen provoziert, definiert wird, kommt als Kardinalsymptom bei vielen dermatologischen Erkrankungen in unterschiedlichen Intensitäten und Qualitäten (z.B. Brennen, Stechen, Beißen, Schmerz) vor (Bautista et al. 2014; Ikoma et al. 2006; Lee et al. 2016; Lerner 2018; Liu et al. 2009). Im Gegensatz zur Schmerzempfindung, bei der die Betroffenen aktiv versuchen, dem nozizeptiven Stimulus zu entkommen, zwingt der Juckreiz die Betroffenen die Lokalisation des Pruritogens zu identifizieren und mit Kratzen darauf zu reagieren. Auf diese Weise kann der Stimulus entfernt und der Zyklus der Signalverarbeitung unterbrochen werden (Bautista et al. 2014; Green and Dong 2016; Lerner 2018; Moore et al. 2018; van Laarhoven et al. 2019). Sowohl mechanische als auch thermische oder chemische Stimuli können Pruritus induzieren, der sich auf der Haut oder bestimmten Schleimhäuten, nicht jedoch in Muskeln, Gelenken oder Eingeweiden manifestiert (LaMotte et al. 2014).

Wie der Schmerz lässt sich auch der Juckreiz in akut und chronisch unterteilen. Akuter Juckreiz ist zeitlich begrenzt und klingt oftmals innerhalb von Stunden oder Tagen spontan wieder ab. Des Weiteren ist akuter Pruritus Histamin-abhängig und kann in der Regel gut mit Antihistaminika therapiert werden (Green and Dong 2016; Silverberg et al. 2016; Yosipovitch et al. 2018). Persistiert Juckreiz dagegen länger als sechs Wochen, wird er als chronisch eingestuft. Unter chronischem Pruritus leiden 8,4 % bis 13,9 % der Allgemeinbevölkerung. Als komplexer pathophysiologischer Prozess geht chronischer Juckreiz mit einem starken Leidensdruck der Betroffenen einher, ist oftmals schwierig zu therapieren und stellt somit eine erhebliche sozioökonomische Belastung dar (LaMotte et al. 2014; Lerner 2018; Mollanazar et al. 2016; van Laarhoven et al. 2019). Ähnlich wie bei chronischen Schmerzen liegen chronischem Pruritus periphere und zentrale Sensibilisierungsprozesse zugrunde (van Laarhoven et al. 2019). Dies hat zum einen eine verstärkte Reaktion auf pruritogene Stimuli (Hyperknesis) zur Folge, zum anderen können Reize, die normalerweise nicht pruritogen sind, Juckreiz auslösen (Alloknesis). Dies entspricht der in chronischen Schmerzzuständen auftretenden Hyperalgesie bzw. Allodynie (Akiyama and Carstens 2013; Yosipovitch et al. 2018).

Primär afferente Neurone sind nicht nur an der Verarbeitung von Schmerzen beteiligt, sondern nehmen auch eine bedeutsame Rolle bei der Prozessierung von Juckreiz ein (Green and Dong 2016; Liu et al. 2009). Außerdem wurde verzeichnet, dass durch Kratzen induzierte Schmerzen Pruritus hemmen und Opioid-Analgetika Juckreiz auslösen können,

sodass sich Pruritus und Schmerzen gegenseitig beeinflussen (Bautista et al. 2014; Ikoma et al. 2006). Dabei wird die Verarbeitung von Schmerz und Juckreiz seit Jahrzehnten heftig diskutiert und in der Literatur sind verschiedene Thesen dazu zu finden (Kardon et al. 2014; Sun et al. 2017). So wurde u.a. beschrieben, dass Pruritogene Juckreiz-spezifische sensorische Neurone aktivieren, während nozizeptive Stimuli sowohl zur Aktivierung von Schmerz- als auch Juckreiz-spezifischen primär afferenten Fasern führen. Hierbei wird der Juckreizsignalweg allerdings auf Rückenmarksebene wieder inhibiert, wobei die Empfindung Schmerz zurückbleibt (Dong 2018).

1.2.1 Periphere und zentrale Mechanismen der Juckreiz-Verarbeitung

Die Haut bedeckt als vielschichtiges Organ und einer Fläche von 1,8 m² bis 2,0 m² den ganzen Körper und stellt somit eine Barriere gegen Umweltreize dar (Dong 2018; Green and Dong 2016; Ogden et al. 2004). Die vor allem aus Keratinozyten bestehende Epidermis ist die äußerste Hautschicht und steht im direkten Kontakt zu exogenen Faktoren. Unterhalb der Epidermis, durch eine Basalmembran getrennt, liegt die Dermis mit Hautanhangsgebilden, Blut- und Lymphgefäßen und Immunzellen (z.B. Mastzellen), gefolgt vom hypodermalen Fettgewebe. Die primär afferenten Neuronen, die die Epidermis innervieren, und ihre Rezeptoren, sind auch bei der Verarbeitung von Juckreiz-Signalen beteiligt (Dong 2018; Han et al. 2013; Liu et al. 2009). Auf einen kleinen Bruch der Epidermis oder das Eindringen eines Pruritogens, z.B. infolge eines Mückenstichs, reagieren Keratinozyten und Immunzellen mit der Freisetzung von Mediatoren, darunter Histamin, Serotonin, Leukotriene, Proteasen, Zytokine und Chemokine. Dies kann zur lokalen Entzündungsreaktion, einschließlich Vasodilatation, Extravasation von Plasma ins umliegende Gewebe und Mastzelldegranulation, führen (Dong 2018; Yosipovitch et al. 2018). Solche Veränderungen können von den freien Nervenendigungen detektiert und als Juckreiz wahrgenommen werden. Im Rahmen verschiedener Dermatitiden kann es durch sich wiederholende oder persistierende Entzündungsreaktionen und somit erhöhten Konzentrationen an Histamin und anderen Mediatoren zur Verdickung und morphologischen Veränderungen der Epidermis, massiver Infiltration weiterer Immunzellen und Ausbildung eines chronischen Juckreizes kommen. Außerdem können Pruritogene, die im Rahmen systemischer Erkrankungen entstehen, über die Blutbahn zu den freien Nervenendigungen gebracht werden und ihre entsprechenden Rezeptoren aktivieren. Daraus resultiert ein chronischer Juckreiz ohne erkennbare Hautläsionen (Dong 2018).

Viele Pruritogene können bestimmte Rezeptoren, oftmals G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), nicht-myelinisierter C-Fasern aktivieren. GPCRs wiederum bewirken eine Öffnung von TRPV1, TRPA1 und spannungsabhängigen Natriumkanälen, was zur Generierung von Aktionspotenzialen führt und das Signal weiter ins Rückenmark leitet (Yosipovitch et al.

2018). Das von Mastzellen, basophilen Granulozyten, Neuronen und Keratinozyten synthetisierte Histamin ist der wohl bekannteste Juckreiz-Mediator. Bisher sind vier G-Protein-gekoppelte Histamin-Rezeptoren, H₁R, H₂R, H₃R und H₄R bekannt, wobei H₁R und H₄R von Pruritus-verarbeitenden Nervenfasern exprimiert werden und Histamin-induzierten Juckreiz vermitteln (Dong and Dong 2018; Kashiba et al. 1999; Simons and Simons 2011; Strakhova et al. 2009; Usoskin et al. 2015). Serotonin (5-Hydroxytryptamin, 5-HT) ist nicht nur ein wichtiger Neurotransmitter des zentralen Nervensystems, sondern kann unabhängig von Histamin ebenso von Mastzellen sezerniert werden (Dong and Dong 2018; Moon et al. 2014). Abgesehen vom 5-HT₃-Rezeptor, welcher einen Liganden-gesteuerten Ionenkanal darstellt, sind die restlichen 13 5-HT-Rezeptoren GPCRs. Einige 5-HT-Rezeptoren konnten in DRG-Neuronen nachgewiesen werden und dabei scheinen 5-HT₁-, 5-HT₂-, 5-HT₃- und 5-HT₇-Rezeptoren eine Rolle in der Juckreiz-Verarbeitung einzunehmen (Dong and Dong 2018; Morita et al. 2015; Nojima and Carstens 2003; Ostadhadi et al. 2015; Usoskin et al. 2015).

In der Haut von Patienten, die an chronischem Pruritus leiden, konnten erhöhte Protease-Konzentrationen nachgewiesen werden. Früher wurde davon ausgegangen, dass sowohl endogene als auch exogene Proteasen über Aktivierung des Protease-aktivierten Rezeptors 2 (PAR2) Juckreiz auslösen. Zum heutigen Zeitpunkt jedoch ist bekannt, dass endogene Proteasen wie z.B. Cathepsin S oder exogene Proteasen wie bspw. das in der Papaya vorkommende Papain den MrgprC11-Rezeptor aktivieren (Bautista et al. 2014; Dong and Dong 2018; Lee et al. 2016). MrgprC11 wird zudem durch das *Bovine Adrenal Medulla 8-22 Peptide* (BAM8-22), ein Mastzell-Amid, dessen Präkursor Proenkephalin A in Keratinozyten exprimiert und in atopischer Dermatitis-Patienten hochreguliert wird, aktiviert (Bautista et al. 2014; Dong and Dong 2018).

Der murine Rezeptor MrgprA3 und der humane Rezeptor MrgprX1 werden durch den Wirkstoff Chloroquin aktiviert (Bautista et al. 2014; Dong and Dong 2018; Lee et al. 2016; Liu et al. 2009). Chloroquin wird zur Therapie der Malaria eingesetzt, wobei unter Chloroquin-Therapie als unerwünschte Arzneimittelwirkung ein stark ausgeprägter Juckreiz verzeichnet wurde, der bei etwa 30 % dieser Patienten zum Abbruch der Behandlung führte. MrgprA3 wird in ca. 5 % der sensorischen Neuronen exprimiert (Lee et al. 2016). Die natürlich vorkommende Aminosäure β -Alanin aktiviert MrgprD, ein weiteres Mitglied der Mrgpr-Klasse. Sowohl in Mausmodellen des chronischen Juckreizes als auch in Patienten mit atopischer Dermatitis oder Psoriasis konnte eine Überexpression von MrgprD und MrgprA3 bzw. MrgprX1 nachgewiesen werden (Dong and Dong 2018; La Nattkemper et al. 2018). Die primär afferenten Nervenfasern, die an der Verarbeitung von Juckreiz beteiligt sind, werden der NP1-, NP2- und NP3-Gruppe, die von Usoskin et al., 2015, identifiziert wurden,

zugeordnet (Dong and Dong 2018; Usoskin et al. 2015). Während MrgprA3-positive Neurone (NP2-Cluster) juckreizspezifisch zu sein scheinen, sind Neurone der NP1-Gruppe polymodal und somit an der Verarbeitung von pruritogenen, nozizeptiven, mechanischen und thermischen Stimuli beteiligt (Dong and Dong 2018; Han et al. 2013; Wang and Zylka 2009; Zylka et al. 2005).

Das im Dorsalhorn des Rückenmarks eintreffende Juckreizsignal wird von exzitatorischen und inhibitorischen Interneuronen moduliert und weiter in höhere Zentren des Gehirns geleitet, wo letztlich die Sinneswahrnehmung Juckreiz entsteht (Lee et al. 2016; Yosipovitch et al. 2018). Neben dem exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat und dem Neuropeptid Substanz P, sind an der Verarbeitung pruritogener Stimuli im Rückenmark weitere Neuropeptide beteiligt. Dazu zählt GRP, welches bspw. aus exzitatorischen Interneuronen freigesetzt wird und Dorsalhornneurone, die GRPR exprimieren, aktiviert (Dong and Dong 2018; Lee et al. 2016). Unter den Substanz P-Rezeptoren ist vor allem der NK1-Rezeptor an der Verarbeitung pruritogener Signale beteiligt (Yosipovitch et al. 2018). Auch das B-Typ natriuretische Peptid (*Brain Natriuretic Peptide*, BNP) ist ein juckreizspezifischer Neurotransmitter, welcher aus den zentralen Endigungen der NP3-Neurone freigesetzt wird und postsynaptisch an den natriuretischen Peptidrezeptor 1 (NPR1) in Dorsalhornneuronen bindet (Dong and Dong 2018; Huang et al. 2018; Lee et al. 2016). Ebenso wird dem Neuropeptid SST im Juckreizsignalweg eine Beteiligung zugeschrieben (Huang et al. 2018). Inhibitorische Bhlhb5-positive Interneurone können durch Stimuli, die das Juckreizgefühl lindern, aktiviert werden. Darunter zählen bspw. nozizeptive Reize (vermittelt über TRPV1 und TRPA1) oder Kältereize/ Menthol (vermittelt über TRPM8). Durch Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter wie Dynorphin, Glycin und GABA werden GRPR-positive Neurone oder dem Juckreizsignalweg nachgeschaltete Neurone und somit der Pruritus selbst inhibiert. NPY-positive Interneurone wirken hemmend auf durch mechanische Stimuli induzierten Juckreiz (Alloknesis) und sind unabhängig vom chemischen Juckreizsignalweg (Dong and Dong 2018; Yosipovitch et al. 2018). Oftmals besteht eine Interaktion zwischen Keratinozyten, dem Immunsystem und nicht-histaminergen sensorischen Neuronen, die für die Pathophysiologie des chronischen Juckreizes verantwortlich ist. In der Peripherie kann der u.a. von Keratinozyten oder Eosinophilen freigesetzte NFG TRPV1-Kanäle sensibilisieren. Im Rückenmark kann eine Fehlfunktion von Bhlhb5- oder NPY-positiven Interneuronen eine Dysfunktion inhibitorischer Schaltkreise, welche Juckreizsignale verarbeiten, bewirken und somit zur Entstehung des chronischen Pruritus beitragen (Yosipovitch et al. 2018).

1.3 Kaliumkanäle im sensorischen System

Die elektrische Aktivität sensorischer Neurone wird vor allem durch die Expression und Funktion von Ionenkanälen, welche u.a. das Ruhemembranpotenzial, die Ausbildung von Aktionspotenzialen und die Transmitter-Freisetzung aus den terminalen Endigungen der primär afferenten Neuronen ins Dorsalhorn des Rückenmarks bestimmen, kontrolliert (Andres-Bilbe et al. 2020; Waxman and Zamponi 2014; Wood 2020). Ionenkanäle sind integrale Membranproteine, die die Passage von Ionen durch die Lipiddoppelschicht der Zellmembran ermöglichen. Durch spezifische Konformationsänderungen wird das Öffnen und Schließen der Kanäle gesteuert, was als Kanalschaltung (*Gating*) bezeichnet wird. Dies bewirkt eine Änderung im elektrischen Strom durch die Zellmembran als Antwort auf externe Stimuli (Schmidt et al. 2011). Bei der Kontrolle der Erregung sensorischer Neurone nehmen neben spannungsabhängigen Natriumkanälen, Calciumkanälen und Liganden-gesteuerten Kanälen, wie bspw. TRP-Kanäle, auch Kaliumkanäle eine maßgebliche Rolle ein. Letztere sind wichtige Regulatoren des Ruhemembranpotenzials und der Repolarisationsphase der Aktionspotenziale in Neuronen (Andres-Bilbe et al. 2020; Waxman and Zamponi 2014; Wood 2020). Dabei stellen Kaliumkanäle die größte, am weitesten verbreitete und vielfältigste Ionenfamilie dar, deren α -Untereinheiten im Menschen von mehr als 80 Genen kodiert werden (Tsantoulas and McMahon 2014; Wood 2020). Nach Aktivierung und Öffnung der Kaliumkanäle kommt es zu einem schnellen transmembranen Kalium-Efflux, welcher die Schwelle, Form und Frequenz der Aktionspotenziale beeinflusst. Da die Öffnung von Kaliumkanälen zur Repolarisation oder sogar Hyperpolarisation der neuronalen Membran führt, kann die Generierung und Feuerungsrate von Aktionspotenzialen limitiert werden (Tsantoulas and McMahon 2014). Basierend auf strukturellen und physiologischen Merkmalen der α -Untereinheiten werden Kaliumkanäle in vier Gruppen unterteilt: spannungsgesteuerte (K_V), zweiporige (K_{2P}), einwärtsrektifizierende (K_{ir}) und calciumaktivierte (K_{Ca}) Kaliumkanäle (Du and Gamper 2013; Tsantoulas and McMahon 2014; Wood 2020). Mitglieder aller vier Hauptgruppen werden in nozizeptiven Neuronen exprimiert (Du and Gamper 2013). Obwohl schon seit längerem bekannt ist, dass es im Rahmen von Nervenverletzungen zur drastischen Abnahme der Kalium-Leitfähigkeit in peripheren Nerven kommt, die mit einem Zustand der Übererregbarkeit und erhöhtem Schmerzverhalten korreliert, konnten erst in jüngster Zeit bestimmte Kaliumkanäle mit diesen Veränderungen in Verbindung gebracht werden. So kommen Kaliumkanäle immer mehr als potenzielle Targets für die Schmerztherapie infrage (Tsantoulas and McMahon 2014).

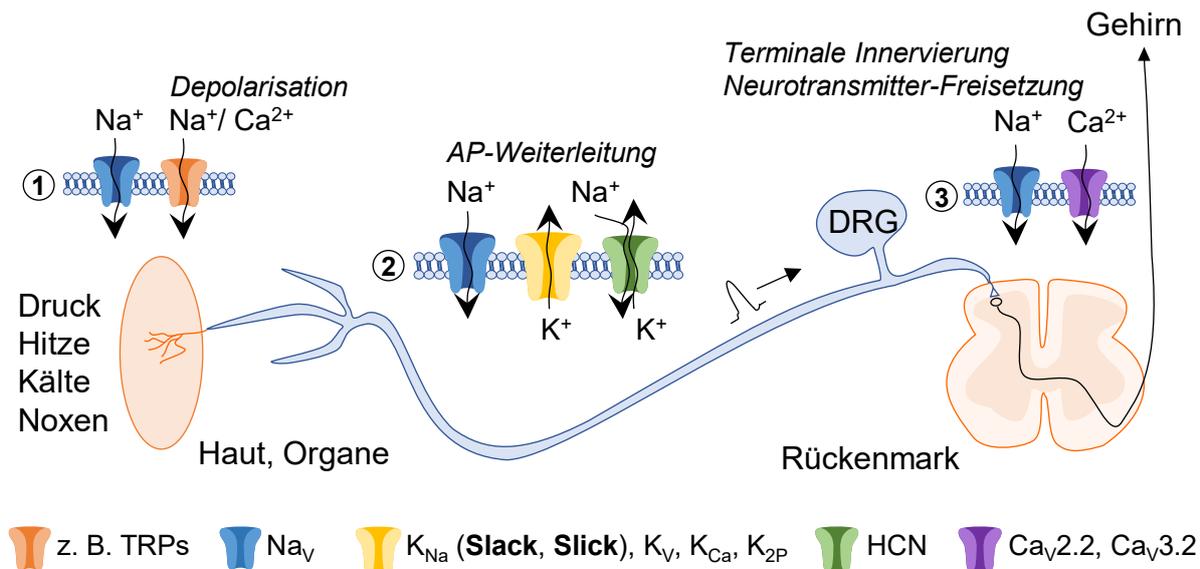


Abb. 5. Ionenkanäle im nozizeptiven System. Die Aktivierung von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na_v) und nicht-selektiven Kationenkanälen in freien Nervenendigungen als Antwort auf verschiedene Reize bewirkt eine Depolarisation der Membran und Ausbildung von Aktionspotentialen (AP) in primär afferenten Fasern (1). In Form von Aktionspotentialen wird das Signal entlang des Axons bis ins Dorsalhorn des Rückenmarks geleitet. An der Ausbildung von Aktionspotentialen sind vor allem spannungsabhängige Natriumkanäle und Kaliumkanäle beteiligt (2). Im Dorsalhorn des Rückenmarks findet die erste synaptische Verschaltung statt. Die Depolarisation der Membran bewirkt die Öffnung spannungsabhängiger Calciumkanäle (Ca_v), wodurch Neurotransmitter wie Glutamat und Substanz P ausgeschüttet werden. Diese aktivieren postsynaptisch Projektionsneurone, die das Signal an Gehirnareale weiterleiten (3). Unten dargestellt sind Beispiele für Natrium-, Calcium-, Kalium- und nicht-selektive Ionenkanäle. Verändert nach Waxman und Zamponi 2014.

1.3.1 Topologie und Struktur der Kaliumkanäle

Kaliumkanäle bestehen aus mehreren Untereinheiten, die aus transmembranen Domänen gebildet werden. Diese transmembranen Helices durchspannen die Lipiddoppelschicht und bilden komplexe Proteinstrukturen aus Dimeren, Tetrameren bzw. Hexameren, die einen funktionsfähigen Kanal formen (Kuang et al. 2015; Schmidt et al. 2011). Strukturell wird zwischen porenformenden und regulatorischen Abschnitten der Kanäle unterschieden. Während die porenbildende Region für den Ionentransport durch die Membran zuständig ist und sich zwischen den Kaliumkanälen der verschiedenen Klassen strukturell nur wenig unterscheidet, nimmt die regulatorische Region unterschiedliche Stimuli wahr und weist zwischen den Kanälen der vier Hauptgruppen strukturelle Unterschiede auf (Kuang et al. 2015).

Die α -Untereinheiten von K_v -Kanälen bestehen aus sechs transmembranen Segmenten S1-S6 mit einem Spannungssensor (S1-S4) und einer porenformenden Schleife zwischen S5 und S6. Ein funktionsfähiger K_v -Kanal entsteht durch Komplexbildung aus Homo- oder Heteromeren bestehend aus vier K_v -Untereinheiten (Du and Gamper 2013; Wood 2020). Die K_v -Kanal-Familie stellt die größte der Kaliumkanal-Gruppen dar und umfasst im Menschen

40 Gene. K_V -Kanäle werden weiter in zwölf Unterfamilien K_V1 - K_V12 geordnet. Die Bildung von Tetrameren sowie die Assoziation mit β -Untereinheiten, Spleiß-Varianten und posttranslationalen Modifikationen führt zu einer enormen Vielfältigkeit der Kanäle (Tsantoulas and McMahon 2014). K_V -Kanäle nehmen eine Schlüsselrolle in der neuronalen Feuerungsfrequenz und Aktionspotenzial-Dauer ein, sodass eine verringerte Aktivität spannungsabhängiger Kaliumkanäle zu einer allgemeinen Übererregbarkeit der Membran führt. Sensorische Neurone exprimieren K_V -Kanäle aus mehreren Untergruppen, darunter aus K_V1 , K_V2 , K_V3 , K_V4 , K_V7 und K_V9 , wobei das jeweilige Expressionsprofil vom neuronalen Subtyp abhängt (Waxman and Zamponi 2014).

K_{Ca} -Kanäle werden überwiegend durch Änderungen der cytosolischen Ionenkonzentration, einschließlich Calcium-, Natrium-, Chlorid-Ionen und Protonen, reguliert. Ursprünglich wurden alle acht Vertreter dieser Unterfamilie als calciumaktivierte Kaliumkanäle bezeichnet. Neuere Untersuchungen zeigten jedoch, dass nicht jeder dieser Kanäle durch Änderungen der Calcium-Ionenkonzentrationen reguliert wird, sodass eine neue Nomenklatur vorgenommen wurde. Die erstmals in Kardiomyozyten nachgewiesenen Natrium-abhängigen Kaliumkanäle (K_{Na}) werden durch einen Anstieg der intrazellulären Natrium-Ionenkonzentration aktiviert. Es sind zwei Gene (*KCNT1*, *KCNT2*) bekannt, die für K_{Na} -Kanäle, die als Slack („**Sequence like a Calcium-activated K^+ -channel**“, Slo2.2, $K_{Na}1.1$) und Slick („**Sequence like an intermediate conductance K^+ -channel**“, Slo2.1, $K_{Na}1.2$) bezeichnet werden, kodieren und in die Gruppe der K_{Na} -Kanäle klassifiziert werden (Kaczmarek et al. 2017).

Die durch Calcium-Ionen aktivierbaren K_{Ca} -Kanäle haben eine strukturelle Ähnlichkeit zu K_V -Kanälen und sind, bis auf den $K_{Ca}1.1$ - (BK, Slo1, Maxi K) und $K_{Ca}5.1$ -Kanal (Slo3), aus sechs transmembranen Domänen (S1-S6), die sich als Tetramere zu funktionsfähigen Kanälen zusammenlagern, aufgebaut. Der $K_{Ca}1.1$ - und $K_{Ca}5.1$ -Kanal haben eine zusätzliche transmembrane Domäne (S0), die vor der S1-Domäne liegt. Aufgrund der zusätzlichen S0-Domäne weist ihr aminotermiales Ende in den Extrazellulärraum (Kaczmarek et al. 2017). Im Vergleich zu K_V -Kanälen haben K_{Ca} -Kanäle einen verlängerten C-Terminus, der regulatorische Abschnitte enthält (Du and Gamper 2013). K_{Ca} -Kanäle nehmen eine Schlüsselrolle in der Hyperpolarisation infolge eines Aktionspotenzials und somit auch im Feuermuster der Neurone ein (Kaczmarek 2013; Tsantoulas and McMahon 2014; Waxman and Zamponi 2014). Die Öffnung der K_{Ca} -Kanäle hyperpolarisiert die Plasmamembran, was den Calcium-Einstrom und die Erregung begrenzt. So kann auch die synaptische Übertragung an den Nervenendigungen reguliert werden (Tsantoulas and McMahon 2014). Nach ihrer Ionenleitfähigkeit werden die Kaliumkanäle der K_{Ca} -Familie weiter in BK- (K_{Ca} -Kanäle mit hoher Leitfähigkeit), IK- (K_{Ca} -Kanäle mit mittlerer Leitfähigkeit)

und SK-Kanäle (K_{Ca} -Kanäle mit kleiner Leitfähigkeit) unterteilt (Kaczmarek 2013; Tsantoulas and McMahon 2014; Waxman and Zamponi 2014). In der ersten Gruppe finden sich u.a. die Natrium-abhängigen Kaliumkanäle Slack und Slick, die durch Änderungen der cytosolischen Natrium- und Chlorid-Ionenkonzentrationen reguliert werden (Kaczmarek et al. 2017).

Bei K_{2P} -Kanälen dagegen handelt es sich von Dimeren bestehend aus jeweils vier transmembranen Domänen mit je zwei porenbildenden Schleifen, jedoch keinem Spannungssensor. Die 15 zur K_{2P} -Kanalfamilie zugehörigen Mitglieder können weiter in sechs Subgruppen unterteilt werden, die sich in ihren Aktivierungsmechanismen unterscheiden (Du and Gamper 2013; Tsantoulas and McMahon 2014; Waxman and Zamponi 2014). Die Hauptaufgabe von K_{2P} -Kanälen ist die Aufrechterhaltung eines hyperpolarisierenden Ruhemembranpotenzials durch Unterstützung von Kalium-Hintergrundströmen. Durch eine vom Membranpotenzial unabhängige kontinuierliche Kalium-Leitfähigkeit wird das Ruhemembranpotenzial stabilisiert (Waxman and Zamponi 2014; Wood 2020).

K_{ir} -Kanäle haben diverse physiologische Funktionen und werden durch verschiedene Mediatoren wie Ionen, Phospholipide und Bindungsproteine reguliert und weiter in sieben Unterfamilien (K_{ir1} - K_{ir7}) kategorisiert. K_{ir} -Kanäle bestehen aus zwei transmembranen Segmenten und formen Homo- oder Hetero-Tetramere (Kuang et al. 2015; Tsantoulas and McMahon 2014). Sie bergen eine für die Ionenleitung zuständige porenformende Region und eine cytosolische Domäne, welche die Kanalschaltung der Kanäle reguliert (Kuang et al. 2015). Anders als andere Kaliumkanäle leiten K_{ir} -Kanäle vielmehr atypische Kalium-Einwärts- als Auswärtsströme (Tsantoulas and McMahon 2014). Während der Depolarisationsphase werden sie durch Magnesium-Ionen und Polyamine blockiert. Diese Blockade löst sich während der Hyperpolarisation, sodass der Einstrom von Kalium-Ionen ins Zellinnere möglich wird (Kuang et al. 2015).

1.3.2 Die Natrium-abhängigen Kaliumkanäle Slack und Slick

Die Nomenklatur des Slack-Kanals „*Sequence like a Ca^{2+} -activated K^+ -channel*“ beruht auf der Analogie eines Teils der porenformenden Domäne und der nachfolgenden S6-Domäne mit entsprechenden Abschnitten des $K_{Ca1.1}$ -Kanals. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen diesen beiden Kanälen liegt tatsächlich allerdings nur bei etwa 7 %. Die Namensgebung des Slick-Kanals „*Sequence like an intermediate conductance K^+ -channel*“ ergab sich dadurch, dass Slick eine Leitfähigkeit aufweist, welche zwischen der des $K_{Ca1.1}$ -Kanals und der Leitfähigkeit einiger anderer Kaliumkanäle liegt. Der Slack- und Slick-Kanal sind eng miteinander verwandt und haben eine zu etwa 74 % identische Aminosäure-Sequenz sowie einen ähnlichen strukturellen Aufbau mit der größten Divergenz in ihren C-terminalen Enden.

K_{Na} -Kanäle formen Tetramere aus Untereinheiten mit jeweils sechs hydrophoben transmembranen Domänen (S1-S6) und einer porenformenden Region zwischen S5 und S6 und zeichnen sich durch einen langen intrazellulären C-Terminus aus (Abb. 6) (Kaczmarek 2013). Innerhalb der C-terminalen Region finden sich zwei RCK-Domänen (Regulatoren der Kalium-Leitfähigkeit) (Jiang et al. 2001; Kaczmarek 2013).

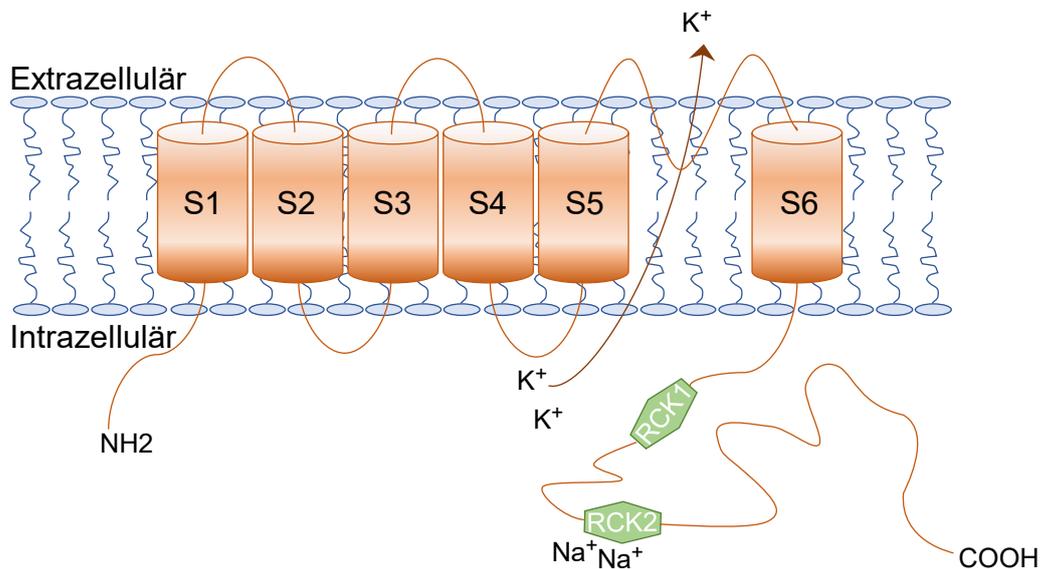


Abb. 6. Schematischer Aufbau einer α -Untereinheit eines K_{Na} -Kanals. Die sechs transmembranen Domänen (S1-S6) sind in orange dargestellt. Die porenbildende Region befindet sich zwischen dem fünften und sechsten transmembranen Segment. Die Amino- und C-terminalen Enden des Kanals zeigen ins Zellinnere. Der lange Carboxyterminus zeichnet sich durch zwei RCK-Domänen (grün) aus. Verändert nach Kaczmarek et al. 2017.

Während der Slack-Kanal einen Wert für die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für Natrium-Ionen von etwa 40 mM aufweist, liegt dieser für Slick bei etwa 89 mM. Außerdem zeigt Slick, im Gegensatz zu Slack, auch eine basale Aktivität in Abwesenheit von Natrium-Ionen (Bhattacharjee et al. 2003; Kaczmarek 2013). Sowohl Slack als auch Slick können zudem durch einen Anstieg der intrazellulären Chlorid-Ionenkonzentration aktiviert werden. Hierbei weist Slick im physiologischen Milieu eine im Vergleich zum Slack-Kanal erhöhte Sensitivität gegenüber Chlorid-Ionen auf (Bhattacharjee et al. 2003; Kaczmarek 2013; Yuan et al. 2000). Innerhalb der RCK2-Region des Slack-Kanals wurde eine potenzielle Natrium-Bindungsstelle identifiziert. Durch Mutationen des Aspartat-Rests D818 oder Histidin-Rests H823 innerhalb dieser konservierten Aminosäuresequenz des Slack-Kanals kann dessen Sensitivität gegenüber Natrium-Ionen verringert werden (Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017; Thomson et al. 2015; Zhang et al. 2010). Es wird vermutet, dass Konformationsänderungen dieser Domäne infolge der Bindung von Natrium-Ionen schließlich zur Öffnung der Kanäle führt (Kaczmarek 2013). Im Slick-Kanal scheint der Aspartat-Rest D757 der RCK2-Region primär für die Natrium-Bindung verantwortlich zu sein (Kaczmarek et

al. 2017; Thomson et al. 2015). Ein weiterer Unterschied zwischen Slack und Slick besteht in einem ATP-Bindungsmotiv, welches C-terminal zur zweiten RCK-Domäne des Slick-Kanals nachgewiesen wurde. Dabei sollen in Gegenwart von ATP die Aktivität der Slick-Kanäle und somit Slick-Ströme um etwa 80 % reduziert werden (Bhattacharjee et al. 2003; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017). Diese Erkenntnisse konnten allerdings in weiteren Arbeiten von Berg et al, 2007, und Garg und Sanguinetti, 2014, nicht bestätigt werden (Berg et al. 2007; Garg and Sanguinetti 2014; Kaczmarek et al. 2017).

Obwohl K_{Na} -Kanäle im Gegensatz zu K_V -Kanälen keine positiv geladenen Aminosäurereste in S4 aufweisen, dem Spannungssensor von K_V -Kanälen, zeigen sie eine moderate Spannungsabhängigkeit. Über welche Reste diese vermittelt wird, ist jedoch bisher nicht bekannt (Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017).

Zelluläre Regulation der Natrium-abhängigen Kaliumkanäle Slack und Slick

Insgesamt kann die Aktivität der K_{Na} -Kanäle durch eine Vielzahl von endogenen Signalmolekülen wie bspw. Proteinkinasen, Phospholipiden und Nicotinamidenindinukleotid (NAD^+) modifiziert werden (Huang et al. 2013; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017; Nuwer et al. 2010; Tamsett et al. 2009). So konnte sowohl bei Slack- als auch bei Slick-Kanälen eine putative Bindungsstelle für NAD^+ innerhalb der zweiten RCK-Domäne identifiziert werden. Dabei wurde gezeigt, dass NAD^+ die Sensitivität der K_{Na} -Kanäle gegenüber Natrium-Ionen erhöht, sodass die Kanal-Aktivität positiv beeinflusst wird (Kaczmarek 2013; Tamsett et al. 2009). Weiter führt die Phosphorylierung eines Serin-Rests zwischen den RCK-Domänen und der transmembranen S6-Domäne innerhalb des C-Terminus des Slack-Kanals durch die PKC zu einem Anstieg der Strom-Amplitude (Barcia et al. 2012; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017; Santi et al. 2006). Dagegen werden Slick-Ströme durch Aktivierung der PKC und möglicherweise über Modifikationen innerhalb des carboxyterminalen Endes des Slick-Kanals supprimiert (Chen et al. 2009; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017; Santi et al. 2006). Neben der direkten Interaktion von Slack und der PKC kann die Aktivität der K_{Na} -Kanäle auch durch indirekte Interaktion mit der PKA und durch Interaktion mit zellulären Proteinen moduliert werden (Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017; Nuwer et al. 2009; Nuwer et al. 2010). Darunter zählt z.B. die Modulation von Slack und Slick durch Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2), die über spezifische Lysin-Reste im C-Terminus der K_{Na} -Kanäle vermittelt wird und eine Erhöhung der K_{Na} -Ströme mit sich bringt (Kaczmarek 2013; Los Angeles Tejada et al. 2012a). Auch das Zusammenspiel von Slack mit dem transmembranen Protein TMEM16C (*Anoctamin 3*, ANO3) erhöht die Sensitivität des Slack-Kanals gegenüber Natrium-Ionen. TMEM16C ist ein Calcium-abhängiger Chloridkanal, der ebenso wie Slack in IB4-positiven, nicht-peptidergen Nozizeptoren exprimiert wird (Huang et al. 2013; Kaczmarek et al. 2017).

Ein weiterer Interaktionspartner und potenter Slack-Aktivator ist das *Fragile X Mental Retardation Protein* (FMRP) (Brown et al. 2010; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017). Hinzu kommt, dass die Öffnungswahrscheinlichkeit der Slack-Kanäle durch 17- β -Östradiol und einem ansteigendem pH-Wert erhöht wird (Kaczmarek et al. 2017; Ruffin et al. 2008; Zhang et al. 2005).

Außerdem konnte gezeigt werden, dass bivalente Kationen, welche Kaliumkanäle der Slo1-Familie zu aktivieren vermögen, die Aktivität der Slack-Kanäle mindern. Dabei stellen Zink-Ionen mit einer mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) von 8 μ M die stärksten und Magnesium-Ionen ($IC_{50} = 1150 \mu$ M) die schwächsten Slack-Inhibitoren dar. Es wird davon ausgegangen, dass eine Hemmung der Aktivität der Kanäle durch allosterische Modifikation der Kanalschaltung zustande kommt und nicht durch eine Blockade der Kanalpore. Eine Ausnahme davon stellen Barium-Ionen dar, die Slack-Kanäle sowohl durch Blockade der Kanalpore als auch durch allosterische Modifikation zu hemmen vermögen (Budelli et al. 2016). Auch pharmakologisch aktive Substanzen wie Quinidin, Bepredil und Clofilium sind in der Lage Slack-Ströme zu reduzieren. Slick-Kanäle werden ebenso durch Quinidin und Clofilium, aber auch durch Isofluran gehemmt. Während Slack durch Bithionol, Loxapin und Niclosamid aktiviert wird, ist Nifluminsäure ein bekannter Slick-Aktivator (Biton et al. 2012; Kaczmarek et al. 2017; Los Angeles Tejada et al. 2012b).

Ein weiteres Merkmal, welches den Kaliumkanal Slick vom eng verwandten Slack-Kanal unterscheidet, ist seine Empfindlichkeit gegenüber kleinen Änderungen des Zellvolumens. In Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Aktivität der Slick-Kanäle durch Zunahme des Zellvolumens stimuliert wird, eine Abnahme des Zellvolumens dagegen bewirkt eine Hemmung der Aktivität (Kaczmarek et al. 2017; Tejada et al. 2014).

In Neuronen wird der Promotor des Gens, welches für Slick kodiert, durch den nukleären Faktor- κ B (NF- κ B) reguliert. Letzterer wird unter hypoxischen Zuständen und Gewebeverletzungen aktiviert, was eine protektive Funktion von Slick unter den zuvor genannten Bedingungen vermuten lässt (Kaczmarek et al. 2017; Tomasello et al. 2017).

Isoformen des Slack-Kanals

Durch alternatives Spleißen von Slack mRNA konnten in der Ratte bisher fünf verschiedene mRNA-Transkripte nachgewiesen werden. Diese bilden funktionsfähige Kanäle aus, die sich vor allem in ihren N-terminalen Enden, aber auch in ihren kinetischen Eigenschaften und Expressionsmustern unterscheiden (Brown et al. 2008; Kaczmarek 2013). Dabei zeigt die Slack-B-Isoform einen langen N-Terminus auf, stellt die größte bislang bekannte Kaliumkanal-Isoform dar und kann Heteromere mit Slick-Kanälen ausbilden. Die Slack-A-Isoform dagegen hat ein kurzes N-terminales Ende, dessen Sequenz dem N-Terminus des

Slick-Kanals ähnelt (Chen et al. 2009; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017). Slack-A-Kanäle zeigen eine schnelle Aktivierungskinetik, wohingegen Slack-B-Kanäle zeitlich verzögert öffnen (Kaczmarek 2013).

Expression von Slack und Slick im sensorischen System

Während der K_{Na} -Kanal Slack vorwiegend in zentralen und peripheren Neuronen exprimiert wird und nur eine schwache Expression in anderen Geweben aufweist, wird der K_{Na} -Kanal Slick in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen exprimiert (Kaczmarek et al. 2017). Auch in einer Studie mit Einzelzell-Transkriptom-Daten wurde beschrieben, dass Slack in Organen außerhalb des Nervensystems nicht oder nur schwach exprimiert wird (The Tabula Muris Consortium 2018). Eine weitere mittels Einzelzell-Transkriptionsprofilen des Nervensystems der adulten Maus durchgeführte Studie ergab, dass die Expression von Slack mRNA in Nozizeptoren weitaus höher ist als die in anderen neuronalen und nicht-neuronalen Zellpopulationen des Nervensystems (Zeisel et al. 2018). Slick hingegen wird im Organismus weitaus breiter exprimiert mit der höchsten Expression in Fibroblasten des Herzens (The Tabula Muris Consortium 2018). Im Nervensystem der adulten Maus konnte eine hohe Slick mRNA-Expression in Neuronen des enterischen Nervensystems verzeichnet werden (Zeisel et al. 2018). Martinez-Espinosa et al., 2015, untersuchten die Slack- und Slick-Expression auf mRNA- und Protein-Ebene. Dabei wurden hohe Slack mRNA-Spiegel u.a. in DRGs verzeichnet, währenddessen Slick mRNA vor allem im Herzen angereichert war. Auch auf Proteinebene wurde der K_{Na} -Kanal Slack in DRGs, im Rückenmark, Cortex und Cerebellum, nicht jedoch im Herzen, nachgewiesen. In DRGs, im Rückenmark, Cortex, Herzen und nur schwach im Cerebellum wurde eine Expression von Slick-Protein detektiert. Außerdem konnte eine Co-Immunopräzipitation zwischen Slack und Slick in Geweben, die beide Natrium-abhängigen Kaliumkanäle exprimieren (in DRGs, im Rückenmark und Cortex) festgestellt werden (Martinez-Espinosa et al. 2015). In der von Usoskin et al., 2015, durchgeführten Studie konnte eine Expression von Slack in allen elf neuronalen Subpopulationen mit der höchsten Expression in den NP1-3-Fraktionen nachgewiesen werden, wohingegen Slick mRNA vorwiegend in der PEP2-Subpopulation verzeichnet wurde (Usoskin et al. 2015).

Die Rolle von Slack und Slick bei der Verarbeitung von Schmerzen und Juckreiz

Dem K_{Na} -Kanal Slack wird eine wichtige Bedeutung bei der Verarbeitung von neuropathischem Schmerz und Juckreiz zugeschrieben, scheint jedoch eine untergeordnete Rolle bei der Verarbeitung von akuten nozizeptiven Stimuli sowie bei Entzündungsschmerzen einzunehmen (Lu et al. 2015; Martinez-Espinosa et al. 2015). Globale Slack^{-/-}-Mäuse zeigten in neuropathischen Schmerzmodellen (*Spared Nerve Injury*-, SNI-, und Paclitaxel-Modell) eine signifikant erhöhte mechanische Hypersensitivität und

somit ein verstärktes neuropathisches Schmerzverhalten als ihre wildtypischen Wurfgeschwister (Lu et al. 2015). Bei diesen Modellen wird durch periphere Nervenverletzung bzw. die intraperitoneale Paclitaxel-Applikation eine langanhaltende mechanische Hypersensitivität erzeugt (Bourquin et al. 2006; Decosterd and Woolf 2000; Lu et al. 2015). Auch bei gewebsspezifischen Slack^{-/-}-Mäusen, bei denen Slack in sensorischen Neuronen deletiert wurde, wurde eine erhöhte mechanische Hypersensitivität im SNI-Modell verzeichnet. Dies spricht für eine funktionelle Beteiligung von Slack, exprimiert in Nozizeptoren, bei der Verarbeitung von neuropathischen Schmerzen (Lu et al. 2015). Weiter zeigten Slack^{-/-}-Mäuse in Modellen für akuten Juckreiz verstärkte Kratzreaktionen innerhalb der ersten fünf Minuten nach Applikation der juckreizinduzierenden Stimuli (Martinez-Espinosa et al. 2015).

Das Schmerzverhalten im neuropathischen Schmerzmodell konnte durch die systemische Applikation des Antipsychotikums und Slack-Aktivators Loxapin effektiv und Slack-abhängig reduziert werden. Hierbei wurde Loxapin in einer Dosierung von 0,175 mg/kg Loxapinsuccinat Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen systemisch verabreicht. Die SNI-induzierte mechanische Hypersensitivität wurde vor und nach Loxapin-Gabe erfasst, wobei die Latenzzeiten von Wildtyp-Mäusen eine bis fünf Stunden nach systemischer Verabreichung von Loxapin signifikant erhöht waren. Höhere Latenzzeiten nach Applikation mechanischer Stimuli spiegeln eine verminderte mechanische Hypersensitivität wider und somit auch ein geringeres neuropathisches Schmerzverhalten. Die Latenzzeiten der Slack^{-/-}-Mäuse hingegen waren vor und nach Loxapin-Gabe unverändert, was darauf hindeutet, dass die Loxapin-induzierte Analgesie von Slack abhängt. Auch die systemische Gabe von 0,175 mg/kg Olanzapin hatte keinen Einfluss auf die mechanische Hypersensitivität beider Genotypen. Als Positivkontrolle wurde 60 mg/kg Pregabalin eingesetzt, wodurch das neuropathische Schmerzverhalten sowohl in Slack^{-/-}- als auch in Wildtyp-Mäusen gelindert wurde (Lu et al. 2015). Die Slack-aktivierenden Eigenschaften des Antipsychotikums Loxapin wurden in einem Bibliotheksscreening mit 1.280 pharmakologisch aktiver Verbindungen im Zellmodell identifiziert. Olanzapin verfügt als Antipsychotikum der zweiten Generation über ein ähnliches pharmakologisches Profil wie Loxapin, besitzt allerdings keine Slack-aktivierenden Eigenschaften (Biton et al. 2012). Diese Daten implizieren, dass durch Slack-Aktivierung neuropathische Schmerzen effektiv gelindert werden können. Auch das Anthelminthikum Niclosamid weist Slack-aktivierende Eigenschaften auf (Biton et al. 2012). Aufgrund ihres pharmakologischen Profils eignen sich allerdings weder Loxapin noch Niclosamid zur Anwendung bei Schmerzpatienten. Als Antipsychotikum der ersten Generation blockiert Loxapin ebenso Dopamin-, Histamin-, Serotonin-, Muskarin- und adrenerge Rezeptoren, was mit unerwünschten Arzneimittelwirkungen wie bspw.

sedierenden Effekten und extrapyramidal-motorischen Symptomen einhergeht (Chakrabarti et al. 2007; Popovic et al. 2015). Zu den häufigsten unerwünschten Arzneimittelwirkungen von Loxapin zählen parkinsonähnliche Symptome wie Tremor, Hypomimie, Rigidität, Akathisie, Schläfrigkeit, Mundtrockenheit, Verstopfung und Gewichtsveränderungen (Popovic et al. 2015). Niclosamid dagegen wird im Magen-Darm-Trakt kaum resorbiert, sodass keine ausreichenden Wirkspiegel für eine systemische Wirkung erreicht werden (Biton et al. 2012; Pan et al. 2012).

Die Funktion des strukturell mit Slack verwandten Slick-Kanals bei der Schmerz- und Juckreizverarbeitung war zum Start dieser Forschungsarbeit noch nicht bekannt. Im Jahr 2017 wurden allerdings erste Erkenntnisse zur funktionellen Beteiligung von Slick bei der Verarbeitung thermischer Stimuli sowie im Rahmen von neuropathischen und Entzündungsschmerzen publiziert. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten globale Slick^{-/-}-Mäuse hierbei eine basale Hypothermie sowie eine verstärkte thermische Hypersensitivität im Komplettes Freund-Adjuvans- (CFA-) und *Sciatic Nerve Cuffing*- (SNL-) Modell für inflammatorische bzw. neuropathische Schmerzen (Tomasello et al. 2017).

Die Rolle von Slack bei Epilepsien

Mutationen im humanen *KCNT1*-Gen stehen im Zusammenhang mit einer Vielzahl von Epilepsien mit frühem Krankheitsbeginn (*Early Onset Epilepsies*) und schwerwiegenden intellektuellen Beeinträchtigungen sowie Entwicklungsdefiziten. Hierzu zählen bspw. die *Malignant Migrating Partial Seizures in Infancy* (MMPSI), die autosomal dominante nächtliche Frontallappenepilepsie (adNFLE), das Ohtahara-Syndrom und weitere Epilepsieformen (Kaczmarek et al. 2017). Die Mutationen betreffen vor allem die funktionellen Bereiche des langen carboxyterminalen Endes des Slack-Kanals und führen zu einer gesteigerten Aktivität der mutierten Slack-Kanäle (Barcia et al. 2012; Kaczmarek 2013; Kaczmarek et al. 2017). Deswegen werden sie auch als *Gain-of-function* Mutationen bezeichnet (Fitzgerald et al. 2019; Kaczmarek et al. 2017; Tang et al. 2016). Die erhöhte Kanalaktivität beruht u.a. auf einer gesteigerten Sensitivität der mutierten Kanäle gegenüber Natrium-Ionen. Die gesteigerte Slack-Aktivität in inhibitorischen Neuronen könnte dabei hemmende Schaltkreise dämpfen, sodass es zur verminderten Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter wie GABA und so zu spontanen Neuronenentladungen während epileptischer Anfälle kommen könnte (Tang et al. 2016). Da Epilepsieformen mit einer zugrundeliegenden Mutation im *KCNT1*-Gen nur schlecht auf herkömmliche Antikonvulsiva ansprechen, wurde das Antiarrhythmikum und Slack-Inhibitor Chinidin bereits im *Off-Label-Use* eingesetzt. Ausgehend von Chinidin als Leitstruktur arbeiten Forschergruppen an der Entwicklung selektiver Slack-Inhibitoren mit einem verbesserten pharmakologischem Profil (Cole et al. 2020; Fitzgerald et al. 2019).

1.4 Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Funktionen der Natrium-abhängigen Kaliumkanäle Slack ($K_{Na}1.1$, *KCNT1*) und Slick ($K_{Na}1.2$, *KCNT2*) im nozizeptiven System. Die Expression von Slack in nozizeptiven Neuronen sowie dessen funktionelle Beteiligung bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen wurde bereits in einigen Vorarbeiten beschrieben (Lu et al. 2015; Martinez-Espinosa et al. 2015; Nuwer et al. 2009; Nuwer et al. 2010; Tamsett et al. 2009). Weiter wurde beobachtet, dass das Slack-aktivierende Neuroleptikum Loxapin (Biton et al. 2012) Slack-abhängig neuropathische Schmerzen im *in vivo*-Mausmodell hemmt (Lu et al. 2015). Darauf aufbauend sollten in dieser Arbeit neu synthetisierte, potenzielle Slack-Aktivatoren *in vitro* und *in vivo* getestet werden und hinsichtlich einer Wirksamkeit bei neuropathischen Schmerzen untersucht werden. Dies erfolgte in enger Zusammenarbeit mit der Forschergruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) mit dem langfristigen Ziel, innovative Arzneistoffe zur Therapie neuropathischer Schmerzen hervorzubringen.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Untersuchung der Expression und Lokalisation des Natrium-abhängigen Kaliumkanals Slick im nozizeptiven System sowie dessen Funktion bei der Verarbeitung von Schmerzen. Martinez-Espinosa et al., 2015, detektierten bereits eine Slick-Expression in nozizeptiven Geweben (Martinez-Espinosa et al. 2015). Welche Rolle Slick bei der Verarbeitung von Schmerzen einnimmt, war jedoch zum Start dieses Forschungsprojektes nicht bekannt. Erst im Jahr 2017 wurden weitere Ergebnisse zur Lokalisation von Slick im schmerzverarbeitenden System und dessen Funktion bei Schmerzen beschrieben. Demnach wird Slick vor allem in CGRP-positiven somatosensorischen Neuronen exprimiert. Darüber hinaus scheint Slick an der Verarbeitung thermischer Stimuli funktionell beteiligt zu sein. Zudem führte der globale Slick-Knockout zu einer verstärkten thermischen Hypersensitivität in Modellen für Entzündungs- und neuropathische Schmerzen (Tomasello et al. 2017). In dieser Arbeit wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen und In-situ-Hybridisierungen in Spinalganglien und dem Rückenmark die Lokalisation von Slick im nozizeptiven System genauer untersucht. Um Rückschlüsse über die funktionelle Beteiligung des Natrium-abhängigen Kaliumkanals Slick an der Schmerzverarbeitung zu erlangen, wurden zudem Verhaltensexperimente an globalen Slick-Knockout-Mäusen durchgeführt und weiter gewebspezifische Knockout-Mäuse mit einer Runterregulation von Slick im Dorsalhorn des Rückenmarks gezüchtet. Ziel dieser Arbeit war es, ein tieferes Verständnis im Zusammenspiel der Akteure im nozizeptiven System zu erlangen, mit dem übergeordneten Bestreben, neue Targets für eine innovative Schmerztherapie zu identifizieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Tab. 1. Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller	Ort
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH	Seelze, Deutschland
Albumin, IgG-frei	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Borsäure	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Cholinchlorid	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Diethylcarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation	Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Desoxyribonukleotidtriphosphat (dNTPs)	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Ethanol absolut	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Ethanol 70 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
<i>Fluoromount-G</i>	Southern Biotech	Birmingham, USA
Gefriermedium (Tissue-Tek® O.C.T.™)	Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
Glukose wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Glukose-Monohydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Glycerol	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Hydroxyethylpiperazinyl- ethansulfonsäure (HEPES)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Kaliumhydroxid (KOH) 1 M	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
KOH-Plätzchen	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland

Roti®-Liquid Barrier Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH) 1 M	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
NaOH-Plätzchen	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Nonidet P-40	USB Corporation	Cleveland, USA
Oligonukleotide	Biomers.net GmbH	Ulm, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
QIAzol™ Lysis-Reagenz	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
RNase freies Wasser	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
RNaseZap™	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation	Waltham, USA
Roti®-Safe	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Roti®-Load (4 x)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (rauchend, 37 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure 1 M	Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Natriumlaurylsulfat- (SDS-) Pellets	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Sudanschwarz	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)aminomethan- (TRIS-) Base	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TRIS-Hydrochlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
TRIzol™-Reagenz	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Tween®-20	Sigma Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland

2.1.2 Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und *in vivo* Applikationen

Tab. 2. Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und *in vivo* Applikationen

Substanz	Hersteller	Ort
<i>BackDrop</i> TM Reagenz	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific; Life Technologies Corporation	Waltham, USA
Capsaicin	Enzo Life Sciences GmbH	Lörrach, Deutschland
Capsaicin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Chloroquindiphosphat	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Clofilium	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Gibco TM <i>Dulbeccos's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
DMSO, steril	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
<i>Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Sigma Life Science, Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Formaldehyd-Lösung (37 %)	AppliChem GmbH	Darmstadt, Deutschland
Gasgemisch 95 % O ₂ + 5 % CO ₂	Praxair	Biebesheim am Rhein, Deutschland
Gibco [®] Geneticin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Gibco [®] L-Glutamin	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Isofluran	Abbot GmbH und Co. KG	Wiesbaden, Deutschland
Kohlendioxid	Praxair	Biebesheim am Rhein, Deutschland
Loxapinsuccinat	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Poly-D-Lysin	Merck Millipore, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Poly-L-Lysin	Merck Millipore, Merck KGaA	Darmstadt, Deutschland
Gibco [®] <i>Minimum Essential Medium Eagle</i> (MEM)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
NaCl 0,9 %	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Olanzapin	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Gibco [®] Penicillin-Streptomycin (5 000 / 10 000 Units/ml)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Trypanblau (0,1 %)	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Zymosan A	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland

2.1.3 Kits und Verbrauchsmaterialien

Tab. 3. Kits

Kit	Hersteller	Ort
<i>First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
FluxOR™ <i>Potassium Ion Channel Assay</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
innuPREP Micro RNA Kit	Analytik Jena AG	Jena, Deutschland
RNeasy Midi Kit	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
RNAse-Free DNase I Set	Qiagen GmbH	Hilden, Deutschland
ViewRNA™ Tissue-Kit	Affymetrix, Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

Tab. 4. Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
Cryomold Einbetttschalen Sakura biopsy	Sakura Finetek Germany GmbH	Staufen, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH	Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24 x 60 mm	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs-GmbH	Braunschweig, Deutschland
Greiner CELLSTAR® 96 <i>Well Plates</i> 655090	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen, Deutschland
Filter 25 µm	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Kanülen (Sterican®; G 30 ½; G 27 ½)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Kryorohre	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim, Deutschland
Objektträger (Thermo Scientific™ <i>SuperFrost Plus™ Adhesion slides</i>)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
PCR-Platte (Hard-Shell® 96-Well PCR Plate und Microseal® PCR Plate Sealing Film)	Bio-Rad	Kalifornien, USA
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Reagenz-Reservoir <i>Bio-pure™</i> 25 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
<i>SafeSeal</i> Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhre 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht, Deutschland
T75 cm ² Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
T175 cm ² Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.4 Größenstandards

Tab. 5. Größenstandards

DNA-Marker	Hersteller	Ort
100 bp <i>GeneRuler</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
100 bp <i>GeneRuler Plus</i>	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

2.1.5 Oligonukleotide

Tab. 6. Oligonukleotide für Genotypisierungs-Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
CB1 fwd	gct gtc tct ggt cct ctt aaa	CB1-Kontrolle Cre ⁻ -PCR
CB1 rev	ggg gtc acc tct gaa aac aga	CB1-Kontrolle Cre ⁻ -PCR
Cre fwd	gaa agc cat gtc caa ttt act gac cgt a	Cre-PCR
Cre rev	gcg cgc ctg aag ata tag aag	Cre-PCR
Slick Del fwd	aac ttt atg agt tcc tct tcc atg	Slick Deletion/ WT-PCR
Slick Del rev	gag cat cat act ttg ctt ttt ggg	Slick Deletion/ WT-PCR
Slick Flox fwd	tca act tta tga gtt cct ctt cca	Slick LoxP/ WT-PCR
Slick Flox rev	gat gcg taa gct cag tga tga	Slick LoxP/ WT-PCR

Tab. 7. Oligonukleotide für real-time quantitative Polymerasekettenreaktionen (qRT-PCR)

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	Verwendung
β-Aktin human	gga cct cga gca aga gat gg	β-Aktin-qPCR (Zellen)
β-Aktin human	agc act gtg ttg gcg tac ag	β-Aktin-qPCR (Zellen)
GAPDH human fwd	gag tca acg gat ttg gtc gt	GAPDH qPCR (Zellen)
GAPDH human rev	ttg att ttg gag gga tct cg	GAPDH qPCR (Zellen)
GAPDH fwd	caa tgt gtc cgt cgt gga tct	GAPDH qPCR
GAPDH rev	gtc ctc agt gta gcc caa gat g	GAPDH qPCR
Slick Exon 22 fwd	gaa agc acc atg agt gca ga	Slick qPCR
Slick Exon 22 rev	gtt ttg aaa gcg cga gag ag	Slick qPCR
Slick Lingle fwd	tct att tga aac aat act cct tgg	Slick qPCR
Slick Lingle rev	gaa caa ata gat ttc tta agg tgg	Slick qPCR
Slack human fwd 01	aaa cca aag atc gag cct ga	Slack qPCR (Zellen)
Slack human rev 01	tag gag ccc agt tga tct cg	Slack qPCR (Zellen)
Slack human fwd 02	gag gag gag tgc aag tac gc	Slack qPCR (Zellen)
Slack human rev 02	tac tcg cgg aag aac ttg ct	Slack qPCR (Zellen)
Slack murin fwd	ctg ctg tgc ctg gtc ttca	Slack qPCR
Slack murin rev	aag gag gtc agc agg ttc aa	Slack qPCR
Slo1; BK fwd	tct cag cat tgg tgc cct cgt aat	BK-Kanal qPCR
Slo1; BK rev	gta gag gag gaa gaa cac gtt gaa	BK-Kanal qPCR

2.1.6 Polymerasen

Tab. 8. Polymerasen

Name	Hersteller	Ort
<i>iTaq Universal SYBR[®] Green SuperMix</i>	Bio-Rad	Kalifornien, USA
<i>Taq DNA Polymerase 2 x Master Mix</i> RED, 1,5 mM MgCl ₂	Ampliqon	Odense, Dänemark

2.1.7 In-situ-Hybridisierungssonden

Tab. 9. In-situ-Hybridisierungssonden

Sondenname, Markierung	Gen, Katalognummer	Hersteller, Ort
Scramble-Typ1	VF1-17155	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Slick-Typ1	KCNT2, VB1-17744	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VGAT-Typ6	SLC32A1, VB6-17400	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
VGLUT2-Typ6	SLC17A6, VB6-16625	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.1.8 Antikörper

Tab. 10. Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

Antigen, Wirt	Katalognummer	Verdünnung	Hersteller, Ort
CGRP, Kaninchen	PC205L	1:800	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
c-Fos, Maus	sc-166940	1:200 – 1:800	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
IB4-Alexa Fluor gelabelt (AF488), <i>Griffonia simplicifolia</i>	121411	1:300	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NF200, Kaninchen	N4142	1:2000	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
NF200, Maus (IgG1)	N0142	1:2000	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Slack, Maus (IgG1)	73-051	1:500	Neuromab, Davis, USA
Slick, Maus (IgG1)	75-055	1:100 – 1:500	Neuromab, Davis, USA
Substanz P, Ratte (IgG2a)	556312	1:200	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
TRPV1, Kaninchen	ACC-030	1:800 – 1:1000	Alomone, Jerusalem, Israel
VGLUT3, Kaninchen	135203	1:400	Synaptic Systems GmbH, Göttingen, Deutschland

Tab. 11. Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

Antigen, Wirt	Katalognummer	Verdünnung	Hersteller, Ort
Anti-Mouse AF350, Ziege (IgG2a)	A21130	1:800	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Mouse AF488, Ziege (IgG1)	A21121	1:800	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Mouse AF555, Ziege (IgG1)	A21127	1:1600	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Mouse Cy3, Schaf (IgG H+L)	C2181	1:1000	Sigma-Aldrich, Missouri, USA
Anti-Rabbit AF488, Ziege	A11008	1:800 – 1:1200	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Rabbit AF555, Ziege	A21429	1:1000	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Anti-Rabbit Cy5, Ziege (IgG H+L)	ab6564	1:800	Abcam, Cambridge, UK

2.1.9 Lösungen und Puffer

Tab. 12. Lösungen und Puffer

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration
IB4-Puffer in Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS)	CaCl ₂ MgCl ₂ MnCl ₂ Triton X-100	0,1 mM 0,1 mM 0,1 mM 0,2 %
Lyse-Puffer 01	TRIS HCl (pH 8,5) EDTA SDS NaCl	100 mM 5 mM 0,2 % 200 mM
Lyse-Puffer 02	TRIS HCl (pH 8,5) EDTA Nonidet P-40 Tween-20	50 mM 1 mM 0,2 % 0,2 %
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	1,7 M 34 mM 111 mM 18,4 mM
PBS-Triton X-100	Triton X-100 in PBS	0,1 %
Paraformaldehyd- (PFA-) Lösung	Paraformaldehyd in PBS (pH 7,4)	1 – 4 %
Proteinase K-Puffer	Proteinase K 1 M TRIS-HCl (pH 8) CaCl ₂ Glycerol	10 mg/ml 5 ml 0,15 g 25 ml

TBE-Puffer (10 x)	TRIS-Base	108 g
	Borsäure	55 g
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	40 ml
	H ₂ O	Ad 1 l

Tab. 13. Lösungen und Puffer für den FluxOR™ Kaliumkanal-Assay

Lösung/ Puffer	Zusammensetzung	Menge/ Konzentration
Assay-Puffer, pH-Wert auf 7,4 mit KOH	H ₂ O	7,7 ml
	Cholin-Puffer (10 x)	1 ml
	HEPES 1 M	200 µl
	Probenecid (gelöst in H ₂ O)	100 µl
	<i>BackDrop</i> ™ Reagenz (1:10)	1 ml
Cholin-Puffer	Cholinchlorid	140 mM
	KCl	5 mM
	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose x H ₂ O	5,55 mM
Calcium-freier Cholin-Puffer	Cholinchlorid	140 mM
	KCl	5 mM
	MgCl ₂	2 mM
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	2 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose x H ₂ O	5,55 mM
Magnesium- und Calcium-freier Cholin-Puffer	Cholinchlorid	142 mM
	KCl	5 mM
	HEPES	10 mM
	Glukose x H ₂ O	5,55 mM
HEPES	HEPES	1 M
Lade-Puffer	PowerLoad™-Konzentrat, 100 x	100 µl
	FluxOR™- Reagenz (gelöst in DMSO)	10 µl
	H ₂ O	7,8 ml
	Cholin-Puffer	1 ml
	Probenecid (gelöst in H ₂ O)	100 µl
	<i>BackDrop</i> ™ Reagenz (1:10)	1 ml
Stimulus-Puffer	H ₂ O	9 ml
	Tl ₂ SO ₄ Konzentrat	1 ml

2.1.10 Geräte und Instrumente

Tab. 14. Geräte und Instrumente

Geräte-/ Instrument-Name	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Brutschrank		Heraeus Instruments, Hanau
Dynamic Plantar Aesthesiometer	37450	Ugo Basile, Gemonio, Italien
<i>Dynamic Weight Bearing-System</i>		Bioseb, Boulogne, Frankreich
Elektrophorese-Kammer	OwlScientific, B1 Electrophoresis Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hargreaves-Apparatur	37370	Ugo Basile, Gemonio, Italien
<i>Hot-/ Cold-Plate</i>	35100	Ugo Basile, Gemonio, Italien
Hybridisierungssofen	<i>ThermoBrite</i> [®]	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Kleintier-Induktionskammer		Groppler, Deggendorf
Kryotom	Cryostar™ NX50 Cryostat	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lichtmikroskop Zellkultur	Nikon Eclipse Ts2	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop	Nikon Eclipse Ni-U	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop-Filter	Orange H Bandpass Filterset, AHF DAPI ET-Set, AHF mCherry HC-Filterset, AHF FITC-3540C-000 Brightline Filterset, Semrock Cy5-4040C-000 Brightline Filterset, Semrock	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop-Kamera	Nikon DS-Qi2 (Monochrom)	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop-Lichtquelle	Intenslight C-HGFI	Nikon GmbH, Düsseldorf
Mikroskop-Objektive	4x Plan Fluor, Nikon 10x Plan Fluor, Nikon 20x Plan Apo λ, Nikon 40x Plan Fluor, Nikon 60x Öl, Plan Apo λ, Nikon	Nikon GmbH, Düsseldorf
<i>Mouse Rotarod</i>	47600	Ugo Basile, Gemonio, Italien
Mikrotiterplatten-Dispenser	Multidrop [®]	Thermo Fisher Scientific, Waltham (USA)
Narkosegerät	UniVet Porta	Groppler, Deggendorf
PCR-Cycler	T100 Thermal Cycler, Bio-Rad, Kalifornien Primus25 advanced [®] , PeqLab, Erlangen CFX96 Touch™ Real-Time System	Bio-Rad, Kalifornien
Platten-Reader mit Injektor	Tecan Infinite M200 Reader mit Injektor	Tecan, Männedorf, Schweiz
Reinraumwerkbank	97103893	Heraeus Instruments, Hanau

Spannungsgeber	PowerPac™ Basic Power Supply Power Supply EPS 301	Bio-Rad, Kalifornien GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Stereo-Mikroskop	GUS2 Stand und C-FMBN Fokus-Einheit Kaltlichtquelle KL 200 LED	Nikon, Tokio, Japan
UV-Vis-Spektralphotometer	NanoDrop™ 2000	Schott, Mainz Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Wasserbad	Lauda-GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge primo Centrifuge 5810 R GS-15 Zentrifuge Heraeus Multifuge 1S-R Centrifuge Sigma 1-16 K S-R	Heraeus Instruments, Hanau Eppendorf, Wesseling Beckmann, Krefeld Heraeus Instruments, Hanau Sigma-Aldrich, Missouri, USA Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Phenol-Chloroform-Extraktion

Die RNA-Isolation aus Rückenmark- und Cortex-Proben beruht auf dem Prinzip der Phenol-Chloroform-Fällung (Chomczynski 1993). Zunächst wurden zu den Gewebeprobe 100 µl phenolhaltiges QIAzol™-Reagenz (Qiagen) oder TRIzol™-Reagenz (Thermo Fisher Scientific) gegeben und das Gewebe fünf Minuten mit einem Potter homogenisiert. Danach wurde mit dem jeweiligen Lysis-Reagenz auf 200 µl aufgefüllt und die Homogenisierung für weitere fünf Minuten fortgesetzt. Die Verarbeitung der Proben sowie deren Lagerung zwischen den einzelnen Schritten erfolgte auf Eis. Nach vollständiger Homogenisierung wurden die Proben auf 800 µl Lysis-Reagenz aufgefüllt, gevortext und fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 800 µl Lysis-Reagenz wurden 160 µl Chloroform hinzugegeben. Durch Inversion wurden die Ansätze 15 Sekunden lang gemischt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die homogene Mischung bei 12.000 g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die obere, farblose, wässrige Phase, in der die RNA in gelöster Form vorliegt, wurde abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Erhöhung der Reinheit wurde die Chloroformfällung wiederholt und die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung und Bindung der RNA an das Säulenmaterial, wurden den Proben 600 µl Ethanol (70 %) hinzugefügt und diese im

Anschluss gevortext. Danach wurden maximal 700 µl des Gemischs auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und diese 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und der Schritt mit der restlichen Flüssigkeit wiederholt. Im nächsten Schritt wurde die Säule mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen, 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um eine Kontamination durch genomische DNA zu vermeiden, wurde ein DNase-Verdau durchgeführt. Hierzu wurden 10 µl der DNase-I-Stammlösung und 70 µl RDD-Puffer (DNase-I-Kit, Qiagen) auf die Säule gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem DNase-Verdau wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen, 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und zunächst 15 Sekunden bei 8.000 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, wurde der Waschschrift mit 500 µl RPE-Puffer wiederholt und die Säule zwei Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und die Säule in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung des verbliebenen RPE-Puffers wurde die Säule für eine Minute bei 20.000 g zentrifugiert. Um die RNA schließlich zu eluieren, wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 30 µl sterilen RNase-freiem Wasser versetzt und eine Minute bei 8.000 g zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit dem Eluat wiederholt und die RNA-Konzentration an einem Photometer (NanoDrop™-Spektrometer) bestimmt.

RNA-Extraktion aus DRGs und Zellen

Für die RNA-Extraktion aus Probenmaterial von bis zu 20 mg kann das innuPrep RNA Micro Kit (Analytik Jena AG) verwendet werden. Hierbei unterscheidet der Hersteller zwischen der RNA-Extraktion aus Gewebeproben (DRGs) und Zellen (*Human Embryonic Kidney*-, HEK-, Slack-HEK-Zellen). Die RNA wurde nach Angaben des Herstellers isoliert. Zur Lyse der DRGs wurden 450 µl Lyse-Puffer zu den Proben hinzugefügt und diese mittels einer Mikropistille homogenisiert. Zu den Zellpellets wurden 400 µl des Lyse-Puffers gegeben und diese für zwei Minuten inkubiert. Danach wurden die Pellets vollständig resuspendiert und für weitere drei Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden sowohl Gewebeproben als auch Zellpellets bei 20.000 g für eine Minute zentrifugiert. Zur Entfernung der genomischen DNA wurde der Überstand auf einen Spin Filter D überführt. Danach wurden die Proben bei 10.000 g für zwei Minuten zentrifugiert und dem Filtrat 400 µl einer SRB-Lösung hinzugefügt. Zur Bindung der RNA wurden die Proben auf einen Spin Filter R gegeben und bei 10.000 g für zwei Minuten zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 µl HS-Lösung auf den Spin Filter R pipettiert. Die Proben wurden erneut für eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, 750 µl einer LS-Lösung auf den Spin Filter R gegeben und für eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Zur vollständigen Entfernung des Ethanol und Trocknung des Spin Filters R wurden die Proben bei 20.627 g für drei Minuten

zentrifugiert. Für die RNA-Elution wurde der Spin Filter R mit 30 bis 50 µl RNase- und DNase-freiem Wasser versetzt und anschließend für eine Minute inkubiert. Danach wurde nochmals eine Minute bei 6.000 g bei Raumtemperatur zentrifugiert und dieser Schritt mit dem Eluat wiederholt.

Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde an einem UV-Vis-Spektralphotometer (NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer, Thermo Fisher Scientific) bestimmt. Für die Messung wurde 1 µl der Probe auf die Messscheibe des Spektrometers gegeben. Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Durch Messung der Verhältnisse $A_{260/280}$ und $A_{260/230}$ konnten Rückschlüsse auf die Reinheit der extrahierten Nukleinsäuren gezogen werden. Das $A_{260/280}$ -Verhältnis sollte für DNA bei ~1,8 und für RNA bei ~2,0 liegen.

2.2.2 Quantitative Echtzeit-PCR

Mittels der quantitativen Echtzeit-PCR (quantitative *real time*, qRT-PCR, qPCR) wird die quantitative Analyse der RNA-Expression von Genen ermöglicht.

cDNA-Synthese

Zur Herstellung der komplementären DNA (cDNA) aus der zuvor extrahierten RNA wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Dieses enthält eine reverse Transkriptase (RT), einen RNase Inhibitor, Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP), Primer und einen Reaktionspuffer mit den für die Reaktion benötigten Salzen. Zur cDNA-Synthese wurden 200 ng RNA und *Random Hexamer* Primer eingesetzt, die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. In Tab. 15 sind die Mengenangaben, die für eine Reaktion benötigt wurden, aufgelistet.

Tab. 15. Ansatz für eine cDNA-Synthese-Reaktion

Zusatz	Volumen (µl)
200 ng RNA	x µl
<i>Random Hexamer</i> Primer	1 µl
dNTP Mix	2 µl
5 x Reaktionspuffer	4 µl
RiboLock RNase Inhibitor	1 µl
M-MuIV Reverse Transkriptase (RT)	2 µl
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl

Zunächst wurde der Ansatz gevortext und im Anschluss zentrifugiert. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 25 °C und danach für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um die reverse

Transkriptase zu inaktivieren, wurden die Proben fünf Minuten auf 70 °C erhitzt. Zur Überprüfung auf Kontaminationen durch genomische DNA wurde ein Ansatz ohne RT (RT-Kontrolle) und ein Ansatz ohne RNA (kein Template-, NTC-Kontrolle) angesetzt.

qPCR und Quantifizierung

Für die qPCR wurde der *iTaq Universal SYBR® GREEN Supermix* (Bio-Rad) verwendet. Dieser in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkalierende Farbstoff wird erst nach Bindung an dsDNA aktiv, sodass während der Entstehung der PCR-Produkte Signale detektiert werden können (Giulietti et al. 2001). Im Mastermix für die qPCR wurden 1 µl der cDNA, entsprechend 10 ng Ausgangs-RNA eingesetzt. Die Proben wurden in Doppel- oder Dreifachbestimmungen gemessen. Zur Überprüfung von Verunreinigungen wurden Wasser-, RT- und NTC-Kontrollen mitgeführt. Die pro Zyklus gemessene Fluoreszenz wurde mittels eines CFX-Cyclers (Bio-Rad) erfasst. Die Slick-Primer zur Überprüfung des Knockouts und die Slack-Primer zur Detektion der mRNA in stabil transfizierten Slack-HEK-Zellen wurden mit dem *Online-tool Prime3Plus* modelliert. Als Grundlage hierfür diente die entsprechende mRNA-Sequenz (NCBI). Die Primer wurden in einer Konzentration von 10 µM eingesetzt. Im Folgenden finden sich Angaben über die Zusammensetzung des qRT-PCR-Ansatzes und die Einstellungen des qPCR-Programms.

Tab. 16. Zusammensetzung des qRT-PCR-Mastermix

Zusatz	Volumen (µl)
cDNA	1 µl
<i>iTaq Universal SYBR® GREEN Supermix</i>	5 µl
Primer <i>fwd</i>	1 µl
Primer <i>rev</i>	1 µl
Nuklease-freies Wasser	2 µl

Tab. 17. qPCR-Programm

PCR-Schritt	°C	Zeit (Min.)	Zyklen
UDG <i>Pre-treatment</i>	50	2	1
Initiale Denaturierung	95	10	1
Denaturierung	95	0,25	40
Amplifizierung	60	1	

Die Datenanalyse erfolgte über die Quantifizierung der relativen mRNA-Expression mittels des Referenzgens Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH, als endogene Kontrolle) und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode. Zur analytischen Auswertung wurden also die C_T - bzw. C_P -Werte herangezogen. Am C_T -Wert ist in allen Reaktionsgefäßen die gleiche Menge neu

synthetisierter Amplifizierungsprodukte enthalten (Pfaffl 2004). Hierzu wurde der C_T -Wert des Referenzgens vom C_T -Wert des zu untersuchenden Gens (Zielgen) abgezogen:

$$C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Referenzgen}) = \Delta C_T$$

Danach wurde vom ΔC_T -Wert der experimentell behandelten Probe der ΔC_T -Wert einer unbehandelten Probe als Kontrolle subtrahiert.

$$\Delta C_T \text{Probe} - \Delta C_T \text{Kontrolle} = \Delta \Delta C_T$$

Da der Wert der unbehandelten Probe auch als Kalibrator betrachtet werden kann, lässt sich die Formel auch wie folgt ausdrücken:

$$\Delta C_T \text{Probe} - \Delta C_T \text{Kalibrator} = \Delta \Delta C_T$$

Zur Berechnung des relativen Expressionsunterschieds einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zum Referenzgen, wurde die mathematische Formel für $2^{-\Delta \Delta C_T}$ herangezogen:

Während der logarithmischen Phase der PCR gilt folgende Gleichung:

$$X_n = X_0 * E^n$$

(X_n = DNA-Gehalt in Zyklus n , X_0 = DNA-Ausgangsmenge, E = Effizienz der PCR, n = Zykluszahl)

An den C_T -Werten gilt weiter:

$$X_{n(1)} = X_{n(2)}$$

Dementsprechend gilt beim Vergleich der Signale einer experimentell behandelten Probe und einer Kontrollprobe an den C_T -Werten:

$$X_{n(\text{Probe})} = X_{n(\text{Kontrolle})}$$

$$X_{0(\text{Probe})} * E^{n(\text{Probe})} = X_{0(\text{Kontrolle})} * E^{n(\text{Kontrolle})}$$

$$\rightarrow X_{0(\text{Probe})} / X_{0(\text{Kontrolle})} = E^{n(\text{Kontrolle})} / E^{n(\text{Probe})} = E^{n(\text{Kontrolle}) - n(\text{Probe})}$$

Die relative DNA-Ausgangsmenge des Zielgens Z (z.B. Slick) im Vergleich zum Referenzgen R (GAPDH) lässt sich mit der Zykluszahl n an den C_T -Werten wie folgt berechnen:

$$Z / R = (X_{0Z(\text{Probe})} / X_{0Z(\text{Kontrolle})}) / (X_{0R(\text{Probe})} / X_{0R(\text{Kontrolle})})$$

$$\rightarrow Z / R = E_Z^{n(\text{Kontrolle})Z - n(\text{Probe})Z} / E_R^{n(\text{Kontrolle})R - n(\text{Probe})R}$$

Nimmt man an, dass für die PCR die maximale Effizienz ($E = 2$) erfüllt ist, so ergibt sich:

$$Z / R = 2^{(n(\text{Kontrolle})Z - n(\text{Probe})Z) - (n(\text{Kontrolle})R - n(\text{Probe})R)}$$

Durch Einsetzen der C_T -Werte in die Formel, erhält man schließlich:

$$Z / R = 2^{-\Delta\Delta CT}$$

Auf diesem Weg lässt sich die n -fache Expression des Zielgens nach einer experimentellen Behandlung bezogen auf das Referenzgen bestimmen (Pfaffl 2004).

2.2.3 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) stellt eine Methode zum Nachweis von Nukleinsäuren (DNA oder RNA) dar. Hierbei wird eine synthetisch erzeugte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die spezifisch gegen die nachzuweisende Nukleinsäure gerichtet ist und an diese über Basenpaarungen binden kann. Die eingesetzte Sonde kann selbst mit fluoreszierenden Molekülen markiert sein oder sie kann durch anschließende Bindung an Fluoreszenzfarbstoffe detektiert werden. Zur Durchführung der ISH wurde das *ViewRNA™ Tissue-Kit* (Affymetrix/ Thermo Fisher Scientific) zum Nachweis von RNA verwendet. Die ISH wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Wasser zur Herstellung der Lösungen, die im Rahmen des Protokolls verwendet wurden, wurden zur Inaktivierung von RNasen mit Diethylcarbonat (DEPC) behandelt und autoklaviert. Das Autoklavieren diente auch der Reduktion der endogenen Phosphatase-Aktivität. Zunächst wurden die Gefrierschnitte über Nacht in 4%igen PFA (in PBS) bei 4 °C postfixiert. Nach Fixierung in PFA wurden die Schnitte zweimal eine Minute kräftig in PBS gewaschen und im Anschluss in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (50 %, 70 %, 100 % Ethanol) für jeweils zehn Minuten und danach bei 60 °C im *ThermoBrite®* (Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH) für 30 Minuten dehydriert. Danach wurde das Gewebe mit einer Protease-Lösung behandelt. Der Protease-Verdau zur Permeabilisierung der Zellmembran erfolgte für 25 Minuten bei 40 °C im *ThermoBrite®*. Danach wurden die Schnitte in PBS gewaschen und erneut für fünf Minuten in 4%igen PFA inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift in PBS erfolgte die Inkubation mit den spezifisch gegen eine bestimmte RNA-Sequenz gerichteten Sonden (2.1.7) über Nacht bei 40 °C im *ThermoBrite®*. Alle nicht oder unspezifisch gebundenen Sondenmoleküle wurden am nächsten Tag durch dreimal starkes Waschen mit einem Waschpuffer entfernt. Danach erfolgte die Behandlung mit dem *Pre-Amplifier*- und *Amplifier-Mix* des Kits. Hierbei wurden verzweigte DNA-Stränge (bDNA) an die hybridisierten Sondenmoleküle gebunden und das Signal so verstärkt. Zur Entfernung unspezifisch gebundener Moleküle wurde zwischen den Inkubationsschritten stark mit Waschpuffer gewaschen. Daraufhin erfolgte zur Visualisierung eine Hybridisierung mit einer alkalischen Phosphatase (AP) konjugierten

Typ1- bzw. Typ6-Sonde, die an Moleküle des Amplifiers binden kann. Die alkalische Phosphatase konvertiert nach Zugabe eines chromogenen Substrats letzteres in ein farbiges Signal. Zur Visualisierung Typ1-markierter Sonden wurden 1-AP-markierte Sekundärsonden und ein sogenanntes *Fast Red Substrat* eingesetzt. Vor Zugabe des *Fast Red Substrats* erfolgte eine Inkubation mit *AP Enhancer*-Lösung des Kits. Zur Visualisierung Typ6-markierter Primärsonden wurden 6-AP-markierte Sekundärsonden und als Substrate drei sogenannte *Blue* Reagenzien verwendet. Die Reaktion der 6-AP mit den *Blue* Reagenzien wurde danach mit der *AP Stop QT*-Lösung des Kits beendet. Zur Entfernung unspezifischer Bindungen wurde mit Waschpuffer oder PBS gewaschen. Abschließend wurden die Schnitte mit DAPI gefärbt, weiter immunhistochemisch untersucht oder direkt mit *Fluoromount-G* eingedeckelt. Für die DAPI-Kern-Färbung wurden die Schnitte für drei bis fünf Minuten mit einer 500 bis 1.000 nM DAPI-Lösung (in PBS) inkubiert und danach dreimal zehn Minuten mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden sie mit *Fluoromount-G* eingedeckelt.

2.2.4 Immunfluoreszenz-Färbung an Gefrierschnitten

Gewebepräparation

Für die Analyse und Lokalisierung spezieller Proteine in den zu untersuchenden Geweben wurden Immunfluoreszenz-Färbungen an Gefrierschnitten angefertigt. Hierzu wurden die Schnitte zunächst mit einem Fettstift (Dako Denmark A/S) oder einem Lack (Roti®-Liquid Barrier, Roth) umrandet und nach Trocknung dreimal für fünf Minuten in PBS gewaschen. Danach wurden die Gefrierschnitte fünf Minuten in PBS-Triton X-100 (0,1 %) permeabilisiert und zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen in Blockierungspuffer (3 % BSA und 10 % NGS in PBS) für 60 Minuten inkubiert. Unmittelbar danach erfolgte die Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung. Die Primärantikörper wurden gemäß der in Kapitel 2.1.8 aufgeführten Konzentrationen in 3 % BSA in PBS verdünnt und über Nacht bei 4 °C unter Lichtschutz inkubiert. Die Inkubation des Primärantikörpers zum Nachweis von Slick-Protein erfolgte über 60 Minuten. Nach Inkubation mit der Primärantikörper-Lösung wurden die Gefrierschnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen und anschließend mit der Sekundärantikörper-Lösung, gemäß der in Kapitel 2.1.8 aufgelisteten Konzentrationen in PBS, für ein bis zwei Stunden bei Raumtemperatur unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurden die Schnitte dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS unter Lichtschutz gewaschen und im Anschluss mit einer 0,06%igen Sudanschwartz-Lösung (in 70 % Ethanol) inkubiert. Dies erfolgte, um die Lipofuszin-Eigenfluoreszenz des Gewebes zu reduzieren (Schnell et al. 1999). Zur Entfernung von überschüssigen Sudanschwartz wurden die Gefrierschnitte erneut dreimal für jeweils zehn Minuten in PBS gewaschen und am Ende mit *Fluoromount-G* eingedeckelt.

Zum Nachweis nicht-peptiderger C-Faser Neuronen wurden einige der Gefrierschnitte mit dem AF488-gekoppelten *Griffonia simplicifolia* Isolektin B4 (IB4) gefärbt. Die IB4-Inkubation erfolgte somit zusammen mit dem Sekundärantikörper für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

2.2.5 Immunfluoreszenz-Färbung von Zellen

Zur Bestätigung der stabilen Transfektion von Slack in HEK-Zellen wurde die Slack-Expression fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Zunächst wurde das Zellkulturmedium abgenommen und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte für 30 bis 90 Minuten eine Fixation der Zellen mit 4%igen PFA (in PBS) bei Raumtemperatur. Danach wurden die Zellen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS für fünf Minuten permeabilisiert, dreimal mit PBS gewaschen und unspezifische Proteinbindungen im Anschluss für zehn Minuten mit 3 % BSA und 10 % NGS in PBS geblockt. Daraufhin erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers (Slack, 1:500, siehe Tab. 10) bei 37 °C und 5 % CO₂ über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurde dreimal mit PBS gewaschen und die sekundäre Antikörper-Lösung (Anti-Mouse AF488, 1:800, siehe Tab. 11) hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte für 90 Minuten im Brutschrank. Abschließend wurde dreimal mit PBS gewaschen und die Zellen im Anschluss fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

2.2.6 Analytische Auswertung der ISH und Immunfluoreszenzfärbung

Die analytische Auswertung der ISH und der Immunfluoreszenzfärbungen erfolgte an einem Nikon Eclipse Ni-U Mikroskop. Dabei konnten Signale der Typ1-markierten Sonden lichtmikroskopisch im roten oder fluoreszenzmikroskopisch im Cy3-Kanal detektiert werden. Die Detektion der Signale der Typ6-markierten Sonden erfolgte im blauen oder im Cy5-Kanal. Die DAPI-Signale wurden mittels eines DAPI-Filters aufgenommen. Mit den entsprechenden Filtern konnten ebenso die fluoreszierenden Signale erfasst und aufgenommen werden. Die nachträgliche Bildbearbeitung (Helligkeit und Kontrast) erfolgte über die *Adobe Photoshop CS6-Software*. Zur Anpassung der Werte für Helligkeit und Kontrast wurden Aufnahmen der Negativkontrolle bzw. des Knockout-Gewebes verwendet. Aufnahmen doppelgefärbter Schnitte wurden ebenso mit Hilfe der Photoshop Software übereinander gelagert. Für weitere Auswertungen wurde die Software *ImageJ (Open Source)* verwendet. Die Auszählung erfolgte über die Zählfunktion des *Point Tools* von *ImageJ*.

2.3 Zellkultur

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Reinraumwerkbank (Haraeus Instruments). Zur Herstellung von Lösungen für die Zellkultur wurde autoklaviertes *Millipore* Wasser verwendet. Fertige Lösungen wurden zusätzlich durch einen Filter der

Porengröße 25 µM (Sarstedt AG & Co. KG) filtriert. Untersuchungen dieser Arbeit erfolgten mit den Zelllinien HEK-293 (*Human Embryonic Kidney*, HEK) und hKCNT1-HEK (stabil transfizierte humane Slack-HEK-Zellen). Die stabil transfizierten Slack- und die entsprechenden Wildtyp-Zellen wurden bei SB Drug Discovery (Glasgow, UK) erworben. Die Zellkulturmedien wurden nach Angaben des Herstellers zusammengesetzt. Für die Arbeiten mit den erworbenen Zelllinien wurden die Protokolle des Herstellers teilweise modifiziert.

2.3.1 Kultivierung und Ernten der Zellen

Vor dem Auftauen der Zellen wurden 10 ml des entsprechenden Mediums in einem 15 ml-Falkon im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Das Auftauen der Zellen erfolgte ebenfalls im Wasserbad. Nachdem die Zellen im Medium resuspendiert wurden, wurden sie für fünf Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet erneut im Medium resuspendiert. Danach wurden die Zellen in eine Zellkulturflasche (Greiner Bio-One) überführt und im Brutschrank (Heraeus Instruments) bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Beide Zelllinien wurden bei 60 bis 70%iger Konfluenz passagiert. Nach einem Waschschrift mit erwärmten PBS/ DPBS oder Kulturmedium wurden die Zellen durch Spülen mit Zellkulturmedium vom Flaschenboden gelöst und anschließend resuspendiert. Je nach Bedarf an Zellen wurden diese im Verhältnis 1:2, 1:5 oder 1:10 gesplittet. Zur Kultivierung wurden T75 cm²- und T175 cm²-Flaschen verwendet.

Zum Ernten der Zellen wurden diese, wie oben beschrieben, vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension in ein 15 ml Tube gegeben. Danach wurden sie für fünf Minuten bei 1.000 g zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Das Zellpellet wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet.

2.3.2 Kryokonservierung

Zum Einfrieren der Zellen wurde eine Lösung aus 10 % DMSO (Sigma-Aldrich) und 90 % Zellkulturmedium mit 20 % FBS (Einfriermedium) verwendet. Die Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit PBS/ DPBS in Zellkulturmedium gelöst und nach mehrmaligem Resuspendieren in ein 15 ml Falkon überführt und für fünf Minuten bei 1.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und das Zellpellet im Einfriermedium aufgenommen. Danach wurde die Zellsuspension in Kryorohre überführt und in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific) bei -80 °C für ein bis fünf Tage eingefroren. Im Anschluss wurden sie in flüssigen Stickstoff gelagert.

2.3.3 Beschichtung von 96-Well-Platten

Zur Durchführung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays wurden 96-Well Platten (Greiner Bio-One) mit einer Poly-D-Lysin-Lösung (Merck Millipore) oder für fluoreszenzmikroskopische Expressionsanalysen mit einer Poly-L-Lysin-Lösung (Merck Millipore) beschichtet. Dies ermöglicht ein besseres Anheften der Zellen an die Oberfläche der Wells. Die Beschichtung der Platten erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Stock-Lösung (1 mg/ml Poly-D-Lysin bzw. Poly-L-Lysin) wurde in Wasser oder PBS/ DPBS auf eine finale Konzentration von 75 µg/ml verdünnt und pro Well 100 µl dieser Lösung gegeben. Die Beschichtung erfolgte über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank (Heraeus Instruments). Danach wurden die Wells zweimal mit dem entsprechenden Lösungsmittel (Wasser oder PBS/ DPBS) unter der Zellkulturwerkbank gewaschen und die Platten mit leicht offenem Deckel bis zur Aussaat der Zellen getrocknet.

2.3.4 Quantifizierung und Aussäen der Zellen

Das Ernten der Zellen erfolgte wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben. Das Zellpellet wurde in 1 ml Zellkulturmedium aufgenommen und resuspendiert. Von dieser Zellsuspension wurden 10 µl entnommen und in 90 µl einer Trypanblau-Lösung (0,1 %) gegeben. Nach kurzem Vortexen wurden 10 µl dieser Lösung auf eine Neubauer Zählkammer (Assistent® Germany, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG) appliziert und die Anzahl lebender Zellen unter einem Lichtmikroskop mittels eines Handstückzählers manuell bestimmt. Es wurden vier Eckquadrate ausgezählt und danach der Mittelwert gebildet. Danach wurde die Zellzahl in Millionen/ ml nach der im Folgenden dargestellten Rechnung ermittelt.

$$\text{Mittelwert/ Quadrat} \times 10\,000 \times 10 = \text{Zellzahl in Millionen/ ml}$$

Zur Herstellung einer Zellsuspension der Konzentration 1 Million/ ml wurde schließlich das entsprechende Volumen an Medium zur Zellsuspension hinzugefügt.

Anschließend wurden die Zellen manuell mit einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) oder mittels eines Mikrotiterplatten-Dispensers (Multidrop®, Thermo Fisher Scientific) in die zuvor beschichteten 96-Well-Platten ausgesät. Pro Well wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben, was 100.000 Zellen pro Well entspricht. Für die manuelle Aussaat wurde die Zellsuspension in ein steriles Reagenz-Reservoir (Carl Roth GmbH & Co. KG) überführt, welches kontinuierlich bewegt wurde, um eine gleichmäßige Verteilung der Zellen zu gewährleisten. Die automatisierte Aussaat der Zellen erfolgte mittels des Multidrops.

Zur Bestimmung der Slack-Expression wurden die Zellen nach Aussaat 24 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und nachfolgend fluoreszenzmikroskopisch untersucht. Platten, die im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay eingesetzt wurden, wurden über 48 Stunden inkubiert.

2.3.5 FluxOR™ Kaliumkanal-Assay

Neue potenzielle Slack-Aktivatoren wurden auf ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften zunächst *in vitro* untersucht. Dies erfolgte in einem FluxOR™ Kaliumkanal-Assay (Thermo Fisher Scientific), dessen Prinzip auf der Permeabilität von Kaliumkanälen für Thallium-Ionen beruht. Zur Durchführung des Assays wurden die Angaben des Herstellers teilweise modifiziert. Da der Slack-Kanal durch Änderungen in der zytosolischen Natriumkonzentration reguliert wird, erfolgte dieses Experiment unter Natrium-freien Bedingungen. Daher wurde für die Herstellung der hier verwendeten Puffer anstelle von NaCl Cholinchlorid eingesetzt und der pH-Wert mit KOH (1 M oder KOH-Plättchen) eingestellt. Der Ablauf des FluxOR™-Assays ist in Abb. 7 graphisch dargestellt. Zunächst wurde das Zellkulturmedium von den *Wells* abgenommen. Um eine Austrocknung der Zellen zu verhindern, wurden maximal drei Reihen gleichzeitig behandelt. Danach wurden 80 µl Lade-Puffer pro *Well* hinzugegeben und die Platte wurde für 60 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Lade-Puffer ist der fluorogene Farbstoff in Form eines Membran-durchlässigen Acetoxymethylesters (AM-Ester) enthalten. Der FluxOR™-Farbstoff wird zunächst in DMSO und unmittelbar vor Durchführung des Assays in *PowerLoad™*-Konzentrat gelöst. In der Zelle wird die Esterbindung des Farbstoffs durch intrazelluläre Esterasen gespalten. Dabei entsteht ein fluorogener Thallium-Ionen-sensitiver Indikator, der sich im Intrazellularraum anreichert. Probenecid, welches sowohl im Lade- als auch im Assay-Puffer enthalten ist, blockiert anionische Ionen-transporter, sodass der Austritt des Farbstoffs aus der Zelle unterbunden wird. Das *BackDrop™* Reagenz (Thermo Fisher Scientific) wurde ebenfalls dem Lade- und Assay-Puffer zur Reduktion der Hintergrundfluoreszenz zugesetzt. Nach Inkubation mit dem Lade-Puffer wurde zweimal mit dem Assay-Puffer gewaschen und danach 80 µl Assay-Puffer pro *Well* hinzugegeben. So wurde sichergestellt, dass extrazellulär vorliegender Farbstoff entfernt wurde. Anschließend wurden pro *Well* 10 µl der zuvor hergestellten Substanz-Lösungen oder des Vehikels hinzugegeben und die Platte für drei Minuten bei 300 g bis 500 g zentrifugiert. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten unter Lichtschutz erfolgte die Messung des Assays an einem Tecan Infinite M200 Reader (Tecan). Bevor die Messung gestartet wurde, wurde der Injektor mit dem Stimulus-Puffer gespült und befüllt. Dieser enthielt Thallium-Ionen, die mit dem fluorogenen Thallium-Ionen-sensitiven Farbstoff ein fluoreszierendes Signal erzeugten, welches mittels des Tecan-Readers erfasst wurde. Zunächst wurde die Baseline-Fluoreszenz ermittelt. Unmittelbar nach der Injektion von 20 µl Stimulus-Puffer wurde die Fluoreszenz pro Zyklus über eine gewisse Anzahl an Zyklen erfasst. Ein Zyklus entspricht in etwa einer Sekunde. Die Aktivierung und Öffnung des Slack-Kanals infolge der Inkubation mit einem Slack-Aktivator bewirkten den Thallium-Ionen Einstrom in die Zelle und folglich einen über die Zeit messbaren Anstieg des fluoreszierenden Signals. Die Anregungs- bzw. Emissionswellenlängen lagen dabei bei $\lambda = 490 \text{ nm}$ bzw. $\lambda = 525 \text{ nm}$. Durch das

Erfassen der Signalstärke konnte somit eine Aussage über die Slack-aktivierenden Eigenschaften der Substanzen getroffen werden.

Zur Auswertung wurde der Anstieg des fluoreszierenden Signals herangezogen. Der Fluoreszenzanstieg wurde dabei aus dem Verhältnis der Fluoreszenz eines Zyklus (z.B. Fluoreszenz, F , im Zyklus x) zur Baseline-Fluoreszenz gebildet:

$$\text{Fluoreszenzanstieg} = \frac{\text{Fluoreszenz im Zyklus } x}{\text{Fluoreszenz (Baseline)}} = \frac{F}{F \text{ (Baseline)}}$$

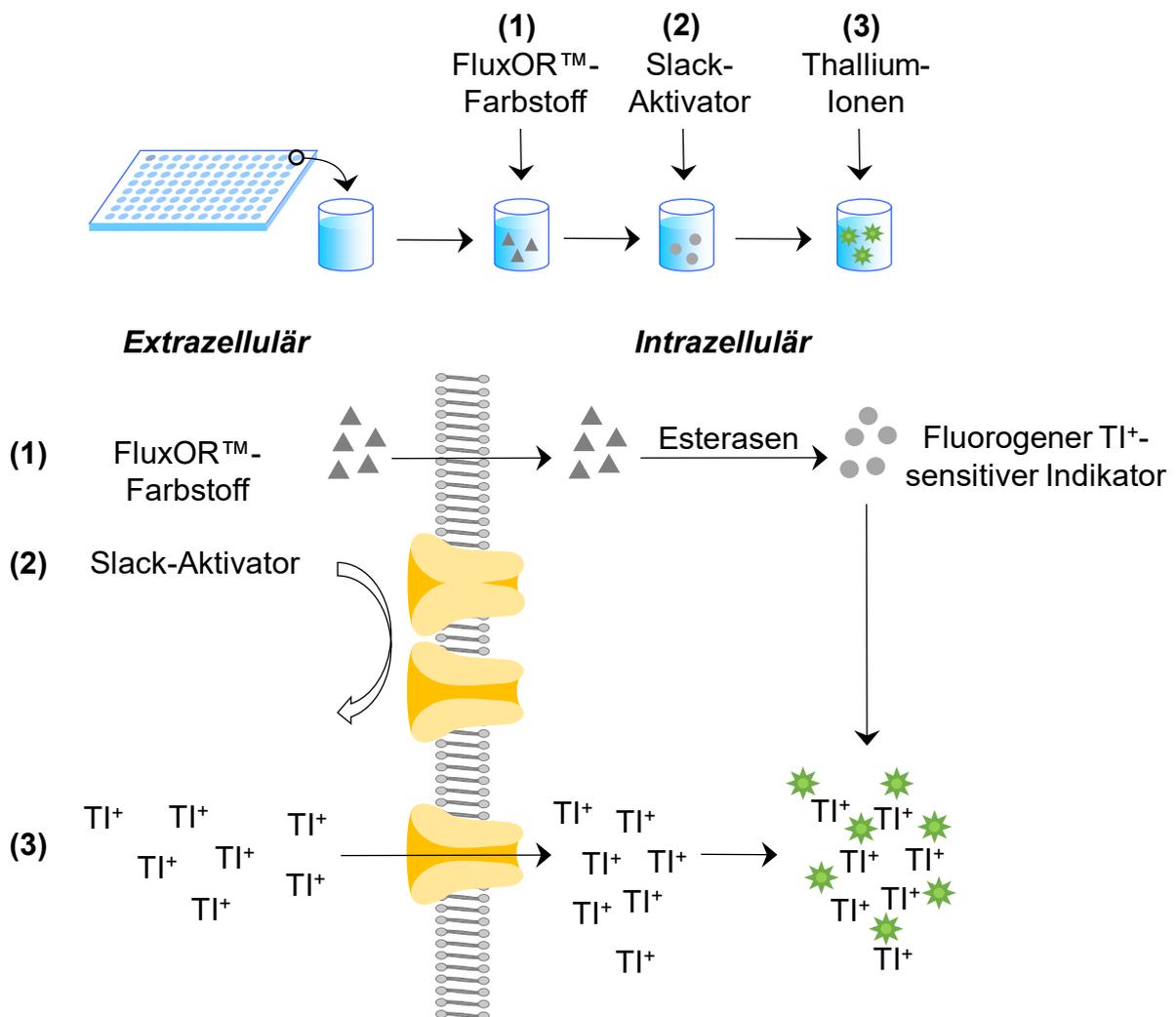


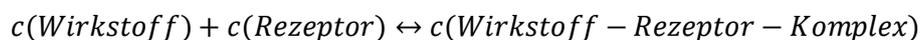
Abb. 7. Ablauf und Prinzip des modifizierten FluxOR™ Kaliumkanal-Assays. Zunächst wurden die Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und über 48 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem FluxOR™-Farbstoff (1), der in den Zellen durch intrazelluläre Esterasen zu einem fluorogenen Thallium-Ionen-sensitiven Indikator gespalten wurde. Anschließend erfolgte die Inkubation des zu testenden Slack-Aktivators (2) und hierauf die Zugabe des Stimulus-Puffers, welcher Thallium- (TI⁺-) Ionen enthält (3). Wenn die Testsubstanz Slack aktiviert, können Thallium-Ionen in die Zelle einströmen und mit dem fluorogenen Thallium-Ionen-sensitiven Farbstoff ein fluoreszierendes Signal ergeben.

Zur Gewährleistung der Stabilität des FluxOR™-Farbstoffs wurde der Lade-Puffer unmittelbar vor Beladung der Platte vorbereitet. Der Assay- und Stimulus-Puffer sowie die Konzentrationsreihen der zu testeten Substanzen wurden während der einstündigen Inkubation mit dem Lade-Puffer hergestellt. Die Slack-Aktivatoren wurden in DMSO gelöst und in Cholin-Puffer verdünnt. Als Vehikel wurde eine 0,03%ige DMSO-Lösung (in Cholin-Puffer) eingesetzt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration der Substanzen im *Well*. Zum Screening der neuen potenziellen Slack-Aktivatoren wurde pro Platte mindestens eine Loxapin-Lösung als Positivkontrolle und das Vehikel mitgeführt. Außerdem wurde jede Probe in dreifacher Bestimmung gemessen.

2.4 Bestimmung der Bindungsaffinitäten ausgewählter Slack-Aktivatoren an dopaminerge Rezeptoren

Die Testung der neuen Slack-Aktivatoren auf ihre Bindungsaffinität an dopaminerge Rezeptoren (D2-, D3-Rezeptoren) erfolgte von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Damit ein Wirkstoff, hier Loxapin bzw. ein neuer Slack-Aktivator, einen Effekt ausüben kann, muss er an seine molekulare Zielstruktur (z.B. an seinen Rezeptor), in diesem Falle an den Slack-Kanal, binden. Die Reaktion lässt sich wie folgt darstellen:



Die Dissoziationskonstante K_d bzw. Gleichgewichtskonstante K_i gibt an, wo das Gleichgewicht dieses Prozesses liegt und wird wie folgt definiert:

$$K_i = \frac{c(\text{Wirkstoff}) * c(\text{Rezeptor})}{c(\text{Wirkstoff} - \text{Rezeptor} - \text{Komplex})}$$

Die Einheit von K_i ist mol/l (M). Wie der oben beschriebenen Gleichung zu entnehmen ist, liegt bei einem kleineren K_i -Wert mehr Wirkstoff gebunden am Rezeptor vor. Je kleiner K_i , desto größer ist folglich die Bindungsaffinität des Wirkstoffs an seinen Rezeptor (Klebe 2009). Oft wird anstelle des K_i -Werts auch der pK_i -Wert angegeben, der durch Bildung des negativen dekadischen Logarithmus aus dem K_i -Wert in mol/l berechnet wird. Je größer der pK_i -Wert einer Substanz, desto kleiner ist der K_i -Wert und desto größer ist die Bindungsaffinität der Substanz an den entsprechenden Rezeptor.

2.5 Tierexperimentelle Methoden

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten tierexperimentellen Methoden wurden von der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Darmstadt) genehmigt. Sie entsprachen den geltenden gesetzlichen Vorgaben (Tierschutzgesetz und Tierschutz-Versuchstierverordnung) und den Richtlinien der *International Association for the Study of Pain* (IASP) für präklinische *in vivo*-Studien im Bereich der Schmerzforschung.

2.5.1 Versuchstiere

Die *in vivo* Untersuchung neuer potenzieller Slack-Aktivatoren wurde an C57BL/6N-Mäusen der Firma Charles River (Freiburg) vorgenommen. Die Testung von Loxapin und Olanzapin im Chloroquin-induzierten Juckreiz-Modell erfolgte ebenfalls an C57BL/6N-Mäusen von Charles River oder aus der hauseigenen Mauszucht (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt). Auch um RNA- und Proteinexpressionen basal oder nach Schmerzinduktion zu untersuchen, wurden C57BL/6N-Mäuse der Firma Charles River oder aus der eigenen Zucht verwendet.

Weiter wurde eine globale Slack-Knockout-Mauslinie verwendet. In dieser Mauslinie wurde Exon 11 des *KCNT1*-Gens, welches für die Region der Pore des Slack-Kanals kodiert, entfernt (Martinez-Espinosa et al., 2015). Slack-Knockout- (*Slack*^{-/-}) und Wildtyp-Mäuse wurden von Prof. Dr. Robert Lukowski und Dr. Anne E. Bausch zur Verfügung gestellt (Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Universität Tübingen).

Zur Untersuchung der Rolle von Slick im nozizeptiven System wurde eine globale Knockout-Mauslinie verwendet. Hierfür wurden Tiere eingesetzt, deren Exon 22 des *Slick*-Gens durch zwei loxP-Sequenzen flankiert war. Exon 22 kodiert dabei die RCK2-Domäne des Slick-Kanals (Tomasello et al. 2017). Heterozygot gefloxt Slick-Mäuse (*Slick*^{fl/wt}) wurden von Jackson Laboratories bezogen (Stock #028419). Diese wurden untereinander verpaart, sodass homozygot gefloxt Nachkommen geboren wurden (*Slick*^{fl/fl}-Mäuse), die für die weitere Zucht verwendet wurden. Für die Zucht globaler Slick-Knockout-Mäuse (*Slick*^{-/-}) wurden sowohl Zuchttiere von Prof. Dr. Robert Lukowski und Dr. Rebekka Ehinger (Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt als auch eigene Tiere gezüchtet. Sie wurden über die Verpaarung einer homozygot gefloxt Slick-Maus mit einer globalen Cre-deleter Maus (CMV-Cre, Stock #006054, Jackson Laboratories, USA) generiert. Die Cre-Rekombinase unterliegt hierbei der Kontrolle des humanen Cytomegalievirus Promotors. Nach Verpaarung wurde das flankierte Exon von der Cre-Rekombinase erkannt und herausgeschnitten. Die Cre-Rekombinase wurde durch weitere Verpaarung mit C57BL/6N-Mäusen rausgekreuzt.

Die heterozygoten Slick-Tiere (Slick^{wt/-}) wurden untereinander verpaart, sodass Knockout-, Wildtyp und heterozygote Wurfgeschwister geboren wurden.

Außerdem wurden konditionelle Slick-Knockout-Mäuse generiert, die einen gewebsspezifischen Knockout in Rückenmarksneuronen (Lbx₁-Slick^{-/-}) aufweisen. Zur Generierung des gewebsspezifischen Knockouts in Rückenmarksneuronen wurden Slick^{f/fi}-Mäuse mit Lbx₁^{Cre/wt}-Mäusen verpaart. Letztere exprimieren die Cre-Rekombinase spezifisch in Neuronen des Dorsalhorns des Rückenmarks und des Hinterhirns (Sieber et al. 2007). Lbx₁^{Cre/wt}-Tiere wurden von Frau Prof. Dr. Carmen Birchmeier-Kohler (Max-Delbrück-Center, Berlin) zur Verfügung gestellt und im eigenen Haus gezüchtet.

2.5.2 Genotypisierung

Die Genotypisierung der Mauslinien erfolgte mit Ohrbiopsien. Sofern die Ohrbiopsien nicht direkt weiterverarbeitet wurden, wurden sie bis zur Durchführung der Genotypisierung bei -20 °C gelagert. Die DNA-Extraktion mittels alkalischer Lyse wurde nach zwei verschiedenen Protokollen, einem Kurzprotokoll und einem längeren Protokoll, durchgeführt. Nach dem längeren Protokoll wurden die Ohrproben in 500 µl Lyse-Puffer (Lyse-Puffer 01) mit 1 % Proteinase-K über vier Stunden bis über Nacht bei 55 °C und 550 rpm im Thermoschüttler inkubiert. Nach erfolgreicher Lyse wurde der Ansatz fünf Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in 500 µl Isopropanol (100 %) überführt und die beiden Ansätze durch Invertieren gemischt. Im Anschluss wurden die Proben zehn Minuten bei 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die DNA-Pellets wurden in 500 µl Ethanol (70 %) gewaschen und erneut für zehn Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen und die Proben für eine Minute bei 13.000 g zentrifugiert. Dann wurde der Überstand mit einer Pipette abgenommen, die DNA-Pellets vollständig getrocknet und in 50 µl destilliertem Wasser für 15 Minuten bei 55 °C gelöst. Die gelöste DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Im Kurzprotokoll wurden die Ohrbiopsien in 50 µl Lyse-Puffer (Lyse-Puffer 02) mit 1 % oder 0,5 % Proteinase-K aufgenommen und über mindestens vier Stunden bei 55 °C und 550 rpm inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase-K wurden die Proben für 20 Minuten bei 90 °C inkubiert und fünf Minuten bei 13.000 g zentrifugiert. Der Überstand, der die DNA enthält, wurde für die nachfolgende Polymerasekettenreaktion genutzt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. In der Polymerasekettenreaktion wird ein ausgewählter DNA-Abschnitt von spezifischen Primern flankiert und exponentiell amplifiziert. Hierzu wurde ein PCR-Mix verwendet, der dNTPs und eine Polymerase enthält (*Taq DNA-Polymerase 2x Master Mix RED*, Ampliqon; *RedTaq Mastermix 2-fold*, M3029, Genaxxon BioScience GmbH). Die Hybridisierungstemperatur wird durch die Schmelztemperaturen der jeweiligen Primern definiert und die Länge der erwarteten PCR-Produkte bestimmt die Polymerisationszeit. Im

Folgenden sind die verwendeten Genotypisierungsansätze und PCR-Programme sowie die zu erwartenden Bandengrößen aufgelistet.

Tab. 18. Genotypisierungsansätze

Slick Deletion		Slick Flox		Cre-Rekombinase	
Zusatz	Mengen	Primer	Mengen	Primer	Mengen
Slick Del fwd	0,5 µl	Slick Flox fwd	0,5 µl	Cre fwd	1,5 µl
Slick Del rev	0,5 µl	Slick Flox rev	0,5 µl	Cre rev	1,5 µl
Wasser	7 µl	Wasser	7 µl	CB1 fwd	1,5 µl
				CB1 rev	1,5 µl
REDEX	10 µl	REDEX	10 µl	REDEX	10 µl
DNA	2 µl	DNA	2 µl	DNA	4 µl

Tab. 19. PCR-Programme

Slick Deletion			Slick Flox			Cre-Rekombinase		
°C	Zeit (min)	Zyklen	°C	Zeit (min)	Zyklen	°C	Zeit (min)	Zyklen
94	3	1	94	3	1	94	5	1
94	0,5	37	94	0,5	40	94	1	40
59,7	0,5		60	0,5		55	1	
72	1		72	1		72	2	
72	5	1	72	5	1	72	10	1
4	∞	Hold	4	∞	Hold	12	∞	Hold

Tab. 20. Erwartete Bandengrößen

PCR	Genotyp	Fragmentgröße (bp)
Slick Deletion	KO	269
	WT	579
Slick Flox	Lox-P	~370
	WT	348
Cre-Rekombinase	CB1	400
	Cre	250

Die Primer der Slick Deletion-PCR und Slick Flox-PCR wurden in einer Konzentration von 10 µM und die Primer für die Amplifikation der Cre-Rekombinase und des CB1-Kontrollgens in einer Konzentration von 1 µM eingesetzt. Zur Überprüfung der Cre-Rekombinase-PCR wurde als Kontrollgen CB1 amplifiziert und so sichergestellt, dass ausreichend Template im Ansatz vorlag. Zur Analyse der PCR wurden die amplifizierten Proben auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen. Zur Visualisierung wurde Roti-Safe® eingesetzt. Die Detektion des Agarosegels erfolgte mit dem Fluoreszenz-Detektionsgerät ChemiDoc XRS (Bio-Rad).

2.5.3 Verhaltenstests

Alle Verhaltenstests wurden von geblindeten Untersuchern durchgeführt. Sie beinhalteten Wurfgeschwister aus heterozygoter Zucht sowie mit verschiedenen Prüfsubstanzen behandelte Versuchstiere.

Open Field-Test

Um die Aktivität und das explorative Verhalten der Mäuse zu untersuchen, wurde der *Open Field-Test* durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere in ein Videosystem der Größe 40 cm x 40 cm x 50 cm, gesetzt und das Verhalten der Mäuse über 30 Minuten mit einer Kamera (VideoMot2, TSE-System) aufgezeichnet. Die zurückgelegte Wegstrecke, prozentuale Lokomotion- und Ruhezeiten der Mäuse wurden durch eine Software automatisch bestimmt.

Zur Untersuchung des Einflusses der neuen Slack-Aktivatoren auf das explorative Verhalten der Versuchstiere im *Open Field-Test*, erfolgte die Baseline-Messung zwei bis drei Tage vor der Testung der Prüfsubstanzen. Die Aktivität im *Open Field-Test* wurde 0,5, zwei und 3,5 Stunden nach Applikation der Testsubstanzen untersucht.

Motorkoordination

Um zu gewährleisten, dass die neuen Slack-Aktivatoren keine motorischen Störungen auslösten, welche als analgetische Effekte missdeutet werden könnten, wurden die Prüfsubstanzen in verschiedenen Motoriktests untersucht. Die Baseline-Messungen der Motoriktests erfolgte sowohl einen Tag vor dem eigentlichen Experiment als auch am Tag des Experiments. Die ersten Baseline-Messungen im *Accelerating Rotarod-Test*, *Hanging Wire-Test*, *Horizontal Bar-Test* und *Vertical Pole-Test* wurden hierbei als Training gewertet und nicht mit in die Auswertung einbezogen. Nach intraperitonealer Gabe der Prüfsubstanzen wurden die motorischen Funktionen nach 0,5, zwei, 3,5 und fünf Stunden nach Substanzapplikation erfasst.

Auch die Motorkoordination der neuen Slick^{-/-}-Mäuse wurde vor Durchführung der nozizeptiven Verhaltenstests im Rotarod-Test überprüft.

Rotarod-Test

Die Motorik der Tiere wurde mit dem Rotarod-Test überprüft (Carter et al. 2001). Hierbei wurden die Mäuse auf eine mit einer konstanten Geschwindigkeit von 15 rpm rotierende Stange (Rotarod Treadmill für Mäuse, Ugo Basile) gesetzt und deren Verweilzeiten auf der Stange bestimmt. Vor der eigentlichen Messung wurden die Versuchstiere in maximal drei Testläufen an die Apparatur gewöhnt. Am Tag der Testung wurden die Mäuse in maximal drei Durchläufen getestet. Erreichten die Mäuse eine *Cut-Off-Zeit* von 120 Sekunden, wurde

der Versuch beendet und es konnte von einer intakten Motorkoordination ausgegangen werden.

Accelerating Rotarod-Test

Auch im *Accelerating Rotarod-Test* wurden die Versuchstiere auf eine rotierende Stange (Rotarod Treadmill für Mäuse, Ugo Basile) gesetzt und ihre Verweildauer bestimmt. Dabei erhöhte sich die Geschwindigkeit der rotierenden Stange innerhalb von fünf Minuten kontinuierlich von 4 rpm auf 40 rpm. Spätestens nach fünf Minuten wurde der Versuch beendet (Harada et al. 2017).

Hanging Wire-Test

In diesem Test werden neuromuskuläre Abnormalitäten der Muskelstärke detektiert. Zunächst wurden die Mäuse auf das Metallgitter eines Käfigs gesetzt. Dieser wurde leicht geschwenkt, sodass die Tiere dazu bewegt wurden, sich am Gitter festzuhalten. Danach wurde das Metallgitter vorsichtig umgedreht und in einem Abstand von 30 cm zum Boden kopfüber einen mit Einstreu gefüllten Haltungskäfig positioniert. Es wurde die Zeit bis zum Herunterfallen der Mäuse mit einer Stoppuhr gemessen und der Versuch nach Erreichen von 60 Sekunden beendet (Karadayian and Cutrera 2013; McDonald et al. 2001; Silverman et al. 2011).

Horizontal Bar-Test

Der *Horizontal Bar-Test* ist ein Test zur Überprüfung einer vorliegenden Katalepsie. Der Testaufbau besteht aus einer horizontalen Glasstange (15 cm lang, Durchmesser 0,5 mm), die 5,5 cm oberhalb des Bodens platziert wird. Die Versuchstiere wurden mit den Vorderpfoten auf die Stange platziert, während die Hinterpfoten der Tiere auf der ebenmäßigen Oberfläche des Bodens positioniert wurden. Die Zeit, die die Mäuse in dieser Position verweilen, wurde mit einer Stoppuhr erfasst. Die *Cut-Off-Zeit* betrug 60 Sekunden (Fink-Jensen et al. 2011). Änderte die Maus ihre Position unmittelbar nachdem sie mit den Vorderpfoten auf die Stange platziert wurde, so wurde sie erneut positioniert bevor ein Nullwert notiert wurde. Insgesamt wurden drei Messungen durchgeführt und ein Mittelwert gebildet.

Vertical Pole-Test

Der *Vertical Pole-Test* dient der Beurteilung von durch Basalganglien verursachten Bewegungsstörungen (Meredith and Kang 2006). In diesem Test wurden die Versuchstiere mit dem Kopf nach oben auf eine 40 cm lange vertikale Stange mit einem Durchmesser von 1 cm gesetzt. Damit sich die Tiere besser an der Stange festhalten konnten, wurde diese zuvor mit Leukoplast® umwickelt. Die Stange wurde während der Messung in einen mit Einstreu gefüllten Haltungskäfig platziert. Es wurde die Zeit bis zum Erreichen des

Käfigbodens mit einer Stoppuhr gemessen. Nach 60 Sekunden wurde der Versuch beendet. Es wurden insgesamt drei Messungen durchgeführt und ein Mittelwert gebildet.

Fäkale Boli

Da Slick auch im enterischen Nervensystem exprimiert wird (Zeisel et al. 2018), wurde die Anzahl der fäkalen Ausscheidungen bestimmt. Hierzu wurden die Versuchstiere auf ein Metallgitter gesetzt und die Anzahl der fäkalen Boli 60 Minuten nach Positionierung der Tiere gezählt.

Dynamic Weight Bearing

Zur Erfassung von spontanen Stimulus-unabhängigen Schmerzen wurde eine Messung mit einem *Dynamic Weight Bearing*-System (DWB-, Bioseb, Boulogne, Frankreich) durchgeführt. Mit Hilfe dieses automatisierten Geräts kann die Gewichtsverteilung der Mäuse auf ihren Pfoten erfasst werden (Laux-Biehlmann et al. 2016; Robinson et al. 2012). Die Apparatur besteht aus einer 11 cm x 11 cm großen Plexiglaskammer, auf deren Boden ein Sensor angebracht wird. Dieser ist ausgestattet mit einem Druckumwandler, um die Belastung und die Körpergewichtsverteilung auf den vier Pfoten des Tieres zu detektieren. Die Probennahme der Gewichtsverteilung erfolgt in einer Frequenz von 10 Hz. Zusätzlich zeichnet eine Kamera die Orientierung und Position der Maus auf. Die so erhaltenen Video- und Druckpunktaufzeichnungen werden von der Bioseb-Software (v1.4.1.28.) synchronisiert. Die Messung selbst erfolgte über zehn Minuten. Unmittelbar nach einer fünfminütigen Eingewöhnungsphase an die Apparatur startete eine fünfminütige Aufnahme phase. In beiden Phasen konnten sich die Versuchstiere frei in der DWB-Kammer bewegen. Für die Auswertung wurden Zonen als valide gewertet, wenn Folgendes verzeichnet wurde: $\geq 0,8$ g auf einer Fläche mit mindestens zwei benachbarten Pixelflächen, die $\geq 1,0$ g detektierten. Ein Zeitabschnitt galt als gültig, wenn \geq drei stabile Bilder erkannt wurden. Zonen innerhalb derer der Sensor keine stabilen Druckpunkte aufnehmen konnte (bspw. durch exzessive Bewegung der Maus), wurden nicht zur Datenanalyse herangezogen. Die Orientierung und Position der Maus auf den vom Sensor generierten Bildern wurden mit den Videosequenzen verglichen und manuell geändert (Cobos et al. 2012; Laux-Biehlmann et al. 2016; Robinson et al. 2012). Zur Quantifizierung neuropathischer Schmerzen nach SNI-Operation wurde das Verhältnis der Gewichtsverlagerung auf der behandelten zur unbehandelten Pfote gebildet.

Hot-Plate-Test

Um das akute Schmerzverhalten nach thermischer Stimulation zu untersuchen, wurde der *Hot-Plate*-Test durchgeführt (Eddy and Leimbach 1953) Hierzu wurden die Versuchstiere auf eine 48 °C bis 54 °C warme Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion ermittelt. Als nozizeptive Reaktion wurde das Lecken oder Schütteln einer

Hinterpfote und das Hochspringen des Tieres gedeutet. Unmittelbar danach wurde das Tier von der Platte genommen. Zeigte das Tier keine Reaktion, wurde der Versuch nach 80 Sekunden (48 °C), 40 Sekunden (50 °C), 30 Sekunden (52 °C) und 20 Sekunden (54 °C) beendet, um Gewebeschäden zu vermeiden. Um einen Gewöhnungseffekt auszuschließen, wurde jedes Tier nur einmal pro Temperatur gemessen (Mogil et al. 1999). Außerdem wurde nur eine Temperatur pro Tag untersucht.

Hot Water Tail-Immersion-Test

Der *Hot Water Tail-Immersion-Test* ist ein Test zur Ermittlung der durch spinale Reflexe vermittelten thermischen Schmerzschwelle (Deuis et al. 2017). Zunächst wurden die Versuchstiere in einer aus Alufolie geformten Röhre immobilisiert, sodass eine freie Schwanzbewegung möglich war. Ein Drittel des Schwanzes wurde für 20 Sekunden in ein 32 °C-Wasserbad getaucht und das Tier an das Wasser gewöhnt. Danach wurde der Schwanz mit einem Tuch getrocknet. Nach 20 Sekunden wurde ein Drittel des Schwanzes in ein auf 45 °C, 46 °C, 47 °C, 48 °C, 49 °C oder 50 °C temperiertes Wasserbad eingetaucht und die Latenzzeit bis zum reflexartigen Wegziehen des Schwanzes gemessen. Um Gewebeschäden zu vermeiden, wurde ein *Cut-Off* festgelegt (160 Sekunden für 45 °C, 80 Sekunden für 46 °C, 60 Sekunden für 47 °C, 40 Sekunden für 48 °C, 30 Sekunden für 49 °C und 20 Sekunden für 50 °C). Es wurde pro Temperatur eine Messung durchgeführt und pro Tag eine Temperatur untersucht (Vandewauw et al. 2018).

Hargreaves-Test

Der Hargreaves-Test dient der Bestimmung der thermischen Schmerzschwelle, die mit einem Hargreaves-Aesthesiometer (Ugo Basile) erfasst wird (Hargreaves et al. 1988). Zunächst wurden die Versuchstiere auf eine Glasplatte gesetzt und für mindestens 30 Minuten akklimatisiert. Danach wurde das Plantar-Testgerät so unter die Glasplatte platziert, dass gegen die Plantarseite einer Hinterpfote des Tieres ein Hitzestimulus (Infrarot, IR) gesetzt werden konnte. Dieser wurde beendet sobald die Maus die Pfote wegzog oder die *Cut-Off-Zeit* von 20 Sekunden erreicht wurde (Yeomans and Proudfit 1994). Jede Hinterpfote wurde mindestens dreimal gemessen und die Messwerte gemittelt. Die Hargreaves-Apparatur wurde auf Intensitätsstufen von 25 IR und 40 IR kalibriert, sodass verschiedene Intensitäten getestet werden konnten.

Cold-Plate-Test

Zur Untersuchung von Kälte-induzierten Schmerzreaktionen wurde der *Cold-Plate-Test* durchgeführt. Dabei wurden die Mäuse auf eine auf 2 °C gekühlte Platte gesetzt und die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion (Lecken oder Schütteln einer Hinterpfote und

das Hochspringen des Tieres) sowie die Anzahl der Reaktionen innerhalb von fünf Minuten ermittelt (Zimmermann et al. 2007).

Cold-Plantar-Test

Der *Cold-Plantar-Test* ist ein weiterer Test zur Untersuchung von Kälteschmerzen. Nach der Methode von Brenner wird hierbei die Kälte-Schmerzschwelle bestimmt. Zunächst wurden die Versuchstiere auf eine erhöhte Borsilikatglasplatte gesetzt und mindestens eine halbe Stunde akklimatisiert. Danach wurde ein Trockeneis-Pellet in einer 5 ml-Spritze mit abgeschnittener Spitze und einem Durchmesser von 1 cm gegen die Unterseite der Glasplatte auf die Plantarseite der Hinterpfote der Tiere gedrückt. Gemessen wurde die Latenzzeit bis zur ersten nozizeptiven Reaktion als horizontale oder vertikale Bewegung der Pfote weg von der kalten Glasplatte. Um Gewebeschäden zu verhindern, wurde ein *Cut-Off* von 20 Sekunden festgelegt. Ein Wert von 20 Sekunden wurde nur notiert, wenn eine Latenzzeit von 20 Sekunden als Reaktion auf zwei aufeinanderfolgenden Messungen verzeichnet wurde (Brenner et al. 2012). Es wurden mindestens drei Werte pro Pfote erfasst und die Pfoten abwechselnd in einem Abstand von mindestens sieben Minuten gemessen.

Dynamic Plantar-Test

Der Dynamic Plantar-Test dient der Erfassung der mechanischen Reizschwelle, welche mittels eines Dynamic Plantar Aesthesiometer (DPA, Ugo Basile, Comerico, Italien) gemessen wird. Dieser besteht aus einem dünnen Edelstahlstab (0,5 mm Durchmesser) und einem Messgerät. Die Versuchstiere wurden zunächst auf ein engmaschiges Metallgitter gesetzt und für mindestens 30 Minuten an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Danach wurde der Dynamic Plantar Aesthesiometer so positioniert, dass der Metallstab mit steigender Kraft die Plantarseite einer Hinterpfote stimulierte. Das Messgerät wurde so kalibriert, dass die Druckstärke in den ersten zehn Sekunden von 0 g auf 5 g gesteigert (0,5 g/s Rampe) und danach für weitere zehn Sekunden bei 5 g konstant gehalten wurde. Das Wegziehen der Pfote beendete die Stimulation und wurde als Reaktion gewertet. Es wurden bei jedem Tier pro Hinterpfote in einem Mindestabstand von 20 Sekunden mindestens drei Latenzzeiten gemessen und anschließend ihre Mittelwerte gebildet (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012; Schmidtke et al. 2008). Zeigte ein Tier keine Reaktion auf den Stimulus, so wurde die Messung nach 20 Sekunden beendet. Die *Cut-Off*-Werte wurden aus der Analyse ausgeschlossen.

Von Frey Filament-Test

Der von Frey Filament-Test, entwickelt von dem Physiologen Maximilian von Frey, ist ein Test zur Charakterisierung der mechanischen Sensitivität. Hierzu wurden die Versuchstiere auf ein engmaschiges Metallgitter gesetzt und 15 Minuten akklimatisiert. Die Messung wurde

mit acht von Frey Filamenten unterschiedlicher Stärke (0,04 g bis 2 g; Bioseb, Boulogne, Frankreich) durchgeführt. Beginnend mit dem feinsten Filament wurde die plantare Oberfläche der Hinterpfoten der Versuchstiere stimuliert. Die Filamente, bestehend aus einer elastischen Faser befestigt an einem Stift, wurden im rechten Winkel bis zur Biegung des elastischen Teils des Filaments gegen die Plantarseite der Hinterpfote gedrückt und drei Sekunden lang gehalten. So wurde pro Filament eine gleichmäßige Kraft auf die plantare Oberfläche der Hinterpfoten ausgeübt. Mit jedem Monofilament wurde die Plantarseite der Hinterpfote fünfmal im Abstand von mindestens fünf Sekunden stimuliert. Zwischen den unterschiedlichen Filamenten wurde ein Intervall von mindestens fünf Minuten eingehalten. Für jedes von Frey Filament wurde die Anzahl der Reaktionen (Zurückziehen, Lecken oder Schütteln der Pfote) während oder unmittelbar nach der Stimulation notiert. Die nozizeptive Antwort wurde als Prozent und als Fläche unter der Kurve (AUC) dargestellt. Die AUC wurde mittels der Trapezregel berechnet (Deuis et al. 2017; Mickle et al. 2015; Shepherd and Mohapatra 2018).

$$\sum_{i=1}^n \left[\frac{c_{i-1} + c_i}{2} * (t_i - t_{i-1}) \right]$$

Tail-Clip-Test

Der *Tail-Clip*-Test bestimmt die Schmerzschwelle bei Ausübung von mechanischem Druck. Die Mäuse wurden in einen Plexiglaszylinder gesetzt und über fünf Minuten akklimatisiert. Dann wurde eine Plastik-Klammer im Bereich der Schwanzwurzel der Tiere angebracht und die Latenzzeit bis zur ersten erkennbaren Reaktion mit einer Stoppuhr gemessen. Als eine Reaktion wurde das Beißen oder Ergreifen des Schwanzes und das Hochspringen des Tieres gewertet. Unmittelbar danach wurde die Klammer entfernt. Um eine Gewebeschädigung auszuschließen, wurde die Klammer für maximal 120 Sekunden appliziert. Es wurden drei bis fünf Messungen pro Maus in einem Abstand von mindestens 120 Sekunden durchgeführt (Murthy et al. 2018; Ranade et al. 2014; Vandewauw et al. 2018).

Tape-Response-Test

Beim *Tape-Response*-Test wird die mechanische Sensibilität der behaarten Haut ermittelt, deren Innervierung sich von der nicht-behaarten Haut unterscheidet (Abraira and Ginty 2013). Die Tiere wurden in einen Plexiglaszylinder gesetzt und über fünf Minuten an die Versuchsbedingungen gewöhnt. Danach wurde ein handelsübliches Laborklebeband (3 cm lang und 1 cm breit, Firma Starlab) auf den Rücken der Maus geklebt. Es wurde sowohl die Zeit bis zur ersten Reaktion auf das Band als auch die Gesamtzahl der Antworten innerhalb

von fünf Minuten gemessen. Unter einer Antwort auf das Band wurde das Beißen oder Kratzen in Richtung des Klebebands oder ein Schütteln des Körpers („*wet dog shake*“) gewertet. Nach Versuchsende wurde das Band entfernt.

Capsaicin-Test

Mit dem Capsaicin-Test werden über TRPV1-Aktivierung vermittelte Schmerzen erfasst (Caterina et al. 2000; Caterina et al. 1997; Xu et al. 2010). Durch periphere und zentrale Vorgänge entsteht eine thermische Hyperalgesie an der Injektionsstelle (O'Neill et al. 2012; Willis 2009). Zunächst wurden die Versuchstiere in einen Plexiglaszylinder gesetzt und über 30 Minuten akklimatisiert. Danach wurden 5 µg Capsaicin in 20 µl Phosphatpuffer und 2 % DMSO subkutan in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert und die Leckzeit pro Minute über maximal 30 Minuten gemessen (Sakurada et al. 1992). Zur Injektion wurde eine Hamilton™-Spritze mit einer 30,5 Kanüle verwendet.

Formalin-Test

Um die über TRPA1-Aktivierung vermittelte Nozizeption zu messen, wurde der Formalin-Test als Modell für tonische Schmerzen durchgeführt (Dubuisson and Dennis 1977; Hunskaar et al. 1985). Die Versuchstiere wurden zunächst in einen Plexiglaszylinder gesetzt. Nach einer Eingewöhnungszeit von mindestens einer halben Stunde wurden 15 µl einer 0,5%igen Formaldehyd-Lösung (Formalin, in 0,9 % NaCl) subkutan in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurde die Leckzeit pro Minute über einen Zeitraum von 60 Minuten mittels einer Stoppuhr erfasst. Im Formalin-Test sind zwei Phasen der nozizeptiven Reaktion zu verzeichnen, die vor allem auf die Stimulation der TRPA1-Kanäle im Nozizeptor zurückzuführen sind (Macpherson et al. 2007). Die erste Phase beginnt unmittelbar nach der Injektion und dauert etwa zehn bis 15 Minuten an. Sie wird durch direkte Stimulation der Nozizeptoren, insbesondere der A δ -Fasern vermittelt. Dieser ersten Phase des intensiven Pfotenleckens folgt eine Ruhephase von fünf bis zehn Minuten, bevor sich die zweite Phase des Formalin-Tests anschließt. Diese ist neben der Nozizeptoren-Stimulation auch auf die entstehende Entzündung im Gewebe der Pfote und zentrale Sensibilisierungsprozesse zurückzuführen. Letztlich kommt es zu einer anhaltenden Aktivierung der C-Fasern (Coderre et al. 1990; Tjølsen et al. 1992). Die Injektion erfolgte mit einer Hamilton™-Spritze und einer 30,5 Kanüle.

Zymosan-induzierte thermische Hyperalgesie

Das Modell der Zymosan-induzierten Hyperalgesie dient der Charakterisierung des inflammatorischen Schmerzverhaltens (Meller and Gebhart 1997). Den Versuchstieren wurden 20 µl einer Zymosan-A-Suspension (3 mg/ml in Phosphatpuffer) subkutan in die Plantarseite einer Hinterpfote injiziert. Infolge der Zymosan-Injektion entwickelten die Tiere

eine persistierende Entzündung, die mit einer Schwellung und Hyperalgesie einhergeht. Das Ausmaß und der Verlauf der thermischen Hyperalgesie wurden vor Zymosan-Injektion (Baseline), innerhalb der ersten acht Stunden sowie 24 und 48 Stunden nach Zymosan-Injektion im Hargreaves-Test erfasst. Um die Tiere vor dem Experiment an den Versuchsaufbau und die Apparatur zu gewöhnen, wurden drei Messungen unter Basalbedingungen durchgeführt.

Spared Nerve Injury-Modell der peripheren Nervenverletzung

Zur Untersuchung des neuropathischen Schmerzverhaltens wurde das Modell der *Spared Nerve Injury* angewandt (Bourquin et al. 2006; Decosterd and Woolf 2000). Dieses Modell beruht auf einer Verletzung des *Nervus ischiadicus*. Hierbei wurden zwei Äste dieses Nervs ligiert und durchtrennt, der dritte Ast, *Nervus suralis*, hingegen blieb intakt. Dies führte zu einer mechanischen Allodynie im lateralen Bereich der Hinterpfote, welcher vom *Nervus suralis* innerviert wird. Das Ausmaß und der Verlauf der Allodynie wurde in verschiedenen Modellen erfasst (DPA, DWB). Zur Analgesie des Wundschmerzes wurde den Versuchstieren 30 Minuten vor der Operation 5 mg/kg Caprofen subkutan in die Nackenfalte injiziert. Die Operation wurde unter tiefer Isofluran-Narkose vorgenommen. Zunächst wurde mittels des Rückziehreflexes einer Hinterpfote auf eine ausreichende Tiefe der Narkose getestet. Danach wurde die Muskulatur auf Höhe des Kniegelenks durchtrennt und der *Nervus peroneus communis* und der *Nervus tibialis* mit einem 0,08 mm Faden (FST 18020-60) jeweils einzeln abgebunden. Zur Vermeidung einer Re-Ligation der Nerven im Bereich des distalen und proximalen Abschnitts wurde an der Ligationstelle jeweils ein Stück des Nervs entfernt. Danach wurde die Wunde vernäht und die Narkose beendet. Die daraus resultierende Allodynie wurde bis zu 39 Tage nach der Operation untersucht. Durch die Entfernung eines Teils der Nerven wurde die Regeneration des *Nervus ischiadicus* unterbunden, wodurch sich eine über den Zeitverlauf konstant bleibende Neuropathie entwickelte.

Akute Juckreiz-Modelle

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Effekt des Antipsychotikums und Slack-Aktivators Loxapin und die Wirkung des atypischen Neuroleptikums Olanzapin auf das Juckreizverhalten naiver C57BL6/N-Mäuse im Chloroquin-induzierten Juckreiz-Modell untersucht. Dem Chloroquin-induziertem Pruritus liegen Histamin-unabhängige Mechanismen zugrunde (Liu et al. 2009).

Chloroquin-induzierter akuter Juckreiz

Die Versuchstiere wurden zwei Tage vor Versuchsbeginn täglich an den Versuchsraum gewöhnt. Zunächst wurden die Testsubstanzen (Loxapin, Olanzapin oder Vehikel)

intraperitoneal appliziert und die Mäuse in einen Plexiglaszylinder zur Akklimation gesetzt. Nach einer Stunde wurden den Mäusen 20 µl einer Chloroquin-Lösung (10 mg/ml in 0,9 % NaCl, entsprechen 200 µg Chloroquin) subkutan in die Nackenfalte appliziert und unmittelbar danach ein Videosystem (VideoMot) zur Erfassung der Kratzreaktionen gestartet. Die Videos wurden nach Versuchsende manuell ausgewertet und die Kratzreaktionen über 45 Minuten bestimmt.

Applikation von Prüfsubstanzen

Um den Effekt der neuen Slack-Aktivatoren VHP93, VH408 und VH425 *in vivo* zu untersuchen, wurden diese in einer Konzentration von 0,13 mg/kg in 2 % DMSO in 0,9 % NaCl intraperitoneal appliziert und in Tests zur Untersuchung der Motoroordination, im *Open Field*-Test sowie im SNI-Modell an C57BL6/N-Mäusen getestet. Loxapin wurde in einer Konzentration von 0,13 mg/kg in 2 % DMSO in 0,9 % NaCl mitgeführt und als Vehikel wurde 2 % DMSO in 0,9 % NaCl verwendet. Die Motoroordination wurde 0,5, zwei, 3,5 und fünf Stunden nach Substanz-Applikation gemessen. Das explorative Verhalten im *Open Field*-Test wurde 0,5, zwei und 3,5 Stunden nach Gabe der Prüfsubstanzen untersucht. Die mechanische Hyperalgesie im SNI-Modell wurde eine, drei, fünf und 24 Stunden nach Administration der neuen potenziellen Slack-Aktivatoren mit dem Dynamic Plantar Aesthesiometer erfasst.

Zur Untersuchung des Einflusses von Loxapin auf das akute Juckreizverhalten von C57BL6/N-Mäusen wurden zwei verschiedene Loxapin-Konzentrationen getestet: 0,0875 mg/kg und 0,175 mg/kg Loxapin in 0,9 % NaCl. Olanzapin wurde in einer Konzentration von 0,175 mg/kg getestet, als Vehikel wurde 0,9 % NaCl eingesetzt. Die Testsubstanzen wurden eine Stunde vor der Chloroquin-Gabe intraperitoneal verabreicht.

Um die Wirkung des Antiarrhythmikums Clofilium im Formalin-Test zu untersuchen, wurde den Versuchstieren Clofilium in einer Konzentration von 2 mg/kg in 0,9 % NaCl oder als Vehikel 0,9 % NaCl intraperitoneal appliziert. Danach wurden die Tiere in einem Plexiglaszylinder für 30 Minuten akklimatisiert bevor ihnen 15 µl einer 0,5%igen Formalin-Lösung subkutan in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert und die Leckzeit über 60 Minuten beobachtet wurde.

2.5.4 Gewebeentnahme

Zur Gewebeentnahme für nachfolgende qPCR-Analysen wurden die Versuchstiere in einer CO₂-Kammer getötet und im Anschluss über eine Perfusion mit isotonischer NaCl-Lösung kardial entblutet. Unmittelbar danach erfolgte die Gewebepräparation. Hierzu wurde der Rücken der Tiere geöffnet und die Wirbelsäule freigelegt. Im Anschluss wurde diese auf der Höhe des Zervikalmarks durchtrennt. Von hier ausgehend wurden die kaudalen Wirbelbögen

seitlich geöffnet und das Rückenmark frei präpariert. Im Anschluss wurde der lumbale Bereich des Rückenmarks und die dazugehörigen Spinalganglien (DRGs L4-L6) entnommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Entnahme des cerebralen Cortex wurde der Schädel seitlich aufgetrennt, der cerebrale Cortex entnommen und in flüssigen Stickstoff überführt. Das Gewebe wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Zur Herstellung von Gefrierschnitten wurden die Mäuse in CO₂ getötet und entblutet. Um das Gewebe zu fixieren, wurde eine 1%ige oder 4%ige PFA-Lösung (in PBS, pH 7,4) eingesetzt. Das lumbale Rückenmark und DRGs (L4-L6) wurden wie oben beschrieben entnommen und für 15 Minuten in 1 % oder 4 % PFA postfixiert. Danach wurde das Gewebe in einer 20%igen D-Saccharose-Lösung entwässert (4 °C). Nach etwa 4 Stunden wurde die 20%ige D-Saccharose-Lösung durch eine 30%ige D-Saccharose-Lösung substituiert, und das Gewebe über Nacht in der 30%igen D-Saccharose-Lösung entwässert (4 °C). Am nächsten Tag wurde das Gewebe in Gefriermedium auf Trockeneis eingebettet und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert. Mittels eines Kryotoms (Cryostar™, Thermo Fisher Scientific) wurden von den eingebetteten Gewebeproben 12 µm und 14 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt (Objekt- und Kammertemperatur -20 °C). Die fertigen Schnitte wurden für zwei Stunden bei Raumtemperatur getrocknet und danach bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

2.6 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software GraphPad Prism (8.0). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwerts (*Standard Error of the Means*, ± SEM) dargestellt. Zunächst wurde auf Normalverteilung der erhobenen Messwerte geprüft. Zur statistischen Überprüfung von Unterschieden zwischen zwei Messgruppen normalverteilter Daten wurde der ungepaarte t-Test durchgeführt, für Unterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen eine einfaktorielle Varianzanalyse (Ein-Weg-ANOVA) mit oder ohne Messwiederholung und nachfolgenden Post-hoc-Test. Zum Vergleich von Gruppen mit zwei oder mehr Messparametern wurde eine zweifaktorielle Varianzanalyse (Zwei-Weg-ANOVA) mit oder ohne Messwiederholungen und nachfolgendem Post-hoc-Test oder bei fehlenden Messwerten ein *Mixed-effects* Modell mit anschließendem Post-hoc-Test angewandt. Verfügt der Faktor mit Messwiederholungen nur über zwei Faktorstufen, so wurde eine Sphärizität angenommen, andernfalls wurde eine *Geisser-Greenhouse's* Korrektur durchgeführt. Zur Prüfung auf Unterschieden zwischen zwei Messgruppen nicht-normalverteilter Daten wurde der *Mann-Whitney*-Test angewendet. Für alle Tests wurde das Signifikanzniveau auf 5 % ($\alpha = 0,05$) festgelegt. Welche statistischen Tests verwendet wurden, ist unter den jeweiligen Abbildungen im Detail angegeben.

Zur Bestimmung der EC₅₀-Werte der neuen Slack-Aktivatoren wurde die x-Achse transformiert ($x = \log(x)$) und die Konzentrationsreihe logarithmiert. Über die „*Nonlinear Regression*“ und „*Dose-response-Stimulation*“ (log (agonist) versus response – variable slope) Funktion der Software GraphPad Prism (5.0 und 8.0) wurden schließlich die EC₅₀-Werte der neuen Slack-Aktivatoren ermittelt. Die EC₅₀ (mittlere effektive Konzentration) stellt die Konzentration eines Wirkstoffs dar, bei der ein halbmaximaler Effekt zu beobachten ist.

3 Ergebnisse

3.1 Slack-Aktivatoren

Ausgehend von Loxapin und Niclosamid als Leitstrukturen wurden von Kooperationspartnern neue potenzielle Slack-Aktivatoren synthetisiert, die im Rahmen dieser Arbeit zunächst *in vitro* getestet wurden. Die vielversprechendsten Derivate wurden danach weiter *in vivo* untersucht. Die Loxapin-Derivate wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME, Dr. Victor Olmos) entwickelt, die Niclosamid-Derivate wurden vom Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) synthetisiert. Durch virtuelles Screening und anschließende synthetische Modifikationen der Leitstrukturen wurden insgesamt 150 Loxapin- und Niclosamid-Derivate synthetisiert und *in vitro* analysiert, darunter 68 Loxapin- und 82 Niclosamid-Modifikationen. Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak konnte durch *in silico* Bindungs-Untersuchungen und der Kryo-EM-Struktur des Slack-Kanals vom Haushuhn, die von Hite et al., 2015, publiziert wurde (Hite et al. 2015), und nachfolgender Übertragung auf die humane Isoform, den Bindungsmodus von Loxapin an den humanen Slack-Kanal identifizieren. Mit Hilfe von *in silico* Bindungsstudien konnten die ersten Loxapin-Derivate entwickelt werden, die anschließend *in vitro* charakterisiert wurden. Die Testung auf Slack-aktivierende Eigenschaften der neuen potenziellen Slack-Aktivatoren erfolgte mittels eines FluxOR™ Kaliumkanal-Assays (Thermo Fisher Scientific) mit stabilen humanen Slack-Kanal-transfizierten HEK-293-Zellen (Slack-HEK-Zellen). Der Einfluss der erfolgversprechendsten Kandidaten auf das Schmerzverhalten im SNI-Modell wurde im Anschluss untersucht. Auch auf unerwünschte Arzneimittelwirkungen wie Sedierung und motorische Einschränkungen durch systemische Administration der neuen Slack-Aktivatoren wurde *in vivo* im Mausmodell getestet.

3.1.1 Testung neuer potenzieller Slack-Aktivatoren *in vitro*

Bestätigung der Slack-Expression in stabil transfizierten Slack-HEK-Zellen

Zunächst wurde die Expression des Slack-Kanals in stabil transfizierten Slack-HEK-Zellen und nicht-transfizierten HEK-Zellen auf mRNA- und Proteinebene untersucht. Zur Bestätigung der Slack-Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR wurden zwei verschiedene Primerpaare, die an unterschiedlichen Stellen des humanen Slack-Gens binden, verwendet. Das Primerpaar Slack 01 überspannt Exon 3 bis Exon 6, während

Primerpaar Slack 02 zwischen Exon 16 und Exon 17 bindet. Außerdem wurde GAPDH als Referenzgen und β -Aktin zur Kontrolle mitgeführt. Wie in Abb. 8 dargestellt, konnte die Slack mRNA-Expression in Slack-HEK-Zellen mittels qRT-PCR unter Verwendung beider Primerpaare nachgewiesen werden, während Slack mRNA in nicht-transfizierten HEK-Zellen nicht detektiert wurde. β -Aktin als endogene Kontrolle wies sowohl in Slack-HEK- und HEK-Zellen eine ähnliche mRNA-Expression auf.

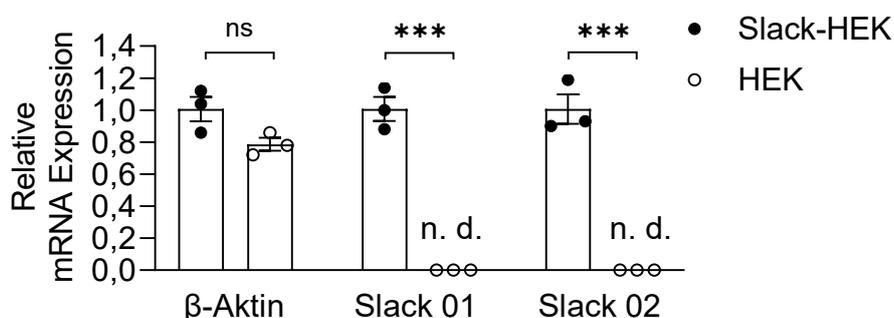


Abb. 8. Relative mRNA Expression in stabil transfizierten humanen Slack-HEK-Zellen und nicht-transfizierten HEK-Zellen. Die β -Aktin- und Slack-Expression wurde auf GAPDH als Referenzgen normiert. Statistik: ungepaarter t-Test, *** $p < 0,001$, ns = nicht signifikant, n. d. = nicht detektiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus einer Dreifachbestimmung.

Die Slack-Expression in Slack-HEK-Zellen und die Abwesenheit von Slack in HEK-Zellen konnte auch auf Proteinebene mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem spezifischen Antikörper gegen den Slack-Kanal bestätigt werden (Abb. 9).



Abb. 9. Immunhistochemische Färbung von Slack-HEK-Zellen (A) und HEK-Zellen (B) mit einem spezifischen Slack-Antikörper. (C) Aufnahme der HEK-Zellen im Durchlichtmikroskop. Maßstab: 50 μ m.

Etablierung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays zur Testung neuer Slack-Aktivatoren

Zu Beginn des Screenings der neuen potenziellen Slack-Aktivatoren im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay (Thermo Fisher Scientific) wurde der Assay zunächst nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Bei den ersten Versuchen wurde eine Loxapin-Konzentration von 30 μ M getestet, als Vehikel diente eine 0,03%ige DMSO Lösung. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem Lade-Puffer inkubiert, welcher danach durch den Assay-Puffer substituiert

wurde. Im Anschluss wurden 10 µl der Loxapin-Lösung oder des Vehikels pro *Well* hinzugeben und für weitere 30 Minuten inkubiert. Zur Auswertung wurde der Anstieg des fluoreszierenden Signals herangezogen. In Abb. 10 sind die ersten Versuche zur Etablierung des FluxOR™-Assays mit Slack-HEK- und HEK-Zellen dargestellt. Nach Zugabe des Thallium-Ionen-haltigen Stimulus-Puffers ist nach Slack-Aktivierung ein Anstieg des fluoreszierenden Signals zu erwarten. Nach Aktivierung und Öffnung der Slack-Kanäle können Thallium-Ionen in die Zelle gelangen und mit dem zuvor durch intrazelluläre Esterasen gespaltenen Farbstoff eine farbgebende Reaktion eingehen. Nach Inkubation mit dem Slack-Aktivator Loxapin ist folglich mit einem Anstieg der Fluoreszenz zu rechnen, die Inkubation des Vehikels sollte sich allerdings nicht auf das Ausmaß der Fluoreszenz auswirken. In den ersten Experimenten war ein Anstieg des fluoreszierenden Signals auch nach Inkubation des Vehikels zu beobachten (Abb. 10A). Somit scheint in diesem Setting eine Messung der Slack-Aktivität nicht möglich zu sein. Nach Angaben des Herstellers sind im FluxOR™-Assay-Puffer sowohl Natrium- als auch Chlorid-Ionen enthalten. Da Slack hauptsächlich durch Änderungen der cytosolischen Natrium-Ionenkonzentration reguliert wird, deutet dies darauf hin, dass in diesem Expressionssystem bereits eine physiologische Natriumkonzentration für die Öffnung der Kanäle ausreichend sein könnte. Im Nachfolgenden wurde das Protokoll des Herstellers teilweise modifiziert. Anstelle des FluxOR™-Assay-Puffers wurde ein selbst hergestellter Cholinchlorid-haltiger Puffer eingesetzt (Cholin-Puffer, Kapitel 2.1.9), welcher hinsichtlich Zusammensetzung und Konzentration der physiologischen Ionenkonzentration des Extrazellularraums entspricht. NaCl wurde jedoch durch Cholinchlorid ersetzt, als Puffersubstanz wurde HEPES hinzugefügt und die pH-Wert Einstellung erfolgte anstelle von NaOH mit KOH. Außerdem wurde nach Abnahme des Lade-Puffers zweimal mit dem Assay-Puffer gewaschen, um sicherzustellen, dass extrazellulär vorliegender Farbstoff vollständig entfernt wurde. Zur Reduktion der Hintergrund-Fluoreszenz wurde weiter das *BackDrop*™ Reagenz hinzugefügt. Nach erneuter Versuchsdurchführung des Fluxor™-Assays mit Slack-HEK-Zellen wurde kein Vehikel-Effekt mehr verzeichnet. Ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz wurde nach Inkubation mit 30 µM Loxapin-Lösung (in 0,03 % DMSO in Cholin-Puffer) beobachtet. Außerdem bewirkte auch die Inkubation mit 140 mM NaCl (in 0,03 % DMSO in Cholin-Puffer) einen Anstieg der Fluoreszenz, was die zuvor vermutete Hypothese bestätigen könnte (Abb. 10B). Der Anstieg der Fluoreszenz nach Inkubation von NaCl im Vergleich zu Vehikel war allerdings statistisch nicht signifikant. Der Fluoreszenz-Anstieg nach Loxapin-Inkubation dagegen war im Vergleich zur Vehikel-Inkubation statistisch signifikant und zum Zeitpunkt 70 Sekunden nach Start der Messung war auch ein statistisch signifikanter Unterschied im Vergleich zum Fluoreszenz-Anstieg nach NaCl-Inkubation zu verzeichnen.

Um zu überprüfen, ob der gemessene Fluoreszenz-Anstieg tatsächlich von Slack abhängt, wurde der FluxOR™-Assay mit HEK-Zellen, die Slack nicht exprimieren, durchgeführt und in diesem Setup auch der erste neu synthetisierte Slack-Aktivator NK96 getestet. Wie in Abb. 10C dargestellt, ergab in den HEK-Zellen weder die Inkubation mit Loxapin (30 µM), NK96 (30 µM) noch mit Vehikel nach Zugabe des Stimulus-Puffers ein im Vergleich zur Baseline erhöhtes Fluoreszenzsignal. Danach wurden Loxapin, NK96 und das Vehikel in Slack-HEK-Zellen getestet. Hierbei erzeugten sowohl Loxapin als auch NK96 ein verstärktes Fluoreszenzsignal (Abb. 10D). Dabei wurde ein signifikanter Unterschied im Fluoreszenz-Anstieg nach Inkubation beider Slack-Aktivatoren im Vergleich zu dem nach Vehikel-Inkubation verzeichnet.

Um den Einfluss von DMSO auf das Assay-System zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt verschiedene DMSO-Konzentrationen getestet. In Abb. 10E ist die Testung von drei DMSO-Konzentrationen dargestellt (3 %, 0,3 % und 0,03 % DMSO in Cholin-Puffer). Der Abbildung ist zu entnehmen, dass durch die Änderung der DMSO-Konzentration kein Anstieg der Fluoreszenz zu beobachten war. Dies deutet darauf hin, dass eine DMSO-Konzentration von bis zu 3 % keinen Einfluss auf die Thallium-Ionen Permeabilität der Zellmembran hat. Um die Vitalität der Zellen während des Assays zu gewährleisten, wurde eine 0,03%ige DMSO-Lösung als Vehikel in der weiteren Testung eingesetzt.

Als nächstes wurden die Slack-aktivierenden Eigenschaften des Slack-Aktivators Niclosamid im FluxOR™-Assay mit Slack-HEK-Zellen untersucht. Da Niclosamid im Rubidium-Efflux-Assay einen deutlich geringeren EC₅₀-Wert als Loxapin aufweist (Biton et al. 2012), wurden zunächst geringere Niclosamid-Konzentrationen getestet. Wie in Abb. 10F dargestellt, führte die Inkubation mit Niclosamid zu einem Anstieg des fluoreszierenden Signals. 110 Sekunden nach Start der Messung war der Unterschied des Fluoreszenz-Anstiegs nach Inkubation mit 21,15 µM, 9,4 µM und 7,17 µM Niclosamid statistisch signifikant, wobei der Effekt bei einer Konzentration von 9,4 µM am stärksten ausgeprägt war. Folglich konnte ebenso die Slack-Aktivierung durch Niclosamid im FluxOR™-Assay bestätigt werden. Insgesamt jedoch war der Anstieg des fluoreszierenden Signals nach Niclosamid-Inkubation geringer im Vergleich zur Zunahme der Fluoreszenz nach Loxapin-Inkubation.

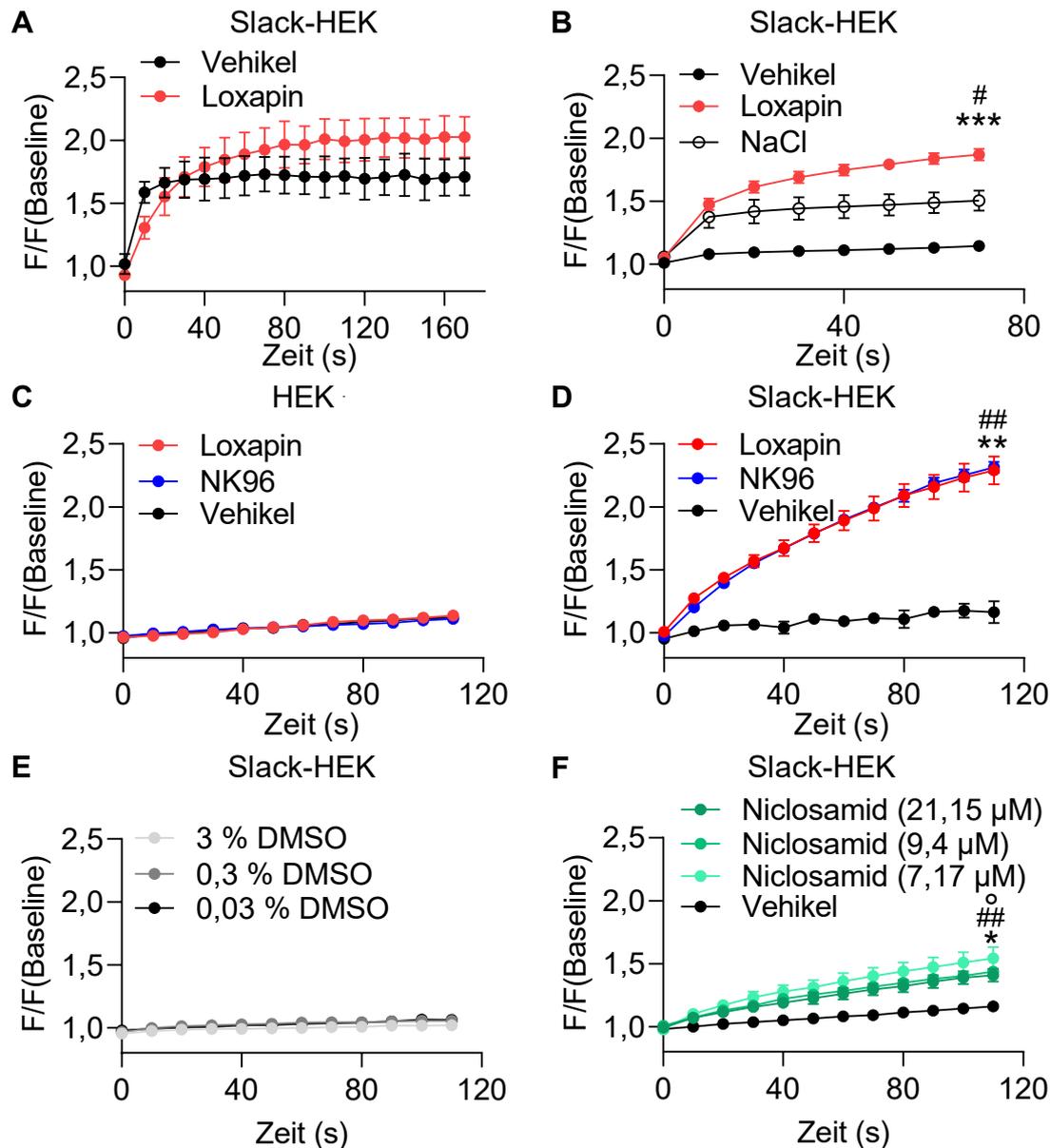


Abb. 10. Etablierung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays. Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz im FluxOR™-Assay aufgetragen gegen die Zeit. (A) Slack-HEK-Zellen nach Inkubation des Vehikels und Loxapin (30 μ M) im physiologischen Milieu (Natrium-Ionen enthalten). (B) Slack-HEK-Zellen nach Inkubation des Vehikels, Loxapin (30 μ M) und NaCl (140 mM) im Natrium-freien Milieu. *** Loxapin versus Vehikel, # Loxapin versus NaCl. (C) HEK-Zellen nach Inkubation des Vehikels, Loxapin (30 μ M) und des Slack-Aktivators NK96 (30 μ M) im Natrium-freien Milieu. (D) Slack-HEK-Zellen nach Inkubation des Vehikels, Loxapin (30 μ M) und des Slack-Aktivators NK96 (30 μ M) im Natrium-freien Milieu. ** Loxapin versus Vehikel, ## NK96 versus Vehikel. (E) Slack-HEK-Zellen nach Inkubation verschiedener DMSO-Konzentrationen (3 %, 0,3 %, 0,03 %) im Natrium-freien Milieu. (F) Slack-HEK-Zellen nach Inkubation mit verschiedenen Niclosamid-Konzentrationen (21,15 μ M, 9,4 μ M, 7,17 μ M) im Natrium-freien Milieu. * 21,15 μ M Niclosamid versus Vehikel, ## 9,4 μ M Niclosamid versus Vehikel, ° 7,17 μ M Niclosamid versus Vehikel. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration in *Weil*. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test. Jede Konzentration bzw. das Vehikel wurden in mindestens dreifacher Bestimmung gemessen. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Weitere *in vitro* Testungen mittels des FluxOR™-Assays erfolgten unter Natrium-freien Bedingungen. Als nächstes wurden die EC_{50} -Werte von Loxapin und NK96 bestimmt, die Konzentration, bei der die Wirkstoffe ihren halbmaximalen Effekt zeigen. Durch Dosis-Wirkungs-Kurven und nachfolgenden mathematischen Modellierungen kann die EC_{50} einer Substanz ermittelt werden. In diesem Fall wurde der Anstieg des fluoreszierenden Signals gegen den Logarithmus der Konzentrationen aufgetragen und mittels des Analysetools von *GraphPad Prism* die EC_{50} abgeleitet. In ersten Versuchen konnte für Loxapin eine EC_{50} von $18,38 \mu\text{M}$ und für den neuen Slack-Aktivator NK96 ein EC_{50} -Wert von $20,32 \mu\text{M}$ ermittelt werden (Abb. 11A, B).

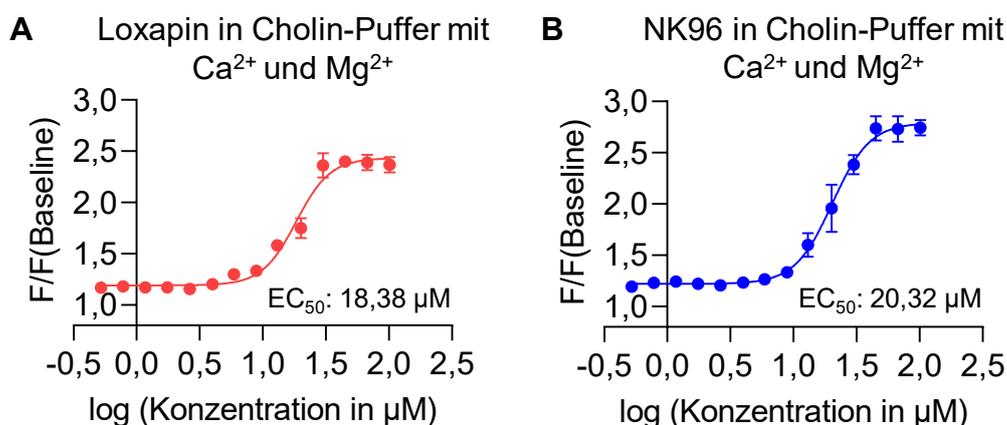


Abb. 11. Bestimmung der EC_{50} von Loxapin und NK96 im FluxOR™-Assay in Slack-HEK-Zellen. (A, B) Im Natrium-freien Milieu (Cholin-Puffer) wurde in Gegenwart von Calcium und Magnesium für Loxapin eine EC_{50} von $18,38 \mu\text{M}$ (A) und für NK96 eine EC_{50} von $20,32 \mu\text{M}$ ermittelt (B).

Da Slack durch bivalente Kationen inhibiert wird (Budelli et al. 2016), wurde in einer weiteren Versuchsreihe die EC_{50} von Loxapin auch unter Calcium-freien bzw. Calcium- und Magnesium-freien Bedingungen bestimmt. Wie in Abb. 12 zu erkennen ist, ergab die Darstellung des Fluoreszenz-Anstiegs gegen den Logarithmus der Konzentrationen von Loxapin im Calcium-freien Cholin-Puffer (mittig) und im Calcium- und Magnesium-freien Cholin-Puffer (rechts) weniger valide Dosis-Wirkungs-Kurven als die von Loxapin im Cholin-Puffer (links). Aus diesem Grund wurden alle weiteren Untersuchungen im FluxOR™-Assay mit dem Natrium-freien Cholin-Puffer, der 2 mM Magnesium und 2 mM Calcium enthält, vorgenommen.

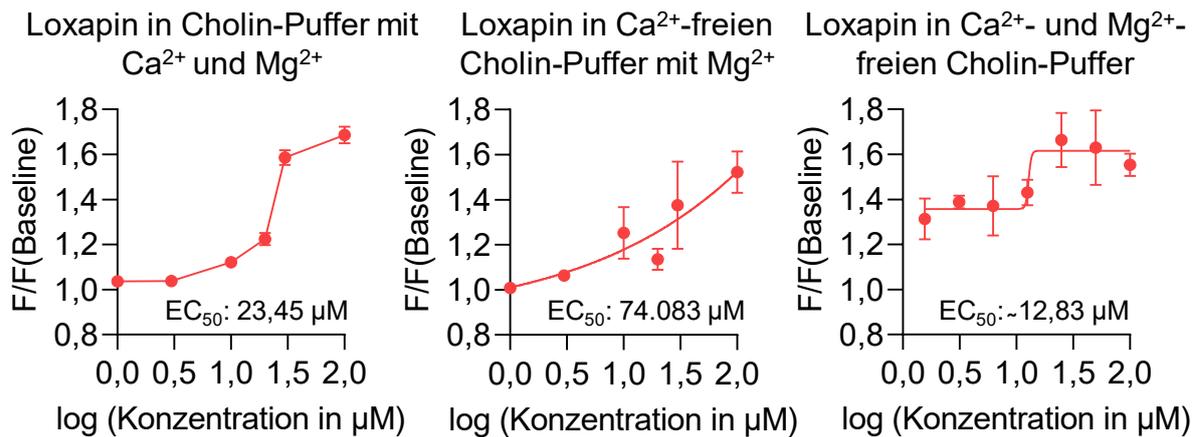


Abb. 12. Bestimmung der EC_{50} von Loxapin im FluxOR™-Assay in Slack-HEK-Zellen in verschiedenen Puffern. In dieser Versuchsreihe wurde die EC_{50} von Loxapin im Natrium-freien Milieu (Cholin-Puffer, links), im Natrium- und Calcium-freien Milieu (Ca^{2+} -freier Cholin-Puffer, mittig) und im Natrium-, Calcium- und Magnesium-freien Milieu (Ca^{2+} - und Mg^{2+} -freier Cholin-Puffer, rechts) bestimmt. Hierbei wurden je nach Puffer unterschiedliche EC_{50} -Werte ermittelt (23,45 μM im Cholin-Puffer, 74,083 μM im Calcium-freien Cholin-Puffer und ~12,83 μM im Calcium- und Magnesium-freien Cholin-Puffer). Jede Konzentration wurde in mindestens dreifacher Bestimmung gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Von 68 neu synthetisierten Loxapin-Derivaten, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, konnten im FluxOR™-Assay insgesamt 23 Substanzen mit Slack-aktivierenden Eigenschaften identifiziert werden. Die im FluxOR™-Assay ermittelten EC_{50} -Werte der 23 Substanzen sind in Tab. 21 aufgeführt. In Abb. 13 sind exemplarisch die Messergebnisse der Substanzen VHP93, VH408 und VH425 dargestellt, die anschließend *in vivo* getestet wurden (Kapitel 3.1.2). Für VHP93 konnte ein EC_{50} -Wert von 14,82 μM bestimmt werden, die EC_{50} von VH408 ergab einen Wert von 19,27 $\mu\text{M} \pm 6,22 \mu\text{M}$ und für VH425 wurde eine EC_{50} von ~73,86 μM bestimmt (Abb. 13). Da bei der ersten EC_{50} -Bestimmung von VH408 kein konzentrationsabhängiger Fluoreszenz-Anstieg verzeichnet wurde, wurde die Messung der EC_{50} im FluxOR™-Assay wiederholt und ein Mittelwert gebildet. Die mathematische Kalkulation der EC_{50} von VH425 ergab ein sehr breites Konfidenzintervall, was im Folgenden mit dem Zeichen „~“ angegeben wird. Eine kleine Stichprobe oder aber auch eine große Streuung der Werte können sich in einem breiten Konfidenzintervall (Vertrauensbereich) widerspiegeln (Du Prel et al. 2009). Der im FluxOR™-Assay ermittelte EC_{50} -Wert von ~73,86 μM für VH425 dient somit als Orientierung und kann unter Umständen vom wahren Wert abweichen.

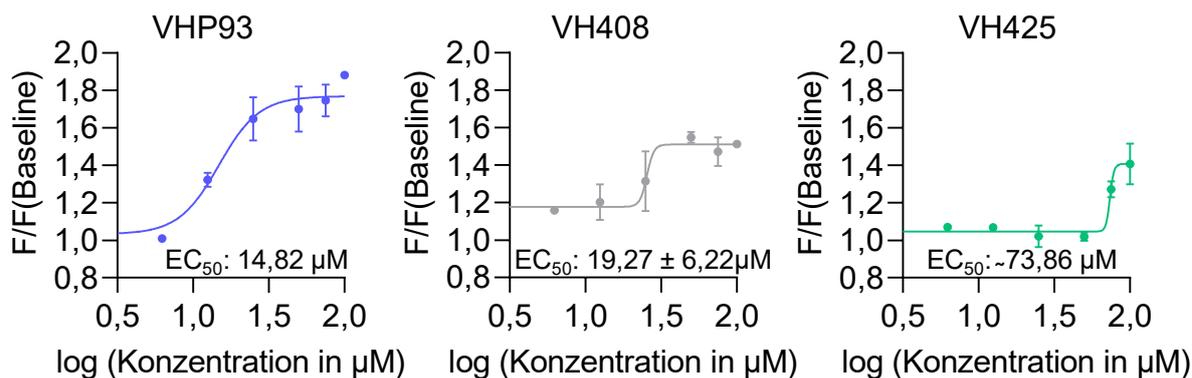


Abb. 13. Bestimmung der EC_{50} der neuen Slack-Aktivatoren VHP93, VH408 und VH425 im FluxOR™-Assay mit Slack-HEK-Zellen im Natrium-freien Milieu (Cholin-Puffer). Für VHP93 wurde eine EC_{50} von 14,82 µM, für VH408 wurde eine EC_{50} von 19,27 ± 6,22 µM und für VH425 wurde eine EC_{50} von ~ 73,86 µM ermittelt. Jede Konzentration wurde in mindestens dreifacher Bestimmung gemessen. Die Bestimmung der EC_{50} von VH408 erfolgte durch Doppelbestimmung der EC_{50} im FluxOR™-Assay. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt.

Die neuen Slack-Aktivatoren VHP93, VH408 und VH425 sowie VH422, VH423 und VHP156 wurden weiter auf ihre Bindungsaffinität an dopaminerge Rezeptoren (D2-, D3-Rezeptoren) untersucht. Diese Testung erfolgte von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Bei Untersuchungen der Bindungsaffinitäten der neuen Slack-Aktivatoren an D2- und D3-Rezeptoren, stellte sich heraus, dass die pK_i -Werte für VH425 an D2- und D3-Rezeptoren geringer waren als die von Loxapin. VH425 stellt somit ein Loxapin-Derivat mit geringerer Bindungsaffinität an die Dopamin-Rezeptoren D2 und D3 dar. In Tab. 21 sind die Loxapin-Derivate mit Slack-aktivierenden Eigenschaften, ihre EC_{50} -Werte und, falls vorhanden, ihre pK_i -Werte (D2, D3) angegeben.

Wie der Tabelle (Tab. 21) zu entnehmen ist, wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Loxapin, VHP93, VH408 und VH425 *in vivo* auf das Schmerzverhalten im SNI-Modell sowie auf mögliche unerwünschte Wirkungen (Störungen der Motorfunktion, Sedierung) untersucht. Weiter wurden vier Loxapin-Modifikationen mit schwacher Slack-aktivierenden Wirkung im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay identifiziert (NK105, VH328, VH445, VHP164), die nicht in der Tabelle aufgeführt sind. Außerdem wurden bereits auf dem Markt zugelassene Arzneistoffe mit trizyklischer Struktur getestet, darunter das Antidepressivum Amoxapin und die Antipsychotika Clotiapin, Quetiapin und Olanzapin. Amoxapin und Clotiapin waren in der Lage Slack zu aktivieren, allerdings in einem geringeren Ausmaß als Loxapin bzw. die neuen Slack-Aktivatoren, bei Quetiapin und Olanzapin konnte im FluxOR™-Assay kein Slack-aktivierender Effekt festgestellt werden.

Dies stimmt mit den Daten von Biton et al., 2012, überein, bei denen eine Reihe von Wirkstoffen hinsichtlich einer Slack-Aktivierung *in vitro* gescannt wurde (Biton et al. 2012).

Tab. 21. Eigenschaften der Slack-Aktivatoren (Loxapin-Derivate)

Bezeichnung ¹	Im FluxOR™-Assay ermittelte EC ₅₀	Bindungsaffinität an Dopamin-Rezeptoren ²	<i>in vivo</i> Testung	Anzahl der Bestimmungen im FluxOR™-Assay
Loxapin	22,96 ± 2,76 µM	pK _i (D2): 7,5 pK _i (D3): 6,95	✓	11
VHP93	14,82 µM	pK _i (D2): 8,44 pK _i (D3): 7,91	✓	1
VH408	19,27 ± 6,22 µM	pK _i (D2): 7,35 pK _i (D3): 7,2	✓	2
VH425	~73,86 µM ³	pK _i (D2): 5,89 pK _i (D3): 5,45	✓	1
VH422	~73,21 µM	pK _i (D2): 6,83 pK _i (D3): 6,63	✗	1
VH423	65,95 ± 20,48 µM	pK _i (D2): 7,3 pK _i (D3): 6,75	✗	2
VHP156	~12,23 µM	pK _i (D2): 7,3 pK _i (D3): 6,92	✗	1
VH329	65,41 µM	✗	✗	1
VHP39	97,92 ± 1,04 µM	✗	✗	2
VHP42	67,87 µM	✗	✗	1
VHP45	33,32 µM	✗	✗	1

¹ Interne Bezeichnung der neuen Slack-Aktivatoren, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak in Zusammenarbeit mit Dr. Victor Olmos synthetisiert wurden

² Durchführung des Dopamin-Bindungsassays von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Holger Stark (Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf)

³ ~ entspricht einem breiten Konfidenzintervall. Die im FluxOR™-Assay ermittelte EC₅₀ dient als Orientierung. Die tatsächliche EC₅₀ kann unter Umständen von dem hier angegebenen Wert abweichen.

VHP74	125,60 μ M	×	×	1
VH404	43,13 \pm 17,22 μ M	×	×	2
VH410	18,02 \pm 5,12 μ M	×	×	2
VH151	91,28 μ M	×	×	1
VH482	11,99 \pm 0,22 μ M	×	×	2
VH483	88,27 \pm 1,80 μ M	×	×	2
VH487	101,15 \pm 4,15 μ M	×	×	2
Amoxapin	24,91 μ M	×	×	1
Clotiapin	~12,44 μ M	×	×	1
VH417	×	×	×	×

Das Screening der Loxapin-Derivate ergab, dass der 8-Chlorsubstituent durch eine Trifluormethylgruppe ersetzt werden kann, während Substituenten in anderen Positionen die Slack-Aktivierung einschränkten oder zum Verlust der Slack-aktivierenden Eigenschaften führten. Größere Substituenten am gegenüberliegenden Benzolring wurden ebenfalls nicht toleriert. Der Ersatz der Sauerstoffbrücke durch Schwefel oder Stickstoff ging ebenso einher mit einem verminderten Slack-aktivierenden Effekt im FluxOR™-Assay. Sowohl die Substitution des Piperazins als auch die Methylierung des Piperazins an Position 2 oder Position 3 führten zu einem verminderten Anstieg des fluoreszierenden Signals im FluxOR™-Assay. Die Erweiterung der Methylgruppe am Piperazin dagegen wurde akzeptiert (Abb. 14). Aus patenschutzrechtlichen Gründen können die Strukturformeln der neuen Slack-Aktivatoren inklusive aller strukturellen Modifikationen in dieser Arbeit nicht angegeben werden.

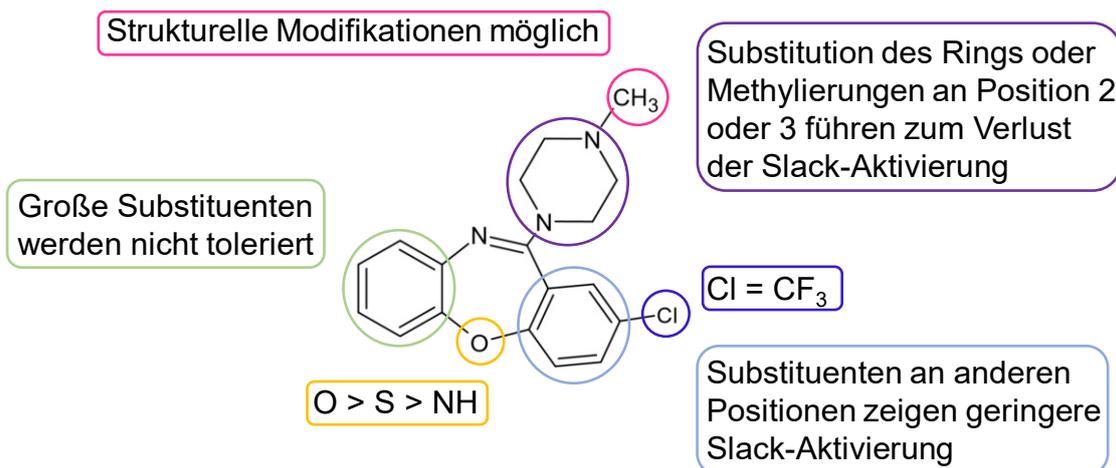


Abb. 14. Vorläufige Struktur-Wirkungsbeziehung der Loxapin-Derivate. Adaptiert aus einem Projektreport der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak.

Von 82 getesteten Niclosamid-Derivaten konnte die Substanz ST-1014 mit Slack-aktivierenden Eigenschaften identifiziert werden. ST-1014 unterscheidet sich strukturell durch Austausch eines Substituenten von Niclosamid. Allerdings war der Anstieg des fluoreszierenden Signals nach Inkubation des neuen Slack-Aktivators im Vergleich zu Vehikel statistisch nicht signifikant (Abb. 15B). Auch nach Inkubation mit Niclosamid als Positivkontrolle konnte in diesem Setting kein statistisch signifikanter Anstieg der Fluoreszenz im Vergleich zu Vehikel verzeichnet werden (Abb. 15A).

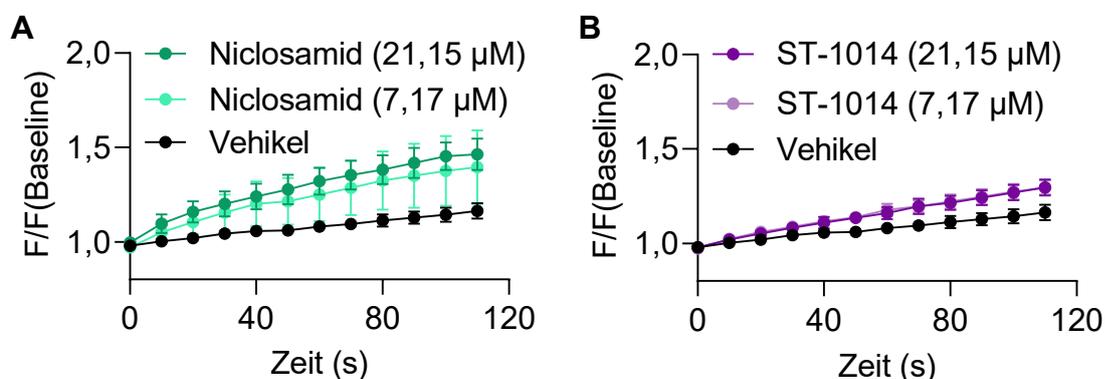


Abb. 15. FluxOR™-Assay mit Slack-HEK-Zellen nach Inkubation mit Vehikel, Niclosamid als Positivkontrolle (A) und ST-1014 (B). Dargestellt ist der Anstieg der Fluoreszenz im FluxOR™-Assay aufgetragen gegen die Zeit. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test. Jede Konzentration bzw. das Vehikel wurden in zwei- bis fünffacher Bestimmung gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Das Ausmaß des Anstiegs des fluoreszierenden Signals war im Vergleich zum Fluoreszenz-Anstieg nach Loxapin-Inkubation bzw. Inkubation der Loxapin-Derivate deutlich geringer, sodass die Entwicklung und Testung neuer Niclosamid-Derivate im Rahmen dieser Arbeit nicht weiterverfolgt wurden.

3.1.2 Testung ausgewählter Slack-Aktivatoren in Maus-Modellen *in vivo*

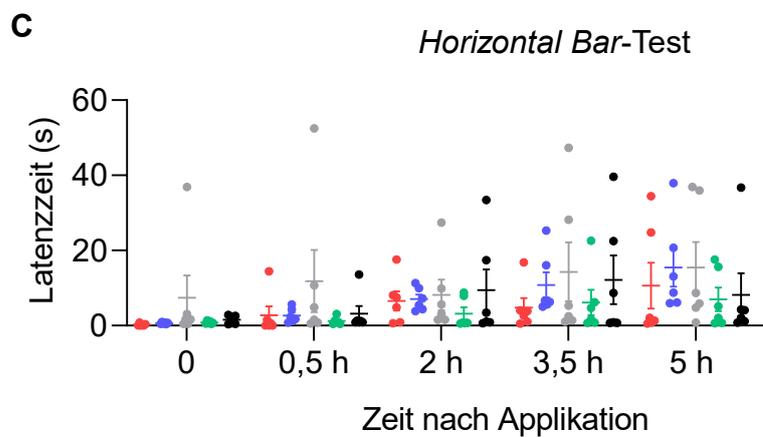
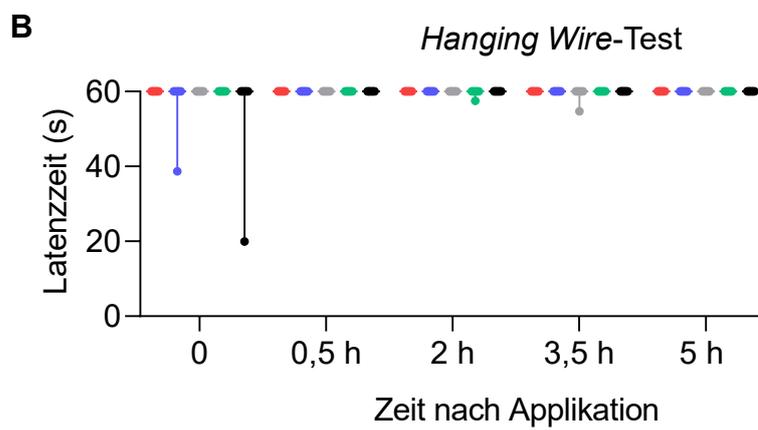
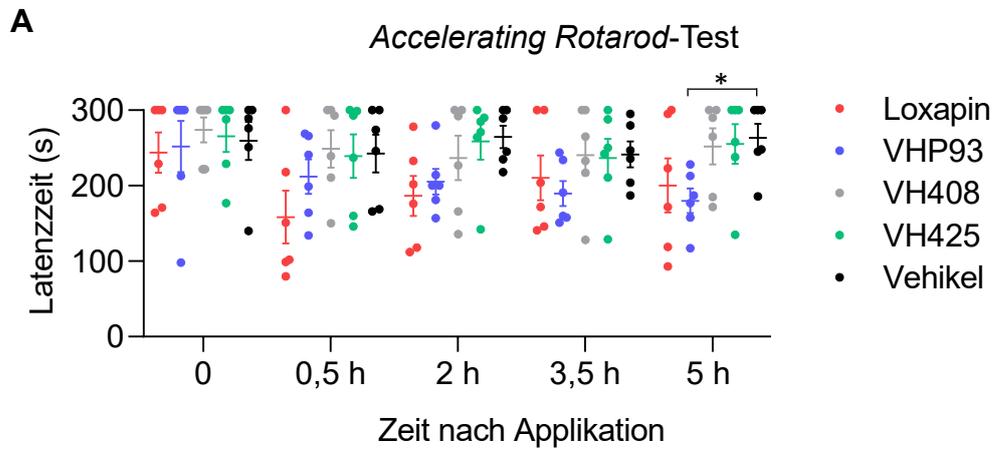
Untersuchung der Motorkoordination und Aktivität nach Applikation der Prüfsubstanzen

Um auszuschließen, dass die Prüfsubstanzen motorische Störungen verursachen, die in den Schmerzmodellen fälschlicherweise als schmerzhemmende Effekte interpretiert werden könnten, wurden die Slack-Aktivatoren VHP93, VH408 und VH425 sowie die Referenzsubstanz Loxapin zunächst in verschiedenen Tests zur Untersuchung der Motorfunktion getestet. Eine gründliche Charakterisierung der neuen Substanzen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Motorik ist außerdem erforderlich, da es unter Loxapin-Therapie aufgrund der D2-Rezeptorblockade im zentralen Nervensystem (ZNS) zur Ausbildung eines extrapyramidalen Syndroms (EPS) kommen kann (Popovic et al. 2015).

Um den Einfluss der neuen Slack-Aktivatoren auf die Motorfunktion der Versuchstiere zu bestimmen, wurden VHP93, VH408, VH425 oder Loxapin jeweils in einer Dosis von 0,13 mg/kg in 2 % DMSO intraperitoneal appliziert. Anschließend erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten Messungen in vier Motorik-Tests. Im *Accelerating* Rotarod-Test war nach Behandlung mit Loxapin und dem neuen Slack-Aktivator VHP93 im Vergleich zur Vehikel-Behandlung eine reduzierte Verweilzeit der Tiere auf der rotierenden Stange zu beobachten (Abb. 16A). Diese war für VHP93-behandelte Tiere nach fünf Stunden statistisch signifikant reduziert, was darauf hindeutet, dass die Applikation dieser Prüfsubstanz die Motorfunktion der Tiere beeinträchtigen könnte. Nach Gabe der Slack-Aktivatoren VH408 und VH425 wurde kein Unterschied im *Accelerating* Rotarod-Test festgestellt (Abb. 16A). Dies bestätigt die Daten aus dem Dopamin-Rezeptor-Bindungsassay der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Holger Stark: die *pK*-Werte von VHP93 an D2- und D3-Rezeptoren sind größer als die von Loxapin (Tab. 21).

Um mögliche neuromuskuläre Abnormalitäten zu erfassen, wurde der *Hanging Wire*-Test durchgeführt. Wie in Abb. 16B dargestellt wirkte sich keine Behandlung auf die Verweilzeit der Mäuse am Metallgitter und somit auf die Muskelstärke der Versuchstiere aus. Weiter wurde im *Horizontal Bar*-Test auf Katalepsie getestet. Auch hier wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen, die zuvor mit den Slack-Aktivatoren behandelt wurden, und den Vehikel-behandelten Mäusen verzeichnet (Abb. 16C). Im *Vertical Pole*-Test können durch Basalganglien verursachte Bewegungsstörungen erfasst werden. Auch wenn der Unterschied statistisch nicht signifikant war, wurde bei VHP93-behandelten Versuchstieren im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen eine erhöhte Verweilzeit auf der vertikalen Stange beobachtet (Abb. 16D). Die Abnahme der Bewegungen und die damit einhergehende

erhöhte Verweilzeit im *Vertical Pole-Test* könnte eine kurzfristige Fehlfunktion der Basalganglien, hervorgerufen durch den neuen Slack-Aktivator VHP93, widerspiegeln.



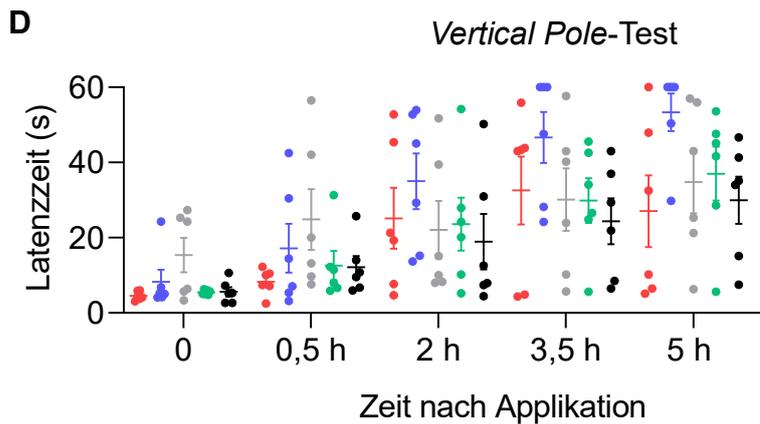


Abb. 16. Untersuchung der Motorfunktion in Loxapin-, VHP93-, VH408-, VH425- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen. Die neuen Slack-Aktivatoren wurden in einer Konzentration von 0,13 mg/kg in Vehikel intraperitoneal verabreicht. Als Vehikel diente 2 % DMSO in 0,9 % NaCl. Die Motorik-Tests erfolgten im Zeitverlauf zu den angegebenen Zeitpunkten nach der einmaligen Applikation. (A) *Accelerating Rotarod-Test*. Dargestellt ist die Latenzzeit der Mäuse auf der rotierenden Stange. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Tukey's Test, Geisser-Greenhouse's Korrektur, * $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt. (B) *Hanging Wire-Test*. Dargestellt ist die Verweilzeit der Mäuse am Metallgitter. Die Daten sind als Median von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt. (C) *Horizontal Bar-Test*. Dargestellt ist die Verweilzeit der Mäuse auf der horizontalen Glasstange. (D) *Vertical Pole-Test*. Dargestellt ist die Latenzzeit der Mäuse auf der vertikalen Stange. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Tukey's Test, Geisser-Greenhouse's Korrektur. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt.

Aufgrund der Blockade von Histamin- (H_1), Serotonin- ($5-HT_{2A}$) und adrenergen (α_1 -) Rezeptoren durch Loxapin und der damit einhergehenden Sedierung wurde darüber hinaus auch die Aktivität der Tiere nach Substanzapplikation im *Open Field-Test* erfasst. Naiven C57BL/6N-Mäusen wurden 0,13 mg/kg Substanz in 2 % DMSO in NaCl oder das Vehikel (2 % DMSO in NaCl) intraperitoneal appliziert und die motorischen Funktionen und die Aktivität im *Open Field-Test* nach Substanzapplikation untersucht. In Abb. 17A ist die in 30 Minuten zurückgelegte Wegstrecke der Mäuse dargestellt. Hierbei ist anzumerken, dass bereits in den Baseline-Wegstrecken vor Verabreichung der Prüfsubstanzen (Zeitpunkt 0) starke Schwankungen zwischen den Gruppen verzeichnet wurden, weshalb VH408- und VH425-behandelte Mäuse aus der Analyse ausgeschlossen wurden. In Abb. 17A ist allerdings deutlich erkennbar, dass VHP93-behandelte Mäuse zu den untersuchten Zeitpunkten verglichen zu Loxapin- und Vehikel-behandelten Mäusen die kürzeste Strecke zurücklegten. Der Unterschied in den zurückgelegten Wegstrecken zwischen VHP93- und Vehikel-behandelten Mäusen war zum Zeitpunkt 0,5 Stunden nach Gabe der Prüfsubstanzen statistisch signifikant. Dies deutet darauf hin, dass die sedierenden Effekte bei VHP93 am stärksten ausgeprägt sein könnten und dieser neue Slack-Aktivator somit hemmend auf die Aktivität und das explorative Verhalten der Mäuse wirken könnte. Allerdings legten auch

Vehikel-behandelte Mäuse bei wiederholten Messungen deutlich kürzere Wege zurück, was auf einen Gewöhnungseffekt der Mäuse an die Kammer deuten könnte.

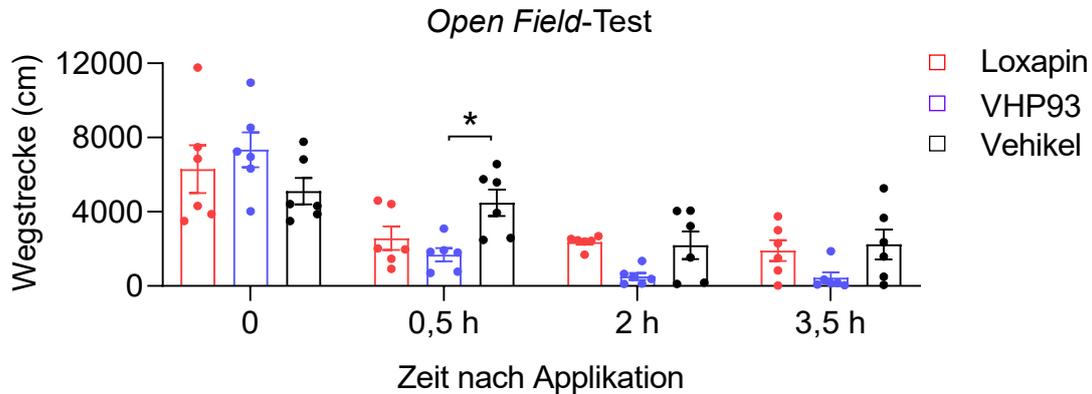


Abb. 17. Untersuchung der Aktivität der Loxapin-, VHP93- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen im *Open Field*-Test. Die neuen Slack-Aktivatoren wurden in einer Konzentration von 0,13 mg/kg in 2 % DMSO in 0,9 % NaCl intraperitoneal verabreicht. Dargestellt ist die zurückgelegte Wegstrecke in cm innerhalb einer Beobachtungszeit von 30 Minuten zum Zeitpunkt 0 (Baseline) sowie 0,5, zwei und 3,5 Stunden nach Applikation der Prüfsubstanzen. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Dunnett's Test, Geisser-Greenhouse's Korrektur, * $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt.

Beeinflussung des Schmerzverhaltens durch die Prüfsubstanzen

Wie aus Kapitel 2.5.3 zu entnehmen ist, werden im *Spared Nerve Injury*- (SNI-) Modell, einem neuropathischen Schmerzmodell, zwei Äste des *Nervus ischiadicus* durchtrennt, wobei der *Nervus suralis* intakt bleibt. Dies führt zu einer mechanischen Allodynie im lateralen Bereich der Hinterpfote, welcher vom *Nervus suralis* innerviert wird. In Vorarbeiten wurde beobachtet, dass der Slack-Aktivator Loxapin nach intraperitonealer Gabe Slack-abhängig das neuropathische Schmerzverhalten von Mäusen im SNI-Modell hemmt (Lu et al. 2015). Daher wurden in dieser Arbeit die neuen Slack-Aktivatoren VHP93 und VH408 im SNI-Modell getestet und dabei das Vehikel (2 % DMSO in 0,9 % NaCl) mitgeführt. Die Loxapin-Derivate wurden in einer Konzentration von 0,13 mg/kg getestet, was der Loxapin-Konzentration entspricht, die das neuropathische Schmerzverhalten hemmte (Lu et al. 2015). Die Testung der neuen Slack-Aktivatoren erfolgte 14 Tage nach SNI. Die mechanische Schmerzschwelle wurde vor der SNI-Operation (Tag 0, Baseline), 14 Tage nach SNI und eine, drei, fünf und 24 Stunden nach Substanz-Applikation mittels des Dynamic Plantar Aesthesimeters (Ugo Basile) erfasst. Wie in Abb. 18 dargestellt, zeigten VHP93-behandelte Mäuse nach drei und fünf Stunden eine signifikant erhöhte Latenzzeit im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen.

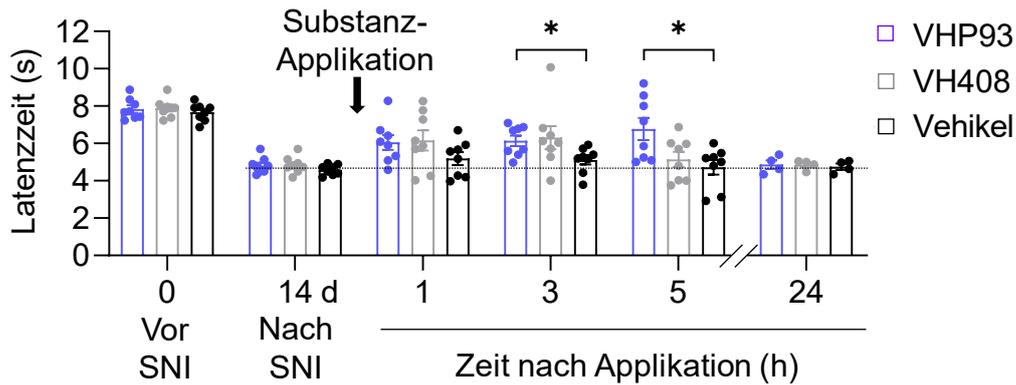


Abb. 18. SNI-induzierte mechanische Allodynie nach Behandlung mit VHP93, VH408 oder Vehikel. Darstellung der Latenzzeit bis zum Wegziehen der Pfote nach mechanischer Stimulation in C57BL/6N-Mäusen vor SNI, 14 Tage nach SNI und eine, drei, fünf und 24 Stunden nach intraperitonealer Applikation von VHP93, VH408 oder Vehikel. Die neuen Slack-Aktivatoren wurden in einer Konzentration von 0,13 mg/kg in Vehikel getestet, als Vehikel diente 2 % DMSO in 0,9 % NaCl. Statistik: Mixed-effects model & Tukey's Test, Geisser-Greenhouse's Korrektur, * $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Versuchstieren dargestellt (24 Stunden nach Applikation: $n = 4$).

3.1.3 Wirkung von Loxapin und Olanzapin im Chloroquin-induzierten Juckreiz-Modell

Bereits 2015 wurde publiziert, dass Slack^{-/-}-Mäuse innerhalb der ersten fünf Minuten nach Injektion eines Pruritogens wie Chloroquin oder Histamin mehr Kratzreaktionen als ihre wildtypischen Wurfgeschwister zeigen (Martinez-Espinosa et al. 2015). Um zu untersuchen, ob der Slack-Aktivator Loxapin neben neuropathischem Schmerzverhalten auch akutes Juckreiz-Verhalten lindern kann, wurde Loxapin in der Dosierung von 0,175 mg/kg und das Vehikel (0,9 % NaCl) eine Stunde vor Chloroquin-Injektion intraperitoneal verabreicht. Olanzapin wurde als Negativkontrolle in der gleichen Dosierung mitgeführt. In Abb. 19A ist der Zeitverlauf nach Applikation von Chloroquin in fünfminütigen Intervallen dargestellt. Zum Zeitpunkt 2,5 Minuten nach Injektion zeigten sowohl Loxapin- als auch Olanzapin-behandelte Mäuse signifikant verringerte Kratzreaktionen als Vehikel-behandelte Mäuse. Danach, zu den Zeitpunkten 7,5 Minuten bis 27,5 Minuten nach Injektion, zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied in der Anzahl an Kratzreaktionen in Loxapin-behandelten Mäusen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen. In der Summe der Kratzreaktionen über den gesamten Beobachtungszeitraum war ein signifikanter Unterschied der Loxapin- und Olanzapin-Gruppe im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zu beobachten (Abb. 19B). Demnach scheinen die Antipsychotika Loxapin und Olanzapin akuten Juckreiz zu hemmen, wobei die hemmenden Eigenschaften bei Loxapin deutlich ausgeprägter waren als bei Olanzapin.

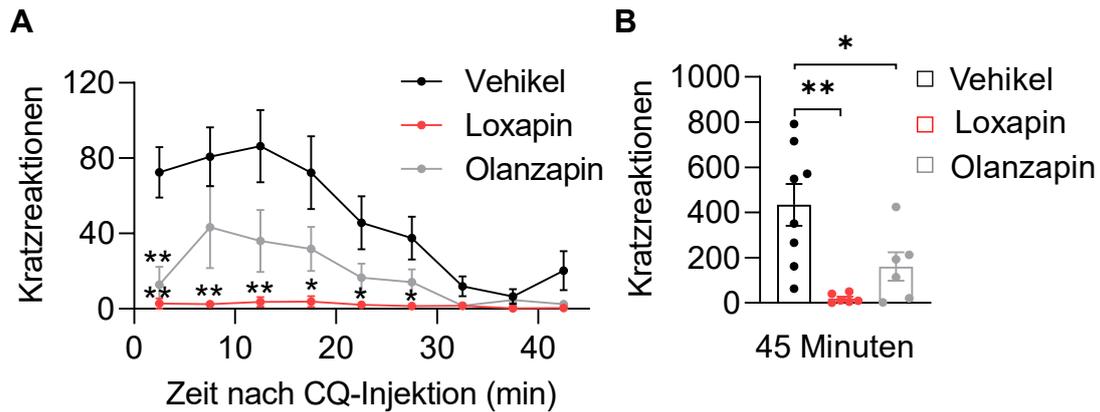


Abb. 19. Chloroquin-induziertes akutes Juckreizverhalten in Loxapin-, Olanzapin- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen. Eine Stunde vor Chloroquin-Injektion wurde den Versuchstieren Loxapin, Olanzapin (jeweils 0,175 mg/kg) oder das Vehikel (0,9 % NaCl) intraperitoneal verabreicht. (A) Zeitverlauf nach subkutaner Injektion von 200 µg Chloroquin (CQ) in die Nackenfalte. Dargestellt ist die Anzahl an Kratzreaktionen in Fünf-Minuten-Intervallen über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 45 Minuten. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Tukey's Test, Geisser-Greenhouse-Korrektur, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. (B) Darstellung der Summe der Kratzreaktionen in 45 Minuten nach Chloroquin-Injektion. Statistik: Ein-Weg-ANOVA & Tukey's Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt.

Da Mäuse, denen vor der Chloroquin-Injektion 0,175 mg/kg Loxapin systemisch appliziert wurde, kaum eine Kratzreaktion auf Chloroquin zeigten, wurde in einer weiteren Kohorte Loxapin in einer Dosis von 0,0875 mg/kg versus Vehikel (0,9 % NaCl) getestet. Wie in Abb. 20 dargestellt, zeigten Loxapin-behandelte Mäuse in den ersten Minuten nach Applikation des Juckreiz-Stimulus weniger Kratzreaktionen als Versuchstiere, denen zuvor das Vehikel verabreicht wurde. Zu den Zeitpunkten 2,5 Minuten bis 12,5 Minuten nach Chloroquin-Injektion wurde ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Kratzreaktionen von Loxapin- und Vehikel-behandelten Versuchstieren verzeichnet. Der Unterschied in den Summen der Kratzreaktionen über den Beobachtungszeitraum von 45 Minuten war allerdings statistisch nicht signifikant (Abb. 20B, $p = 0,0976$).

Somit scheint Loxapin dosisabhängig das Juckreiz-Verhalten im Chloroquin-Modell für nicht-histaminergen Juckreiz zu hemmen.

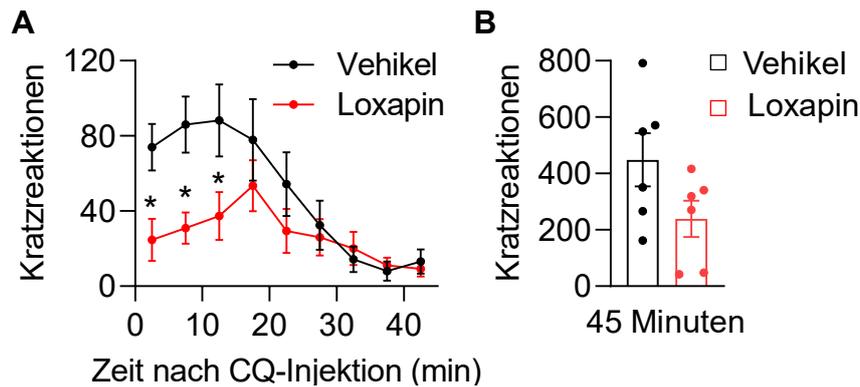


Abb. 20. Chloroquin-induziertes akutes Juckreizverhalten in Loxapin- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen. Eine Stunde vor Chloroquin-Injektion wurde den Versuchstieren Loxapin (0,0875 mg/kg) oder das Vehikel (0,9 % NaCl) intraperitoneal verabreicht. (A) Zeitverlauf nach subkutaner Injektion von 200 µg Chloroquin (CQ) in die Nackenfalte. Dargestellt ist die Anzahl an Kratzreaktionen in Fünf-Minuten-Intervallen über einen Beobachtungszeitraum von insgesamt 45 Minuten. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test, * $p < 0,05$. (B) Darstellung der Summe der Kratzreaktionen in 45 Minuten nach Chloroquin-Injektion. Statistik: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 6$ Versuchstieren dargestellt.

3.2 Wirkung von Clofilium im Formalin-Test

Ein weiteres Thema der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Funktionen des Kaliumkanals Slick im somatosensorischen System. In Voruntersuchungen wurde die Wirkung des Antiarrhythmikums Clofilium, welches sowohl Slack- als auch Slick-Kanäle blockiert (Los Angeles Tejada et al. 2012b), im Formalin-Test untersucht. Um zwischen Slick und Slack zu unterscheiden, wurde der Versuch mit Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. In Abb. 21 ist die Leckzeit der Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse nach Vehikel- (Abb. 21A) oder Clofilium-Applikation (Abb. 21B) im Zeitverlauf dargestellt. Sowohl im Leckverhalten von Vehikel-behandelten Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen, als auch im Leckverhalten von Clofilium-behandelten Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen, war jeweils kein Unterschied zu beobachten. Vergleicht man allerdings das Leckverhalten der Versuchstiere nach Vehikel- und Clofilium-Applikation, so zeigten Clofilium-behandelte Tiere eine deutlich geringere Leckzeit als die Vehikel-Gruppe. In Abb. 21C ist die statistische Auswertung der zwei Phasen des Formalin-Tests aufgeführt. Weder die erste Phase (0-10 Minuten), die auf Aktivierung der TRPA1-Kanäle zurückzuführen ist (McNamara et al. 2007), noch die zweite Phase (11-60 Minuten), die durch zusätzliche Sensibilisierungsprozesse im Rückenmark gekennzeichnet ist, zeigte signifikante Unterschiede zwischen den Genotypen. Der Unterschied in der Leckzeit der ersten Phase zwischen Vehikel- und Clofilium-behandelten Versuchstieren war statistisch nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied ergab sich jedoch sowohl zwischen Vehikel- und Clofilium-behandelten Slack^{-/-}- als auch zwischen Vehikel- und Clofilium-behandelten Wildtyp-Mäusen in der zweiten Phase des Formalin-Tests (Abb. 21C).

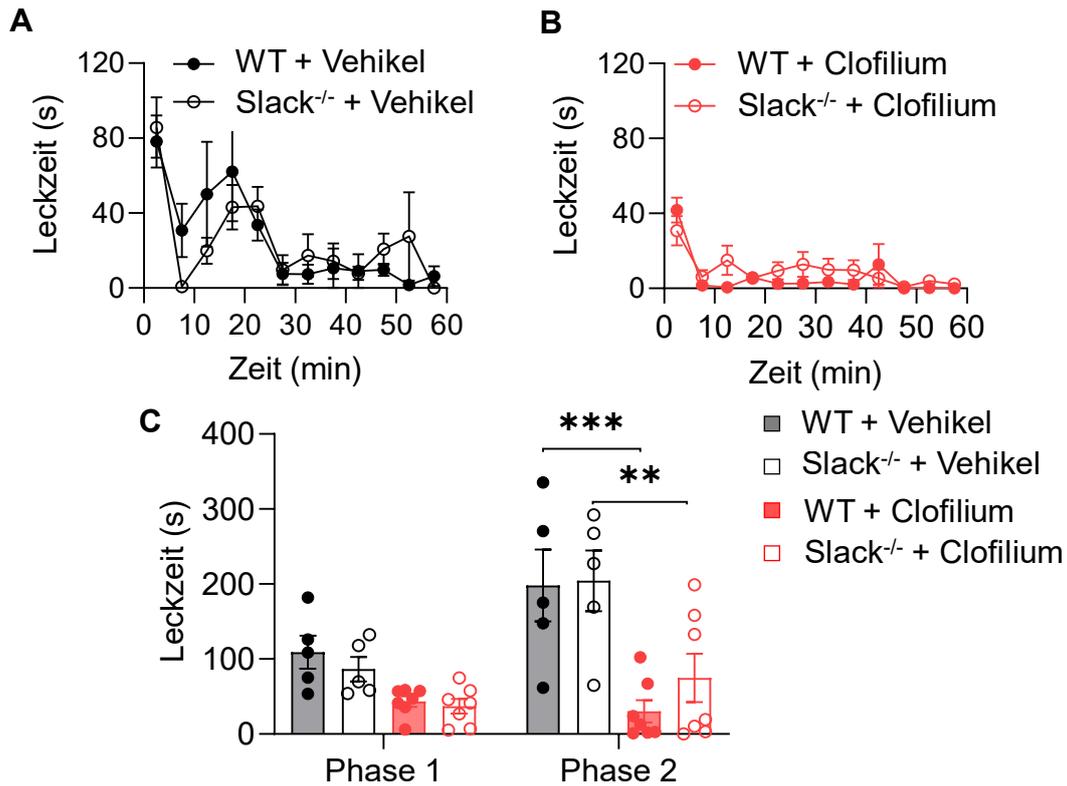


Abb. 21. Formalin-Test mit Slack^{-/-}- und Wildtyp- (WT-) Mäusen 30 Minuten nach systemischer Applikation von Clofilium (2 mg/kg in 0,9 % NaCl) oder des Vehikels (0,9 % NaCl). (A, B) Darstellung des Leckverhaltens Vehikel-behandelter (A) und Clofilium-behandelter (B) Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse nach Formalin-Injektion im Zeitverlauf. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test, Geisser-Greenhouse's Korrektur. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 5-7 Versuchstieren dargestellt. (C) Darstellung der zwei Phasen des Formalin-Tests als Summe des Leckverhaltens nach Vehikel- bzw. Clofilium-Applikation. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Tukey's Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 5-7 Versuchstieren dargestellt.

Das Leckverhalten der zweiten Phase des Formalin-Tests wird somit durch die systemische Clofilium-Applikation gehemmt. Diese Daten lassen vermuten, dass die Hemmung des Schmerzverhaltens im Formalin-Test durch Clofilium Slack-unabhängig verläuft. Ob das reduzierte Schmerzverhalten in der späten Phase des Formalin-Tests durch Inhibition von Slick oder durch Blockade anderer Kanäle vermittelt wird, kann in diesem Modell nicht abschließend geklärt werden.

3.3 Charakterisierung der Expression und Funktion von Slick im schmerzverarbeitenden System

In bereits publizierten Forschungsergebnissen wurde eine Slick-Expression in Dorsalhornneuronen des Rückenmarks sowie in CGRP-positiven somatosensorischen Neuronen verzeichnet (Häring et al. 2018; Tomasello et al. 2017). Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisation des Kaliumkanals Slick in schmerzrelevanten Geweben wurden Immunfluoreszenzfärbungen und In-situ-Hybridisierungen von Rückenmarks- und DRG-Schnitten angefertigt.

3.3.1 Zelluläre Lokalisation von Slick im Rückenmark

In Abb. 22A, B ist die Immunfluoreszenzfärbung von Slick im Rückenmark von Wildtyp- und Slick^{-/-}-Mäusen dargestellt. Im Wildtyp-Rückenmark wurde eine ausgeprägte Slick-Immunfluoreszenz im Dorsalhorn detektiert. Weiter wurde eine schwache Slick-Expression in der Region des Zentralkanals verzeichnet (Abb. 22A). Immunhistochemische Untersuchungen von Rückenmarksschnitten von Slick^{-/-}-Mäusen dagegen zeigten keine Slick-Immunfluoreszenz (Abb. 22B), was sowohl für eine erfolgreiche Slick-Deletion als auch für die Spezifität des Antikörpers spricht.

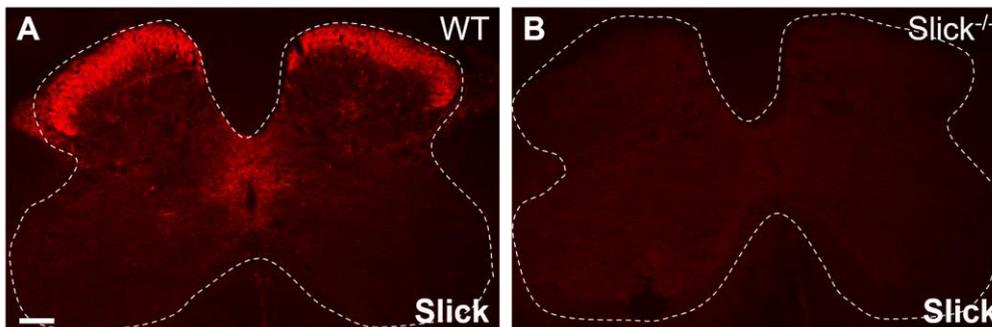


Abb. 22. Immunhistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick im Rückenmark. Slick-Immunfluoreszenzfärbung (rot) auf wildtypischem Rückenmarksgewebe (A) und Slick^{-/-}-Rückenmarksgewebe (B). Maßstab: 100 μ m.

Zur weiteren Charakterisierung der Lokalisation von Slick im Dorsalhorn des Rückenmarks wurden Ko-Färbungen mit den Markern CGRP (Marker der Lamina I und II₀), IB4 (Marker der inneren/ dorsalen Lamina II, II_{id}) und VGLUT3 (Marker der inneren/ ventralen Lamina II, II_{iv}) angefertigt (Abraira et al. 2017; Peirs and Seal 2016). Wie in Abb. 23A bis I dargestellt, ist in den Epifluoreszenz-Aufnahmen Slick mit allen drei Markern des Dorsalhorns kolokalisiert. Daraus kann geschlossen werden, dass Slick in den Laminae I bis II_{iv} lokalisiert ist.

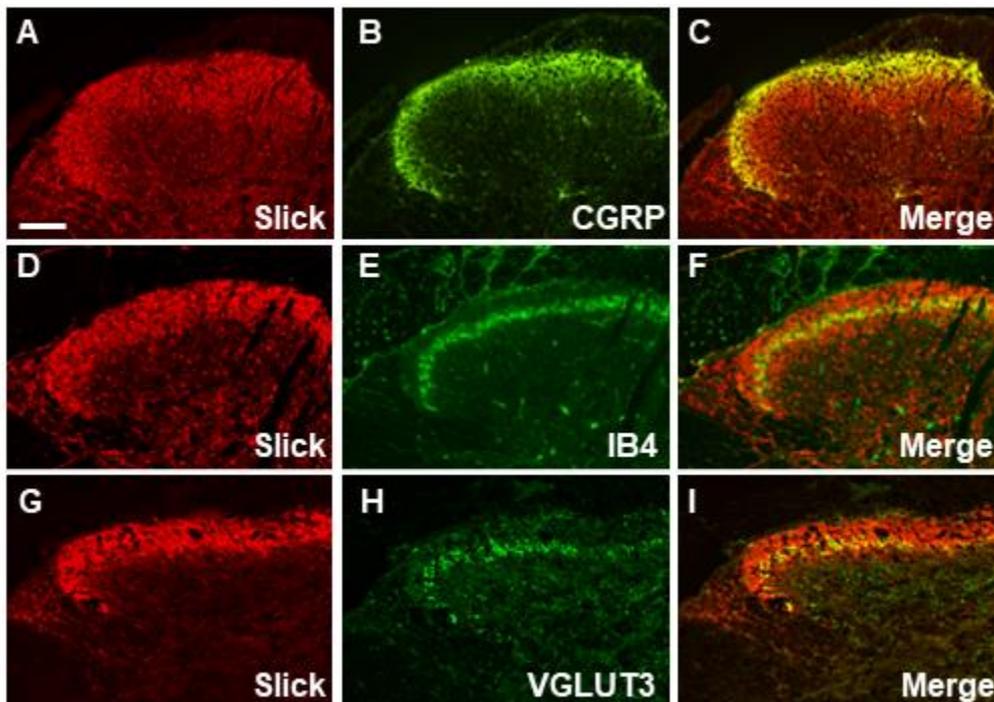


Abb. 23. Immunhistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick im Rückenmark anhand von Doppelfärbungen. (A-I) Doppelte immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Slick und CGRP (A-C), Marker der Lamina I und II_o, IB4 (D-F), welches die innere/ dorsale Lamina II (Lamina II_{i/d}) im Dorsalhorn des Rückenmarks färbt und VGLUT3 (G-I), einem Marker für die innere/ ventrale Lamina (Lamina II_{i/v}). Die Kolo-kalisation ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 100 µm.

Außerdem wurde die Expression der Slick mRNA im Rückenmark mittels In-situ-Hybridisierung untersucht. Abb. 24A zeigt, dass Slick mRNA (rot) im schmerzrelevanten Bereich des Dorsalhorns exprimiert ist. Bei der entsprechenden Typ1-gelabelten *Scramble*-Kontrolle, die als Negativkontrolle mitgeführt wurde, wurde dagegen kein fluoreszierendes Signal detektiert (Abb. 24B). Zur detaillierteren Untersuchung der Slick-Expression im Rückenmark wurden doppelte In-situ-Hybridisierungen von Slick mit VGLUT2 und VGAT, Marker exzitatorischer bzw. inhibitorischer Neurone im Dorsalhorn, durchgeführt. Slick mRNA wurde sowohl in VGLUT2- als auch in VGAT-positiven Neuronen (grün) detektiert (Abb. 24C bis H). In Abb. 24I ist der prozentuale Anteil der Slick mRNA in VGLUT2- und VGAT-positiven Zellen angegeben. Demnach wurde Slick mRNA zu 23,33 % ± 3,55 % in exzitatorischen und zu 42,12 % ± 2,17 % in inhibitorischen Neuronen nachgewiesen (VGLUT2: n = 7, VGAT: n = 12).

Somit konnte Slick mRNA vorwiegend in inhibitorischen Interneuronen nachgewiesen werden. In welchen Zellen die restlichen circa 35 % der detektierten Slick mRNA exprimiert sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert.

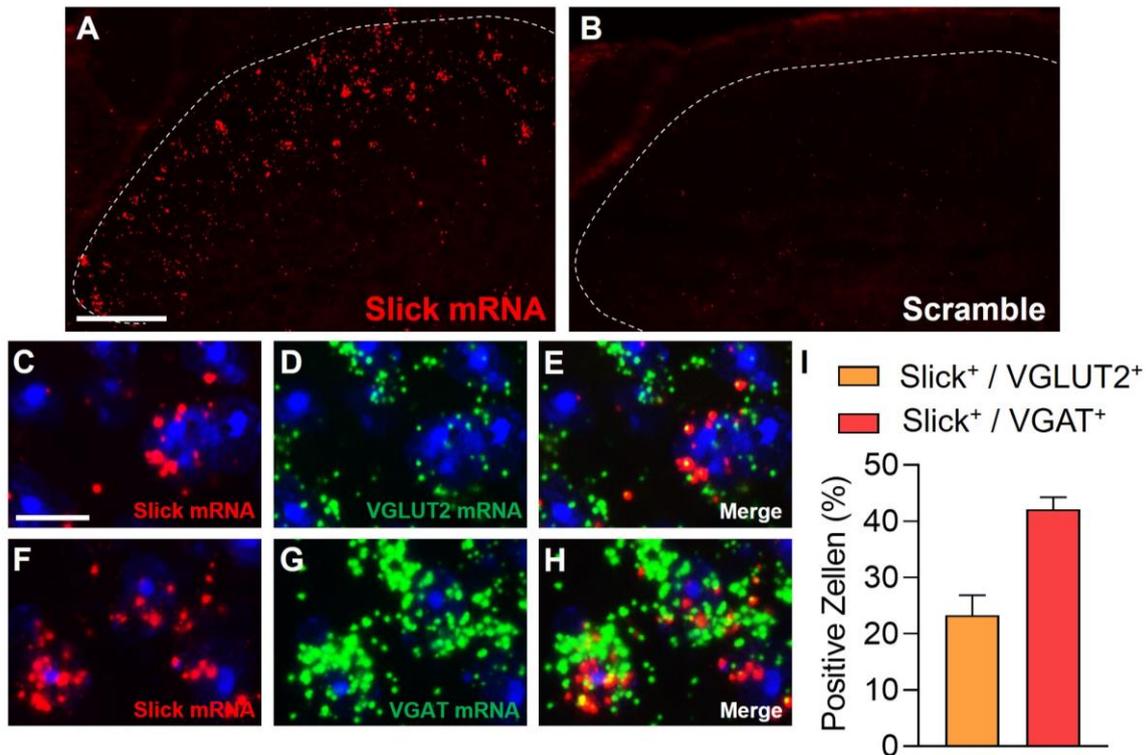


Abb. 24. In-situ Hybridisierung von Slick und Marker für exzitatorische (*Vesicular Glutamate Transporter 2*, VGLUT2) und inhibitorische Neurone (*Vesicular GABA Transporter*, VGAT) des Dorsalorns auf Rückenmarksschnitten. (A) Dargestellt ist das Hybridisierungssignal der Slick-Sonde gegen Slick mRNA (rot). (B) *Scramble*-Kontrolle als Negativkontrolle. Maßstab: 100 μ m. (C-E) Doppelte In-situ-Hybridisierung von Slick (rot) und einer Sonde zur Detektion von VGLUT2-positiven Neuronen (grün). (F-H) Doppelte In-situ-Hybridisierung von Slick (rot) und einer VGAT-Sonde gegen VGAT mRNA (grün). Die Zellkerne sind mit DAPI gefärbt (blau). Maßstab: 10 μ m. (I) Quantifizierung der Slick mRNA-Expression in exzitatorischen und inhibitorischen Neuronen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 7-12$ Versuchstieren dargestellt, Anzahl ausgezählter Neurone: 3.380.

3.3.2 Zelluläre Lokalisation von Slick in den Spinalganglien

Zur Charakterisierung der zellulären Lokalisation von Slick in Spinalganglien wurden immunhistochemische Färbungen an DRG-Schnitten durchgeführt. Die immunhistochemische Untersuchung ergab, dass $9,3\% \pm 2,4\%$ der Spinalganglien Slick exprimieren (Abb. 25A, J). In Slick^{-/-}-Gewebe wurde hingegen keine Slick-Immunfluoreszenz detektiert (Abb. 25B). Eine doppelte Immunfluoreszenzfärbung von Slick und CGRP, einem Marker für peptiderge primär afferente Neurone, ergab, dass $91,5\% \pm 8,5\%$ der Slick-positiven Zellen, ebenso positiv für CGRP waren. Dagegen zeigten nur $36,3\% \pm 8,0\%$ der CGRP-positiven Zellen eine Slick-Expression, was darauf hindeuten könnte, dass Slick nur in einem bestimmten Cluster von CGRP-positiven Zellen zu finden ist. Weiter wurde in $93,9\% \pm 6,1\%$ der Slick-positiven Zellen ein immunhistochemisches Signal für NF200, einem Marker für myelinisierte primär afferente Neurone, detektiert. $90,2\% \pm 9,8\%$ der Slick-positiven Zellen exprimieren sowohl CGRP als auch NF200 (Abb. 25C-F, J), was auf

eine Lokalisation von Slick in A δ -Fasern hindeutet. Im Gegensatz zu Slack scheint Slick nicht in Isolektin B4-positiven (IB4) Zellen exprimiert zu sein (Abb. 25G-J).

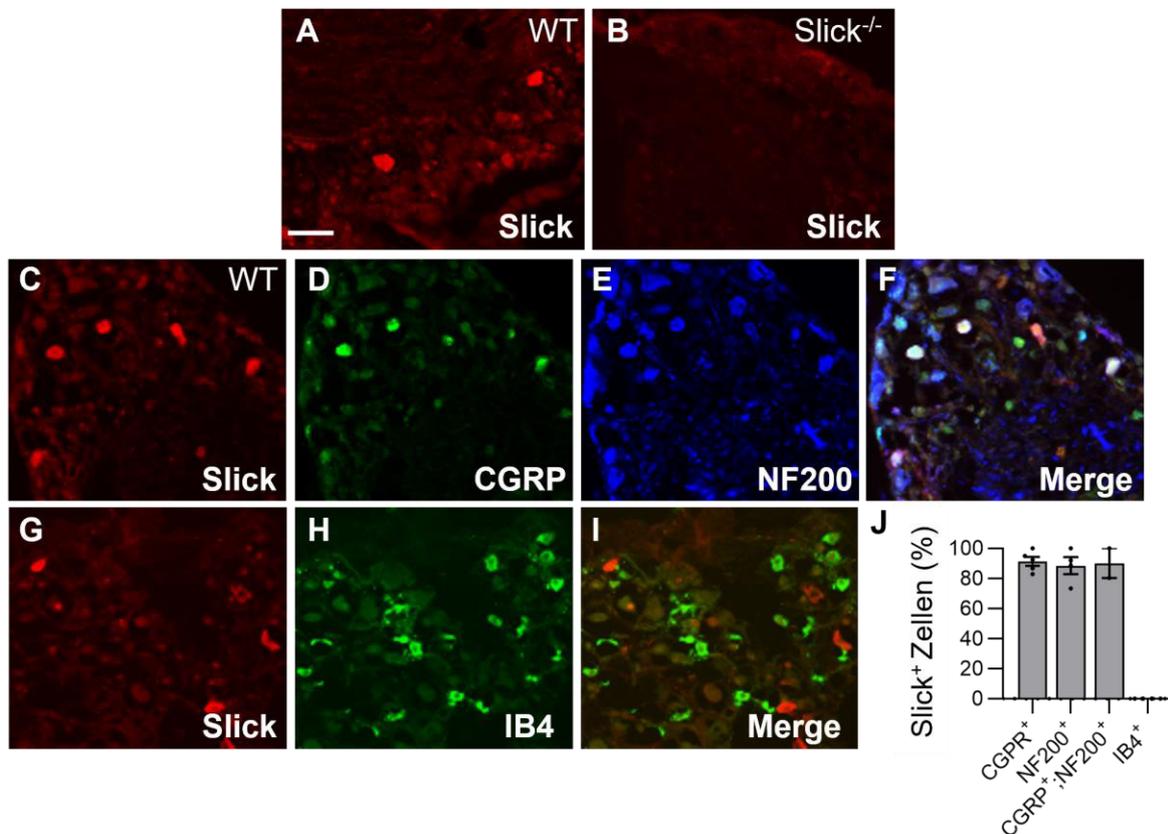


Abb. 25. Immunohistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick in Spinalganglien. Slick-Immunfluoreszenzfärbung (rot) auf wildtypischem Gewebe (A) und Slick^{-/-}-Gewebe (B). (C-I) Doppelte immunohistochemische Fluoreszenzfärbung von Slick (rot), CGRP (grün), einem Marker für peptiderge primär afferente Neurone, NF200 (blau), einem Marker für myelinisierte primär afferente Neurone (C-F) und IB4 (grün), einem Marker für nicht-peptiderge C-Faser Neurone (G-I). Maßstab: 50 μ m. (J) Quantifizierung der Slick Protein-Expression in Marker-positiven Zellen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von n = 3-5 Versuchstieren dargestellt, Anzahl ausgezählter Neurone: 5.959.

3.3.3 Basale Charakterisierung von Slick^{-/-}-Mäusen

Zur Charakterisierung der Rolle von Slick im nozizeptiven System wurde das Verhalten von globalen Slick^{-/-}-Mäusen und den entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwistern untersucht. Hierfür wurden sechs bis zwölf Wochen alte Versuchstiere verwendet. Die Generierung der Slick^{-/-}-Mäuse wurde von Martinez-Espinosa et al., 2015, beschrieben und im Zuge dessen wurde von keiner Belastung der globalen Slick^{-/-}-Tiere berichtet (Martinez-Espinosa et al. 2015). Die Slick^{-/-}-Mäuse und die wildtypischen Wurfgeschwister wurden durch Verpaarung heterozygoter Mäuse erhalten. Sie sind lebens- und vermehrungsfähig und hinsichtlich des Aussehens phänotypisch unauffällig.

Zur Differenzierung zwischen Knockout-, Wildtyp- und heterozygoten Tieren wurde eine Genotypisierung durchgeführt (Abb. 26A). Zur Überprüfung des erfolgreichen Rauskreuzens der Cre-Rekombinase wurde ebenfalls eine PCR durchgeführt. Bei Wildtyp-Mäusen wurde eine DNA-Bande bei 579 Basenpaaren (bp) detektiert, wohingegen bei Slick^{-/-}-Mäusen nach Deletion des markierten Bereichs des Slick-Gens ein Fragment der Größe 269 bp amplifiziert wurde. Heterozygote Tiere weisen entsprechend eine DNA-Bande bei 579 bp und eine weitere bei 269 bp auf (Abb. 26A). Die Tiere wurden mit einer Verteilung von 19 % Wildtyp-, 49 % heterozygoten und 32 % Knockout-Tieren geboren (Abb. 26B). Damit wurden bei der betrachteten n-Zahl von 297 Mäusen etwa 10 % mehr Knockout- als Wildtyp-Tiere geboren. Dennoch entspricht die prozentuale Verteilung der Genotypen in etwa der Mendel'schen Verteilung. Zudem wurde die Häufigkeit der Geschlechter der Genotypen untersucht, wobei etwa 10 % mehr Männchen als Weibchen geboren wurden (Abb. 26C).

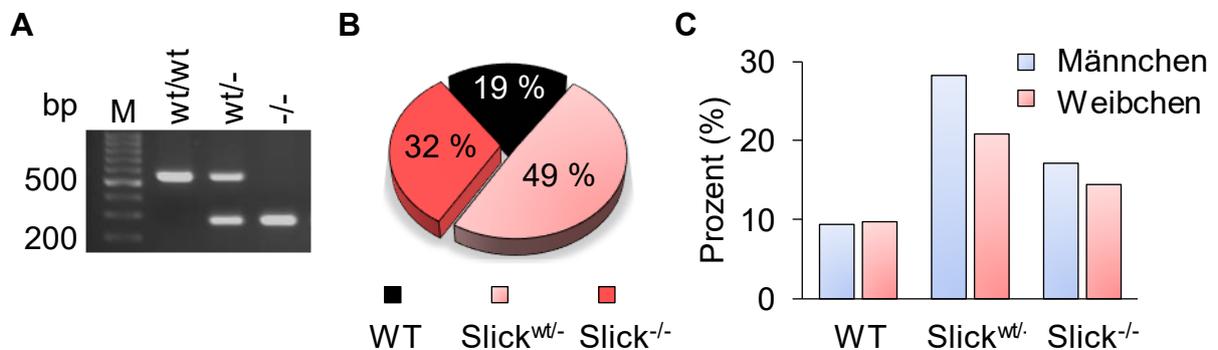


Abb. 26. Genotypisierung von Slick^{-/-}-Mäusen und deren Wurfgeschwistern sowie prozentuale Verteilung der Genotypen und Geschlechterverteilung in der Slick^{-/-}-Zucht. (A) Genotypisierung der Slick^{-/-}-Tiere: Wildtyp (WT): 579 bp, heterozygot: 579 + 269 bp, Knockout (KO): 269 bp. (B) Darstellung der prozentualen Verteilung der Geburtenrate (n = 297). Es wurden 19,19 % Wildtyp-, 49,16 % heterozygote und 31,65 % Knockout-Mäuse geboren. (C) Darstellung der Häufigkeit der Geschlechter der Genotypen. Es wurden insgesamt 54,88 % Männchen und 45,12 % Weibchen geboren.

Weiter wurde das Wachstum der Versuchstiere hinsichtlich des Körpergewichts und der Körpergröße untersucht. Die Körpergröße stellt die naso-anal gemessene Länge der Maus dar. Über eine Beobachtungszeit von zwölf Wochen (84 Tagen) konnte kein Unterschied in der Entwicklung männlicher und weiblicher Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verzeichnet werden (Abb. 27).

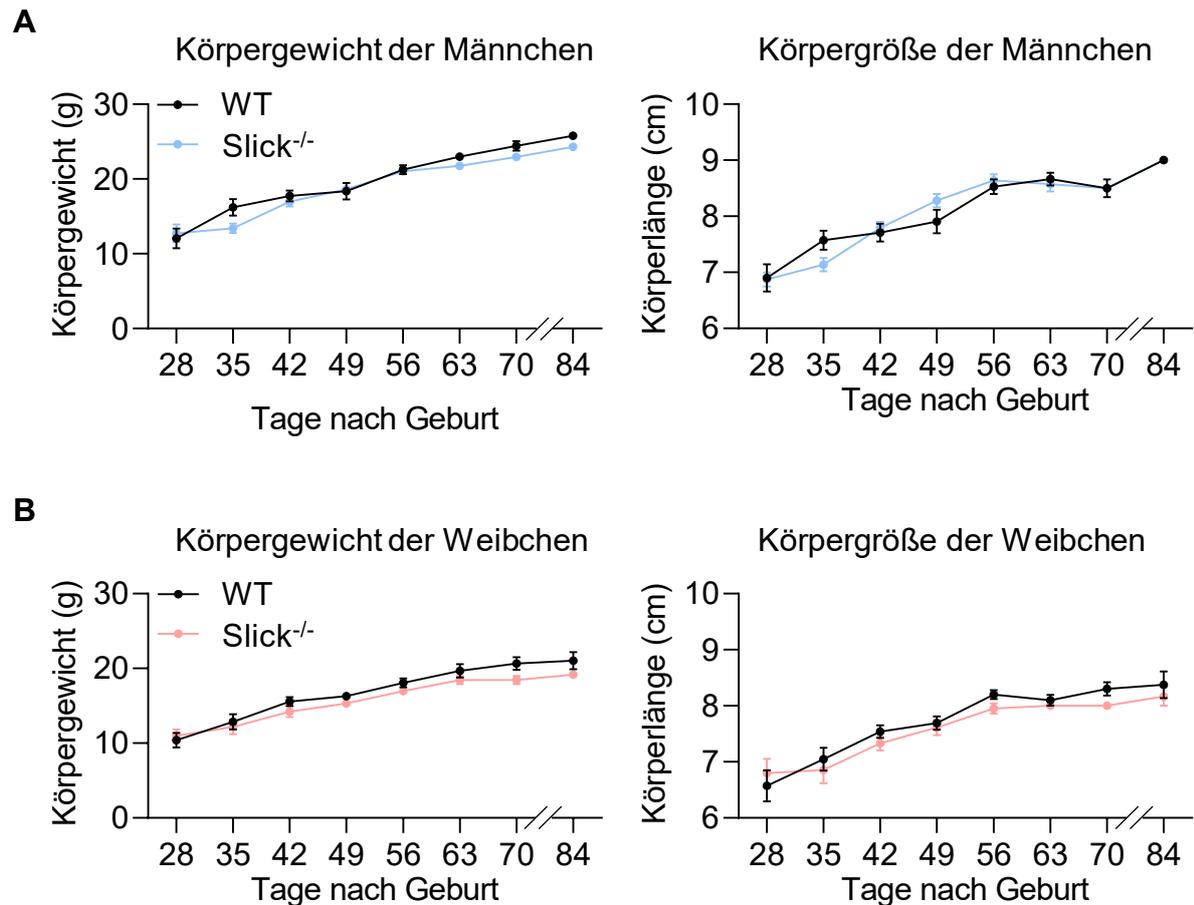


Abb. 27. Körpergewicht und Körpergröße von männlichen und weiblichen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. (A) Auf der linken Seite ist die Zunahme des Körpergewichts männlicher Versuchstiere über einen Zeitraum von zwölf Wochen dargestellt. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte \pm SEM von $n = 5-19$ Versuchstieren. Auf der rechten Seite ist das Längenwachstum männlicher Versuchstiere über zwölf Wochen dargestellt. Gemessen wurde die naso-anale Länge der Maus. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-19$ Versuchstieren dargestellt. (B) Körpergewicht und Körpergröße von weiblichen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen über eine Beobachtungszeit von zwölf Wochen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4-14$ (links) und $n = 4-13$ (rechts) Versuchstieren angegeben. Statistik: Mixed-effects model & Sidak's Test.

Morphologie des Rückenmarks und der Spinalganglien

Zur Untersuchung, ob die globale Deletion von Slick zu morphologischen Änderungen des Rückenmarks bzw. der Spinalganglien führt, wurden Gefrierschnitte mit Gewebe von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen immunhistochemisch untersucht. Als Marker zur histologischen Beurteilung des Rückenmarks dienten NF200, CGRP und IB4. Das Rückenmark von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen unterschied sich weder in der Größe noch in der Struktur vom Wildtyp-Gewebe. Durch Immunfluoreszenzfärbung von CGRP und IB4 können die Strukturen von Lamina I (CGRP) und Lamina II (IB4) des Dorsalhorns des Rückenmarks von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verglichen werden. Wie in Abb. 28A und B dargestellt, zeigte das Rückenmark von Slick^{-/-}-Mäusen keine strukturellen Veränderungen. In den Spinalganglien wurde neben den oben genannten Marker auch die Expression von TRPV1 und Substanz P

untersucht. Der prozentuale Anteil der Marker-positiven Zellen war in DRGs von *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen vergleichbar (Abb. 28C).

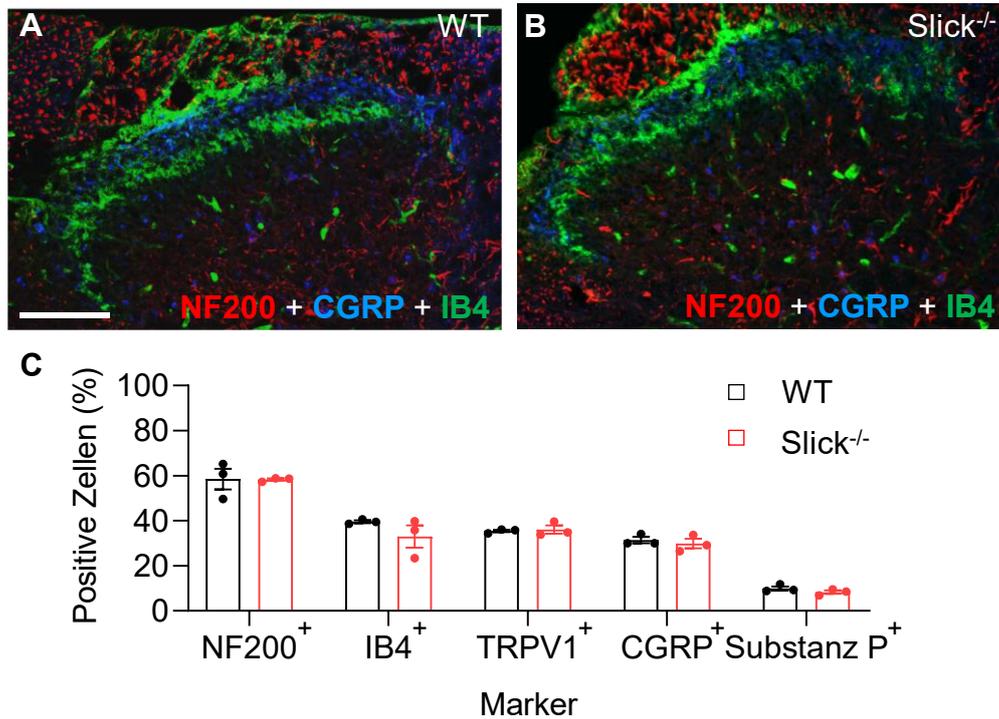


Abb. 28. Immunohistochemische Charakterisierung des Rückenmarks und der DRG-Neuronen Populationen in *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Immunfluoreszenzfärbungen mit den Markern NF200 (rot), CGRP (blau) und IB4 (grün) auf wildtypischen Rückenmarksgewebe (A) und *Slick*^{-/-}-Rückenmarksgewebe (B). Maßstab: 100 μ m. (C) Quantifizierung der DRG-Neuronen-Populationen in *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-DRGs. Dargestellt ist der prozentuale Anteil Marker-positiver Zellen bezogen auf die Gesamtzahl aller Zellen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Versuchstieren dargestellt, Anzahl ausgezählter Neurone: 19.622.

Expression der *Slick* mRNA

Der *Slick*-Knockout wurde auf mRNA Ebene mittels qPCR untersucht. Zur Zucht der *Slick*^{-/-}-Mäuse wurden Tiere eingesetzt, deren Exon 22 des *Slick*-Gens durch zwei loxP-Sequenzen flankiert war. Deswegen wurde zur Überprüfung der Expression der *Slick* mRNA ein Primerpaar verwendet, welches im Bereich des Exons 22 an die DNA bindet. Wie in Abb. 29A dargestellt, wurde in *Slick*^{-/-}-Tieren keine *Slick* mRNA detektiert, was für eine erfolgreiche Deletion des geflochtenen Exons spricht. Aufgrund der strukturellen und funktionellen Ähnlichkeit zum Slack-Kanal wurde auch die relative Slack mRNA-Expression in Geweben von *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen mittels qPCR untersucht. Weder im Rückenmark noch in den Spinalganglien sowie im cerebralen Cortex wurde ein Unterschied in der relativen Slack mRNA-Expression von *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verzeichnet (Abb. 29B). So konnte eine eventuelle kompensatorische Regulation des Slack-Kanals in *Slick*^{-/-}-Mäusen ausgeschlossen werden. Weiter wurde auch die relative Slo1 mRNA-Expression in *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen untersucht, die ebenfalls keinen Unterschied im Slo1 mRNA-

Level von Slick^{-/-}-Mäusen und den entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwistern ergab (Abb. 29C).

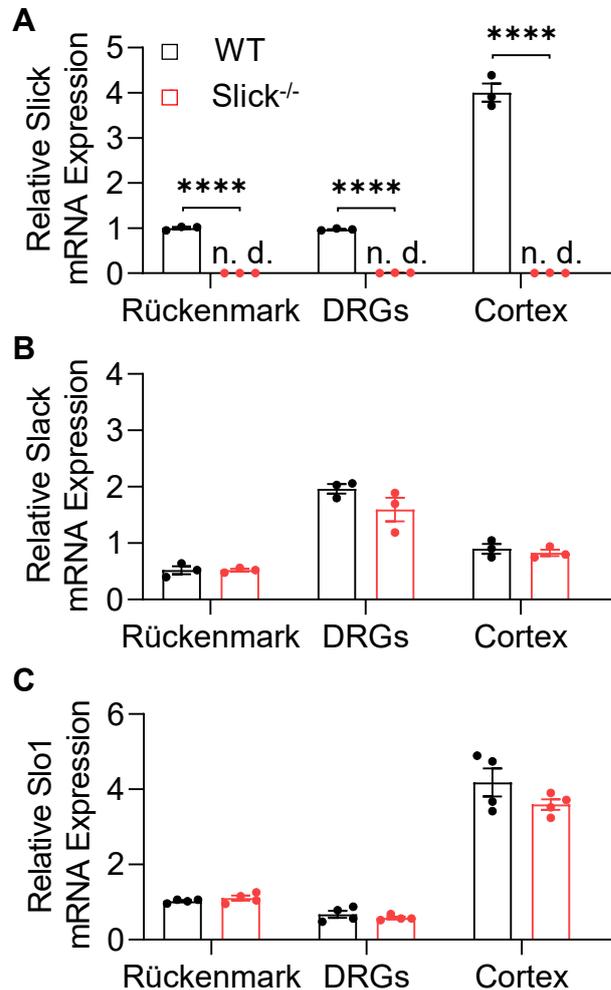


Abb. 29. Relative Expression der Slick, Slack und Slo1 mRNA im Rückenmark, in DRGs und im cerebralen Cortex von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. (A) Dargestellt ist die relative Slick mRNA-Expression bezogen auf GAPDH als Referenzgen. (B) Dargestellt ist die relative Slack mRNA-Expression bezogen auf GAPDH als Referenzgen. (C) Dargestellt ist die relative Slo1 mRNA-Expression bezogen auf GAPDH als Referenzgen. Statistik: ungepaarter t-Test, **** p < 0,0001. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 3-4 Versuchstieren dargestellt.

Open Field-Test

Um die Aktivität und das explorative Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen zu untersuchen, wurden die Tiere im *Open Field*-Test in einem Beobachtungszeitraum von 30 Minuten von einem Video-System (VideoMot2) aufgezeichnet. Es konnte kein Unterschied im prozentualen Anteil der Zeit, die die Mäuse in Bewegung bzw. Ruhe verbrachten, sowie in der in dieser Periode zurückgelegten Wegstrecke zwischen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Abb. 30). Der globale Knockout von Slick scheint demnach die Aktivität und das explorative Verhalten von Mäusen nicht zu beeinflussen.

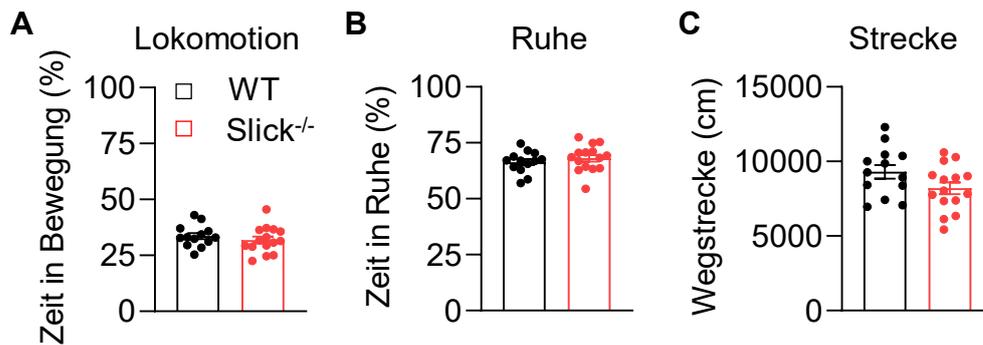


Abb. 30. Verhalten von Slick^{-/-} und Wildtyp-Mäusen im *Open Field*-Test. Darstellung des prozentualen Anteils der Zeit in Bewegung (A) sowie in Ruhe (B). (C) Darstellung der in 30 Minuten zurückgelegte Wegstrecke in cm. Statistik: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 13-15$ Versuchstieren dargestellt.

Motorische Koordination

In vivo Untersuchungen des Schmerzverhaltens werden oftmals durch motorische Reaktionen auf schmerzinduzierende Stimuli quantifiziert. Daher ist eine intakte Motorik der Versuchstiere Voraussetzung, um die Mäuse in weiteren Schmerzmodellen charakterisieren zu können. Die motorische Koordination und Balance der Slick^{-/-} und Wildtyp-Mäuse wurde mittels des Rotarod-Tests überprüft. Sowohl Slick^{-/-} als auch Wildtyp-Mäuse erreichten spätestens nach der Trainingsphase die *Cut-Off*-Zeit von 120 Sekunden, sodass von einer intakten Motorik der Versuchstiere ausgegangen werden kann. Es wurden insgesamt 16 Slick^{-/-} und 16 wildtypische Wurfgeschwister im Rotarod-Test untersucht.

Fäkale Boli

Da die Slick-Expression im enterischen Nervensystem stark ausgeprägt ist (Zeisel et al. 2018), wurde die gastrointestinale Aktivität mittels der Bestimmung der Anzahl an fäkalen Ausscheidungen über einen bestimmten Zeitraum untersucht. Wie in Abb. 31 dargestellt, gab es hinsichtlich der gastrointestinalen Aktivität der Slick^{-/-} und Wildtyp-Mäuse keinen Unterschied. Slick^{-/-}-Mäuse und ihre wildtypischen Wurfgeschwister schieden innerhalb 60 Minuten vergleichbar viele fäkale Boli aus.

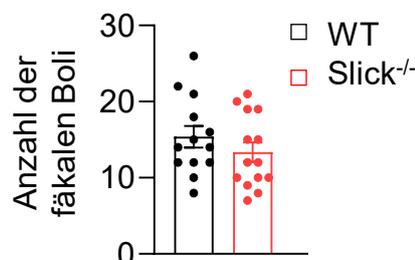


Abb. 31. Anzahl an fäkalen Ausscheidungen über einen Zeitraum von 60 Minuten repräsentierend für die gastrointestinale Aktivität der Slick^{-/-} und Wildtyp-Mäuse. Es wurde kein Unterschied in der Anzahl an fäkalen Ausscheidungen verzeichnet. Statistik: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 13-14$ Versuchstieren dargestellt.

3.3.4 Nozizeptives Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen

Akutes nozizeptives Verhalten

Zur Untersuchung des akuten nozizeptiven Verhaltens von Slick^{-/-}-Mäusen wurden die Tiere in verschiedenen Schmerzmodellen nach thermischer und mechanischer Stimulation untersucht. Im *Hot-Plate*-Test konnte ein statistisch signifikanter Unterschied im nozizeptiven Verhalten der Slick^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyp-Mäusen festgestellt werden. Hierbei war bei Slick^{-/-}-Mäusen eine geringere thermische Schmerzschwelle bei 48 °C und 50 °C, die sich als verkürzte Latenzzeit widerspiegelt, zu verzeichnen (Abb. 32).

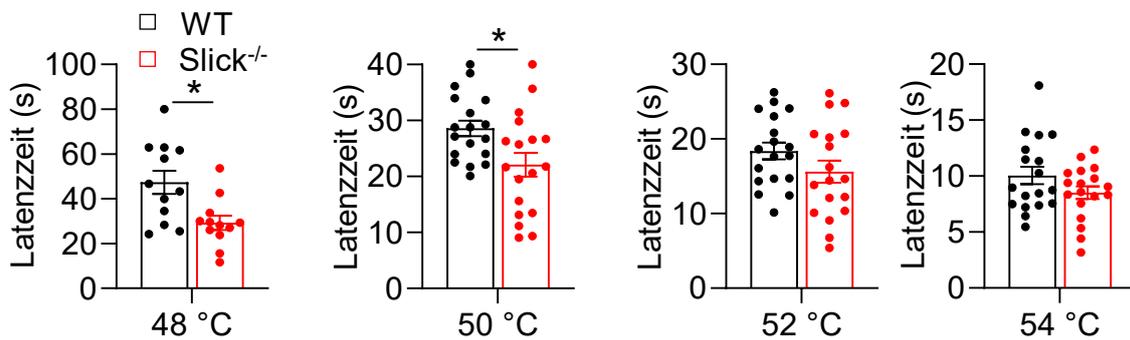


Abb. 32. *Hot-Plate*-Test zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Es wurden Temperaturen von 48 °C, 50 °C, 52 °C und 54 °C untersucht. Statistik: ungepaarter t-Test, * $p < 0,05$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 12-18$ Versuchstieren dargestellt.

Der *Hot Water Tail-Immersion*-Test dient der Bestimmung der durch spinale Reflexe vermittelten thermischen Schmerzschwelle (Deuis et al. 2017). Hierbei wurde das distale Ende des Schwanzes in ein temperiertes Wasserbad (45 °C bis 50 °C) getaucht und die Zeit bis zum reflexartigen Rückzug des Schwanzes bestimmt. Die Latenzzeit von Slick^{-/-}-Mäusen war im Vergleich zur Latenzzeit von wildtypischen Wurfgeschwistern bei Temperaturen von 46 °C, 47 °C und 48 °C verkürzt (Abb. 33). Dabei war der Unterschied in den Latenzzeiten statistisch signifikant. Folglich könnte Slick an der Verarbeitung akuter thermischer Reize von niedrigeren Temperaturen beteiligt sein.

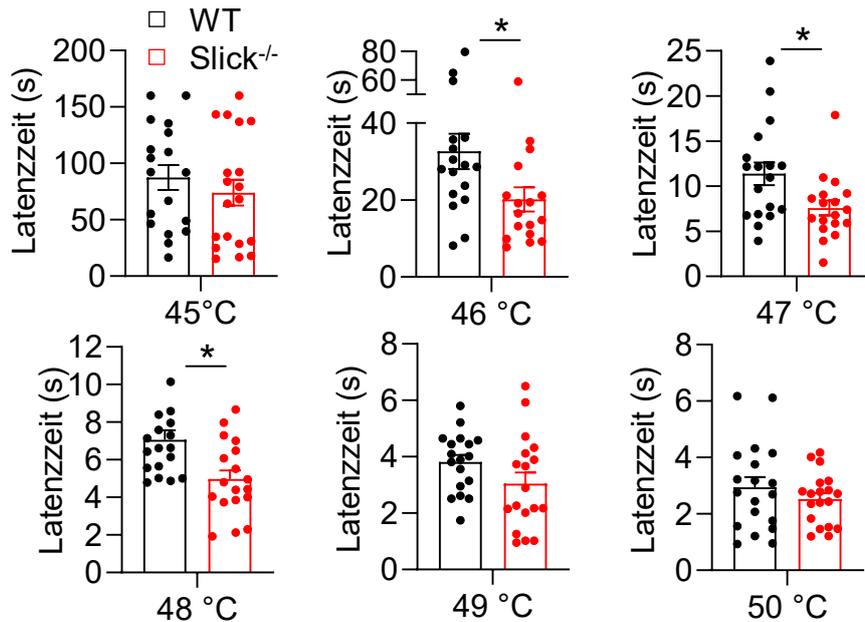


Abb. 33. Nozizeptives Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen im *Hot Water Tail-Immersion-Test*. Slick^{-/-}-Mäuse zeigten bei Temperaturen von 46 °C bis 48 °C eine statistisch signifikant verkürzte Latenzzeit und somit eine geringere thermische Schmerzschwelle. Bei höheren Temperaturen war kein Unterschied im Verhalten der Slick^{-/-}-Mäuse zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern zu verzeichnen. Statistik: ungepaarter t-Test, * p < 0,05. Die Daten sind Mittelwerte ± SEM von n = 17-19 Versuchstieren dargestellt.

Aufgrund des bestehenden Phänotyps im *Hot-Plate-* und *Hot Water Tail-Immersion-Test* wurde die thermische Reizschwelle im Hargreaves-Test untersucht. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Modellen zur Untersuchung der thermischen Schmerzschwelle konnte kein Unterschied in den Latenzzeiten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Hargreaves-Test festgestellt werden (Abb. 34). Zum einen wurde eine Intensität von 40 mit einem *Cut-Off* von 15 Sekunden getestet (Tomasello et al. 2017) (Abb. 34A, links), zum anderen eine Intensität von 25 mit einem *Cut-Off* von 20 Sekunden (Abb. 34A, rechts).

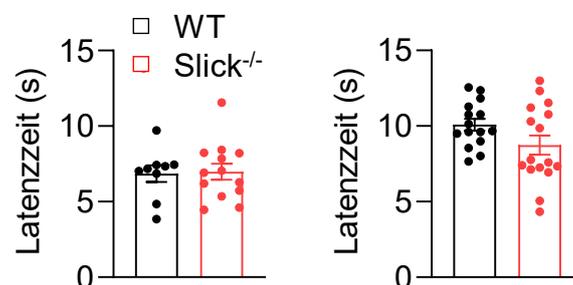


Abb. 34. Nozizeptives Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen in Modellen zur Bestimmung der thermischen Schmerzschwelle. Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Hargreaves-Test bei einer Intensität von 40 (links) und 25 (rechts). Statistik: links: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 9-13 Versuchstieren dargestellt. Rechts: ungepaarter t-Test, p = 0,0888. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 15-16 Versuchstieren dargestellt.

Das Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen nach Kältestimulation wurde ebenfalls untersucht. Im *Cold-Plate*-Test konnte zwischen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Tieren weder in der Latenzzeit der ersten Reaktion auf den Kälte-Stimulus noch in der Summe aller Reaktionen in fünf Minuten ein Unterschied festgestellt werden (Abb. 35A). Auch im *Cold-Plantar*-Test konnte im Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen kein Unterschied detektiert werden (Abb. 35B).

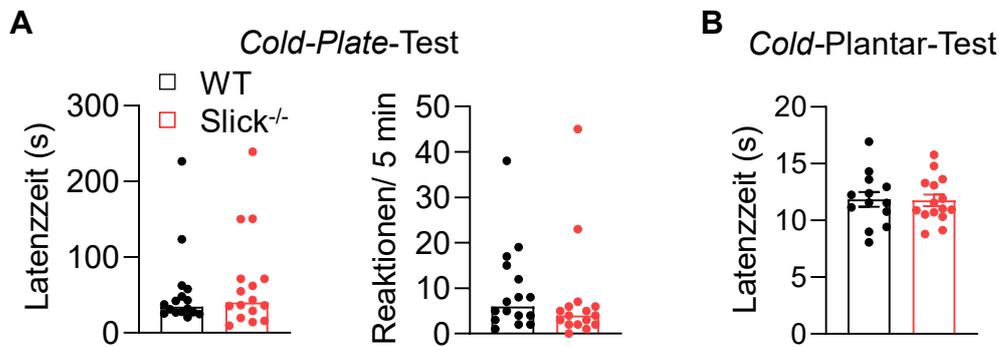


Abb. 35. Nozizeptives Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen in Modellen für akute Kälteschmerzen. (A) Darstellung der Latenzzeit bis zur ersten positiven Reaktion auf einen Kältestimulus von 2 °C (links) und der Summe der Reaktionen in fünf Minuten (rechts) im *Cold-Plate*-Test. Statistik: *Mann-Whitney*-Test. Die Daten sind als Mediane von n = 16 Versuchstieren dargestellt. (B) *Cold-Plantar*-Test mit Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Statistik: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 13-15 Versuchstieren dargestellt.

Neben den Modellen nach thermischer Stimulation wurde das Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen in Modellen nach mechanischer Stimulation untersucht. Der Dynamic Plantar- und der von Frey-Test dienen der Erfassung der mechanischen Schmerz- und Wahrnehmungsschwelle. Hierbei bestand kein Unterschied im Verhalten der Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse (Abb. 36).

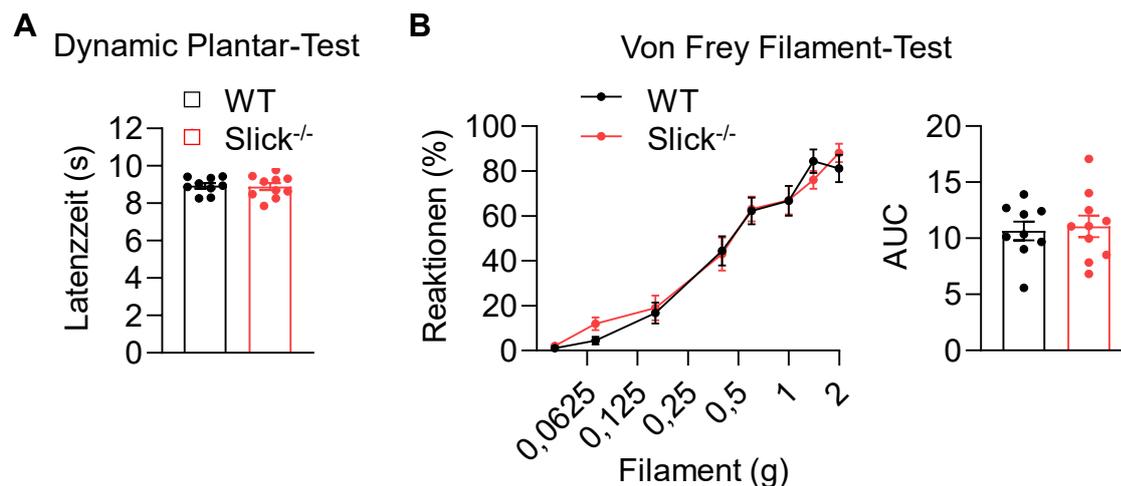


Abb. 36. Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen in Modellen nach mechanischer Stimulation. (A) Dynamic Plantar-Test mit Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Dargestellt ist die Latenzzeit bis zum Wegziehen der Hinterpfote nach einem mechanischen Stimulus. (B) Von Frey Filament-Test mit Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. Darstellung der Antwort auf die von Frey Filamente der entsprechenden Stärke in Prozent (links) und ausgedrückt als AUC (rechts). Statistik: A, B rechts: ungepaarter t-Test, B links: zweifaktorielle ANOVA. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 9-15 Versuchstieren dargestellt.

Der *Tail-Clip*-Test bestimmt die Schmerzschwelle bei Ausübung von mechanischem Druck. In diesem Test konnte ebenso kein Unterschied im Verhalten der *Slick*^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern festgestellt werden (Abb. 37).

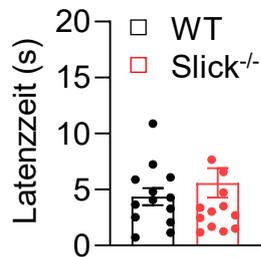


Abb. 37. Verhalten von *Slick*^{-/-}-Mäusen im *Tail-Clip*-Test. Statistik: ungepaarter t-Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 9-15$ Versuchstieren dargestellt.

Ein weiterer Test zur Untersuchung des Verhaltens nach mechanischer Stimulation stellt der *Tape-Response*-Test dar. Dieses Modell dient der Bestimmung der mechanischen Empfindung auf der behaarten Haut. Den Versuchstieren wurde ein Stück Laborklebeband auf den Rücken geklebt und die Latenzzeit bis zur ersten Reaktion auf das Band und die Gesamtzahl der Reaktionen innerhalb eines Zeitraums von fünf Minuten bestimmt. In Abb. 38 ist der Zeitverlauf der Reaktionen innerhalb von fünf Minuten (Abb. 38A), die Latenzzeit (Abb. 38B) und die Summe aller Reaktionen (Abb. 38C) dargestellt. Im Verhalten von *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen auf das Klebeband konnte kein Unterschied verzeichnet werden.

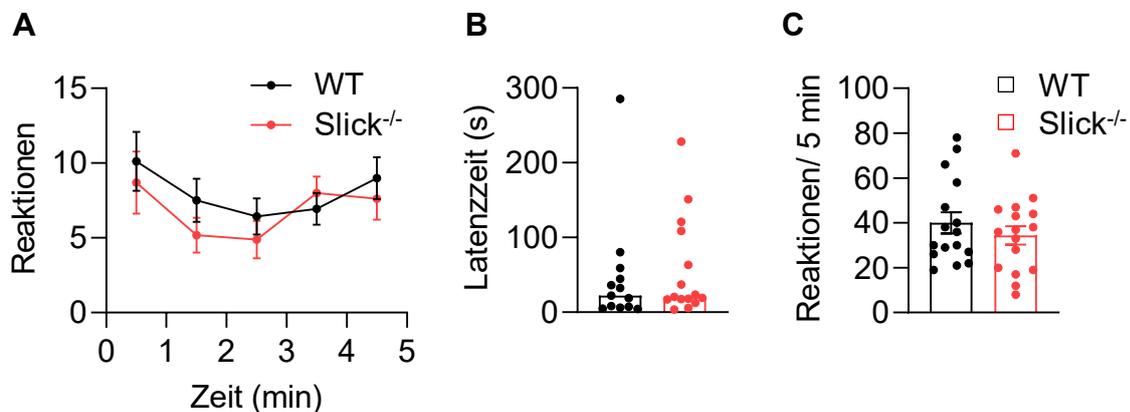


Abb. 38. Verhalten von *Slick*^{-/-}-Mäusen nach mechanischer Stimulation im *Tape-Response*-Test. Dargestellt ist der Zeitverlauf der Anzahl an Reaktionen pro Minute über eine Beobachtungszeit von fünf Minuten (A), die Latenzzeit bis zur ersten positiven Reaktion auf das Klebeband (B) und die Summe aller Reaktionen innerhalb von fünf Minuten (C). Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen (A), Mann-Whitney-Test (B), ungepaarter t-Test (C). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM (A, C) bzw. als Mediane (B) von $n = 16$ Versuchstieren dargestellt.

Aus diesen Daten wird ersichtlich, dass der globale Knockout des *Slick*-Kanals die akute thermische Nozizeption von vor allem niedrigeren Temperaturen beeinflusst, jedoch keinen

Einfluss auf die Verarbeitung von Hitzeschmerzen bei höheren Temperaturen, Kälteschmerzen sowie von mechanischen Stimuli hat.

Verhalten von *Slick*^{-/-}-Mäusen im Capsaicin-Test und Lokalisation von *Slick* und TRPV1 im Rückenmark

Weiter wurde das Verhalten von *Slick*^{-/-}-Mäusen und wildtypischen Wurfgeschwistern im Capsaicin-Test, einem Modell für akute chemisch-induzierte Schmerzen, untersucht. Capsaicin aktiviert TRPV1-Kanäle in C-Fasern (Gilchrist et al. 1996). Nach Capsaicin-Injektion wurde die Leckzeit pro Minute über insgesamt 15 Minuten beobachtet. Wie in Abb. 39 dargestellt, ist bei *Slick*^{-/-}-Mäusen, nicht jedoch bei Wildtyp-Mäusen, ein zweiphasiger Verlauf zu verzeichnen. Die erste Phase (0-3 Minuten nach Capsaicin-Injektion) war bei *Slick*^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren nicht verändert. Zwischen vier und 15 Minuten nach Injektion hingegen war bei *Slick*^{-/-}-Mäusen ein deutlich verstärktes Leckverhalten zu beobachten.

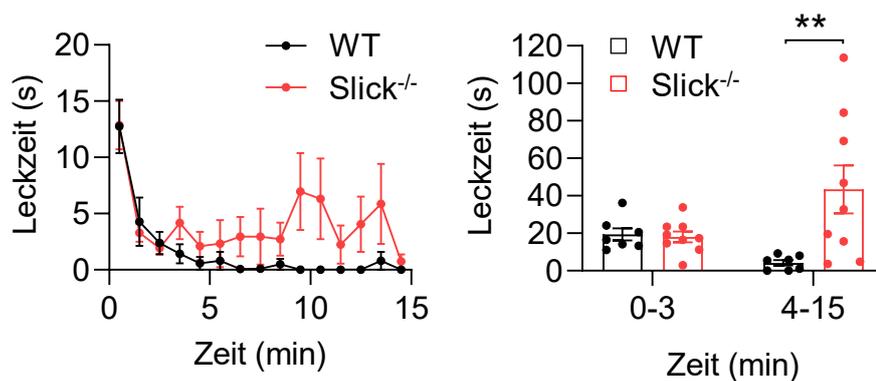


Abb. 39. Capsaicin-Test mit *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. (A) Zeitverlauf nach Capsaicin-Injektion (5 µg Capsaicin in 2 % DMSO in 20 µl Phosphatpuffer) in eine Hinterpfote. (B) Darstellung der Summe der Leckzeit 0-3 Minuten und 4-15 Minuten nach Injektion. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test, ** p < 0,01. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 7-9 Versuchstieren dargestellt.

Nach Identifizierung des Phänotyps der *Slick*^{-/-}-Mäuse im Capsaicin-Test, wurde die Lokalisation von *Slick* und TRPV1 im Rückenmark und DRGs genauer untersucht. Hierfür wurden immunhistochemische Färbungen von *Slick* und TRPV1 an Wildtyp-Gewebe angefertigt. Wie in Abb. 40A bis D dargestellt, wurde eine Kolokalisation von *Slick* mit TRPV1 im Dorsalhorn des Rückenmarks verzeichnet. Die zentralen Endigungen der TRPV1-positiven Nozizeptoren könnten somit mit *Slick*-positiven Interneuronen synaptisch verknüpft sein (Abb. 40D).

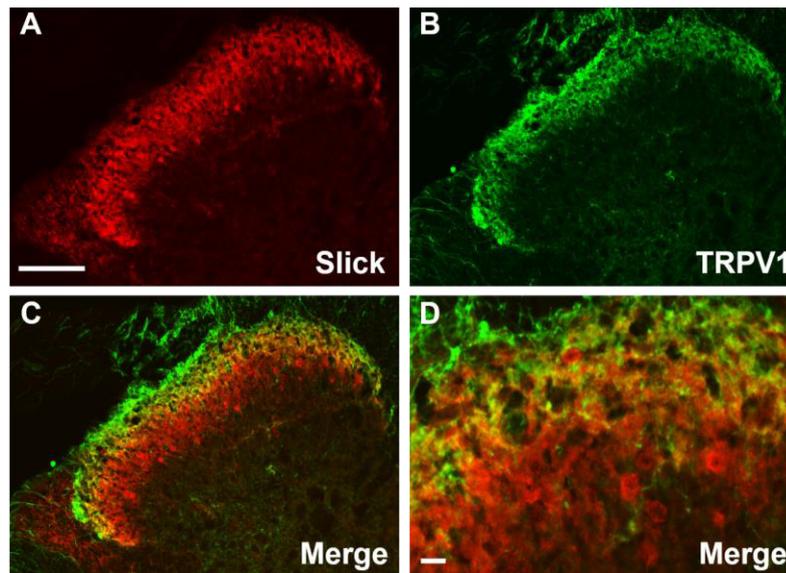


Abb. 40. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolokalisation von Slick und TRPV1 im Rückenmark. (A-D) Doppelte immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Slick (rot) und TRPV1 (grün). Die Kolokalisation ist in Gelb dargestellt. Maßstab: 100 μ m.

In immunhistochemischen Färbungen an wildtypischen DRG-Schnitten konnte dagegen keine Kolokalisation von Slick und TRPV1 festgestellt werden (Abb. 41).

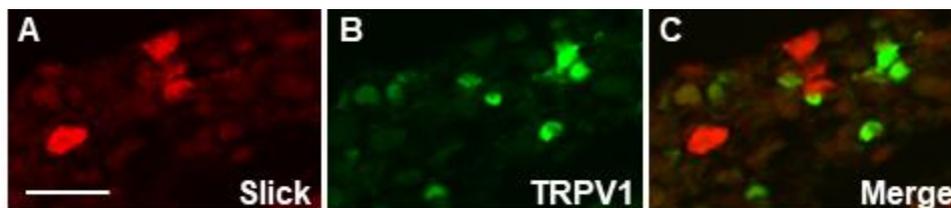


Abb. 41. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolokalisation von Slick und TRPV1 in Spinalganglien. (A-C) Doppelte immunhistochemische Fluoreszenzfärbung von Slick (rot) und TRPV1 (grün). Maßstab: 50 μ m.

Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen im Formalin-Test und Expression von c-Fos nach Formalin-Injektion

Um die Rolle von Slick bei der Verarbeitung eines weiteren chemischen nozizeptiven Stimulus zu untersuchen, wurde der Formalin-Test durchgeführt. Hierfür wurde den Versuchstieren eine 0,5%ige Formalin-Lösung in die Dorsalseite einer Hinterpfote injiziert und die Leckzeit pro Minute über einen Zeitraum von 60 Minuten bestimmt. Die Formalin-Injektion führt zu einer biphasischen Leckreaktion der Mäuse. Während die erste Phase (0-10 Minuten), die durch Aktivierung der TRPA1-Kanäle gebildet wird (McNamara et al. 2007), bei Slick^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu wildtypischen Wurfgeschwistern tendenziell, aber nicht signifikant, verändert war, zeigten Slick^{-/-}-Mäuse in der zweiten Phase (11-60 Minuten) ein statistisch signifikant verstärktes Leckverhalten (Abb. 42).

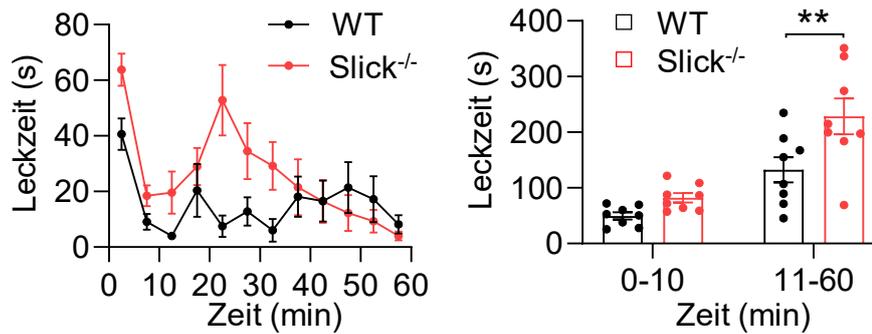


Abb. 42. Formalin-Test mit *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen. (A) Zeitverlauf nach 0,5%iger Formalin-Injektion in eine Hinterpfote. (B) Darstellung der zwei Phasen des Formalin-Tests als Summe des Leckverhaltens. Statistik: Zwei-Weg-ANOVA mit Messwiederholungen & Sidak's Test, ** $p < 0,01$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Versuchstieren dargestellt.

Sowohl *c-Fos*, das Protein des Protoonkogens *c-fos*, als auch die Phosphorylierung der Serin/ Threonin-Kinasen ERK dienen als Marker zur Quantifizierung neuronaler Aktivität und zentraler Sensibilisierung durch nozizeptive Stimuli. Unter physiologischen Bedingungen werden *c-Fos* und pERK kaum in Dorsalhornneuronen des Rückenmarks exprimiert (Gao and Ji 2009). Um der Fragestellung nachzugehen, ob das erhöhte Schmerzverhalten der *Slick*^{-/-}-Mäuse in der zweiten Phase des Formalin-Tests auf eine verstärkte *c-Fos* Expression in Dorsalhornneuronen zurückzuführen ist, wurde die Expression von *c-Fos* nach Formalin-Injektion im Rückenmark untersucht. Hierfür wurde Rückenmarksgewebe von *Slick*^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen 70 Minuten nach Formalin-Injektion entnommen. Nach Formalin-Injektion konnten im Rückenmark von Wildtyp-Mäusen $93,76 \pm 9,00$ *c-Fos*-positive Neurone identifiziert werden, während im Rückenmark von *Slick*^{-/-}-Mäusen $95,95 \pm 7,25$ Neurone immunreaktiv für *c-Fos* waren, was keinen signifikanten Unterschied ergab. Der Unterschied in der Anzahl an *c-Fos*-positiven Zellen zwischen der ipsi- und contralateralen Seite war jedoch bei beiden Genotypen statistisch signifikant, was für die typische Hochregulation von *c-Fos* nach nozizeptiver Stimulation spricht.

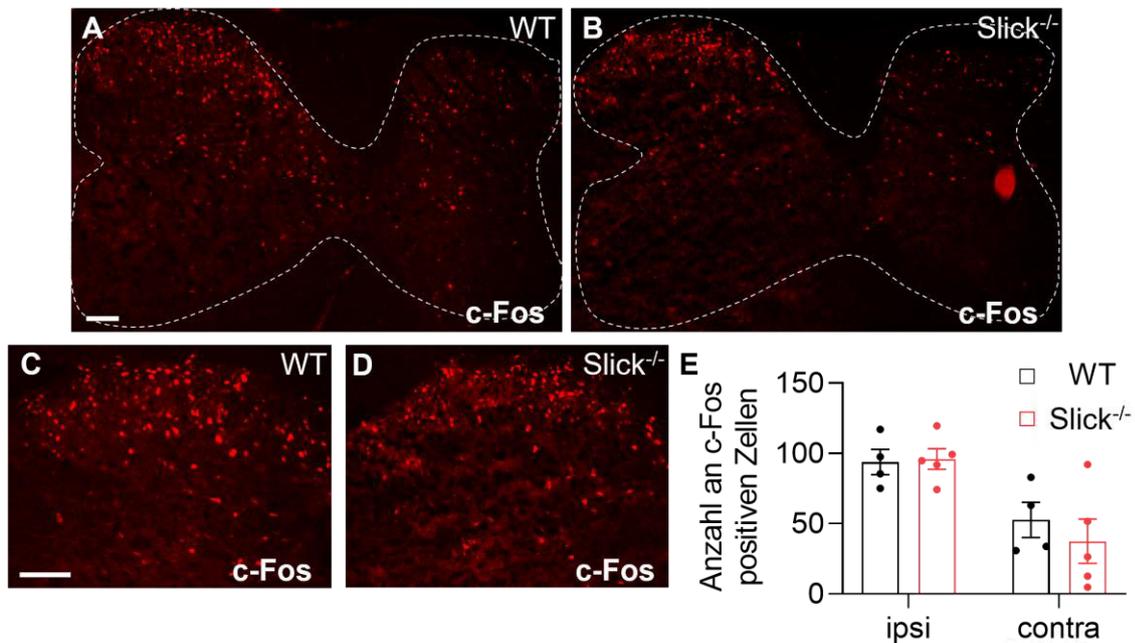


Abb. 43. Immunhistochemische Untersuchung der c-Fos-Expression im Rückenmark von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach Formalin-Injektion in eine Hinterpfote. (A-B) c-Fos-Immunfluoreszenzfärbung (rot) auf wildtypischen Rückenmarksgewebe (A) und Slick^{-/-}-Rückenmarksgewebe (B) 70 Minuten nach subkutaner Formalin-Injektion in die Dorsalseite einer Hinterpfote. (C-D) Vergrößerte Darstellung der ipsilateralen Seite des dorsalen Rückenmarks. Maßstab: 100 µm. (E) Quantifizierung der c-Fos positiven Zellen im ipsi- und contralateralen dorsalen Rückenmark nach Formalin-Injektion. Die Daten sind als Mittelwert ± SEM von n = 4-5 Versuchstieren dargestellt.

Trotz des erhöhten Schmerzverhaltens von Slick^{-/-}-Mäusen in der zweiten Phase des Formalin-Tests, unterschied sich die c-Fos-Expression im Rückenmark von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach Injektion der nozizeptiven Stimuli nicht.

Thermische Hyperalgesie von Slick^{-/-}-Mäusen nach Zymosan-Injektion

Um die funktionelle Bedeutung von Slick bei der Verarbeitung von persistierenden Entzündungsschmerzen zu untersuchen, wurde das Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen und entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwistern im Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung analysiert. In Abb. 44 sind die Latenzzeiten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen der ipsilateralen Pfoten nach Zymosan-Injektion dargestellt. Sowohl Slick^{-/-}- als auch Wildtyp-Mäuse entwickelten eine thermische Hyperalgesie (Abb. 44). Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Zymosan-Injektion wurde ein tendenzieller Unterschied in den Latenzzeiten zwischen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verzeichnet. Der Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant. Vier bis acht Stunden nach Zymosan-Injektion war die thermische Hyperalgesie am stärksten ausgeprägt, wobei kein Unterschied im Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen zu beobachten war.

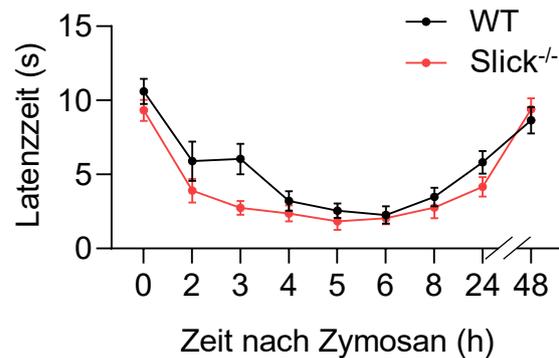


Abb. 44. Thermische Hyperalgesie von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach Zymosan-Injektion. Darstellung des Zeitverlaufs nach Injektion von 0,1 mg Zymosan in eine Hinterpfote. Statistik: Mixed-effects model & Sidak's Test. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 8$ Versuchstieren dargestellt.

Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen im Spared Nerve Injury- (SNI-) Modell und Expression der Slick mRNA nach SNI

Zur Charakterisierung der Funktion von Slick bei neuropathischen Schmerzen, wurden die Versuchstiere im SNI-Modell untersucht. Die mechanische Allodynie im lateralen Bereich der Hinterpfote ist etwa zehn Tage nach der Operation vollständig ausgeprägt. Sowohl Slick^{-/-}- als auch Wildtyp-Mäuse entwickelten nach sieben bis elf Tagen eine Hypersensitivität gegenüber mechanischen Stimuli (Abb. 45A, B). Nach 25 Tagen war bei Slick^{-/-}-Mäusen eine geringfügige Zunahme der Latenzzeit im Dynamic Plantar-Test zu verzeichnen, während die Latenzzeit der Wildtypen weitgehend konstant blieb. Die Zunahme der Latenzzeit war bis Tag 39 nach SNI zu beobachten. Der Gruppenunterschied der Genotypen war statistisch signifikant (Abb. 45A). Weiter wurde das spontane Schmerzverhalten der Versuchstiere mittels einer *Dynamic Weight-Bearing*-Apparatur erfasst. Hierbei wurde die Gewichtsverlagerung der Mäuse auf der operierten (links, L) bzw. der nicht behandelten Pfote (rechts, R) in einem Zeitraum von fünf Minuten bestimmt und das Verhältnis (L/R-Ratio) gebildet (Abb. 45B). In beiden Genotypen war eine stärkere Belastung der nicht behandelten Pfote und somit eine Abnahme der L/R-Quotienten zu beobachten. Über eine Beobachtungszeit von 34 Tagen wurde jedoch kein Unterschied im spontanen Schmerzverhalten zwischen Slick^{-/-}-Mäusen und wildtypischen Wurfgeschwistern verzeichnet (Abb. 45B).

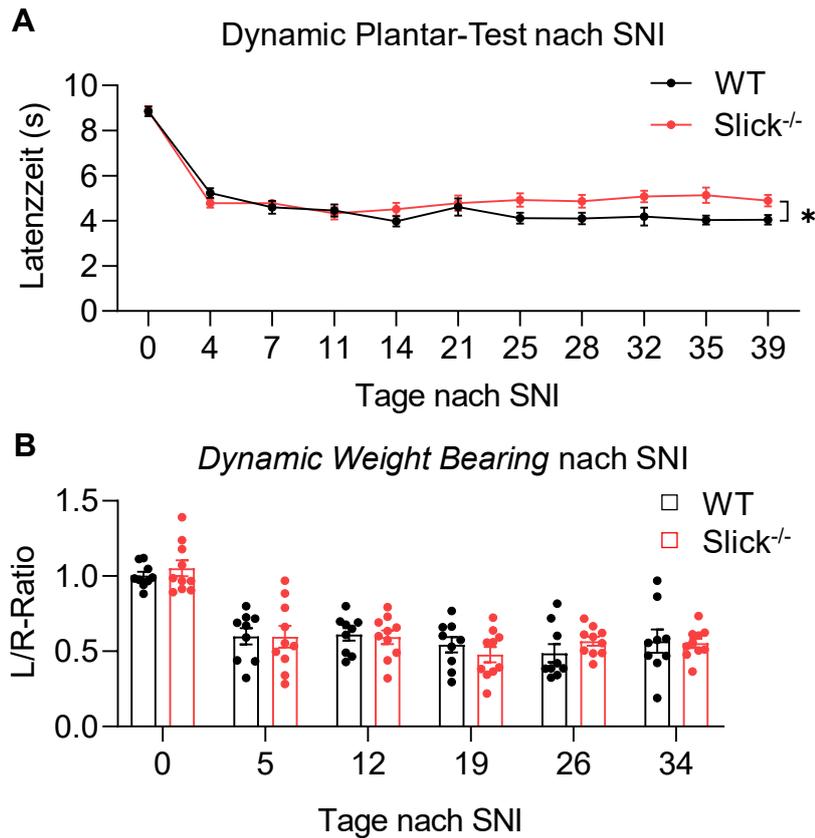


Abb. 45. Neuropathisches Schmerzverhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen nach peripherer Nervenverletzung durch SNI. (A) Darstellung des Zeitverlaufs der mechanischen Hyperalgesie im Dynamic Plantar-Test. (B) Darstellung des spontanen Schmerzverhaltens im *Dynamic Weight Bearing*-Modell. Die L/R-Ratio stellt die Belastung der behandelten im Verhältnis zur unbehandelten Pfote dar. Statistik: Mixed-effects model & Sidak's Test, * p < 0,05. Die Daten sind als Mittelwerte ± SEM von n = 8-10 Versuchstieren dargestellt.

Zur Untersuchung, ob das verringerte Schmerzverhalten von Slick^{-/-}-Mäusen im SNI-Modell mit einer veränderten Slick mRNA-Expression einhergeht, wurde wildtypisches Gewebe basal sowie sieben, 14, 21 und 28 Tage nach SNI mittels qPCR untersucht. In Abb. 46 ist die relative Slick mRNA-Expression im Rückenmark (Abb. 46A), contralateralen (Abb. 46B) und ipsilateralen DRGs (Abb. 46C, D) nach SNI dargestellt. Im Rückenmark und in contralateralen DRGs wurde kein verändertes mRNA-Level nach Nervenverletzung detektiert. In ipsilateralen DRGs dagegen wurde ein signifikanter Rückgang der Slick-Expression sieben Tage nach SNI verzeichnet (Abb. 46C, D). Die verringerte Slick Expression in den Spinalganglien zum Zeitpunkt sieben Tage nach peripherer Nervenverletzung wurde mit einem weiteren Primerpaar (Martinez-Espinosa et al. 2015) bestätigt (Abb. 46 D).

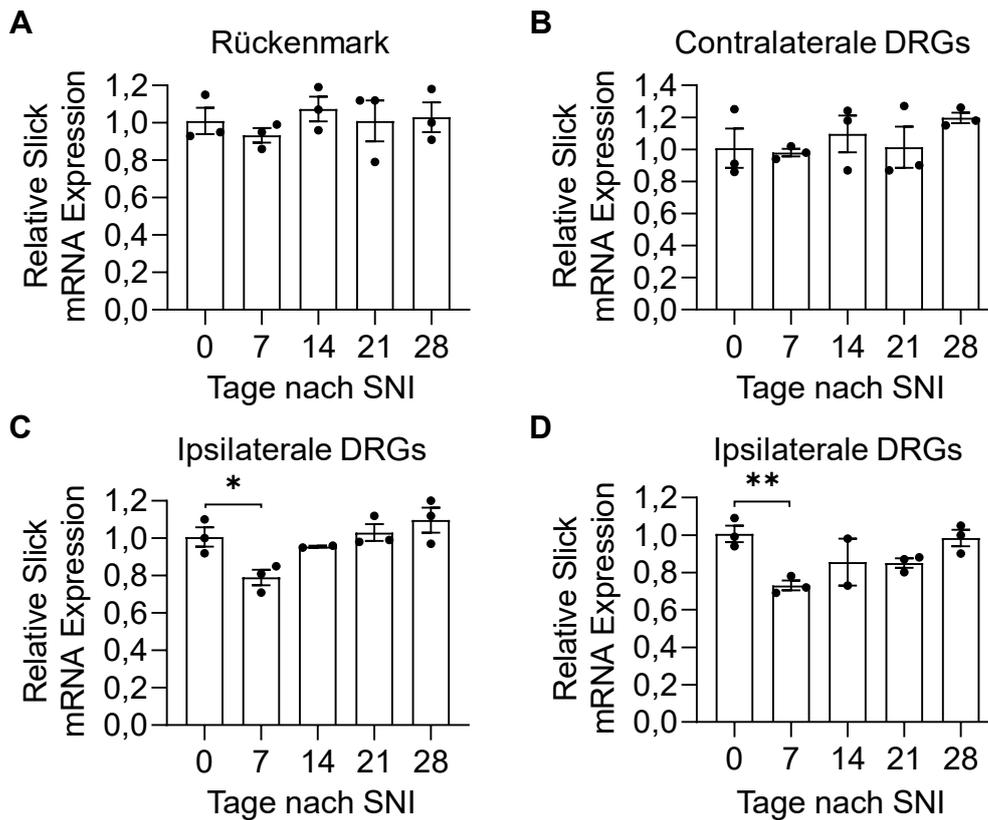


Abb. 46. Relative Expression der Slick mRNA im Rückenmark und in DRGs nach Nervenverletzung (SNI). Dargestellt ist die mittels qRT-PCR bestimmte relative Slick mRNA-Expression bezogen auf natives Gewebe und GAPDH als Referenzen im Rückenmark (A), in contralateralen (B) und ipsilateralen DRGs (C, D). Für die in D dargestellten Werte wurde ein zweites Slick-Primer-Paar verwendet. Statistik: Ein-Weg-ANOVA & Dunnett's Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 3$ Versuchstieren dargestellt.

3.4 Zucht der Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäuse

Um die Rolle von Slick im schmerzverarbeitenden System genauer zu untersuchen, sollten gewebsspezifische Knockout-Mauslinien mit spezifischer Deletion in Dorsalhornneuronen (Lbx_1 -Slick) generiert werden. Die Charakterisierung dieser konditionalen Knockout-Mauslinien könnte die Fragestellung klären, ob das veränderte Schmerzverhalten globaler Slick^{-/-}-Mäuse auf die Slick-Expression im Dorsalhorn des Rückenmarks zurückzuführen ist.

Die Strategie der Zucht ist in Abb. 47 schematisch dargestellt. Zunächst wurde in der F₀-Generation eine Cre-positive Maus (Lbx_1 -Cre) mit Wildtyp-Allelen für den Slick-Kanal ($Lbx_1^{Cre/wt}$ -Slick^{wt/wt}) mit einer homozygot geflochten, Cre-negativen Maus ($Lbx_1^{wt/wt}$ -Slick^{fl/fl}) verpaart. Letztere wies auf beiden Allelen loxP-Sites (gefloxt) um das Exon 22 des Slick-Gens auf. In der F₁-Generation wurden sowohl Cre-positive als auch Cre-negative Nachkommen geboren, die bezüglich des Slick-Gens heterozygot gefloxt waren ($Lbx_1^{Cre/wt}$ -Slick^{wt/fl}; $Lbx_1^{wt/wt}$ -Slick^{wt/fl}). Nach Verpaarung eines Cre-positiven heterozygot geflochten mit einem Cre-negativen heterozygot geflochten Tieres, erhielt man in der F₂-Generation unter

anderem Cre-positive und Cre-negative Tiere, die in beiden Allelen des Slick-Gens loxP-Sites trugen ($Lbx_1^{Cre/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$; $Lbx_1^{wt/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$). Mäuse dieser Genotypen können als Versuchstiere verwendet werden ($Lbx_1^{Cre/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$ als konditionelle Knockout- und $Lbx_1^{wt/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$ als Kontrolltiere). Um Zuchtüberhangstiere zu reduzieren, wurden $Lbx_1^{Cre/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$ -Mäuse aus der F₂-Generation mit Cre-negativen homozygot geflochten Slick-Mäusen ($Lbx_1^{wt/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$) verpaart. Alle Nachkommen dieser Zuchtpaare entsprechen den Genotypen der konditionellen Knockout- bzw. Kontrolltiere und können für die weitere Charakterisierung verwendet werden ($Lbx_1^{Cre/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$; $Lbx_1^{wt/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$).

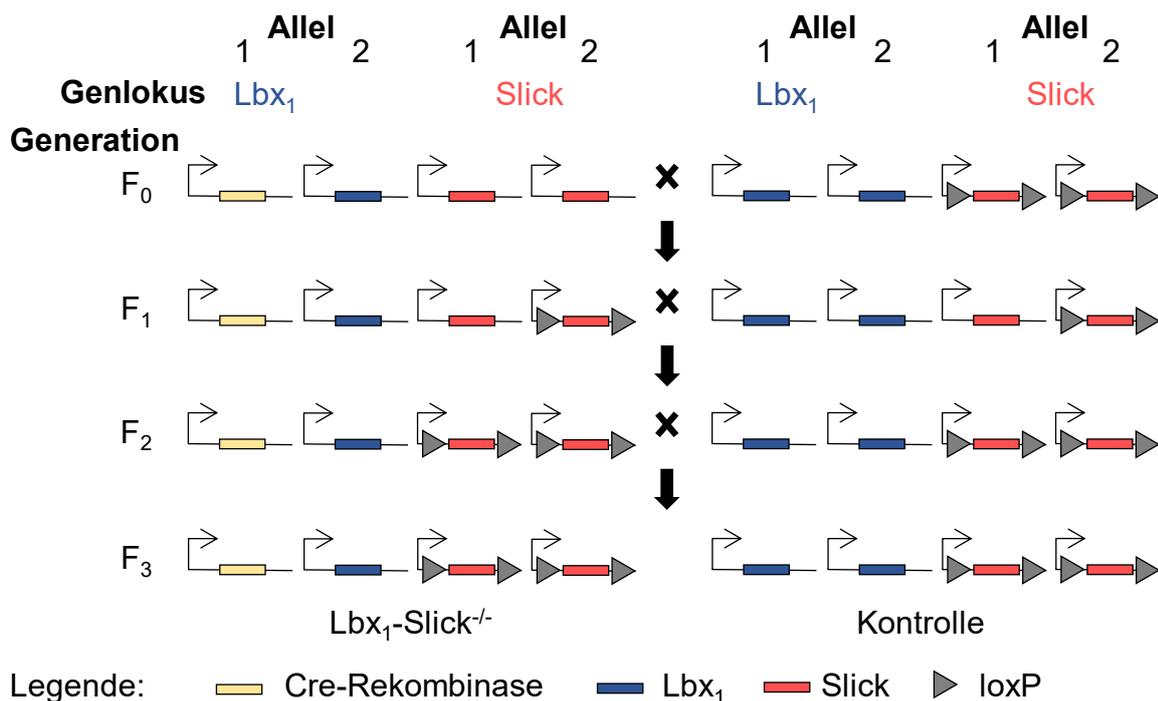


Abb. 47. Schematische Darstellung der Zuchtstrategie zur Generierung konditioneller Slick-Knockout-Mäusen in Lbx_1 -positiven Zellen. F₀: Parentalgeneration: Verpaarung einer Lbx_1 -Cre Maus mit einer homozygot geflochtenen Slick-Maus. F₁: Erste Filialgeneration: Tiere dieser Generation sind entweder Cre-positiv oder Cre-negativ, in jedem Falle aber heterozygot geflocht. Ein Cre-positives Tier aus der F₁-Generation wurde mit einem Cre-negativen Tier der F₁-Generation verpaart. Nachkommen dieser Generation liefern die erwünschten konditionellen Knockout- und Kontrolltiere. F₂: Zweite Filialgeneration: Tiere dieser Generation sind u.a. Cre-positiv bzw. Cre-negativ und homozygot geflocht. Zur Erhaltung einer effizienteren Zucht wurden diese Tiere untereinander verpaart, sodass in der F₃-Generation lediglich Cre-positive bzw. Cre-negative homozygot geflochte Tiere geboren wurden. F₃: Dritte Filialgeneration: Tiere dieser Generation konnten für weitere Untersuchungen verwendet werden ($Lbx_1^{Cre/wt}\text{-Slick}^{-/-}$ als konditionelle Knockout- und $Lbx_1^{wt/wt}\text{-Slick}^{fl/fl}$ als Kontrolltiere).

Zur Genotypisierung der Tiere wurde eine PCR zur Identifikation des geflochtenen Slick-Gens und eine weitere zum Nachweis der Cre-Rekombinase durchgeführt (Slick Flox- und Cre-Rekombinase-PCR, Kapitel 2.5.2). Die Amplifikation für die loxP-Sites im Slick-Gen ergab bei homozygot geflochtenen Tieren eine Bande der Größe ~370 bp. Während die Cre-PCR bei konditionellen Knockout-Tieren zwei PCR-Produkte lieferte, eine Bande bei 250 bp für die

Cre-Amplifikation und eine weitere bei 400 bp für die CB1-Amplifikation (Kontrolle), war bei Kontrolltieren nur die CB1-Amplifikation positiv (Abb. 48).

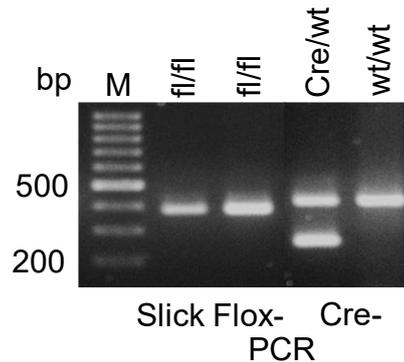


Abb. 48. Genotypisierung der konditionellen Slick-Knockout-Mäusen. Darstellung des Agarosegels mit PCR-Produkten der Slick- und Cre-PCR. Die Slick-PCR beider Genotypen ergab eine Bande für die homozygote loxP-Site (~370 bp), die Cre-PCR von $Lbx_1^{Cre/wt}$ -Slick^{-/-}-Mäusen lieferte sowohl eine CB1-Bande (Kontrolle, 400 bp) als auch eine Bande für die Amplifikation der Cre-Rekombinase (250 bp). Kontrolltiere ($Lbx_1^{wt/wt}$ -Slick^{fl/fl}-Mäuse) zeigten nur eine Bande für die CB1-Amplifikation (Kontrolle, 400 bp). M = Marker.

Mit der oben beschriebenen herkömmlichen Genotypisierungsmethode zum Nachweis der loxP-Sites und der Cre-Rekombinase können jedoch manche Komplikationen, die in der Zucht unter Verwendung des Cre/loxP-Systems auftreten können, nicht identifiziert werden. Denn es kann auch zu unerwarteten Rekombinationsereignissen kommen, wie z.B. einer transienten Expression der Cre-Rekombinase in der Keimbahn oder während der frühen Entwicklung, was mit einer unerwünschten Rekombination in der Keimbahn einhergeht (Song and Palmiter 2018). Auch auf diese sogenannte „ektopische“ Genexpression sollte bei der Genotypisierung der Tiere geprüft werden. Die oben beschriebene Zwei-Primer PCR (Slick Flox) kann eine mögliche Rekombination in der Keimbahn und somit, neben der gewünschten Deletion des Slick-Kanals in Lbx_1 -positiven Zellen, auch eine Ausschaltung des Slick-Kanals in somatischen Zellen, nicht detektieren. Zur Identifikation unerwarteter Rekombinationsereignissen muss ebenso die Slick Deletion-PCR durchgeführt werden oder, wie von Song und Palmiter, 2018, beschrieben, eine Drei-Primer-PCR. Die Problematik der Zwei-Primer-PCR (Slick Flox-PCR) ist in Abb. 49 schematisch dargestellt. Der *Reverse*-Primer zum Nachweis der loxP-Site bindet innerhalb des Exons 22. Nach erfolgreicher Deletion der markierten DNA-Sequenz ist keine Bindung des *Reverse*-Primers an seine komplementäre Sequenz möglich, sodass kein PCR-Produkt amplifiziert und in der Gelelektrophorese nachgewiesen werden kann. Bei der Slick Deletion-PCR hingegen bindet der *Reverse*-Primer hinter der zweiten loxP-Site, sodass dieser auch nach Deletion des markierten Bereichs an seine entsprechende DNA-Sequenz binden kann (Abb. 49).

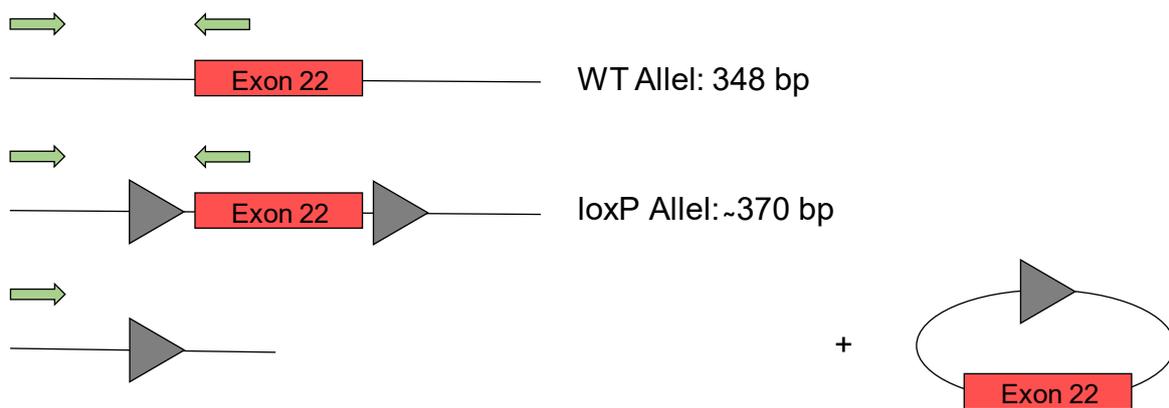
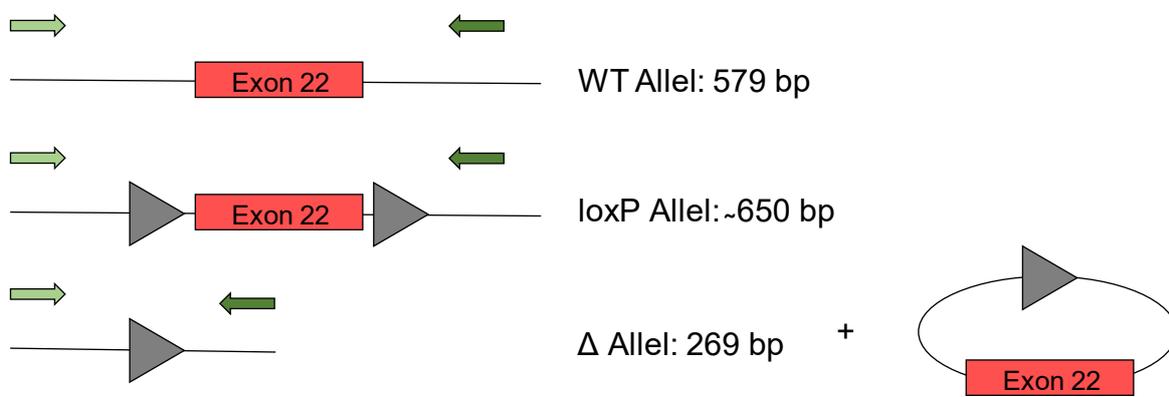
Slick Flox-PCR**Slick Deletion-PCR**

Abb. 49. Schematische Darstellung der Primerbindung der Slick Flox- (oben) und Slick Deletion-PCR (unten). Der *Reverse-Primer* der Slick Flox-PCR bindet innerhalb des Exons 22, wohingegen der *Reverse-Primer* der Slick Deletion-PCR hinter der zweiten loxP-Site bindet. Während die durch die loxP-Sites markierten DNA-Sequenzen durch die Cre-Rekombinase herausgeschnitten und die verbleibenden loxP-Enden zusammengefügt werden, wird der kurze ringförmige DNA-Abschnitt in der Zelle abgebaut. Der *Reverse-Primer* der Slick Flox-PCR kann folglich nicht an seine komplementäre Sequenz binden und die Deletion kann nicht nachgewiesen werden und bleibt so lange unbemerkt bis beide Allele betroffen sind. Der *Reverse-Primer* der Slick Deletion-PCR kann auch nach Deletion an seinen entsprechenden DNA-Bereich binden und liefert eine Bande der Größe 269 bp (Δ Allel). Das Amplifikationsprodukt zum Nachweis der loxP-Sites ist bei beiden PCRs größer als das des Wildtyp-Allels (Slick Flox-PCR: WT Allel $\hat{=}$ 348 bp, loxP Allel $\hat{=}$ ~370 bp; Slick Deletion-PCR: WT Allel $\hat{=}$ 579 bp, loxP Allel $\hat{=}$ ~ 650 bp; die Größe des loxP-PCR-Produkts ist im Paper, aus dem die Primersequenzen bezogen wurden, nicht angegeben (Wojtovich et al. 2016). Verändert nach Song und Palmiter 2018.

Eine mögliche Deletion liefert bei Durchführung der Slick Deletion-PCR ein PCR-Produkt der Größe 269 bp und kann somit in der Gelelektrophorese detektiert werden (Abb. 50). Die Amplifikation der loxP-Site des zweiten Allels liefert eine Bande der Größe ~ 370 bp.

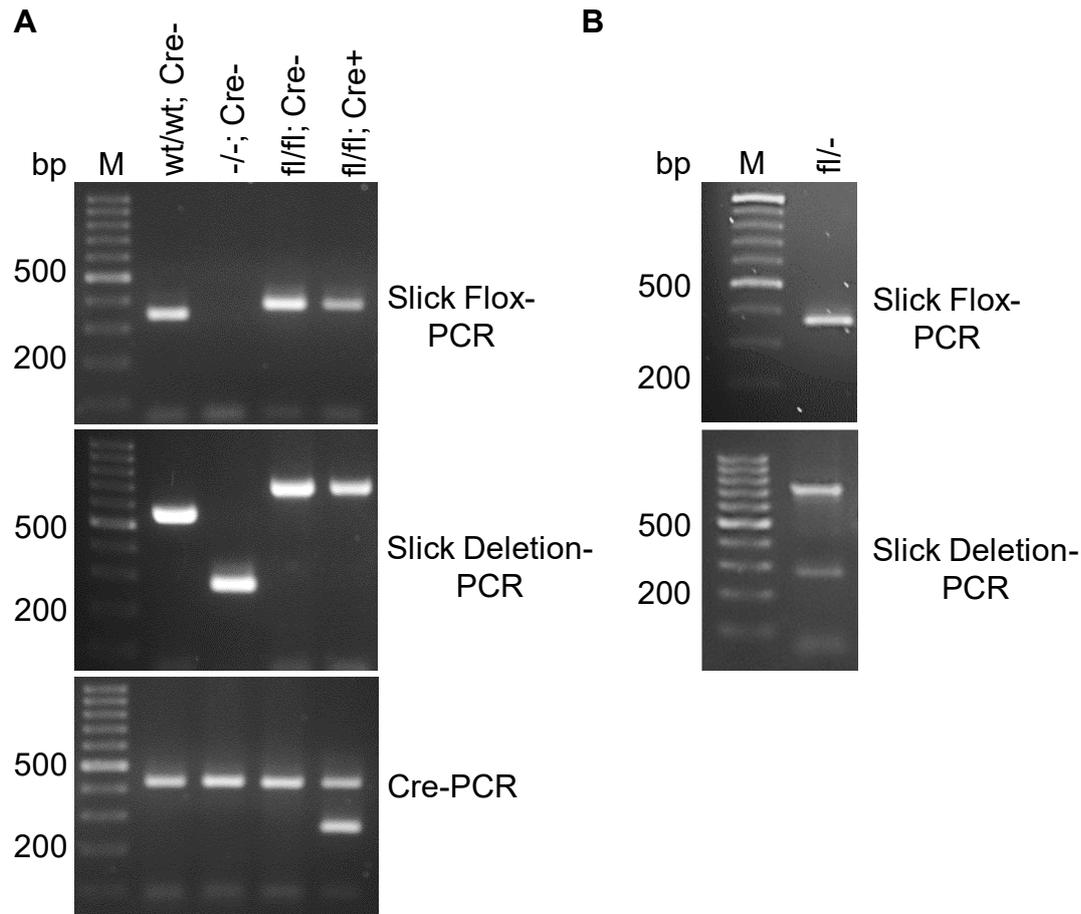


Abb. 50. Genotypisierung von Mäusen verschiedener Genotypen unter Anwendung der Slick Flox-, Slick Deletion- und Cre-PCR. (A) Genotypisierung von Wildtyp-, globalen und konditionalen Slick-Knockout- und Kontroll-Mäusen. Mittels der Slick Flox-PCR kann keine Bande für die Δ Allele detektiert werden, die Slick Deletion-PCR dagegen liefert eine Bande der Größe 269 bp für die Δ Allele (Slick Flox-PCR: WT Allel \triangleq 348 bp, loxP Allel \triangleq ~ 370 bp; Slick Deletion-PCR: WT Allel \triangleq 579 bp, loxP Allel \triangleq ~ 650 bp). Für die Amplifikation der Cre-Rekombinase ist bei dem Cre-positiven Tier eine Bande bei 250 bp abgebildet, bei den Cre-negativen Mäusen wurde nur CB1 amplifiziert (400 bp). Die homozygot geflochten Cre-positiven Mäuse sind konditionelle Knockout-Mäuse, die Cre-negativen Tiere die entsprechenden Kontroll-Mäuse. (B) Genotypisierung eines heterozygot geflochten Knockout-Tieres. Während die Slick Flox-PCR eine Bande bei ~ 370 bp liefert (Nachweis der loxP-Site), ergibt die Slick Deletion-PCR zwei Banden (loxP Allel \triangleq ~ 650 bp, Δ Allel \triangleq 269 bp). M = Marker.

Expression der Slick mRNA in den verschiedenen Genotypen

Um zu bestimmen, inwiefern ein heterozygoter Knockout (Slick^{fl/-}) die relative Slick mRNA-Expression beeinflusst, wurden verschiedene Gewebe der Tiere mittels qPCR untersucht. In Abb. 51 ist die relative Slick mRNA-Expression im Rückenmark (Abb. 51A), in DRGs (Abb. 51B) und im cerebralen Cortex (Abb. 51C) von Lbx₁-Slick-Mäusen dargestellt. Für die Lbx₁^{Cre/wt}-Slick^{fl/fl}-Maus wurde im Vergleich zur entsprechenden Kontroll-Maus (Lbx₁^{wt/wt}-Slick^{fl/fl}) ein Knockdown im Rückenmark, aber nicht in den DRGs und im cerebralen Cortex, detektiert. Die Slick mRNA-Expression des Kontroll-Tieres entsprach in etwa der Slick mRNA-Expression naiver C57BL/6N-Tiere. Da jeweils nur ein Cre-Rekombinase-negatives

und positives homozygot gefloxtes Tier vorhanden war und somit mittels qPCR untersucht wurde, wurden die $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $Slick^{fl/fl}$ -Maus und das entsprechende Kontroll-Tier aus der statistischen Analyse ausgeschlossen. In allen Geweben wurde in den heterozygoten Knockout-Tieren eine verringerte Slick mRNA-Expression verzeichnet. Der Unterschied in der relativen Slick mRNA-Expression der heterozygoten Knockout-Tieren (Cre-positiv und Cre-negativ) war dabei im Vergleich zu C57BL/6N-Tieren statistisch signifikant. Außerdem war die Expression der Slick-mRNA im Rückenmark der $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $Slick^{fl/-}$ im Vergleich zu der im Rückenmark der $Lbx_1^{wt/wt}$ - $Slick^{fl/-}$ -Tiere verringert. Im Gewebe von globalen Knockout-Tieren (Cre-positiv und Cre-negativ) konnte, wie erwartet, keine Slick mRNA nachgewiesen werden.

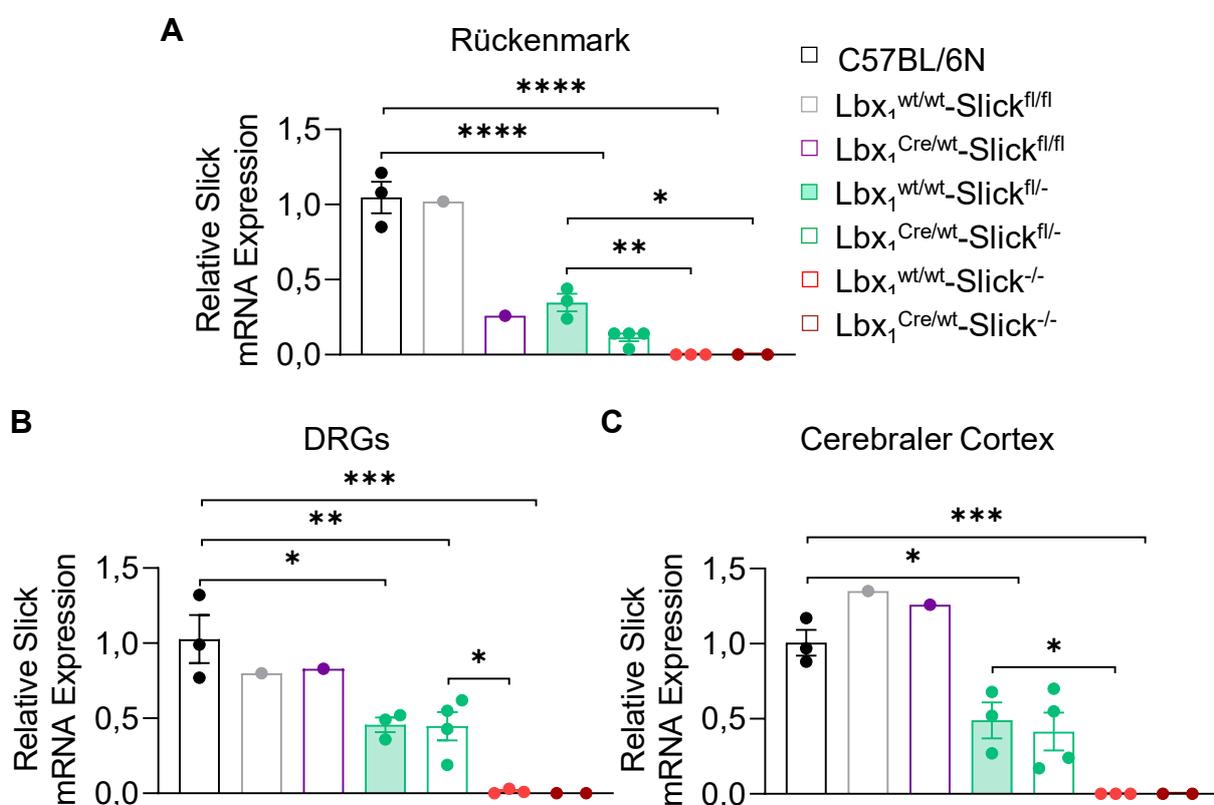


Abb. 51. Relative Expression der Slick mRNA in C57BL/6N-Tieren und in Lbx_1 -Slick-Mäusen der Genotypen, die unter Verwendung des Cre/loxP-Systems entstanden sind. Darstellung der Slick mRNA-Expression im Rückenmark (A), in den DRGs (B) und im cerebralen Cortex (C). Die $Lbx_1^{wt/wt}$ - $Slick^{fl/fl}$ - und $Lbx_1^{Cre/wt}$ - $Slick^{fl/fl}$ -Maus wurden aus der statistischen Analyse ausgeschlossen ($n = 1$). Die Slick-Expression wurde auf GAPDH als Referenzgen normiert. Statistik: Ein-Weg-ANOVA & Tukey's Test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 2-4$ Versuchstieren dargestellt.

Expression der Slick mRNA in Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäusen

Durch Prüfung auf unerwartete Rekombinationsereignisse durch Anwendung der Slick Flox-, Slick Deletion und Cre-PCR bei der Genotypisierung der Mäuse in der Zucht konnte das Cre/loxP-Systems erfolgreich angewendet und Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäuse generiert werden. Zur

Bestätigung des gewebspezifischen Knockdowns im Rückenmark von Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäusen, wurden verschiedene Gewebe der Tiere mittels qPCR untersucht. Wie in Abb. 52A dargestellt, konnte ein signifikanter Knockdown von Slick im Rückenmark von Lbx_1 -Slick^{-/-}-Tieren detektiert werden. Weder in den DRGs noch im cerebralen Cortex wurde ein Unterschied in der relativen Slick mRNA-Expression festgestellt, was für einen gewebspezifischen Knockdown von Slick in Dorsalhornneuronen spricht. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von Slick zum Slack-Kanal, wurde auch die relative Slack mRNA-Expression in den Geweben der konditionellen Knockout- und Kontroll-Mäusen untersucht. Es wurde kein Unterschied in der relativen Slack mRNA-Expression im Rückenmark, DRGs und cerebralen Cortex zwischen Lbx_1 -Slick^{-/-}- und den entsprechenden Kontroll-Mäusen festgestellt (B). Somit scheint Slack in den Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäusen nicht kompensatorisch reguliert zu sein.

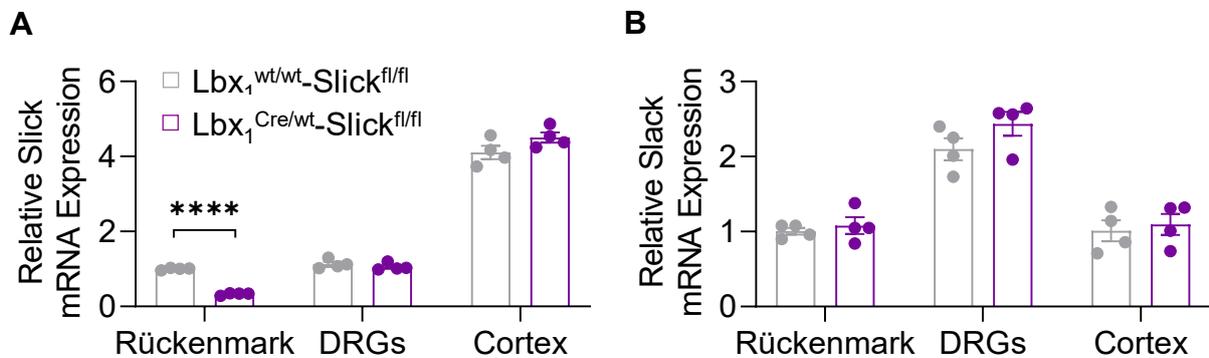


Abb. 52. Relative Expression der Slick und Slack mRNA in Lbx_1 -Slick^{-/-}- und Kontroll-Mäusen. (A) Darstellung der Slick mRNA-Expression im Rückenmark, den DRGs und im cerebralen Cortex. (B) Darstellung der Slack mRNA-Expression im Rückenmark, den DRGs und im cerebralen Cortex. Die Slick- bzw. Slack-Expression wurde auf GAPDH als Referenzgen normiert. Statistik: ungepaarter t-Test, **** $p < 0,0001$. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von $n = 4$ Versuchstieren dargestellt.

4 Diskussion

Als Regulatoren der elektrischen Aktivität sensorischer Neurone werden Kaliumkanäle immer mehr als potenzielle Targets zur Entwicklung analgetisch wirksamer Pharmaka herangezogen (Andres-Bilbe et al. 2020; Wood 2020). Auch die an der neuronalen Erregung beteiligten spannungsabhängigen Natriumkanäle und die Neurotransmitter-Freisetzung steuernden Calciumkanäle sowie TRP-Kanäle und ASICs können als potenzielle Targets in Frage kommen und bieten so weitere Möglichkeiten für innovative Schmerztherapien (Stevens and Stephens 2018). Mit dem Natrium-abhängigen Kaliumkanal Slack wurde bereits ein neues Target identifiziert, welches potenziell eine effektivere Schmerztherapie ermöglicht (Lu et al. 2015). Außerdem kommt Slack auch eine Bedeutung bei der Prozessierung akuter Juckreiz-Stimuli zu. In der vorliegenden Arbeit wurden Testsubstanzen zunächst auf ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften *in vitro* getestet. Danach wurde der Einfluss ausgewählter Slack-Aktivatoren auf das Schmerzverhalten im neuropathischen Schmerzmodell *in vivo* untersucht. Weiter wurde die juckreizmindernde Wirkung von Loxapin bei akutem Pruritus beleuchtet. Darüber hinaus wurde die Funktion des strukturell eng mit dem Slack-Kanal verwandten Slick-Kanals bei der Verarbeitung von akuten, inflammatorischen und neuropathischen Schmerzen sowie dessen Expression im nozizeptiven System untersucht.

4.1 Neue Slack-Aktivatoren zur Therapie von neuropathischen Schmerzen

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der K_{Na} -Kanal Slack in nicht-peptidergen C-Faser-Neuronen exprimiert wird (Lu et al. 2015; Zeisel et al. 2018). Während Slack^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern ein erhöhtes Schmerzverhalten in neuropathischen Schmerzmodellen aufweisen, ist ihr Verhalten in Modellen für akute Schmerzen sowie Entzündungsschmerzen mit dem der Wildtyp-Mäuse vergleichbar (Lu et al. 2015). Das erhöhte Schmerzverhalten von Slack^{-/-}-Mäusen nach SNI konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden. Dabei zeigten Slack^{-/-}-Mäuse nach SNI im von Frey Filament-Test eine erhöhte mechanische Hypersensitivität sowie im *Dynamic Weight Bearing*-Modell ein größeres Ausmaß an nicht-reflexivem Schmerzverhalten. In wildtypischen DRG-Neuronen wurden nach SNI reduzierte Slack-Ströme verzeichnet, während die Slack mRNA- und Proteinexpression in DRGs und Rückenmark unverändert war (Lu et al. 2021). Die Öffnung der Kanäle mit der damit einhergehenden Hyperpolarisation der Membran und infolgedessen reduzierte neuronale Erregung könnte somit eine innovative Strategie zur effektiven Schmerztherapie darstellen. Durch systemische Applikation des Antipsychotikums und Slack-Aktivators Loxapin konnte das

neuropathische Schmerzverhalten in der Maus signifikant und Slack-abhängig reduziert werden (Lu et al. 2015).

Außerdem wurde der analgetische Effekt von Loxapin bereits in einer ersten Studie am humanen Schmerzpatienten untersucht (offene *Single-Center*-, Dosis-Eskalations-, *Proof of Principle*-Studie). Dabei litten die Schmerzpatienten an Therapie-refraktären Chemotherapie-induzierten neuropathischen Schmerzen. Über eine numerische *Rating*-Skala (NRS) konnten die Patienten ihre subjektiv empfundenen Schmerzen einer Skala von null bis zehn zuordnen, wobei die Ziffer null für „kein Schmerz“ und die Ziffer zehn für „stärkster vorstellbarer Schmerz“ steht. Loxapin wurde niedrig dosiert und als perorale Begleittherapie zur üblichen Behandlung, einschließlich der analgetischen Therapie, in vier 14-tägigen Behandlungsepisoden verabreicht. Bei zwei Patienten, die Loxapin für mindestens zwei Behandlungsepisoden erhielten, wurde eine klinisch relevante Analgesie bei einer Tagesdosis von 20 mg bis 30 mg Loxapin verzeichnet. Zwei weitere Patienten dagegen mussten bereits nach wenigen Tagen die Loxapin-Behandlung aufgrund der schlechten Verträglichkeit abbrechen. Als unerwünschte Arzneimittelwirkungen wurden vor allem Parkinson-ähnliche Symptome wie Tremor, Akathisie, Gangstörungen, Unruhe, Somnolenz und Schwindel verzeichnet. Die Studie war ursprünglich für zwölf Patienten vorgesehen, musste allerdings aufgrund der aufgetretenen unerwünschten Ereignisse vorzeitig beendet werden. Die Autoren der Studie folgerten, dass die Slack-Aktivierung im humanen Schmerzpatienten eine neue Strategie für die Therapie neuropathischer Schmerzen darstellen könnte, Loxapin dabei allerdings aufgrund der starken Affinität zu Dopamin- und Histamin-Rezeptoren keine valide Behandlungsoption sei. Die Autoren sahen jedoch ein großes Potenzial in der Entwicklung neuer Slack-Aktivatoren mit einem verbesserten pharmakologischen Profil. So könnten Slack-Aktivatoren, die die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden und somit keine zentralnervösen Effekte auslösen, effektiv und nebenwirkungsarm analgetisch wirken (Schmiedl et al. 2019).

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Slack-Aktivatoren zur Therapie neuropathischer Schmerzen beruhen auf den Strukturen von Loxapin und Niclosamid. Allerdings konnte bei den getesteten Niclosamid-Derivaten sowie bei Niclosamid selbst im FluxOR™-Assay kein mit Loxapin vergleichbarer Fluoreszenzanstieg verzeichnet werden (Abb. 10), sodass der Fokus auf die Entwicklung neuer potenzieller Wirkstoffe ausgehend von Loxapin als Leitstruktur gelegt wurde. Der Anstieg des fluoreszierenden Signals wurde als Ausmaß der Slack-Aktivierung gewertet. Auch Biton et al., 2012, beschrieben eine effektivere Slack-Aktivierung durch Loxapin im Vergleich zu Niclosamid. Der Unterschied in den Slack-aktivierenden Wirkungen der beiden Substanzen war dabei statistisch signifikant (Biton et al.

2012). Der geringere Slack-aktivierende Effekt könnte jedoch auch auf die schlechte Löslichkeit von Niclosamid zurückzuführen sein (Biton et al. 2012; Pan et al. 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei neue Slack-Aktivatoren (VHP93, VH408 und VH425) *in vivo* untersucht. Im Dynamic Plantar-Test reduzierte das strukturell eng mit Loxapin verwandte VHP93 die mechanische Hypersensitivität nach SNI. Dabei zeigten VHP93-behandelte Versuchstiere drei und fünf Stunden nach intraperitonealer Gabe im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen signifikant erhöhte Latenzzeiten (Abb. 18). Dies deutet darauf hin, dass VHP93, wie Loxapin, durch Slack-Aktivierung neuropathisches Schmerzverhalten hemmen könnte. Da VHP93 über eine hohe Bindungsaffinität an dopaminerge D2- und D3-Rezeptoren verfügt und sowohl die Motorfunktion als auch die Aktivität der Versuchstiere im *Open Field*-Test beeinflusst (Abb. 16, Abb. 17), liegt es nahe, dass die erhöhten Latenzzeiten im DPA-Modell nicht allein durch eine Aktivierung von Slack-Kanälen zu erklären sind. Hierfür spricht, dass VHP93-behandelte Mäuse im *Accelerating Rotarod*-Test zur Überprüfung der Motorik zum Zeitpunkt fünf Stunden nach systemischer Applikation eine im Vergleich zu Vehikel-behandelten Mäusen signifikant reduzierte Verweilzeit auf der rotierenden Stange aufwiesen. Auch zeigten sie eine tendenzielle Abnahme der Bewegungen und damit einhergehend eine erhöhte Verweilzeit im *Vertical Pole*-Test auf. Dies könnte durch die starke Bindungsaffinität von VHP93 an D2- und D3-Rezeptoren zu erklären sein, wodurch eine kurzfristige Fehlfunktion der Basalganglien ausgelöst wird. Dabei hat VHP93 eine höhere Bindungsaffinität zu D2- und D3-Rezeptoren als Loxapin. Dies spiegelt sich in den gemessenen pK_i -Werten wider, die bei VHP93 deutlich größer waren als bei Loxapin (Tab. 21). Außerdem legten VHP93-behandelte Mäuse im *Open Field*-Test 30 Minuten nach systemischer Applikation eine signifikant reduzierte Wegstrecke im Vergleich zur Vehikel-Gruppe zurück. Dies lässt vermuten, dass VHP93 aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Loxapin ebenso an anderen Targets bindet und u.a. Serotonin- und Histamin-Rezeptoren blockiert. Die unerwünschten Ereignisse, wie bspw. die Ausbildung eines EPS und Schläfrigkeit, die im Zusammenhang mit einer Loxapin-Therapie stehen, beruhen auf der Blockade von Dopamin-, Histamin-, Serotonin-, Muskarin- und adrenergen Rezeptoren (Chakrabarti et al. 2007; Popovic et al. 2015). Somit scheint VHP93 im Vergleich zur Leitsubstanz Loxapin kein selektiverer Slack-Aktivator zu sein. Weiter ist zu erwähnen, dass VHP93 als lipophiler Vertreter die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann. Die im neuropathischen Schmerzmodell verzeichnete Reduktion der mechanischen Hypersensitivität durch VHP93 könnte somit ebenso Folge einer Blockade dopaminerger und histaminerger Rezeptoren sein und fälschlicherweise als analgetischer Effekt interpretiert worden sein.

Für den Slack-Aktivator VH408 konnten trotz der mit Loxapin vergleichbaren Affinität zu D2- und D3-Rezeptoren im Dopaminbindungsassay keine Auffälligkeiten bei VH408-behandelten Mäusen in den Tests zur Überprüfung der Motorfunktion festgestellt werden. Dies könnte daran liegen, dass VH408 aufgrund der im Vergleich zu Loxapin höheren Polarität nicht in der Lage ist die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden. Allerdings konnte der neue Slack-Aktivator VH408 das Schmerzverhalten im neuropathischen Schmerzmodell nicht hemmen, sodass diese Substanz für die Weiterentwicklung zum Wirkstoffkandidaten zur Therapie neuropathischer Schmerzen nicht weiter berücksichtigt werden kann. Dagegen ist das Loxapin-Derivat VH425 trotz des im Vergleich zu Loxapin höheren EC_{50} -Wertes ein vielversprechender Wirkstoffkandidat. Dieser neue Slack-Aktivator schien in den hier durchgeführten Motoriktests keinen Einfluss auf die Motorfunktion der Mäuse zu haben und hat mit einem pK_i -Wert von 5,89 für D2-Rezeptoren bzw. einem pK_i -Wert von 5,45 für D3-Rezeptoren eine deutlich geringere Affinität an die entsprechenden Rezeptoren als Loxapin. Durch Erweiterung der Methylgruppe des Piperazin-Rings von VH425 um eine polare Seitenkette könnte es sein, dass dieses Loxapin-Derivat die Blut-Hirn-Schranke nicht mehr passieren kann. Infolgedessen könnte eine systemische Applikation von VH425 effektiv und selektiv Slack-Kanäle, exprimiert in peripheren sensorischen Fasern, aktivieren, ohne dabei zentralnervöse unerwünschte Wirkungen auszulösen.

Ausblick

In Zukunft könnte man die Wirkung des neuen, hinsichtlich der Bindungsaffinität an dopaminerge Rezeptoren (D2, D3) selektiveren, Slack-Aktivators VH425 im SNI-Modell untersuchen und zur Erhöhung der Selektivität der neuen Aktivatoren noch weitere Strukturoptimierungen vornehmen.

4.1.1 Juckreizmindernder Effekt von Loxapin bei akutem Juckreiz

Dem K_{Na} -Kanal Slack wird nicht nur bei der Nozizeption eine Bedeutung zugeschrieben, sondern ist auch bei der Signalweiterleitung und Prozessierung von Pruritogenen funktionell beteiligt. So zeigten Slack^{-/-}-Mäuse in akuten Juckreiz-Modellen zur Untersuchung des Histamin-abhängigen und unabhängigen Pruritus verstärkte Kratzreaktionen innerhalb der ersten fünf Minuten nach Applikation der juckreizinduzierenden Stimuli (Martinez-Espinosa et al. 2015). Zur Untersuchung, ob Loxapin durch Slack-Aktivierung akuten Juckreiz mindern kann, wurden Loxapin und Olanzapin im Chloroquin-Modell getestet. Das in einer Dosierung von 0,175 mg/kg eingesetzte Loxapin und Olanzapin wirkte hemmend auf Chloroquin-induzierten akuten Juckreiz (Abb. 19). Dabei konnte für Loxapin eine weitaus ausgeprägtere Juckreiz-Hemmung verzeichnet werden als für Olanzapin. Diese Beobachtung könnte für einen durch Aktivierung des Slack-Kanals vermittelten Effekt sprechen. Allerdings zeigten Loxapin-behandelte Mäuse kaum eine Reaktion auf den akuten Juckreiz-Stimulus, was

darauf hindeuten könnte, dass die Dosierung in diesem Modell zu hoch gewählt wurde und die Versuchstiere sediert waren. Aus diesem Grund wurde Loxapin in einer Dosierung von 0,0875 mg/kg erneut im Chloroquin-Modell getestet. Auch hier wurde in den ersten Minuten nach Applikation des Pruritogens ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der Kratzreaktionen von Loxapin- und Vehikel-behandelten Versuchstieren festgestellt (Abb. 20). Dies deutet darauf hin, dass niedrig dosiertes Loxapin vor allem in der ersten Zeit nach Chloroquin-Injektion der Auslösung akuten Juckreizes entgegenwirken könnte. Die hemmende Wirkung von Loxapin im Modell des akuten Chloroquin-induzierten Juckreizes entspricht dem Phänotyp der Slack^{-/-}-Mäuse. Bei Slack^{-/-}-Mäusen konnte eine erhöhte Anzahl an Kratzreaktionen innerhalb der ersten fünf Minuten nach Injektion des Pruritogens in Modellen für akuten Juckreiz verzeichnet werden (Martinez-Espinosa et al. 2015).

Ausblick

Um die Slack-Abhängigkeit in diesem Modell zu überprüfen, könnte niedrig dosiertes Loxapin an Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen getestet und als Negativkontrolle niedrig dosiertes Olanzapin mitgeführt werden. Außerdem könnte in Zukunft der juckreizmindernde Effekt von Loxapin nach lokaler Applikation sowie die Wirksamkeit neuer Slack-Aktivatoren im akuten Pruritus-Modell untersucht werden.

Des Weiteren könnte der Fragestellung nachgegangen werden, ob Slack auch an der Entstehung von chronischem Juckreiz funktionell beteiligt ist. Hierzu könnten Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäuse in Modellen für chronischen Pruritus wie z.B. im **Aceton/ Diethylether/ Wasser-** (AEW-) Modell oder im Modell der 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol- (DFNB-) induzierten allergischen Kontaktdermatitis getestet werden. Das AEW-Modell ist durch Dehydrierung der Haut infolge einer Aceton/ Diethylether/ Wasser-Behandlung gekennzeichnet und führt somit zu trockenen Hautzuständen, die oftmals auch mit chronischem Juckreiz einhergehen können (Liu et al. 2016). Im Modell der DFNB-induzierten Kontaktdermatitis wird durch Applikation des Haptens DNFB eine allergische Kontaktdermatitis erzeugt (Zhao et al. 2013). Darüber hinaus ist auch die Untersuchung des potenziell juckreizmindernden Effekts von Loxapin und dessen Derivaten in chronischen Juckreiz-Modellen eine interessante Fragestellung, die weiterverfolgt werden könnte.

4.2 Schwierigkeiten in der Zucht gewebsspezifischer Slick^{-/-}-Mäuse

Nachdem der K_{Na}-Kanal Slick im nozizeptiven System lokalisiert wurde und beobachtet wurde, dass er an der Verarbeitung von thermischen und chemischen Stimuli beteiligt ist, sollten konditionelle Knockout-Mäuse in Modellen für akute, inflammatorische und neuropathische Schmerzen untersucht werden. Dabei sollten Lbx₁-Slick^{-/-}-Mäuse generiert werden, bei denen Slick gewebsspezifisch in Dorsalhornneuronen des Rückenmarks

deletiert ist. So könnte festgestellt werden, ob Slick, exprimiert in Neuronenpopulationen im Dorsalhorn an nozizeptiven Prozessen funktionell beteiligt ist. Wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, wurden durch die nicht erfolgreiche Anwendung des Cre/loxP-Systems neben gewebsspezifischen Lbx_1 -Slick^{-/-} auch heterozygot gefloxt Slick^{fl/-}- und globale Slick^{-/-}-Mäuse generiert. Die Daten aus den mRNA-Expressionsanalysen bestätigen diese Annahme (Kapitel 3.4). Befindet sich die Cre-Rekombinase in der männlichen Keimbahn, so kann das Enzym durch die Spermien auf die Oozyte übertragen werden und dort eine Rekombination auslösen. Wird die Cre-Rekombinase in den Eizellen exprimiert, kann es auch nach der Befruchtung zu einer Rekombination kommen. Außerdem kann das Gen der Cre-Rekombinase auch nach der Befruchtung transient exprimiert werden und so zur Rekombination des gefloxten Allels in der befruchteten Oozyte oder der frühen Blastomere führen. Unabhängig davon ist das Vorhandensein des Δ -Allels nach PCR von DNA aus Geweben, in denen keine Expression erwartet wird (z.B. Schwanz- oder Ohr-DNA), bei Mäusen ein Hinweis auf eine unerwartete Rekombination. Da die Cre-Rekombinase sowohl in männlichen als auch in weiblichen Keimbahnen exprimiert wird, steigt die Wahrscheinlichkeit einer unerwarteten Rekombination und somit die Notwendigkeit des Nachweises des Δ -Allels (Song and Palmiter 2018). Daher ist die Durchführung der Slick Flox und der Slick Deletion-PCR bzw. einer Triple-PCR bei der Genotypisierung gewebsspezifischer Slick^{-/-}-Mäuse unerlässlich und muss künftig berücksichtigt werden.

Ausblick

Die auf diese Weise generierten Lbx_1 -Slick^{-/-}-Mäuse können in Zukunft in nozizeptiven Verhaltenstests charakterisiert werden, um so Hinweise über die Funktion von Slick in Dorsalhornneuronen zu erlangen. Zudem könnten unter Anwendung des Cre/loxP-Systems konditionelle Slick-Knockout-Mäuse generiert werden, die einen gewebsspezifischen Knockout in sensorischen Neuronen (Advillin-, Adv-Slick^{-/-}) aufweisen. Da das Advillin-Gen in allen peripheren sensorischen Neuronen exprimiert wird, könnte so ein vollständiger konditioneller Slick-Knockout in DRG-Neuronen herbeigeführt werden (Zurborg et al. 2011). So könnte festgestellt werden, ob Slick, exprimiert in peripheren Fasern, eine funktionelle Beteiligung an nozizeptiven Prozessen zugeschrieben werden kann.

4.3 Expressionsanalysen von Slick in schmerzrelevanten Geweben

Während die Expression und Funktion des Kaliumkanals Slack bereits im Jahr 2015 vorgestellt und dem Slack-Kanal hierbei eine wesentliche Beteiligung bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen und akuter Juckreiz-Stimuli zugeschrieben wurde, ist die Rolle von Slick im nozizeptiven System noch nicht in vergleichbarem Umfang geklärt (Lu et al. 2015; Martinez-Espinosa et al. 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit entstandenen Expressionsanalysen ergaben, dass Slick nur zu einem geringen Anteil in DRG-Neuronen

exprimiert wird und dabei vor allem in CGRP- und NF200-positiven Neuronen nachgewiesen wurde (Abb. 25). Demnach findet sich Slick vorrangig in dünn myelinisierten A δ -Fasern, wohingegen Slack fast ausschließlich in nicht-peptidergen IB4-positiven DRG-Neuronen gebildet wird (Lu et al. 2015). Entsprechend der von Usoskin et al., 2015, vorgenommenen Klassifizierung lassen sich Slick-positive Neurone dem PEP2-Cluster zuordnen (Usoskin et al. 2015). Diese Daten decken sich zudem mit Ergebnissen aus jüngsten Untersuchungen. Mittels Einzelzell-RNA-Sequenzierung konnten insgesamt acht neuronale DRG-Subtypen nachgewiesen werden, wobei Slick als Marker peptiderger Nozizeptoren identifiziert wurde (Zheng et al. 2019). Basierend auf Transkriptionsfaktoren unterteilte eine erst kürzlich veröffentlichte Studie CGRP-positive DRG-Neurone weiter in sechs verschiedene Subpopulationen (α , ϵ , η , γ , θ , ζ). Demnach wird Slick spezifisch in den Populationen CGRP- α und CGRP- η exprimiert (Sharma et al. 2020). Auch Tomasello et al., 2017, detektierten Slick ausschließlich in CGRP-positiven somatosensorischen Neuronen sowie in größeren CGRP-positiven synaptischen Vesikeln mit dichterem Kernbereich (*Large Dense-core Vesicles*, LDCV) (Tomasello et al. 2017). In IB4-bindenden DRG-Neuronen wurde dagegen keine Slick-Immunoreaktivität verzeichnet (Abb. 25). In Anbetracht dessen, dass Slack vorwiegend in nicht-peptidergen Fasern zu finden ist, ist eine Heteromerbildung aus diesen beiden K_{Na}-Kanälen in DRG-Neuronen sehr unwahrscheinlich. Im Gegensatz dazu wurde in anderen Geweben eine Bildung von Heteromeren aus Slack- und Slick-Kanälen beschrieben. So konnte bspw. in Neuronen des zentralen Nervensystems sowie in Zellen der Niere und des Pankreas eine Formung von Heteromeren aus beiden Kanälen festgestellt werden (Chen et al. 2009; Martinez-Espinosa et al. 2015; Tejada et al. 2017).

Im Dorsalhorn des Rückenmarks wird Slick in den Laminae I bis II_{IV} exprimiert (Abb. 22). Außerdem wurde Slick mittels In-situ Hybridisierung überwiegend in inhibitorischen Interneuronen nachgewiesen (Abb. 24). Diese interneuronale Verteilung von Slick bestätigt die Daten aus einer im Jahr 2018 publizierten Studie mit Transkriptom-Daten. Häring et al., 2018, detektierten Slick in inhibitorischen und exzitatorischen Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks, wobei Slick inhibitorische Interneurone der Gaba2-3 sowie Gaba8-9 Untergruppe repräsentiert (Häring et al. 2018). Diese Daten liefern Hinweise, dass Slick eine bedeutende Funktion im schmerzrelevanten System aufweist.

4.4 Funktionelle Beteiligung von Slick an akuten, entzündlichen und neuropathischen Schmerzen

Um mögliche Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung des Natrium-abhängigen Kaliumkanals Slick bei der Verarbeitung akuter, inflammatorischer und neuropathischer Schmerzen zu erlangen, wurden globale Slick^{-/-}-Mäuse in verschiedenen nozizeptiven Tests untersucht. Hinsichtlich der basalen Charakterisierung der Mäuse scheint der globale

Knockout von Slick die generelle Aktivität und das explorative Verhalten nicht zu beeinflussen (Abb. 30). Ebenso scheint Slick weder an der Verarbeitung akuter mechanischer Stimulation noch an der Prozessierung mechanischer Reize beteiligt zu sein (Abb. 36, Abb. 37, Abb. 38). Auch die Verarbeitung von Kälteschmerzen blieb durch den Knockout von Slick unbeeinflusst (Abb. 35). Dagegen deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass Slick an der Nozizeption akuter thermischer Stimuli funktionell beteiligt ist. Außerdem scheint der Verlust des Slick-Kanals zu einem erhöhten Schmerzverhalten nach Injektion chemischer Stimuli zu führen (Kapitel 3.3.4).

4.4.1 Rolle von Slick bei der Verarbeitung akuter thermischer Stimuli

Slick^{-/-}-Mäuse zeigten im *Hot-Plate*-Test bei 48 °C und 50 °C sowie im *Hot Water Tail-Immersion*-Test zwischen 46 °C und 48 °C eine geringere thermische Schmerzschwelle als ihre wildtypischen Wurfgeschwister auf. Bei höheren Temperaturen jedoch unterschied sich die Hitzeschmerzschwelle der beiden Genotypen nicht (Abb. 32, Abb. 33). Folglich scheint Slick an hitzerelevanten Signalwegen im niedrigeren Temperaturbereich eine Rolle zu spielen.

In den letzten zwei Jahrzehnten wurden viele Ionenkanäle als potenzielle Thermosensoren identifiziert (Vay et al. 2012; Vriens et al. 2014). Darunter gehören Mitglieder der TRP-Kanal-Familie, der Calcium-aktivierte Chlorid-Kanal Anoctamin 1 (ANO1, auch als TMEM16A bezeichnet), das *Stromal Interaction Molecule 1* (STIM1) sowie der spannungsabhängige Natrium-Kanal Na_v1.8 und Vertreter der K_{2P}-Kanäle wie bspw. TREK1. TRP-Kanäle sind nicht selektive Liganden-gesteuerte Kationenkanäle und umfassen etwa 30 Subtypen, die in sechs Unterfamilien unterteilt werden (Moore et al. 2018; O'Neill et al. 2012; Vriens et al. 2014). Darunter gehören die kanonischen (TRPC), Vanilloid (TRPV), Ankyrin (TRPA), Melastatin (TRPM), Polycystin (TRPP) und Mucolipin (TRPML) Untergruppen (Moore et al. 2018; Wu et al. 2010). Ähnlich wie K_v-Kanäle formen auch Kanäle der TRP-Familie Tetramere, wobei jede der vier Untereinheiten aus sechs transmembranen Domänen (S1-S6) mit zytosolischen N- und C-terminalen Endigungen und einer porenbildenden Region zwischen S5 und S6 besteht (Moore et al. 2018; O'Neill et al. 2012; Vay et al. 2012). Dabei werden TRPV1, TRPV2, TRPV3, TRPV4, TRPA1, TRPM2, TRPM3 und TRPM8 eine bedeutsame Rolle in der Weiterleitung thermischer Stimuli zugeschrieben (Vay et al. 2012; Vriens et al. 2014). Temperaturen > 43 °C können beim Menschen Gewebeschädigungen verursachen, sodass Hauttemperaturen über ~ 45 °C mit Schmerzen verbunden sind. Auch Temperaturen unter ~ 15 °C werden als schmerzhaft empfunden und gelten somit als schädlich (Basbaum et al. 2009; Kandel 2013; Vriens et al. 2014). Es konnte gezeigt werden, dass TRPV1 u.a. bei Temperaturen > 43 °C aktiviert wird und neben TRPV2 und TRPM3 an der Prozessierung schädlicher Hitzestimuli beteiligt ist (Caterina et al. 2000; Moore et al.

2018; Tan and McNaughton 2016; Vay et al. 2012; Vriens et al. 2014; Vriens et al. 2011). Während TRPV3, TRPV4 und TRPM2 für die Wahrnehmung nicht schmerzhafter Wärme zuständig sind und somit einen wesentlichen Beitrag zum Wärmeempfinden leisten, werden TRPM8 und TRPA1 durch moderate bzw. extreme Kältestimuli aktiviert. So kann der gesamte thermische Bereich von extremer Hitze bis hin zu schmerzhafter Kälte erfasst werden (Tan and McNaughton 2016; Vay et al. 2012). In tierexperimentellen Untersuchungen zeigten TRPV1^{-/-}-Mäuse sowohl im *Hot-Plate*-Test bei Temperaturen $\geq 52,5$ °C als auch im *Hot Water Tail-Immersion*-Test bei Temperaturen ≥ 50 °C erhöhte Latenzzeiten, während bei niedrigeren Temperaturen eine mit Wildtyp-Mäusen vergleichbare Reaktion verzeichnet wurde (Caterina et al. 2000). Auch bei Versuchen mit TRPM3^{-/-}-Mäusen wurde im *Hot-Plate*-Test bei Temperaturen ≥ 52 °C und im *Hot Water Tail-Immersion*-Test bei Temperaturen ≥ 45 °C eine höhere Hitzeschmerzschwelle festgestellt (Vriens et al. 2011). Obwohl bei TRPA1^{-/-}-Mäusen im *Hot-Plate*-Test bei Temperaturen von 50 °C, 52 °C und 55 °C kein verändertes Schmerzverhalten im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern zu finden war, scheint TRPA1 auch durch thermische Hitze aktivierbar zu sein (Kwan et al. 2006; Moparthy et al. 2016). Dies konnte in jüngsten Forschungsergebnissen von Vandewauw et al., 2018, bestätigt werden. Dabei führte ein *Tripleknockout* von TRPV1, TRPM3 und TRPA1 in Mäusen zu einer erheblichen Zunahme der Hitzeschmerzschwelle. So zeigten *Tripleknockout*-Mäuse im *Hot-Plate*-Test bei Temperaturen von 45 °C bis 52 °C und im *Hot Water Tail-Immersion*-Test bei Temperaturen von 45 °C bis 57 °C stark erhöhte Latenzzeiten. Eine Reaktion auf schädliche Hitze, um so die Entstehung von Gewebeschädigungen im Rahmen von Verbrennungen zu verhindern, war nur dann zu beobachten, wenn mindestens einer dieser TRP-Kanäle funktionsfähig war. Dagegen waren die Reaktionen der *Tripleknockout*-Mäuse auf Kälte sowie mechanische Stimuli mit denen der Wildtypen vergleichbar. Die Autoren der Studie schlussfolgern, dass die Verarbeitung schädlicher Hitze im Wesentlichen TRPV1, TRPM3 und TRPA1 zuzuschreiben ist (Vandewauw et al. 2018).

Während TRPV1 in peptidergen und nicht-peptidergen C- und einigen A δ -Fasern exprimiert wird, wird TRPA1 vor allem in DRG-Neuronen des NP-Clusters gebildet (Moore et al. 2018; Usoskin et al. 2015; Zeisel et al. 2018). Allerdings konnte auch eine Kolo-kalisation von TRPV1, TRPM3 und TRPA1 in somatosensorischen Neuronen des PEP-Clusters festgestellt werden (Usoskin et al. 2015; Zeisel et al. 2018). Obwohl in immunhistochemischen Untersuchungen keine Kolo-kalisation zwischen Slick und TRPV1 in DRG-Neuronen zu verzeichnen war (Abb. 41), sprechen die aus Einzelzell-RNA-Sequenzierung gewonnenen Daten dafür, dass Slick und TRPV1 zumindest teilweise koexprimiert werden (Sharma et al. 2020; Usoskin et al. 2015; Zeisel et al. 2018). So könnte Slick, exprimiert in peptidergen

CGRP-positiven Neuronen, durch Natrium-Einstrom infolge der Aktivierung von Temperaturempfindlichen TRP-Kanälen aktiviert werden. Der daraus resultierende Kalium-Efflux und die damit einhergehende Re- und Hyperpolarisation der Plasmamembran könnte folglich den Hitzeschmerz in einem bestimmten Temperaturbereich modulieren (Abb. 54).

Auch Erkenntnisse der Arbeitsgruppe von Dr. Arin Bhattacharjee sprechen für eine funktionelle Beteiligung von Slick bei der Hitzeweiterleitung. Unter basalen Bedingungen zeigten Slick^{-/-}-Mäuse eine verringerte Körpertemperatur und außerdem im Hargreaves-Test eine im Vergleich zu ihren wildtypischen Wurfgeschwistern reduzierte Latenzzeit (Tomasello et al. 2017). Im Gegensatz dazu konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Unterschied im Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Hargreaves-Test festgestellt werden. Die Differenz der Ergebnisse könnten dadurch bedingt sein, dass verschiedene Slick^{-/-}-Mauslinien verwendet wurden oder aber auch auf eine begrenzte Reproduzierbarkeit der Methode deuten. Hierbei ist anzumerken, dass Slick^{-/-}-Mäuse im Hargreaves-Test bei einer Intensität von 25 ein tendenziell erhöhtes Schmerzverhalten aufzeigten, das jedoch leicht über der Signifikanzgrenze lag ($p = 0,0888$) (Abb. 34).

Interessanterweise scheint auch dem K_{Na}-Kanal Slack eine funktionelle Beteiligung bei der thermischen Nozizeption zuzukommen. Obwohl Lu et al., 2015, keinen Unterschied in der thermischen Schmerzschwelle von Slack^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im *Hot-Plate*-Test feststellen konnten (Lu et al. 2015), wurde im Hargreaves-Test eine reduzierte thermische Reizschwelle bei Slack^{-/-}-Mäusen verzeichnet (Evely et al. 2017).

Ausblick

Ob die verkürzten Latenzzeiten der Slick^{-/-}-Mäuse im *Hot-Plate*- und *Hot Water Tail-Immersion*-Test durch Slick, exprimiert in somatosensorischen Neuronen und/ oder in Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks, vermittelt wird, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden und könnte Bestandteil künftiger Untersuchungen mit konditionellen Slick^{-/-}-Mäusen sein. Da Neuronen des PEP2-Clusters eine Bedeutung an der Verarbeitung von durch bspw. einen Nadelstich ausgelösten stechenden Schmerzen zugeschrieben wird (Kupari et al. 2021), könnte man in Zukunft globale sowie gewebspezifische Slick^{-/-}-Mäuse in entsprechenden Verhaltenstest wie bspw. dem *Pin Prick*-Test untersuchen. So könnte ggf. eine funktionelle Beteiligung von Slick bei der Verarbeitung stechender Schmerzen identifiziert werden. Weiter könnte der *Thermal Preference*-Test Rückschlüsse auf die Funktion von Slick bei der Verarbeitung thermischer Reize liefern. In diesem Test werden die Versuchstiere auf eine Platte gesetzt, deren einzelne Areale Temperaturen zwischen 15 °C und 40 °C annehmen können. Im Anschluss

können die bevorzugten Aufenthaltsorte der Versuchstiere bestimmt werden (Touska et al. 2016).

4.4.2 Untersuchung möglicher Interaktionspartner

Rolle von Slick im Capsaicin- und Formalin-Test

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen TRPV1 bzw. TRPA1 und Slick herstellen zu können, wurden Slick^{-/-}-Mäuse sowohl im Capsaicin- als auch im Formalin-Test untersucht. Im Capsaicin-Test werden direkt TRPV1-Kanäle angesteuert, während sich der Formalin-Test durch eine Aktivierung von TRPA1-Kanälen auszeichnet. Hierbei zeigten Slick^{-/-}-Mäuse eine verstärkte Reaktion einige Minuten nach der Capsaicin-Injektion und auch im Formalin-Test wurde bei Slick^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Reaktion in der zweiten Phase beobachtet (Abb. 39, Abb. 42). Dies lässt vermuten, dass Slick bei Sensibilisierungsvorgängen im Rückenmark, die die späte Phase ausmachen, eine Rolle spielen könnte.

Dagegen wurde in einer anderen Studie bei Mäusen mit einem globalen Doppel-Knockout von Slack und Slick ein ausgeprägteres Leckverhalten in der ersten Phase des Capsaicin-Tests festgestellt (Martinez-Espinosa et al. 2015). Da die erste Schmerzantwort im Capsaicin-Test bei Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen vergleichbar war, könnte dies für eine funktionelle Beteiligung von Slack an der unmittelbaren Reaktion auf Capsaicin sprechen.

Mäuse mit einem globalen Doppel-Knockout beider K_{Na}-Kanäle zeigten weiter kein verändertes Schmerzverhalten im Formalin-Test auf (Martinez-Espinosa et al. 2015). Zugleich konnte die Arbeitsgruppe von Dr. Arin Bhattacharjee keinen signifikanten Unterschied im Leckverhalten zwischen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Formalin-Test feststellen. Tomasello et al., 2017, beobachteten 25 Minuten nach Formalin-Injektion, dass Slick^{-/-}-Mäuse vermehrt die injizierte Pfote anheben und schütteln. Der Unterschied in den Schüttelzeiten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen war zum Zeitpunkt 25 Minuten nach Injektion statistisch signifikant (Tomasello et al. 2017). Dies könnte ebenso auf eine funktionelle Beteiligung von Slick in der zweiten Phase des Formalin-Tests deuten. Die Differenzen der Ergebnisse zu dieser Arbeit könnten dadurch bedingt sein, dass Tomasello et al., 2017, eine andere globale Slick^{-/-}-Mauslinie getestet haben oder aber daran, dass anstelle einer 0,5%igen eine 5%ige Formalin-Lösung zur Injektion verwendet wurde (Tomasello et al. 2017).

In Voruntersuchungen zur Charakterisierung des Slick-Kanals wurde die Wirkung des Slack- und Slick-Inhibitors Clofilium im Formalin-Test mit Slack^{-/-}-Mäusen untersucht. Nach Clofilium-Applikation wurde ein signifikanter Unterschied im Verhalten von Vehikel- und Clofilium-behandelten Slack^{-/-}- als auch zwischen Vehikel- und Clofilium-behandelten

Wildtyp-Mäusen in der späten Phase festgestellt. Hierbei wurde nach Clofilium-Gabe eine verringerte Schmerzreaktion in der zweiten Phase des Formalin-Tests verzeichnet (Abb. 21). Dies deutet darauf hin, dass das Leckverhalten der zweiten Phase des Formalin-Tests durch die systemische Clofilium-Applikation und Inhibition von Kaliumkanälen gehemmt wird. Anders als nach den im Formalin-Test mit Slack^{-/-}-Mäusen nach Clofilium-Injektion gewonnenen Ergebnissen erwartet, wurde jedoch bei Slick^{-/-}-Mäusen eine verstärkte Reaktion in der zweiten Phase des Formalin-Tests verzeichnet. Diese Daten lassen vermuten, dass die Hemmung des Schmerzverhaltens im Formalin-Test durch Clofilium Slack- und Slick-unabhängig verläuft und vielmehr durch eine Blockade anderer Kanäle vermittelt wird. Neben Slack und Slick blockiert Clofilium z.B. auch Kanäle der K_{Ca}- und K_V-Familie (Abi Nahed et al. 2018; Gessner and Heinemann 2003; Los Angeles Tejada et al. 2012b; Malayev et al. 1995).

Rolle von Slick im Modell der Zymosan-induzierten thermischen Hyperalgesie

Da Tomasello et al., 2017, bereits eine Beteiligung von Slick bei der Verarbeitung von langanhaltenden Entzündungsschmerzen nach CFA-Injektion im Hargreaves-Test feststellen konnten (Tomasello et al. 2017), wurde auch in dieser Arbeit die funktionelle Bedeutung von Slick bei der Verarbeitung von Entzündungsschmerzen untersucht. Hierbei wurde das Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen und entsprechenden wildtypischen Wurfgeschwistern im Modell der Zymosan-induzierten Pfotenentzündung analysiert. Durch Injektion einer CFA-Lösung kommt es, wie nach Zymosan-Injektion, zu einer Entzündungsreaktion, die mit einer Überempfindlichkeit der Pfote gegenüber mechanischen und thermischen Stimuli einhergeht (Ferreira et al. 2001). Während die Zymosan-induzierte Hyperalgesie allerdings nach zwei bis drei Tagen wieder abklingt, kann die CFA-induzierte Hyperalgesie über einen Zeitraum von fast zwei Wochen andauern. An Tag 1 nach CFA-Injektion entwickelten sowohl Slick^{-/-}- als auch Wildtyp-Mäuse eine thermische Hyperalgesie, die sich durch eine im Vergleich zur Baseline-Messung statistisch signifikanten Reduktion der Latenzzeiten im Hargreaves-Test darstellte. Die thermische Hyperalgesie der Wildtyp-Mäuse war reversibel, an Tag 12 war kein Unterschied in den Latenzzeiten im Vergleich zur Baseline-Latenzzeit zu verzeichnen. Slick^{-/-}-Mäuse dagegen zeigten an Tag 12 nach CFA-Injektion eine, verglichen mit der Baseline-Messung, signifikant verkürzte Latenzzeit und somit eine erhöhte thermische Hyperalgesie. Daraus schlussfolgern die Autoren, dass Slick an Regenerationsprozessen bei anhaltenden Entzündungsprozessen beteiligt zu sein scheint (Tomasello et al. 2017). Im Gegensatz hierzu konnte im Rahmen dieser Arbeit kein statistisch signifikanter Unterschied im Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen im Modell der Zymosan-induzierten thermischen Hyperalgesie festgestellt werden (Abb. 44). Zum Zeitpunkt drei Stunden nach Zymosan-Injektion wurde jedoch ein tendenzieller Unterschied in den Latenzzeiten zwischen

Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verzeichnet. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Entzündung der Pfote und die damit einhergehende Sensibilisierung bei Verlust von Slick schneller voranschreitet. Der Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz und zu späteren Zeitpunkten war kein Unterschied in den Latenzzeiten zu verzeichnen. Wie bereits weiter oben aufgeführt, arbeiteten Tomasello et al., 2017, mit einer anderen Slick^{-/-}-Mauslinie. Hierbei handelte es sich um einen C57BL6/J/129 Hintergrund mit einer Deletion der Exons zwei bis sieben des Slick-Gens. Diese kodieren für die transmembranen Domänen und die Pore des Slick-Kanals (Tomasello et al. 2017). Außerdem ist zu berücksichtigen, dass im Hargreaves-Test bereits kleinste Änderungen im Abstand der zu messenden Pfote und der Heizquelle das Ergebnis beeinflussen können.

Mögliche Beteiligung von Slick im SST-SST_{2A}-Signalweg

Da Slick^{-/-}-Mäuse in der späten Phase des Capsaicin-Tests eine verstärkte Reaktion zeigen, liegt die Vermutung nahe, dass Slick, exprimiert in Interneuronen des Dorsalorns, an Sensibilisierungsprozessen beteiligt ist. Interessanterweise wird Slick zusammen mit dem Rezeptor für Somatostatin SST_{2A} vor allem in inhibitorischen Interneuronen der Gaba2-3 Populationen exprimiert (Häring et al. 2018). Nach Aktivierung von TRPV1 durch Capsaicin kommt es nicht nur zur Glutamat-Freisetzung, sondern auch zur Ausschüttung von Somatostatin (SST) aus präsynaptischen Endigungen (Park et al. 2011; Szolcsányi et al. 1998). TRPV1-positive somatosensorische Neurone konnten in unmittelbarer Nähe von Somata Slick-positiver Zellen nachgewiesen werden (Abb. 40), was auf eine Interaktion zwischen SST, SST_{2A} und Slick und möglicherweise eine SST-SST_{2A}-abhängige Aktivierung von Slick deuten könnte. Das inhibitorische Peptidhormon SST kommt in zwei biologisch aktiven Formen, SST-14 und SST-28, vor und ist an einer Vielzahl von physiologischen Prozessen beteiligt (Bowman et al. 2019; Günther et al. 2018). Die SST-Rezeptoren gehören zur Klasse der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und werden in fünf Subtypen unterteilt (SST1-5) (Günther et al. 2018). Dabei wurden SST_{2A} und SST_{2B} im Dorsalhorn des Rückenmarks nachgewiesen (Bowman et al. 2019). Infolge der SST_{2A}-Aktivierung kommt es auch zur Aktivierung von K_V-Kanälen (Yang et al. 2005). Jüngste Ergebnisse aus dem Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt stützen eine mögliche Interaktion von SST, SST_{2A} und Slick. Ebenso wie Slick^{-/-}-Mäuse zeigten auch Lbx₁-Slick^{-/-}-Mäuse ein erhöhtes Schmerzverhalten in der späten Phase des Capsaicin-Tests. So liegt die Vermutung nahe, dass das Fehlen von Slick in Dorsalhornneuronen die verstärkte Leckreaktion nach Capsaicin-Injektion auslöst. Des Weiteren war im Capsaicin-Test nach vorheriger intrathekaler Applikation eines SST_{2A}-Antagonisten kein Unterschied im Leckverhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen zu beobachten. Dagegen hatte die Vorbehandlung mit dem SST_{2A}-Antagonisten keine Auswirkungen auf das Capsaicin-

induzierte Leckverhalten von Wildtyp-Mäusen. Dies deutet darauf hin, dass SST nach Capsaicin-Injektion die GABA-Freisetzung aus SST_{2A}-positiven inhibitorischen Interneuronen hemmen und diese Enthemmung über eine Slick-Aktivierung verlaufen könnte (Flauaus et al. 2022). Infolgedessen könnte es zu einer erhöhten Aktivität von SST_{2A}-positiven inhibitorischen Interneuronen bei globaler Deletion von Slick kommen. Gleichzeitig würden bei einem globalen Slick-Knockout aber auch die inhibitorischen Effekte von Slick in exzitatorischen Interneuronen wegfallen, was die verstärkte Leckreaktion von Slick^{-/-}-Mäusen in der späten Phase des Capsaicin-Tests erklären könnte (Abb. 53).

SST wird zusammen mit BNP in Neuronen des NP3-Clusters exprimiert und nimmt auch bei der Verarbeitung von Pruritus eine wesentliche Rolle ein (Huang et al. 2018; Usoskin et al. 2015). Huang et al., 2018, konnten zeigen, dass SST zum einen für eine physiologische Juckreiz-Empfindung nötig ist, zum anderen aber auch, dass SST den durch Histamin-, BNP- und GRP-induzierten Pruritus verstärkt (Huang et al. 2018). Dabei bindet BNP an NPR1 in Dorsalhornneuronen, wodurch die GRP-Freisetzung initiiert wird. Infolgedessen bindet GRP an GRP-Rezeptoren, wodurch das pruritogene Signal an supraspinale Bereiche weitergeleitet und Juckreiz vermittelt wird (Albisetti et al. 2019; Huang et al. 2018). Die Forschergruppe identifizierte einen möglichen Signalweg, über welchen SST am Juckreizgeschehen beteiligt sein könnte. Dabei soll SST an SST_{2A} in inhibitorischen Dynorphin-positiven Interneuronen binden und diese Neuronenpopulation hemmen. Hierdurch könnten GRPR-positive Neurone enthemmt werden und infolgedessen über GRPR-vermittelten Pruritus verstärken (Huang et al. 2018). Weitere Forschungsergebnisse lassen darauf schließen, dass auch Slick im Juckreiz-Signalweg funktionell beteiligt sein könnte (Flauaus et al. 2022). Intrathekal verabreichtes SST oder SST-Analoga wie z.B. Octreotid induziert über Bindung an SST_{2A} einen ausgeprägten Juckreiz (Huang et al. 2018). Allerdings führte die intrathekale Applikation des SST-Analogons Octreotid zu einem verminderten Juckreiz-Verhalten von Slick^{-/-}-Mäusen, während die wildtypischen Wurfgeschwister einen ausgeprägten Pruritus entwickelten. Der gleiche Phänotyp wurde auch bei Lbx₁-Slick^{-/-}-Mäusen verzeichnet. Dies lässt vermuten, dass Slick, exprimiert in inhibitorischen Interneuronen im Rückenmark, für den durch SST-SST_{2A} induzierten Juckreiz erforderlich ist. Dagegen wurde kein Unterschied im Juckreiz-Verhalten von Slick^{-/-}- bzw. Lbx₁-Slick^{-/-}- und den entsprechenden Kontroll-Tieren nach intrathekaler Applikation von GRP festgestellt (Flauaus et al. 2022). Hierbei ist zu sagen, dass Slick vorwiegend in inhibitorischen Subpopulation exprimiert wird, während GRP und GRPR vor allem in exzitatorischen Interneuronen zu finden sind (Häring et al. 2018; Zeisel et al. 2018). In Abb. 53 ist ein möglicher Signalweg dargestellt.

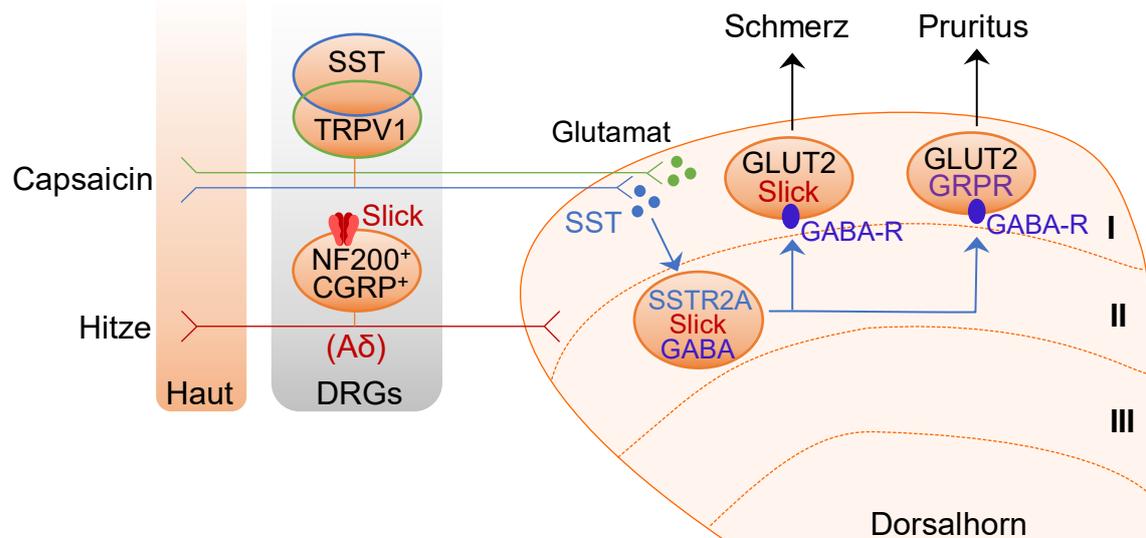


Abb. 53. Graphische Darstellung des SST-SST_{2A}-Slick-Signalswegs. Das durch Capsaicin freigesetzte SST bindet an SST_{2A}-Rezeptoren in GABAergen Interneuronen, was direkt oder indirekt zur Aktivierung von Slick führen könnte. Infolge der Slick-vermittelten Re- und Hyperpolarisation könnte es zur Hemmung der GABA-Freisetzung kommen und als Folge dieser Enthemmung, über VGLUT2- und Slick-positive Interneurone erzeugte Schmerzen verstärken. Bei einer Deletion von Slick könnte es zur erhöhten Aktivität von SST_{2A}-positiven inhibitorischen Interneuronen kommen, aber gleichzeitig würden auch die inhibitorischen Effekte von Slick in exzitatorischen Interneuronen wegfallen, wodurch eine verstärkte Schmerzreaktion hervorgerufen werden könnte. SST-induzierter Pruritus wird durch Bindung von SST an SST_{2A}-Rezeptoren in inhibitorischen Dorsalhornneuronen vermittelt. Dies könnte Slick aktivieren, was die Hemmung dieser Neuronenpopulation einleitet und infolgedessen GRPR-positive Neurone enthemmt und so Juckreiz verstärkt. Verändert nach Flauaus et al. 2022.

Mögliche Interaktion von Slick und TNF α im Rückenmark

Das bei Entzündungen und Gewebeerletzungen freigesetzte proinflammatorische Zytokin TNF α ist an peripheren und zentralen Sensibilisierungsprozessen und der Pathogenese chronischer Schmerzzustände beteiligt. So konnte im Rahmen der zentralen Sensibilisierung eine über TNF α vermittelte gesteigerte Erregung von Dorsalhornneuronen festgestellt werden (Zhang et al. 2011). Interessanterweise wurde zudem verzeichnet, dass TNF α über den p38-MAPK-Weg Slick-Ströme und die Slick Protein-Expression im Dorsalhorn des Rückenmarks inhibiert (Wang et al. 2017). Eine Hemmung von Slick, exprimiert in Dorsalhornneuronen, könnte somit im Zusammenhang mit einer erhöhten zentralen Sensibilisierung stehen, was mit den gesteigerten Schmerzreaktionen der Slick^{-/-}-Mäuse in der späten Phase des Capsaicin- bzw. Formalin-Tests einhergehen könnte.

Mögliche Beteiligung von Slick im Bradykinin-Signalweg

Als polymodaler Sensor wird der nicht-selektive Liganden-gesteuerte Kationenkanal TRPV1 neben Hitzestimuli auch durch Protonen, endogenen Lipiden wie z.B. Anandamid, bestimmten Entzündungsmediatoren und auch exogenen Substanzen, wie das in der Pflanzengattung *Capsicum* enthaltene Capsaicin, aktiviert (O'Neill et al. 2012; Ross 2003;

Szallasi and Blumberg 1999; Vay et al. 2012). Nach Bindung des lipophilen Capsaicins an intrazelluläre Bindungsstellen, kommt es zur Öffnung des Kationenkanals und zum Einstrom von Natrium- und vor allem Calcium-Ionen. Der chemische Reiz wird so erkannt und in ein elektrisches Signal überführt, welches an höhere Zentren des Gehirns weitergeleitet wird (Basbaum et al. 2009; Basbaum and Bráz 2016; Caterina et al. 1997; O'Neill et al. 2012). Zu den exogenen Aktivatoren von TRPA1 gehören scharfe Verbindungen wie das in Zimt enthaltene Zimtaldehyd, das in Knoblauch enthaltene Stoffwechselprodukt Allicin sowie Allylisothiocyanat, ein Inhaltsstoff von Senf, Meerrettich und Wasabi und auch Formalin (Bandell et al. 2004; Kádková et al. 2017; Vay et al. 2012). Die Aktivierung von TRPA1 führt zur Depolarisierung der Membran und zum lokalen Calcium-Einstrom in die Zelle, welcher die Freisetzung von Neuropeptiden wie CGRP, Substanz P und Neurokinin A bewirkt. Infolgedessen kommt es zur verstärkten Schmerzreaktion, Rekrutierung von Immunzellen, Vasodilatation und Entzündung. Entsprechend kann TRPA1 mit verschiedenen Schmerzzuständen wie z.B. viszerale Schmerzen, Schmerzen im Zusammenhang mit Arthritis oder Migräne in Verbindung gebracht werden. Im Rahmen von Entzündungen und Gewebeverletzungen werden Entzündungsmediatoren wie z.B. Prostaglandine, ATP, Endothelin-1, Serotonin und extrazelluläre Proteasen freigesetzt. Diese Mediatoren können TRPA1 direkt aktivieren oder Signalwege stimulieren, die zu Phosphorylierungen von TRPA1 führen, sodass dessen Kanalaktivität moduliert wird. Letzteres macht die Nozizeptoren empfindlicher gegenüber noxische Stimuli (Kádková et al. 2017). Dabei wird auch dem Nonapeptid und Entzündungsmediator Bradykinin und seinen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren B₁ und B₂ eine bedeutende Rolle zugeschrieben (Kádková et al. 2017; O'Neill et al. 2012; Sugiura et al. 2002; Wang et al. 2006). Während B₂-Rezeptoren in somatosensorischen Neuronen exprimiert werden, wird die Expression des B₁-Rezeptors im Rahmen von Entzündungsreaktionen hochreguliert (Kádková et al. 2017; Wang et al. 2006). Nach Rezeptorbindung wird im Anschluss über einen G_q-Signalweg die Phospholipase C (PLC) aktiviert, welche PIP₂ zu Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP₃) spaltet. Nachfolgend aktiviert DAG die PKC und IP₃ erhöht die Calcium-Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum (Kádková et al. 2017; O'Neill et al. 2012; Wang et al. 2006). Die erhöhten intrazellulären Calcium-Spiegel bewirken die direkte Aktivierung von TRPA1. Zum anderen kann über einen G_s-Signalweg eine Aktivierung der Adenylatzyklase (AC) erfolgen. Dies führt zu einer verstärkten Bildung von cAMP, was schließlich die PKA aktiviert (Kádková et al. 2017). Durch Aktivierung dieser Serin/ Threonin-Kinasen können im Anschluss TRPV1 bzw. TRPA1 phosphoryliert und deren Aktivierungsschwelle herabgesetzt werden (Kádková et al. 2017; O'Neill et al. 2012; Wang et al. 2006). Außerdem beeinflusst Bradykinin auch die Gentranskription. So wird NF-κB, ein spezifischer Transkriptionsfaktor, der auch bei der Regulation von Schmerzen von Bedeutung ist, durch Bradykinin aktiviert

(Tegeder et al. 2004; Wang et al. 2006). Interessanterweise wird die Expression von Slick über NF- κ B moduliert und unterliegt der Aktivierung von NF- κ B (Tomasello et al. 2015). Slick wird zusammen mit B₂-Rezeptoren in peptidergen DRG-Neuronen exprimiert. Weiter wurde eine Koexpression von Slick und B₁-Rezeptoren überwiegend in inhibitorischen, aber auch in exzitatorischen Interneuronen verzeichnet (Zeisel et al. 2018). Über die Bradykinin vermittelte Aktivierung von NF- κ B könnte es zu einer Hochregulation von Slick in DRG-Neuronen kommen, was durch den Kalium-Efflux zur Re- und Hyperpolarisation der neuronalen Plasmamembran führen würde und peripheren Sensibilisierungsprozessen entgegenwirken könnte.

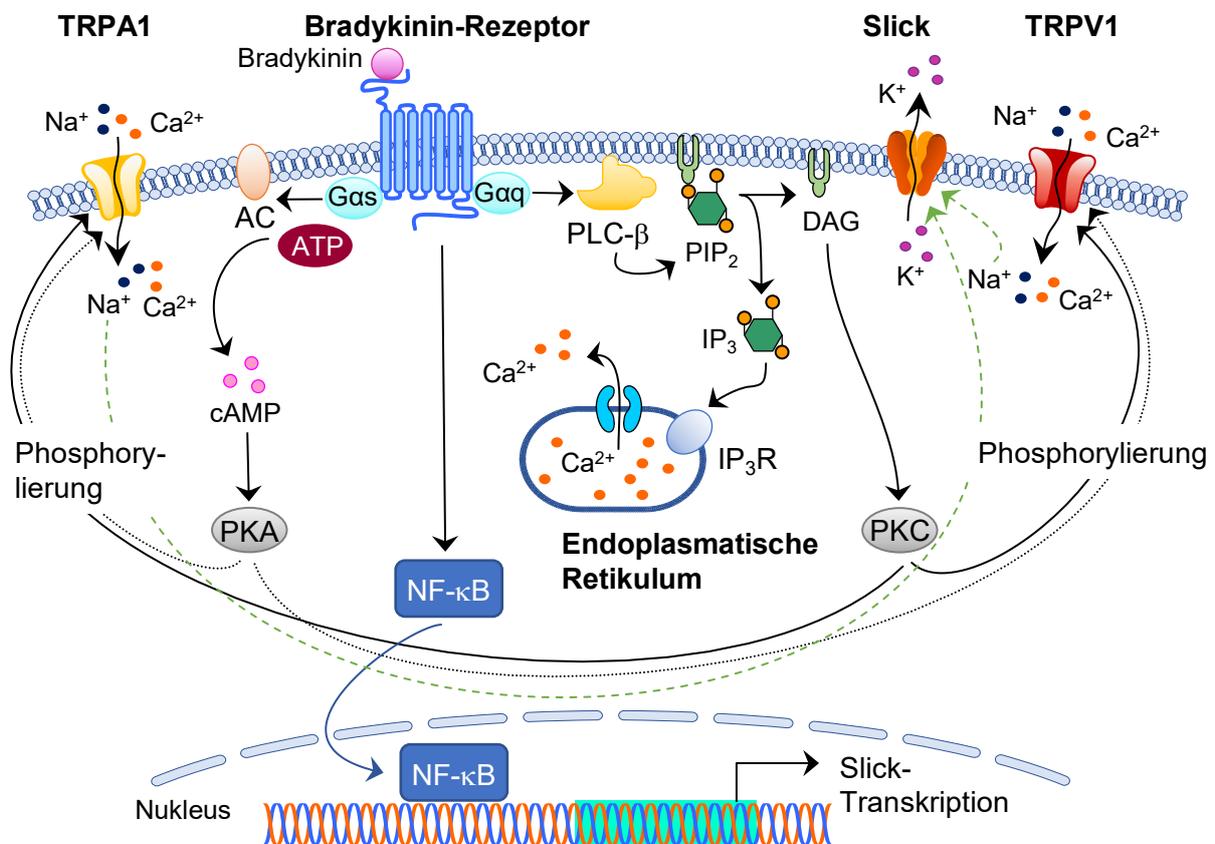


Abb. 54. Graphische Darstellung von zusammenhängenden Signalwegen, die möglicherweise zur Sensibilisierung von TRPA1 beitragen. Nach Bindung von Bradykinin an B₂-Rezeptoren wird über ein Gαq-Protein die PLC- β aktiviert. Diese spaltet PIP₂ zu DAG und IP₃. IP₃ bindet an IP₃-Rezeptoren (IP₃R) und bewirkt eine Calcium-Ausschüttung aus dem endoplasmatischen Retikulum, was vermutlich TRPA1 direkt sensibilisiert. DAG führt zur Aktivierung der PKC. Über ein Gαs-Protein wird außerdem die AC aktiviert, die ATP in cAMP umwandelt. Letzteres aktiviert die PKA. Durch Aktivierung der Proteinkinasen kommt es zu Phosphorylierungen von TRPA1 und TRPV1, wodurch die Kanäle sensibilisiert werden, was Einfluss auf deren Aktivierungsschwelle nimmt. Die über Bradykinin vermittelte Aktivierung von TRPV1 und der damit einhergehende Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kann eine verstärkte Aktivierung von TRPA1 herbeiführen. Weiter wird durch die Bindung von Bradykinin an seine Rezeptoren der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, der die Expression von Slick kontrolliert. Außerdem kann es über die steigenden intrazellulären Natrium-Spiegel durch Aktivierung der TRP-Kanäle zu einer direkten Aktivierung von Slick und einem daraus resultierenden Kalium-Efflux kommen. Die damit einhergehende Re- und Hyperpolarisation der Plasmamembran könnte zur Hemmung der Schmerzreaktion beitragen. Verändert nach Kádková et al. 2017.

Diese Vermutung ist jedoch rein spekulativer Natur und könnte in Zukunft mit Hilfe von Expressionsanalysen verfolgt werden. Die verstärkte Schmerzreaktion von Slick^{-/-}-Tieren im Capsaicin- und Formalin-Test sowie das tendenziell erhöhte Schmerzverhalten von Slick^{-/-}-Mäusen im Modell der Zymosan-induzierten thermischen Hyperalgesie zum Zeitpunkt drei Stunden nach Injektion stützen jedoch diese These.

4.4.3 Rolle von Slick bei neuropathischen Schmerzen

Anders als bei Tomasello et al., 2017, die als Folge des Verlustes von Slick eine verstärkte thermische Hypersensitivität bei neuropathischen Schmerzen beobachtet haben (Tomasello et al. 2017), zeigten Slick^{-/-}-Mäuse ab Tag 25 nach SNI im Dynamic Plantar-Test eine geringfügig höhere mechanische Schmerzschwelle als ihre wildtypischen Wurfgeschwister (Abb. 45). Hierbei zeichnete sich ein statistisch signifikanter Gruppenunterschied zwischen Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen ab. Auch hier könnten Slick-Kanälen, exprimiert in inhibitorischen Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks, eine Bedeutung zugeschrieben werden. Die Öffnung von Kaliumkanälen ermöglicht einen hyperpolarisierenden Kalium-Efflux, welcher der Depolarisation entgegenwirkt und daher typischerweise die neuronale Erregung hemmt (Tsantoulas 2015). Ein Knockout von Slick in inhibitorischen Interneuronen könnte folglich die Erregung GABAerger Neuronen stärken und die Freisetzung inhibitorischer Neurotransmitter erhöhen, was ein verringertes Schmerzverhalten zur Folge haben könnte.

Auch die Runterregulation von Slick mRNA in DRGs sieben Tage nach SNI könnte für eine funktionelle Beteiligung von Slick bei der Verarbeitung von neuropathischen Schmerzen sprechen (Abb. 46). In der Literatur wurde bereits des Öfteren eine Runterregulation von Kaliumkanälen im sensorischen System als Folge peripherer Nervenverletzungen beschrieben. Hierbei ist z.B. die verminderte Expression der spannungsabhängigen Kanäle K_v1, K_v1.2 und K_v9.1 infolge von Nervenverletzungen zu nennen (Calvo et al. 2016; Tsantoulas et al. 2012). KCNS1, das Gen, welches für die K_v9.1-Untereinheit kodiert, ist das erste Gen der K_v-Familie, welches mit der Entstehung chronischer Schmerzen beim Menschen in Verbindung gebracht wurde. So ergaben genetische Analysen, dass ein KCNS1-Polymorphismus mit einer erhöhten basalen Schmerzempfindlichkeit sowie der Neigung zur Entwicklung von Phantomschmerzen, Rückenschmerzen und Schmerzen im Zusammenhang mit HIV, assoziiert sein könnte. Der spannungsabhängige Kaliumkanal K_v9.1 wird in DRGs, im Rückenmark und Gehirn, nicht jedoch in nicht-neuronalen Geweben exprimiert (Tsantoulas et al. 2018). In der Ratte konnte gezeigt werden, dass ein K_v9.1-Knockdown zur Entstehung neuropathischer Schmerzen mit mechanischer Hypersensitivität und einer erhöhten neuronalen Erregung myelinisierter Fasern führt (Tsantoulas et al. 2012; Waxman and Zamponi 2014). Auch in konditionellen Knockout-Mäusen mit einer K_v9.1-

Deletion in peripheren DRG-Neuronen wurde im neuropathischen Schmerzmodell eine stark ausgeprägte mechanische Hypersensitivität sowie eine Überempfindlichkeit gegenüber schädlicher sowie harmloser Kältestimuli verzeichnet. Eine Modulation von $K_v9.1$ in der Peripherie lässt demnach eine Linderung von mechanischer sowie Kälte-induzierter Hypersensitivität im Rahmen von chronischen Schmerzzuständen vermuten (Tsantoulas et al. 2018).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die mRNA einiger Vertreter der K_{2P} -Kanalfamilie in DRGs runterreguliert wurde (Busserolles et al. 2016). Bei Ratten wurde auf mRNA-Ebene eine Herabregulation von TASK3 und TWIK1 sieben Tage nach SNI im Vergleich zu Sham-behandelten Versuchstieren verzeichnet, sodass diese Kanäle bei der Entstehung chronischer Schmerzzuständen beteiligt sein könnten. Vier Wochen nach SNI waren die mRNA-Level von TWIK1 weiterhin runterreguliert, was für dessen Beteiligung bei der Aufrechterhaltung neuropathischer Schmerzen spricht (Busserolles et al. 2016; Pollema-Mays et al. 2013). Im Gegensatz dazu konnte eine Runterregulation von Slick nur zu einem Zeitpunkt festgestellt werden. Zu berücksichtigen ist auch, dass im *Dynamic Weight Bearing*-Modell zur Untersuchung von spontanen Schmerzen kein Unterschied im Verhalten von Slick^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen verzeichnet werden konnte (Abb. 45). Zusammengefasst scheint die funktionelle Beteiligung von Slick bei der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen gering zu sein.

4.5 Slack und Slick als potenzielle Targets in der Schmerztherapie

Bereits im Jahr 1999 wurde eine neue Substanzklasse, deren Wirkprinzip die selektive neuronale Kaliumkanalöffnung (*Selective Neuronal Potassium Channel Opener*, SNEPCO) darstellt, vorgestellt (Kornhuber et al. 1999). Prototyp dieser Wirkstoffklasse mit analgetischen, muskelrelaxierenden und neuroprotektiven Eigenschaften ist Flupirtin, das in Europa bereits seit den 1980er Jahren zur Therapie von akuten und chronischen Schmerzzuständen eingesetzt wurde (Abd-Elseyed et al. 2019; Kornhuber et al. 1999; Szelenyi 2013). Dabei aktiviert Flupirtin Kaliumkanäle, wodurch die Plasmamembran hyperpolarisiert und das Ruhemembranpotenzial stabilisiert wird. Dies führt über eine indirekte Hemmung von NMDA-Rezeptoren zur Verringerung des Glutamat-induzierten Anstiegs der intrazellulären Calciumkonzentration (Harish et al. 2012)). Seit 2018 jedoch ist Flupirtin aufgrund seines leberschädigenden Potenzials nicht mehr zugelassen (Abd-Elseyed et al. 2019; Szelenyi 2013). Ein weiterer bekannter Kaliumkanal-Aktivator stellt Retigabin dar. Dieser K_v7 -Aktivator wurde in den USA seit 2011 zur Therapie von Krampfanfällen bei Epilepsie eingesetzt, ist allerdings aufgrund seines Nebenwirkungsprofils seit 2017 nicht mehr auf dem Markt (Abd-Elseyed et al. 2019). Zu den im Zusammenhang mit Retigabin aufgetretenen unerwünschten Wirkungen zählen ZNS-assoziierte Ereignisse wie Schwindel,

Somnolenz, Kopfschmerzen und Müdigkeit sowie Pigmentveränderungen der Haut und der Netzhaut (Abd-Elseyed et al. 2019). Als K_V7 -Aktivator zeigte Retigabin in tierexperimentellen Schmerzmodellen antinozizeptive Effekte (Abd-Elseyed et al. 2019; Wood 2020). Interessanterweise konnte auch bei Diclofenac eine Hemmung von $K_V7.2$ -, $K_V7.3$ - und $K_V7.2$ - $K_V7.3$ -Kanälen festgestellt werden. $K_V7.2$ - und $K_V7.3$ -Kanäle werden überwiegend in nozizeptiven Neuronen der Spinal- und Trigeminusganglien exprimiert und scheinen eine Rolle bei der peripheren Sensibilisierung einzunehmen. So kommt es im Zuge einer peripheren Nervenverletzung bspw. zu einer Runterregulation von $K_V7.2$ -Kanälen in primär afferenten Fasern (Abd-Elseyed et al. 2019). Obwohl nach SNI keine Veränderungen in der Slack mRNA-Expression festgestellt wurde, zeichnete sich auch bei Slack-Strömen eine reduzierte elektrische Aktivität in DRG-Neuronen ab (Lu et al. 2021). Die überwiegende Slack-Expression in sensorischen Neuronen macht Slack zu einem vielversprechenden Target in der Therapie von neuropathischen Schmerzen. Mit der Identifizierung von Wirkstoffkandidaten, die durch Slack-Aktivierung peripher analgetisch wirken, nicht jedoch die Blut-Hirn-Schranke passieren, könnte eine neue Substanzklasse mit gutem Sicherheitsprofil geschaffen werden. Im Gegensatz hierzu ist Slick in weitaus mehr Geweben lokalisiert und zeigt u.a. eine starke Expression im Herzen (Zeisel et al. 2018). Dies müsste bei einer pharmakologischen Intervention an Slick-Kanälen berücksichtigt werden. Außerdem scheint Slick, anders als Slack, eher eine untergeordnete Rolle bei neuropathischen Schmerzzuständen einzunehmen. Eine Slick-Aktivierung bei Entzündungsschmerzen könnte jedoch möglicherweise antinozizeptiv wirken, wobei hier noch nicht endgültig geklärt werden konnte, ob hierbei eine Slick-Aktivierung peripher oder zentral erfolgen sollte. Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit vielmehr die funktionelle Beteiligung des Slick-Kanals bei der Verarbeitung thermischer und chemischer Reize und leisten somit einen wesentlichen Beitrag in der Grundlagenforschung.

5 Zusammenfassung

In Vorarbeiten wurde gezeigt, dass der K_{Na} -Kanal Slack an der Verarbeitung neuropathischer Schmerzen funktionell beteiligt ist und dass das klassische Neuroleptikum Loxapin Slack-abhängig neuropathisches Schmerzverhalten im Mausmodell lindert (Lu et al. 2015). Ausgehend von Loxapin als Leitstruktur wurden in der vorliegenden Arbeit im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay an Slack-transfizierten HEK-Zellen insgesamt 68 neue Loxapin-Derivate gescreent. Hierbei wurden 23 Substanzen mit Slack-aktivierenden Eigenschaften identifiziert, von denen VHP93, VH408 und VH425 weiter *in vivo* untersucht wurden. Dabei zeigten Mäuse nach systemischer Gabe von VHP93 ein reduziertes Verhalten in einem Modell für neuropathische Schmerzen. Dem gegenüber wurde durch VH408 das Verhalten im neuropathischen Schmerzmodell nicht beeinflusst.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass durch eine Slack-Aktivierung nicht nur neuropathisches Schmerzverhalten gehemmt wird, sondern auch die Kratzreaktionen im Chloroquin-Modell des Histamin-unabhängigen Juckreizes reduziert werden können.

Neben Slack wurde in dieser Arbeit auch die Gewebsexpression und funktionelle Bedeutung des eng mit Slack verwandten K_{Na} -Kanals Slick charakterisiert. Expressionsanalysen ergaben, dass Slick überwiegend in dünn myelinisierten A δ -Fasern und inhibitorischen Interneuronen im Dorsalhorn des Rückenmarks lokalisiert ist. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigten, dass Slick^{-/-}-Mäuse ein erhöhtes Schmerzverhalten nach thermischer Stimulation aufwiesen. Außerdem wurde bei Slick^{-/-}-Mäusen in der späten Phase des Capsaicin- und Formalin-Tests ein signifikant erhöhtes Leckverhalten verzeichnet. Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern somit Hinweise auf eine funktionelle Beteiligung von Slick bei der Detektion von Hitzeschmerzen und bei der TRPV1- und TRPA1-vermittelten Schmerzantwort. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Slick vorrangig an der Verarbeitung thermischer und chemischer Noxen beteiligt ist und dabei eine antinozizeptive Funktion ausübt.

6 Abkürzungsverzeichnis

A

Abb.....	Abbildung
AC.....	Adenylatzyklase
AEW.....	Aceton/ Diethylether/ Wasser
Adv.....	Advillin
AF.....	Alexa Fluor
AMPA.....	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure
ANO1.....	Anoctamin 1
ANOVA.....	Varianzanalyse
AP.....	Alkalische Phosphatase
ASICs.....	<i>Acid Sensing Ion Channels</i>
ATP.....	Adenosintriphosphat
AUC.....	Fläche unter der Kurve, <i>Area under the Curve</i>
AVP.....	Vasopressin
AVPR1a.....	Arginin-Vasopressin-Rezeptor-1A

B

BAM8-22.....	<i>Bovine Adrenal Medulla 8-22 Peptide</i>
BDNF.....	<i>Brain-derived Neurotrophic Factor</i>
Bhlhb5.....	<i>Helix-loop-helix Family Member B5</i>
BNP.....	B-Typ natriuretisches Peptid
bp.....	Basenpaare
BSA.....	Bovines Serumalbumin
bspw.....	beispielsweise
bzw.....	beziehungsweise

C

C.....	Celsius
cAMP.....	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA.....	Komplementäre DNA
CFA.....	Komplettes Freund-Adjuvans, <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
cGMP.....	Cyclisches Guanosinmonophosphat
CGRP.....	<i>Calcitonin Gene-Related Peptide</i>
cm.....	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid

Cox-2.....	Cyclooxygenase 2
CQ.....	Chloroquin
Cre	Cre-Rekombinase
CREB	<i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
CSF1	<i>Colony Stimulating Factor 1</i>
C _T	<i>Cycle Threshold</i>
Cy3.....	Cyanin 3
Cy5.....	Cyanin 5

D

DAG	Diacylglycerin
DAPI.....	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DEPC	Diethylcarbonat
DMSO.....	Dimethylsulfoxid
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
dNTPs	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DPA.....	Dynamic Plantar Aesthesiometer
DPBS	Gibco™ Dulbeccos' <i>Phosphate Buffered Saline</i>
DRG	Dorsalganglien/ Spinalganglien
dsDNA.....	Doppelsträngige DNA
DWB.....	<i>Dynamic Weight Bearing</i>

E

E	Effizienz
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EPS.....	Extrapyramidales Syndrom
EPSP.....	Exzitatorisches postsynaptisches Potenzial
ERK.....	<i>Extracellular-Signal Regulated Kinases</i>

F

F	Fluoreszenz
FBS.....	<i>Fetal Bovine Serum</i>
fwd.....	<i>forward</i>

G

g	Erdbeschleunigung, Gramm
GABA	γ -Aminobuttersäure

GAD	Glutamat-Decarboxylase
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDNF	<i>Glial Cell-derived Neurotrophic Factor</i>
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRP	<i>Gastrin Releasing Peptide</i>
GRPR	<i>Gastrin Releasing Peptide</i> -Rezeptor
GTP	Guanosintriphosphat

H

h	Stunde/n
HEK-	<i>Human Embryonic Kidney-</i>
HEPES	Hydroxyethylpiperazinyl-ethansulfonsäure

I

IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IB4	Isolektin B4
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IP ₃	Inositoltriphosphat
IP ₃ R	Inositoltriphosphat-Rezeptoren
IR	Infrarot
ISH	In-situ-Hybridisierung

J

JNK	c-Jun N-Terminal Kinase
-----	-------	-------------------------

K

K _{2P}	Zweiporige Kaliumkanäle
K _{Ca}	Calciumaktivierte Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
K _{ir}	Einwärtsrektifizierende Kaliumkanäle
K _{Na}	Natrium-abhängige Kaliumkanäle
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
K _v	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

L

l	Liter
---	-------	-------

L	lumbal
Lbx1	<i>Ladybird Homeobox 1</i>
loxP	<i>Locus of crossing over of bacteriophage P1</i>
LTMRs	<i>Low-threshold Mechanoreceptors</i>

M

M	Mol pro Liter
MAPK	<i>Mitogen-aktivierten Proteinkinasen</i>
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
Mrgpr	<i>Mas-related G-Protein-gekoppelte/r Rezeptor/en</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>

N

n	Anzahl
n. d.	nicht detektiert
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
Nav	spannungsabhängige Natriumkanäle
NeuPSIG	<i>Special Interest Group on Neuropathic Pain</i>
NF-κB	Nukleärer Faktor-κB
ng	Nanogramm
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NK1	Neurokinin 1
NKB	Neurokinin B
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
Npr1	Natriuretischer Peptidrezeptor 1
NPY	Neuropeptid Y
NRS	Numerische <i>Rating</i> -Skala
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika

O

O ₂	Sauerstoff
----------------------	------------

P

PAR2.....	Protease-aktivierter Rezeptor 2
PBS.....	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR.....	Polymerase Kettenreaktion
PFA.....	Paraformaldehyd
PGE ₂	Prostaglandin E2
PI3K.....	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA.....	Proteinkinase A
PKC.....	Proteinkinase C
PKG.....	Proteinkinase G
PLC.....	Phospholipase C

Q

qPCR.....	Quantitative Echtzeit-PCR
-----------	---------------------------

R

RCK.....	Regulatoren der K ⁺ -Leitfähigkeit
rev.....	<i>reverse</i>
RNA.....	Ribonukleinsäure
ROS.....	Reaktive Sauerstoffspezien
RT.....	Reverse Transkriptase

S

SCN9A.....	<i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9</i>
SEM.....	Standardfehler des Mittelwerts, <i>Standard Error of the Mean</i>
Slack.....	<i>Sequence like a Calcium-activated K⁺-channel, Slo2.2, K_{Na}1.1</i>
Slick.....	<i>Sequence like an intermediate conductance K⁺-channel, Slo2.1, K_{Na}1.2</i>
SNI.....	<i>Spared Nerve Injury</i>
SST.....	Somatostatin
SST2A.....	Somatostatin-Rezeptor 2A

T

Tab.....	Tabelle
TBE.....	TRIS-Borat-EDTA
TH.....	Tyrosinhydrolase
TNF-α.....	Tumornekrosefaktor-α

TRIS.....	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TrkA.....	Tropomyosinrezeptorkinase A
TrkB.....	Tropomyosinrezeptorkinase B
TRP-.....	<i>Transient Receptor Potential-</i>
TRPA.....	Ankyrin-Unterfamilie
TRPC	kanonische Unterfamilie
TRPM	Melastatin-Unterfamilie
TRPML	Mucolipin-Unterfamilie
TRPP.....	Polycystin-Unterfamilie
TRPV.....	Vanilloid-Unterfamilie

U

u.a.	unter anderem/n
UV	Ultraviolett

V

VGAT	<i>Vesicular GABA Transporter</i>
VGLUT2	<i>Vesicular Glutamate Transporter 2</i>
VGLUT3	<i>Vesicular Glutamate Transporter 3</i>
Vis	visuelles Spektrum

W

WT.....	Wildtyp
---------	---------

Z

z.B.....	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

7 Literaturverzeichnis

- Abd-Elseyed A, Jackson M, Gu SL, Fiala K, Gu J. Neuropathic pain and Kv7 voltage-gated potassium channels: The potential role of Kv7 activators in the treatment of neuropathic pain. *Molecular pain* 2019; 15: 1744806919864256.
- Abi Nahed R, Martinez G, Hograindleur JP, Le Blévec E, Camugli S, Le Boucher R, Ray PF, Escoffier J, Schmitt E, Arnoult C. Slo3 K⁺ channel blocker clofilium extends bull and mouse sperm-fertilizing competence. *Reproduction (Cambridge, England)* 2018; 156(6): 463–476.
- Abraira VE, Ginty DD. The sensory neurons of touch. *Neuron* 2013; 79(4): 618–639.
- Abraira VE, Kuehn ED, Chirila AM, Springel MW, Toliver AA, Zimmerman AL, Orefice LL, Boyle KA, Bai L, Song BJ, Bashista KA, O'Neill TG, Zhuo J, Tsan C, Hoynoski J, Rutlin M, Kus L, Niederkofler V, Watanabe M, Dymecki SM, Nelson SB, Heintz N, Hughes DI, Ginty DD. The Cellular and Synaptic Architecture of the Mechanosensory Dorsal Horn. *Cell* 2017; 168(1-2): 295-310.e19.
- Akiyama T, Carstens E. Neural processing of itch. *Neuroscience* 2013; 250.
- Albisetti GW, Pagani M, Platonova E, Hösli L, Johannssen HC, Fritschy J-M, Wildner H, Zeilhofer HU. Dorsal Horn Gastrin-Releasing Peptide Expressing Neurons Transmit Spinal Itch But Not Pain Signals. *J. Neurosci.* 2019; 39(12): 2238–2250.
- Alexandre C, Latremoliere A, Ferreira A, Miracca G, Yamamoto M, Scammell TE, Woolf CJ. Decreased alertness due to sleep loss increases pain sensitivity in mice. *Nature medicine* 2017; 23(6).
- Andres-Bilbe A, Castellanos A, Pujol-Coma A, Callejo G, Comes N, Gasull X. The Background K⁺ Channel TRESK in Sensory Physiology and Pain. *International Journal of Molecular Sciences* 2020; 21(15).
- Bandell M, Story GM, Hwang SW, Viswanath V, Eid SR, Petrus MJ, Earley TJ, Patapoutian A. Noxious Cold Ion Channel TRPA1 Is Activated by Pungent Compounds and Bradykinin. *Neuron* 2004; 41(6): 849–857.
- Barcia G, Fleming MR, Deligniere A, Gazula V-R, Brown MR, Langouet M, Chen H, Kronengold J, Abhyankar A, Cilio R, Nitschke P, Kaminska A, Boddaert N, Casanova J-L, Desguerre I, Munnich A, Dulac O, Kaczmarek LK, Colleaux L, Nabbout R. De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. *Nature genetics* 2012; 44(11): 1255–1259.
- Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell* 2009; 139(2): 267–284.
- Basbaum AI, Bráz JM. Cell transplants to treat the “disease” of neuropathic pain and itch. *Pain* 2016; 157(Suppl 1): S42-7.
- Bautista DM, Wilson, SR, Hoon MA. Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. *Nature neuroscience* 2014; 17(2).

- Berg AP, Sen N, Bayliss DA. TrpC3/C7 and Slo2.1 are molecular targets for metabotropic glutamate receptor signaling in rat striatal cholinergic interneurons. *J. Neurosci.* 2007; 27(33): 8845–8856.
- Bhattacharjee A, Joiner WJ, Wu M, Yang Y, Sigworth FJ, Kaczmarek LK. Slick (Slo2.1), a Rapidly-Gating Sodium-Activated Potassium Channel Inhibited by ATP. *J. Neurosci.* 2003; 23(37): 11681–11691.
- Biton B, Sethuramanujam S, Picchione KE, Bhattacharjee A, Khessibi N, Chesney F, Lanneau C, Curet O, Avenet P. The antipsychotic drug loxapine is an opener of the sodium-activated potassium channel slack (Slo2.2). *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2012; 340(3): 706–715.
- Bourquin A-F, Süveges M, Pertin M, Gilliard N, Sardy S, Davison AC, Spahn DR, Decosterd I. Assessment and analysis of mechanical allodynia-like behavior induced by spared nerve injury (SNI) in the mouse. *Pain* 2006; 122(1-2): 14.e1-14.
- Bowman BR, Bokiniec P, McMullan S, Goodchild AK, Burke PGR. Somatostatin 2 Receptors in the Spinal Cord Tonicly Restrain Thermogenic, Cardiac and Other Sympathetic Outflows. *Front. Neurosci.* 2019; 13: 121.
- Breivik H, Collett B, Ventafridda V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. *European journal of pain (London, England)* 2006; 10(4).
- Brenner DS, Golden JP, Gereau RW. A novel behavioral assay for measuring cold sensation in mice. *PloS one* 2012; 7(6): e39765.
- Bröhl D, Strehle M, Wende H, Hori K, Bormuth I, Nave KA, Müller T, Birchmeier C. A transcriptional network coordinately determines transmitter and peptidergic fate in the dorsal spinal cord. *Developmental biology* 2008; 322(2).
- Brown MR, Kronengold J, Gazula V-R, Chen Y, Strumbos JG, Sigworth FJ, Navaratnam D, Kaczmarek LK. Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. *Nat Neurosci* 2010; 13(7): 819–821.
- Brown MR, Kronengold J, Gazula V-R, Spilianakis CG, Flavell RA, Hehn CAA von, Bhattacharjee A, Kaczmarek LK. Amino-terminal isoforms of the Slack K⁺ channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. *The Journal of physiology* 2008; 586(21): 5161–5179.
- Budelli G, Sun Q, Ferreira J, Butler A, Santi CM, Salkoff L. SLO2 Channels Are Inhibited by All Divalent Cations That Activate SLO1 K⁺ Channels. *The Journal of biological chemistry* 2016; 291(14): 7347–7356.
- Busserolles J, Tsantoulas C, Eschalier A, López García JA. Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. *Pain* 2016; 157 Suppl 1: S7-S14.
- Calvo M, Richards N, Schmid AB, Barroso A, Zhu L, Ivulic D, Zhu N, Anwandter P, Bhat MA, Court FA, McMahon SB, Bennett DLH. Altered potassium channel distribution and composition in myelinated axons suppresses hyperexcitability following injury. *eLife* 2016; 5: e12661.
- Cameron D, Polgár E, Gutierrez-Mecinas M, Gomez-Lima M, Watanabe M, Todd AJ. The organisation of spinoparabrachial neurons in the mouse. *Pain* 2015; 156(10).

- Carter RJ, Morton J, Dunnett SB. Motor coordination and balance in rodents. *Current protocols in neuroscience* 2001; Chapter 8: Unit 8.12.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeit KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 2000; 288(5464): 306–313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 1997; 389(6653): 816–824.
- Chakrabarti A, Bagnall A, Chue P, Fenton M, Palaniswamy V, Wong W, Xia J. Loxapine for schizophrenia. *The Cochrane database of systematic reviews* 2007; 2007(4): CD001943.
- Chen H, Kronengold J, Yan Y, Gazula V-R, Brown MR, Ma L, Ferreira G, Yang Y, Bhattacharjee A, Sigworth FJ, Salkoff L, Kaczmarek LK. The N-terminal domain of Slack determines the formation and trafficking of Slick/Slack heteromeric sodium-activated potassium channels. *J. Neurosci.* 2009; 29(17): 5654–5665.
- Chen S-R, Zhou H-Y, Byun HS, Pan H-L. Nerve injury increases GluA2-lacking AMPA receptor prevalence in spinal cords: functional significance and signaling mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2013; 347(3): 765–772.
- Chiang MC, Hachisuka J, Todd AJ, Ross SE. Insight into B5-I spinal interneurons and their role in the inhibition of itch and pain. *Pain* 2016; 157(3).
- Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques* 1993; 15(3): 532-4, 536-7.
- Cobos EJ, Ghasemlou N, Araldi D, Segal D, Duong K, Woolf CJ. Inflammation-induced decrease in voluntary wheel running in mice: a nonreflexive test for evaluating inflammatory pain and analgesia. *Pain* 2012; 153(4): 876–884.
- Coderre TJ, Vaccarino AL, Melzack R. Central nervous system plasticity in the tonic pain response to subcutaneous formalin injection. *Brain research* 1990; 535(1): 155–158.
- Cohen SP, Mao J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. *BMJ (Clinical research ed.)* 2014; 348: f7656.
- Cole BA, Johnson RM, Dejakaisaya H, Pilati N, Fishwick CWG, Muench SP, Lippiat JD. Structure-Based Identification and Characterization of Inhibitors of the Epilepsy-Associated KNa1.1 (KCNT1) Potassium Channel. *iScience* 2020; 23(5): 101100.
- Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annual review of neuroscience* 2009; 32.
- Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, Al-Gazali L, Hamamy H, Valente EM, Gorman S, Williams R, McHale DP, Wood JN, Gribble FM, Woods CG. An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature* 2006; 444(7121).
- Crofford LJ. Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 2015; 126.
- Decosterd I, Woolf CJ. Spared nerve injury: an animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* 2000; 87(2): 149–158.

- Deuis JR, Dvorakova LS, Vetter I. Methods Used to Evaluate Pain Behaviors in Rodents. *Front. Mol. Neurosci.* 2017; 10: 284.
- Dong X. Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* 2018; 98(3).
- Dong X, Dong X. Peripheral and Central Mechanisms of Itch. *Neuron* 2018; 98(3): 482–494.
- Du X, Gamper N. Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. *Current neuropharmacology* 2013; 11(6): 621–640.
- Du Prel J-B, Hommel G, Röhrig B, Blettner M. Confidence interval or p-value?: part 4 of a series on evaluation of scientific publications. *Deutsches Arzteblatt international* 2009; 106(19): 335–339.
- Duan B, Cheng L, Bourane S, Britz O, Padilla C, Garcia-Campmany L, Krashes M, Knowlton W, Velasquez T, Ren X, Ross S, Lowell BB, Wang Y, Goulding M, Ma Q. Identification of spinal circuits transmitting and gating mechanical pain. *Cell* 2014; 159(6).
- Dubin AE, Patapoutian A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *The Journal of clinical investigation* 2010; 120(11).
- Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4(Supp C): 161–174.
- Eddy NB, Leimbach D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. undefined 1953.
- Eva Kosek, Milton Cohen, Ralf Baron, Gerald F Gebhart, A. Kathleen Sluka. Do we need a third mechanistic descriptor for chronic pain states? *Pain* 2016; 157(7): 1.
- Evely KM, Pryce KD, Bausch AE, Lukowski R, Ruth P, Haj-Dahmane S, Bhattacharjee A, Slack KNa Channels Influence Dorsal Horn Synapses and Nociceptive Behavior. *Molecular pain* 2017; 13: 1744806917714342.
- Ferreira J, Campos MM, Pesquero JB, Araújo RC, Bader M, Calixto JB. Evidence for the participation of kinins in Freund's adjuvant-induced inflammatory and nociceptive responses in kinin B1 and B2 receptor knockout mice. *Neuropharmacology* 2001; 41(8): 1006–1012.
- Fink-Jensen A, Schmidt LS, Dencker D, Schülein C, Wess J, Wörtwein G, Woldbye DPD. Antipsychotic-induced catalepsy is attenuated in mice lacking the M4 muscarinic acetylcholine receptor. *European Journal of Pharmacology* 2011; 656(1-3): 39–44.
- Finnerup NB, Attal N. Pharmacotherapy of neuropathic pain: time to rewrite the rulebook? *Pain management* 2016; 6(1).
- Finnerup NB, Attal N, Haroutounian S, McNicol E, Baron R, Dworkin RH, Gilron I, Haanpaa M, Hansson P, Jensen TS, Kamerman PR, Lund K, Moore A, Raja SN, Rice ASC, Rowbotham M, Sena E, Siddall P, Smith BH, Wallace M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: systematic review, meta-analysis and updated NeuPSIG recommendations. *The Lancet. Neurology* 2015; 14(2): 162–173.
- Finnerup NB, Jensen TS. Mechanisms of disease: mechanism-based classification of neuropathic pain—a critical analysis. *Nature clinical practice. Neurology* 2006; 2(2).
- Fitzgerald MP, Fiannacca M, Smith DM, Gertler TS, Gunning B, Syrbe S, Verbeek N, Stamberger H, Weckhuysen S, Ceulemans B, Schoonjans A-S, Rossi M, Demarquay G, Lesca G, Olofsson K, Koolen DA, Homemann F, Baulac S, Rubboli G, Minks KQ, Lee B, Helbig I, Dlugos D, Møller RS,

- Bearden D. Treatment Responsiveness in KCNT1-Related Epilepsy. *Neurotherapeutics* 2019; 16(3): 848–857.
- Flauaus C, Engel P, Zhou F, Petersen J, Ruth P, Lukowski R, Schmidtko A, Lu R. Slick Potassium Channels Control Pain and Itch in Distinct Populations of Sensory and Spinal Neurons in Mice. *Anesthesiology* 2022.
- Freyenhagen R, Parada HA, Calderon-Ospina CA, Chen J, Rakhmawati ED, Fernández-Villacorta FJ, Franco H, Ho KY, Lara-Solares A, Li CC, Mimenza AA, Nimmaanrat S, Dolma SM, Ciampi dAD. Current understanding of the mixed pain concept: a brief narrative review. *Current medical research and opinion* 2019; 35(6).
- Gao YJ, Ji RR. Chemokines, neuronal-glia interactions, and central processing of neuropathic pain. *Pharmacology & therapeutics* 2010; 126(1).
- Gao Y-J, Ji R-R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *The open pain journal* 2009; 2: 11–17.
- Garg P, Sanguinetti MC. Intracellular ATP does not inhibit Slo2.1 K⁺ channels. *Physiological reports* 2014; 2(9).
- Gessner G, Heinemann SH. Inhibition of hEAG1 and hERG1 potassium channels by clofilium and its tertiary analogue LY97241. *British Journal of Pharmacology* 2003; 138(1): 161–171.
- Gilchrist HD, Allard BL, Simone DA. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. *Pain* 1996; 67(1): 179–188.
- Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods (San Diego, Calif.)* 2001; 25(4): 386–401.
- Green D, Dong X. The cell biology of acute itch. *The Journal of cell biology* 2016; 213(2).
- Günther T, Tulipano G, Doumaud P, Bousquet C, Csaba Z, Kreienkamp H-J, Lupp A, Korbonits M, Castaño JP, Wester H-J, Culler M, Melmed S, Schulz S. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. CV. Somatostatin Receptors: Structure, Function, Ligands, and New Nomenclature. *Pharmacological reviews* 2018; 70(4): 763–835.
- Gutierrez-Mecinas M, Am Bell, Marin A, Taylor R, Boyle KA, Furuta T, Watanabe M, Polgár E, Todd AJ. Preprotachykinin A is expressed by a distinct population of excitatory neurons in the mouse superficial spinal dorsal horn including cells that respond to noxious and pruritic stimuli. *Pain* 2017; 158(3).
- Gutierrez-Mecinas M, Furuta T, Watanabe M, Todd AJ. A quantitative study of neurochemically defined excitatory interneuron populations in laminae I-III of the mouse spinal cord. *Molecular pain* 2016; 12.
- Gutierrez-Mecinas M, Watanabe M, Todd AJ. Expression of gastrin-releasing peptide by excitatory interneurons in the mouse superficial dorsal horn. *Molecular pain* 2014; 10.
- Han L, Ma C, Liu Q, Weng HJ, Cui Y, Tang Z, Kim Y, Nie H, Qu L, Patel KN, Li Z, McNeil B, He S, Guan Y, Xiao B, Lamotte RH, Dong X. A subpopulation of nociceptors specifically linked to itch. *Nature neuroscience* 2013; 16(2).

- Harada A, Suzuki K, Kimura H. TAK-063, a Novel Phosphodiesterase 10A Inhibitor, Protects from Striatal Neurodegeneration and Ameliorates Behavioral Deficits in the R6/2 Mouse Model of Huntington's Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 2017; 360(1): 75–83.
- Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain* 1988; 32(1): 77–88.
- Häring M, Zeisel A, Hochgerner H, Rinwa P, Jakobsson J.E.T., Lönnerberg P., La Manno G., Sharma N., Borgius L., Kiehn O., Lagerström MC, Linnarsson S, Ernfors P. Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. *Nat Neurosci* 2018; 21(6): 869–880.
- Harish S, Bhuvana K, Bengalorkar GM, Kumar T. Flupirtine: Clinical pharmacology. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology* 2012; 28(2): 172–177.
- Hite RK, Yuan P, Li Z, Hsuing Y, Walz T, MacKinnon R. Cryo-electron microscopy structure of the Slo2.2 Na(+)-activated K(+) channel. *Nature* 2015; 527(7577): 198–203.
- Holmes D. The pain drain. *Nature* 2016; 535(7611): S2-S3.
- Huang F, Wang X, Ostertag EM, Nuwal T, Huang B, Jan Y-N, Basbaum AI, Jan LY. TMEM16C facilitates Na(+)-activated K+ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. *Nat Neurosci* 2013; 16(9): 1284–1290.
- Huang J, Polgár E, Solinski HJ, Mishra SK, Tseng P-Y, Iwagaki N, Boyle KA, Dickie AC, Kriegbaum MC, Wildner H, Zeilhofer HU, Watanabe M, Riddell JS, Todd AJ, Hoon MA. Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. *Nat Neurosci* 2018; 21(5): 707–716.
- Huang M, Huang T, Xiang Y, Xie Z, Chen Y, Yan R, Xu J, Cheng L. Ptf1a, Lbx1 and Pax2 coordinate glycinergic and peptidergic transmitter phenotypes in dorsal spinal inhibitory neurons. *Developmental biology* 2008; 322(2).
- Hunskar S, Fasmer OB, Hole K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of neuroscience methods* 1985; 14(1): 69–76.
- Ikoma A, Steinhoff M, Ständer S, Yosipovitch G, Schmelz M. The neurobiology of itch. *Nature reviews. Neuroscience* 2006; 7(7).
- Ji R-R, Nackley A, Huh Y, Terrando N, Maixner W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology* 2018; 129(2): 343–366.
- Jiang Y, Pico A, Cadene M, Chait BT, MacKinnon R. Structure of the RCK Domain from the E. coli K+ Channel and Demonstration of Its Presence in the Human BK Channel. *Neuron* 2001; 29(3): 593–601.
- Kaczmarek LK. Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. *ISRN neuroscience* 2013; 2013(2013).
- Kaczmarek LK, Aldrich RW, Chandy KG, Grissmer S, Wei AD, Wulff H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. *Pharmacological reviews* 2017; 69(1): 1–11.
- Kádková A, Synytsya V, Krusek J, Zimová L, Vlachová V. Molecular basis of TRPA1 regulation in nociceptive neurons. A review. *Physiological research* 2017; 66(3): 425–439.

- Kallenborn-Gerhardt W, Schröder K, Del Turco D, Lu R, Kynast K, Kosowski J, Niederberger E, Shah AM, Brandes RP, Geisslinger G, Schmidtko A. NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J. Neurosci.* 2012; 32(30): 10136–10145.
- Kandel ER, ed. *Principles of neural science*, 5th ed. McGraw-Hill medical. New York, London: McGraw-Hill Medical; 2013.
- Karadayian AG, Cutrera RA. Alcohol hangover: type and time-extension of motor function impairments. *Behavioural Brain Research* 2013; 247: 165–173.
- Kardon AP, Polgár E, Hachisuka J, Snyder LM, Cameron D, Savage S, Cai X, Kamup S, Fan CR, Hemenway GM, Bernard CS, Schwartz ES, Nagase H, Schwarzer C, Watanabe M, Furuta T, Kaneko T, Koerber HR, Todd AJ, Ross SE. Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord. *Neuron* 2014; 82(3).
- Kashiba H, Fukui H, Morikawa Y, Senba E. Gene expression of histamine H1 receptor in guinea pig primary sensory neurons: a relationship between H1 receptor mRNA-expressing neurons and peptidergic neurons. *Brain research. Molecular brain research* 1999; 66(1-2): 24–34.
- Klebe G. Protein-Ligand-Wechselwirkungen als Grundlage der Arzneistoffwirkung. In: Klebe G, ed. *Wirkstoffdesign: Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2009: 49–67.
- Kornhuber J, Maler M, Wiltfang J, Bleich S, Degner D, Rütger E. Neuronale Kaliumkanalöffnung durch Flupirtin. *Fortschr Neurol Psychiatr* 1999; 67(10): 466–475.
- Kuang Q, Purhonen P, Hebert H. Structure of potassium channels. *Cellular and molecular life sciences CMLS* 2015; 72(19): 3677–3693.
- Kuner R, Flor H. Structural plasticity and reorganisation in chronic pain. *Nature reviews. Neuroscience* 2016; 18(1).
- Kupari J, Usoskin D, Parisien M, Lou D, Hu Y, Fatt M, Lönnberg P, Spångberg M, Eriksson B, Barkas N, Kharchenko PV, Loré K, Khoury S, Diatchenko L, Ernfors P. Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain. *Nat Commun* 2021; 12(1): 1510.
- Kwan KY, Allchorne AJ, Vollrath MA, Christensen AP, Zhang D-S, Woolf CJ, Corey DP. TRPA1 contributes to cold, mechanical, and chemical nociception but is not essential for hair-cell transduction. *Neuron* 2006; 50(2): 277–289.
- La Nattkemper, Tey HL, Valdes-Rodriguez R, Lee H, Mollanazar NK, Albornoz C, Sanders KM, Yosipovitch G. The Genetics of Chronic Itch: Gene Expression in the Skin of Patients with Atopic Dermatitis and Psoriasis with Severe Itch. *The Journal of investigative dermatology* 2018; 138(6).
- LaMotte RH, Dong X, Ringkamp M. Sensory neurons and circuits mediating itch. *Nature reviews. Neuroscience* 2014; 15(1): 19–31.
- Latremoliere A, Woolf CJ. Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The journal of pain official journal of the American Pain Society* 2009; 10(9): 895–926.

- Laux-Biehlmann A, Boyken J, Dahllöf H, Schmidt N, Zollner TM, Nagel J. Dynamic weight bearing as a non-reflexive method for the measurement of abdominal pain in mice. *European journal of pain* (London, England) 2016; 20(5): 742–752.
- Lechner SG. Neue Einsichten in die spinalen und peripheren Signalwege der Schmerzentscheidung. *Neuroforum* 2017; 23(3): 173–178.
- Lee JS, Han JS, Lee K, Bang J, Lee H. The peripheral and central mechanisms underlying itch. *BMB Reports* 2016; 49(9): 474–487.
- Lerner EA. Pathophysiology of Itch. *Dermatologic clinics* 2018; 36(3): 175–177.
- Liu Q, Tang Z, Surdenikova L, Kim S, Patel KN, Kim A, Ru F, Guan Y, Weng HJ, Geng Y, Udem BJ, Kollarik M, Chen ZF, Anderson DJ, Dong X. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell* 2009; 139(7).
- Liu T, Han Q, Chen G, Huang Y, Zhao L-X, Berta T, Gao Y-J, Ji R-R. Toll-like receptor 4 contributes to chronic itch, allodynia, and spinal astrocyte activation in male mice. *Pain* 2016; 157(4): 806–817.
- Los Angeles Tejada M de, Jensen LJ, Klaerke DA. PIP₂ modulation of Slick and Slack K⁺ channels. *Biochemical and biophysical research communications* 2012a; 424(2): 208–213.
- Los Angeles Tejada M de, Stolpe K, Meinild A-K, Klaerke DA. Clofilium inhibits Slick and Slack potassium channels. *Biologics Targets & Therapy* 2012b; 6: 465–470.
- Lu R, Bausch AE, Kallenborn-Gerhardt W, Stoetzer C, Debrun N, Ruth P, Geisslinger G, Leffler A, Lukowski R, Schmidtko A. Slack channels expressed in sensory neurons control neuropathic pain in mice. *J. Neurosci.* 2015; 35(3): 1125–1135.
- Lu R, Metzner K, Zhou F, Flauaus C, Balzulat A, Engel P, Petersen J, Ehinger R, Bausch A, Ruth P, Lukowski R, Schmidtko A. Functional Coupling of Slack Channels and P2X3 Receptors Contributes to Neuropathic Pain Processing. *International Journal of Molecular Sciences* 2021; 22(1).
- Lu Y, Dong H, Gao Y, Gong Y, Ren Y, Gu N, Zhou S, Xia N, Sun Y-Y, Ji R-R, Xiong L. A feed-forward spinal cord glycinergic neural circuit gates mechanical allodynia. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123(9): 4050–4062.
- Macpherson LJ, Xiao B, Kwan KY, Petrus MJ, Dubin AE, Hwang S, Cravatt B, Corey DP, Patapoutian A. An ion channel essential for sensing chemical damage. *J. Neurosci.* 2007; 27(42): 11412–11415.
- Malayev AA, Nelson DJ, Philipson LH. Mechanism of clofilium block of the human Kv1.5 delayed rectifier potassium channel. *Molecular pharmacology* 1995; 47(1): 198–205.
- Malmberg AB, Chen C, Tonegawa S, Basbaum AI. Preserved acute pain and reduced neuropathic pain in mice lacking PKC γ . *Science (New York, N.Y.)* 1997; 278(5336).
- Martinez-Espinosa PL, Wu J, Yang C, Gonzalez-Perez V, Zhou H, Liang H, Xia X-M, Lingle CJ. Knockout of Slo2.2 enhances itch, abolishes KNa current, and increases action potential firing frequency in DRG neurons. *eLife* 2015; 4.
- McDonald MP, Miller KM, Li C, Deng C, Crawley JN. Motor deficits in fibroblast growth factor receptor-3 null mutant mice. *Behavioural pharmacology* 2001; 12(6-7): 477–486.

- McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007; 104(33): 13525–13530.
- Meller ST, Gebhart GF. Intraplantar zymosan as a reliable, quantifiable model of thermal and mechanical hyperalgesia in the rat. *European journal of pain (London, England)* 1997; 1(1): 43–52.
- Meredith GE, Kang UJ. Behavioral models of Parkinson's disease in rodents: a new look at an old problem. *Movement disorders official journal of the Movement Disorder Society* 2006; 21(10): 1595–1606.
- Mickle AD, Shepherd AJ, Loo L, Mohapatra DP. Induction of thermal and mechanical hypersensitivity by parathyroid hormone-related peptide through upregulation of TRPV1 function and trafficking. *Pain* 2015; 156(9): 1620–1636.
- Miracourt LS, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction turns touch into pain through PKC γ interneurons. *PLoS one* 2007; 2(11).
- Miracourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 2009; 29(8).
- Mogil JS, Wilson SG, Bon K, Eun Lee S, Chung K, Raber P, Pieper JO, Hain HS, Belknap JK, Hubert L, Elmer GI, Mo Chung J, Devor M. Heritability of nociception I: Responses of 11 inbred mouse strains on 12 measures of nociception. *Pain* 1999; 80(1): 67–82.
- Mollanazar NK, Smith PK, Yosipovitch G. Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out? *Clinic Rev Allerg Immunol* 2016; 51(3): 263–292.
- Moon TC, Befus AD, Kulka M. Mast cell mediators: their differential release and the secretory pathways involved. *Front. Immunol.* 2014; 5: 569.
- Moore C, Gupta R, Jordt S-E, Chen Y, Liedtke WB. Regulation of Pain and Itch by TRP Channels. *Neuroscience bulletin* 2018; 34(1): 120–142.
- Moparthi L, Kichko TI, Eberhardt M, Högestätt ED, Kjellbom P, Johanson U, Reeh PW, Leffler A, Filipovic MR, Zygmunt PM. Human TRPA1 is a heat sensor displaying intrinsic U-shaped thermosensitivity. *Sci Rep* 2016; 6(1): 28763.
- Morita T, McClain SP, Batia LM, Pellegrino M, Wilson SR, Kienzler MA, Lyman K, Olsen ASB, Wong JF, Stucky CL, Brem RB, Bautista DM. HTR7 Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch. *Neuron* 2015; 87(1): 124–138.
- Murthy SE, Loud MC, Daou I, Marshall KL, Schwaller F, Kühnemund J, Francisco AG, Keenan WT, Dubin AE, Lewin GR, Patapoutian A. The mechanosensitive ion channel Piezo2 mediates sensitivity to mechanical pain in mice. *Science translational medicine* 2018; 10(462).
- Nojima H, Carstens E. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)₂ receptor involvement in acute 5-HT-evoked scratching but not in allergic pruritus induced by dinitrofluorobenzene in rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2003; 306(1): 245–252.
- Nuwer MO, Picchione KE, Bhattacharjee A. cAMP-dependent kinase does not modulate the Slack sodium-activated potassium channel. *Neuropharmacology* 2009; 57(3): 219–226.

- Nuwer MO, Picchione KE, Bhattacharjee A. PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. *J. Neurosci.* 2010; 30(42): 14165–14172.
- Ogden CL, Fryar CD, Carroll MD, Flegal KM. Mean body weight, height, and body mass index, United States 1960-2002. *Advance data* 2004(347).
- O'Neill J, Brock C, Olesen AE, Andresen T, Nilsson M, Dickenson AH. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacological reviews* 2012; 64(4): 939–971.
- Ostadhadi S, Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Mansouri P, Dehpour AR. 5-HT₃ receptors antagonists reduce serotonin-induced scratching in mice. *Fundamental & clinical pharmacology* 2015; 29(3): 310–315.
- Pan J-X, Ding K, Wang C-Y. Niclosamide, an old antihelminthic agent, demonstrates antitumor activity by blocking multiple signaling pathways of cancer stem cells. *Chinese Journal of Cancer* 2012; 31(4): 178–184.
- Park C-K, Lü N, Xu Z-Z, Liu T, Serhan CN, Ji R-R. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J. Neurosci.* 2011; 31(42): 15072–15085.
- Peirs, Seal. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. *Science* 2016; 354(6312): 578–584.
- Pfaffl MW. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *Biospektrum* 2004; 1/04 10. Jahrgang: 92–95.
- Polgár E, Furuta T, Kaneko T, Todd A. Characterization of neurons that express preprotachykinin B in the dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 2006; 139(2).
- Polgár E, Sardella TC, Tiong SY, Locke S, Watanabe M, Todd AJ. Functional differences between neurochemically defined populations of inhibitory interneurons in the rat spinal dorsal horn. *Pain* 2013; 154(12).
- Pollema-Mays SL, Centeno MV, Ashford CJ, Apkarian AV, Martina M. Expression of background potassium channels in rat DRG is cell-specific and down-regulated in a neuropathic pain model. *Molecular and cellular neurosciences* 2013; 57: 1–9.
- Popovic D, Nuss P, Vieta E. Revisiting loxapine: a systematic review. *Annals of General Psychiatry* 2015; 14: 15.
- Proudlock F, Spike RC, Todd AJ. Immunocytochemical study of somatostatin, neurotensin, GABA, and glycine in rat spinal dorsal horn. *The Journal of comparative neurology* 1993; 327(2).
- Ranade SS, Woo S-H, Dubin AE, Moshourab RA, Wetzel C, Petrus M, Mathur J, Bégay V, Coste B, Mainquist J, Wilson AJ, Francisco AG, Reddy K, Qiu Z, Wood JN, Lewin GR, Patapoutian A. Piezo2 is the major transducer of mechanical forces for touch sensation in mice. *Nature* 2014; 516(7529): 121–125.
- Robinson I, Sargent B, Hatcher JP. Use of dynamic weight bearing as a novel end-point for the assessment of Freund's Complete Adjuvant induced hypersensitivity in mice. *Neuroscience letters* 2012; 524(2): 107–110.
- Ross RA. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptors. *British Journal of Pharmacology* 2003; 140(5): 790–801.

- Ross SE, Mardinly AR, McCord AE, Zurawski J, Cohen S, Jung C, Hu L, Mok SI, Shah A, Savner EM, Tolias C, Corfas R, Chen S, Inquimbert P, Xu Y, McInnes RR, Rice FL, Corfas G, Ma Q, Woolf CJ, Greenberg ME. Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in *Bhlhb5* mutant mice. *Neuron* 2010; 65(6).
- Rowan S, Todd AJ, Spike RC. Evidence that neuropeptide Y is present in GABAergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat spinal cord. *Neuroscience* 1993; 53(2).
- Ruffin VA, Gu XQ, Zhou D, Douglas RM, Sun X, Trouth CO, Haddad GG. The sodium-activated potassium channel Slack is modulated by hypercapnia and acidosis. *Neuroscience* 2008; 151(2): 410–418.
- Sakurada T, Katsumata K, Tan-No K, Sakurada S, Kisara K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology* 1992; 31(12): 1279–1285.
- Santi CM, Ferreira G, Yang B, Gazula V-R, Butler A, Wei A, Kaczmarek LK, Salkoff L. Opposite regulation of Slick and Slack K⁺ channels by neuromodulators. *J. Neurosci.* 2006; 26(19): 5059–5068.
- Sardella TC, Polgár E, Garzillo F, Furuta T, Kaneko T, Watanabe M, Todd AJ. Dynorphin is expressed primarily by GABAergic neurons that contain galanin in the rat dorsal horn. *Molecular pain* 2011a; 7.
- Sardella TC, Polgár E, Watanabe M, Todd AJ. A quantitative study of neuronal nitric oxide synthase expression in laminae I-III of the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience* 2011b; 192(6-2).
- Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E, Handwerker H. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 1995; 15(1 Pt 1).
- Schmidt RF, Lang F, Heckmann M, eds. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie mit Online-Repetitorium*, 31st ed. Springer-Lehrbuch. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011.
- Schmidtko A, Gao W, Sausbier M, Rauhmeier I, Sausbier U, Niederberger E, Scholich K, Huber A, Neuhuber W, Allescher H-D, Hofmann F, Tegeder I, Ruth P, Geisslinger G. Cysteine-rich protein 2, a novel downstream effector of cGMP/cGMP-dependent protein kinase I-mediated persistent inflammatory pain. *J. Neurosci.* 2008; 28(6): 1320–1330.
- Schmiedl S, Peters D, Schmalz O, Mielke A, Rossmannith T, Diop S, Piefke M, Thürmann P, Schmidtko A. Loxapine for Treatment of Patients With Refractory, Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: A Prematurely Terminated Pilot Study Showing Efficacy But Limited Tolerability. *Front. Pharmacol.* 2019; 10: 838.
- Schnell SA, Staines WA, Wessendorf MW. Reduction of lipofuscin-like autofluorescence in fluorescently labeled tissue. *The journal of histochemistry and cytochemistry official journal of the Histochemistry Society* 1999; 47(6): 719–730.
- Scholz J, Finnerup NB, Attal N, Aziz Q, Baron R, Bennett MI, Benoliel R, Cohen M, Cruccu G, Davis KD, Evers S, First M, Giamberardino MA, Hansson P, Kaasa S, Korwisi B, Kosek E, Lavand'homme P, Nicholas M, Nurmikko T, Perrot S, Raja SN, Rice AS, Rowbotham MC, Schug S, Simpson DM, Smith BH, Svensson P, Vlaeyen JW, Wang SJ, Barke A, Rief W, Treede RD. The IASP classification of chronic pain for ICD-11: chronic neuropathic pain. *Pain* 2019; 160(1).

- Sharma N, Flaherty K, Lezgiyeva K, Wagner DE, Klein AM, Ginty DD. The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature* 2020; 577(7790): 392–398.
- Shepherd AJ, Mohapatra DP. Pharmacological validation of voluntary gait and mechanical sensitivity assays associated with inflammatory and neuropathic pain in mice. *Neuropharmacology* 2018; 130: 18–29.
- Sieber MA, Storm R, Martinez-de-la-Torre M, Müller T, Wende H, Reuter K, Vasyutina E, Birchmeier C. Lbx1 acts as a selector gene in the fate determination of somatosensory and viscerosensory relay neurons in the hindbrain. *J. Neurosci.* 2007; 27(18): 4902–4909.
- Silverberg JI, Hinami K, Trick WE, Cella D. Itch in the General Internal Medicine Setting: A Cross-Sectional Study of Prevalence and Quality-of-Life Effects. *American journal of clinical dermatology* 2016; 17(6).
- Silverman JL, Turner SM, Barkan CL, Tolu SS, Saxena R, Hung AY, Sheng M, Crawley JN. Sociability and motor functions in Shank1 mutant mice. *Brain research* 2011; 1380: 120–137.
- Simmons, Spike RC, Todd AJ. Galanin is contained in GABAergic neurons in the rat spinal dorsal horn. *Neuroscience letters* 1995; 187(2).
- Simons FER, Simons KJ. Histamine and H1-antihistamines: celebrating a century of progress. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2011; 128(6): 1139-1150.e4.
- Song AJ, Palmiter RD. Detecting and Avoiding Problems When Using the Cre-lox System. *Trends in genetics TIG* 2018; 34(5): 333–340.
- Steven E. Harte, Richard E. Harris, Daniel J. Clauw. The neurobiology of central sensitization. *Journal of Applied Biobehavioral Research* 2018; 23(2).
- Stevens EB, Stephens GJ. Recent advances in targeting ion channels to treat chronic pain. *British Journal of Pharmacology* 2018; 175(12): 2133–2137.
- Strakhova MI, Nikkel AL, Manelli AM, Hsieh GC, Esbenshade TA, Brioni JD, Bitner RS. Localization of histamine H4 receptors in the central nervous system of human and rat. *Brain research* 2009; 1250: 41–48.
- Sugiura T, Tominaga M, Katsuya H, Mizumura K. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *Journal of Neurophysiology* 2002; 88(1): 544–548.
- Sun S, Xu Q, Guo C, Guan Y, Liu Q, Dong X. Leaky Gate Model: Intensity-Dependent Coding of Pain and Itch in the Spinal Cord. *Neuron* 2017; 93(4): 840-853.e5.
- Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. *Nature* 2007; 448(7154).
- Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, Yin J, Liu XY, Chen ZF. Cellular basis of itch sensation. *Science (New York, N.Y.)* 2009; 325(5947).
- Szallasi A, Blumberg PM. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev* 1999; 51(2): 159–212.
- Szelenyi I. Flupirtine, a re-discovered drug, revisited. *Inflammation research official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 2013; 62(3): 251–258.

- Szolcsányi J, Helyes Z, Oroszi G, Németh J, Pintér E. Release of somatostatin and its role in the mediation of the anti-inflammatory effect induced by antidromic stimulation of sensory fibres of rat sciatic nerve. *British Journal of Pharmacology* 1998; 123(5): 936–942.
- Szucs P, Luz LL, Lima D, Safronov BV. Local axon collaterals of lamina I projection neurons in the spinal cord of young rats. *The Journal of comparative neurology* 2010; 518(14).
- Tamsett TJ, Picchione KE, Bhattacharjee A. NAD⁺ activates KNa channels in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.* 2009; 29(16): 5127–5134.
- Tan C-H, McNaughton PA. The TRPM2 ion channel is required for sensitivity to warmth. *Nature* 2016; 536(7617): 460–463.
- Tang Q-Y, Zhang F-F, Xu J, Wang R, Chen J, Logothetis DE, Zhang Z. Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms. *Cell reports* 2016; 14(1): 129–139.
- Tegeder I, Niederberger E, Schmidt R, Kunz S, Gühring H, Ritzeler O, Michaelis M, Geisslinger G. Specific Inhibition of I κ B kinase reduces hyperalgesia in inflammatory and neuropathic pain models in rats. *J. Neurosci.* 2004; 24(7): 1637–1645.
- Tejada MA, Hashem N, Calloe K, Klaerke DA. Heteromeric Slick/Slack K⁺ channels show graded sensitivity to cell volume changes. *PloS one* 2017; 12(2): e0169914.
- Tejada MA, Stople K, Hammami Bomholtz S, Meinild A-K, Poulsen AN, Klaerke DA. Cell volume changes regulate slick (Slc2.1), but not slack (Slc2.2) K⁺ channels. *PloS one* 2014; 9(10): e110833.
- The Tabula Muris Consortium. Single-cell transcriptomics of 20 mouse organs creates a Tabula Muris. *Nature* 2018; 562(7727): 367–372.
- Thomson SJ, Hansen A, Sanguinetti MC. Identification of the Intracellular Na⁺ Sensor in Slc2.1 Potassium Channels. *The Journal of biological chemistry* 2015; 290(23): 14528–14535.
- Tiong SY, Polgár E, van KJC, Watanabe M, Todd AJ. Galanin-immunoreactivity identifies a distinct population of inhibitory interneurons in laminae I-III of the rat spinal cord. *Molecular pain* 2011; 7.
- Tjølsen A, Berge O-G, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1): 5–17.
- Todd AJ. Identifying functional populations among the interneurons in laminae I-III of the spinal dorsal horn. *Molecular pain* 2017; 13.
- Todd AJ, Di Hughes, Polgár E, Nagy GG, Mackie M, Ottersen OP, Maxwell DJ. The expression of vesicular glutamate transporters VGLUT1 and VGLUT2 in neurochemically defined axonal populations in the rat spinal cord with emphasis on the dorsal horn. *The European journal of neuroscience* 2003; 17(1).
- Todd AJ, Spike RC, Price RF, Neilson M. Immunocytochemical evidence that neurotensin is present in glutamatergic neurons in the superficial dorsal horn of the rat. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 1994; 14(2).
- Tomasello DL, Gancarz-Kausch AM, Dietz DM, Bhattacharjee A. Transcriptional Regulation of the Sodium-activated Potassium Channel SLICK (KCNT2) Promoter by Nuclear Factor- κ B. *Journal of Biological Chemistry* 2015; 290(30): 18575–18583.

- Tomasello DL, Hurley E, Wrabetz L, Bhattacharjee A. Slick (Kcnt2) Sodium-Activated Potassium Channels Limit Peptidergic Nociceptor Excitability and Hyperalgesia. *Journal of Experimental Neuroscience* 2017; 11: 1179069517726996.
- Touska F, Winter Z, Mueller A, Vlachova V, Larsen J, Zimmermann K. Comprehensive thermal preference phenotyping in mice using a novel automated circular gradient assay. *Temperature: Multidisciplinary Biomedical Journal* 2016; 3(1): 77–91.
- Tsantoulas C. Emerging potassium channel targets for the treatment of pain. *Current opinion in supportive and palliative care* 2015; 9(2): 147–154.
- Tsantoulas C, Denk F, Signore M, Nassar MA, Futai K, McMahon SB. Mice lacking Kcns1 in peripheral neurons show increased basal and neuropathic pain sensitivity. *Pain* 2018; 159(8): 1641–1651.
- Tsantoulas C, McMahon SB. Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. *Trends in neurosciences* 2014; 37(3): 146–158.
- Tsantoulas C, Zhu L, Shaifta Y, Grist J, Ward JPT, Raouf R, Michael GJ, McMahon SB. Sensory neuron downregulation of the Kv9.1 potassium channel subunit mediates neuropathic pain following nerve injury. *J. Neurosci.* 2012; 32(48): 17502–17513.
- Usoskin D, Furlan A, Islam S, Abdo H, Lönnerberg P, Lou D, Hjerling-Leffler J, Haeggström J, Kharchenko O, Kharchenko PV, Linnarsson S, Ernfors P. Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nature neuroscience* 2015; 18(1).
- van Hecke O, Austin SK, Khan RA, Smith BH, Torrance N. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. *Pain* 2014; 155(4): 654–662.
- van Laarhoven AI, Marker JB, Elberling J, Yosipovitch G, Arendt-Nielsen L, Andersen HH. Itch sensitization? A systematic review of studies using quantitative sensory testing in patients with chronic itch. *Pain* 2019; 160(12): 2661.
- Vandewauw I, Clercq K de, Mulier M, Held K, Pinto S, van Ranst N, Segal A, Voet T, Vennekens R, Zimmermann K, Vriens J, Voets T. A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. *Nature* 2018; 555(7698): 662–666.
- Vay L, Gu C, McNaughton PA. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *British Journal of Pharmacology* 2012; 165(4): 787–801.
- Vriens J, Nilius B, Voets T. Peripheral thermosensation in mammals. *Nat Rev Neurosci* 2014; 15(9): 573–589.
- Vriens J, Owsianik G, Hofmann T, Philipp SE, Stab J, Chen X, Benoit M, Xue F, Janssens A, Kerselaers S, Oberwinkler J, Vennekens R, Gudermann T, Nilius B, Voets T. TRPM3 is a nociceptor channel involved in the detection of noxious heat. *Neuron* 2011; 70(3): 482–494.
- Wang H, Ehnert C, Brenner GJ, Woolf CJ. Bradykinin and peripheral sensitization. *Biological chemistry* 2006; 387(1): 11–14.
- Wang H, Zylka MJ. Mrgprd-expressing polymodal nociceptive neurons innervate most known classes of substantia gelatinosa neurons. *The Journal of Neuroscience* 2009; 29(42): 13202–13209.

- Wang K, Wang F, Bao J-P, Xie Z-Y, Chen L, Zhou B-Y, Xie X-H, Wu X-T. Tumor necrosis factor α modulates sodium-activated potassium channel SLICK in rat dorsal horn neurons via p38 MAPK activation pathway. *Journal of Pain Research* 2017; 10: 1265–1271.
- Waxman SG, Zamponi GW. Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. *Nat Neurosci* 2014; 17(2): 153–163.
- Willis WD. The role of TRPV1 receptors in pain evoked by noxious thermal and chemical stimuli. *Experimental brain research* 2009; 196(1): 5–11.
- Wojtovich AP, Smith CO, Urciuoli WR, Wang YT, Xia X-M, Brookes PS, Nehrke K. Cardiac Slo2.1 Is Required for Volatile Anesthetic Stimulation of K⁺ Transport and Anesthetic Preconditioning. *Anesthesiology* 2016; 124(5): 1065–1076.
- Wood P. *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*. OXFORD HANDBOOKS SERIES: Oxford University Press; 2020.
- Woolf CJ. Pain: moving from symptom control toward mechanism-specific pharmacologic management. *Annals of internal medicine* 2004; 140(6).
- Woolf CJ, Ma Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron* 2007; 55(3).
- Wu L-J, Sweet T-B, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 2010; 62(3): 381–404.
- Xu Y, Lopes C, Qian Y, Liu Y, Cheng L, Goulding M, Turner EE, Lima D, Ma Q. Tlx1 and Tlx3 coordinate specification of dorsal horn pain-modulatory peptidergic neurons. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 2008; 28(15).
- Xu Y, Lopes C, Wende H, Guo Z, Cheng L, Birchmeier C, Ma Q. Ontogeny of excitatory spinal neurons processing distinct somatic sensory modalities. *The Journal of neuroscience the official journal of the Society for Neuroscience* 2013; 33(37).
- Xu Z-Z, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, Serhan CN, Ji R-R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med* 2010; 16(5): 592-7, 1p following 597.
- Yang S-K, Parkington HC, Blake AD, Keating DJ, Chen C. Somatostatin increases voltage-gated K⁺ currents in GH3 cells through activation of multiple somatostatin receptors. *Endocrinology* 2005; 146(11): 4975–4984.
- Yasaka T, Tiong SY, Di Hughes, Riddell JS, Todd AJ. Populations of inhibitory and excitatory interneurons in lamina II of the adult rat spinal dorsal horn revealed by a combined electrophysiological and anatomical approach. *Pain* 2010; 151(2).
- Yeomans DC, Proudfit HK. Characterization of the foot withdrawal response to noxious radiant heat in the rat. *Pain* 1994; 59(1): 85–94.
- Yosipovitch G, Rosen JD, Hashimoto T. Itch: From mechanism to (novel) therapeutic approaches. *The Journal of allergy and clinical immunology* 2018; 142(5).
- Yuan A, Dourado M, Butler A, Walton N, Wei A, Salkoff L. SLO-2, a K⁺ channel with an unusual Cl⁻ dependence. *Nat Neurosci* 2000; 3(8): 771–779.

- Zeisel A, Hochgerner H, Lönnerberg P, Johnsson A, Memic F, van dZJ, Häring M, Braun E, Le Borm, La MG, Codeluppi S, Furlan A, Lee K, Skene N, Harris KD, Hjerling-Leffler J, Arenas E, Ernfors P, Marklund U, Linnarsson S. Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. *Cell* 2018; 174(4).
- Zhang L, Berta T, Xu Z-Z, Liu T, Park JY, Ji R-R. TNF- α contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. *Pain* 2011; 152(2): 419–427.
- Zhang L, Sukhareva M, Barker JL, Maric D, Hao Y, Chang YH, Ma W, O'Shaughnessy T, Rubinow DR. Direct binding of estradiol enhances Slack (sequence like a calcium-activated potassium channel) channels' activity. *Neuroscience* 2005; 131(2): 275–282.
- Zhang Z, Rosenhouse-Dantsker A, Tang Q-Y, Noskov S, Logothetis DE. The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2.2 channels. *The Journal of Neuroscience* 2010; 30(22): 7554–7562.
- Zhao Z-Q, Huo F-Q, Jeffry J, Hampton L, Demehri S, Kim S, Liu X-Y, Barry DM, Wan L, Liu Z-C, Li H, Turkoz A, Ma K, Cornelius LA, Kopan R, Battey JF, Zhong J, Chen Z-F. Chronic itch development in sensory neurons requires BRAF signaling pathways. *The Journal of clinical investigation* 2013; 123(11): 4769–4780.
- Zheng Y, Liu P, Bai L, Trimmer JS, Bean BP, Ginty DD. Deep Sequencing of Somatosensory Neurons Reveals Molecular Determinants of Intrinsic Physiological Properties. *Neuron* 2019; 103(4): 598-616.e7.
- Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature* 2007; 447(7146): 855–858.
- Zurborg S, Piszczek A, Martínez C, Hublitz P, Al Banchaabouchi M, Moreira P, Perlas E, Heppenstall PA. Generation and characterization of an Advillin-Cre driver mouse line. *Molecular pain* 2011; 7: 66.
- Zylka MJ, Rice FL, Anderson DJ. Topographically distinct epidermal nociceptive circuits revealed by axonal tracers targeted to Mrgprd. *Neuron* 2005; 45(1): 17–25.

8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Die drei von der IASP definierten Schmerztypen nozizeptive, neuropathische und nozioplastische Schmerzen führen zu Überschneidungen, die in der Literatur als Mischschmerz bezeichnet werden.....	3
Abb. 2. Vereinfachte schematische Darstellung des schmerzerregenden Systems.....	5
Abb. 3. Vereinfachte schematische Darstellung des schmerzerregenden Systems. Verschaltung der primär afferenten Neurone im Dorsalhorn des Rückenmarks.....	7
Abb. 4. Molekulare Mechanismen der zentralen Sensibilisierung im Dorsalhorn des Rückenmarks. ...	14
Abb. 5. Ionenkanäle im nozizeptiven System.....	20
Abb. 6. Schematischer Aufbau einer α -Untereinheit eines K_{Na} -Kanals.....	23
Abb. 7. Ablauf und Prinzip des modifizierten FluxOR™ Kaliumkanal-Assays.....	50
Abb. 8. Relative mRNA Expression in stabil transfizierten humanen Slack-HEK-Zellen und nicht-transfizierten HEK-Zellen.....	67
Abb. 9. Immunhistochemische Färbung von Slack-HEK-Zellen (A) und HEK-Zellen (B) mit einem spezifischen Slack-Antikörper.....	67
Abb. 10. Etablierung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays.....	70
Abb. 11. Bestimmung der EC_{50} von Loxapin und NK96 im FluxOR™-Assay in Slack-HEK-Zellen.....	71
Abb. 12. Bestimmung der EC_{50} von Loxapin im FluxOR™-Assay in Slack-HEK-Zellen in verschiedenen Puffern.....	72
Abb. 13. Bestimmung der EC_{50} der neuen Slack-Aktivatoren VHP93, VH408 und VH425 im FluxOR™-Assay mit Slack-HEK-Zellen im Natrium-freien Milieu (Cholin-Puffer).....	73
Abb. 14. Vorläufige Struktur-Wirkungsbeziehung der Loxapin-Derivate.....	76
Abb. 15. FluxOR™-Assay mit Slack-HEK-Zellen nach Inkubation mit Vehikel, Niclosamid als Positivkontrolle (A) und ST-1014 (B).....	76
Abb. 16. Untersuchung der Motorfunktion in Loxapin-, VHP93-, VH408-, VH425- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen.....	79
Abb. 17. Untersuchung der Aktivität der Loxapin-, VHP93- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen im <i>Open Field</i> -Test.....	80
Abb. 18. SNI-induzierte mechanische Allodynie nach Behandlung mit VHP93, VH408 oder Vehikel..	81
Abb. 19. Chloroquin-induziertes akutes Juckreizverhalten in Loxapin-, Olanzapin- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen.....	82
Abb. 20. Chloroquin-induziertes akutes Juckreizverhalten in Loxapin- und Vehikel-behandelten C57BL/6N-Mäusen.....	83
Abb. 21. Formalin-Test mit Slack ^{-/-} - und Wildtyp- (WT-) Mäusen 30 Minuten nach systemischer Applikation von Clofillium (2 mg/kg in 0,9 % NaCl) oder des Vehikels (0,9 % NaCl).....	84
Abb. 22. Immunhistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick im Rückenmark.....	85

Abb. 23. Immunhistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick im Rückenmark anhand von Doppelfärbungen.....	86
Abb. 24. In-situ Hybridisierung von Slick und Marker für exzitatorische (Vesicular glutamate transporter 2, VGLUT2) und inhibitorische Neurone (Vesicular GABA transporter, VGAT) des Dorsalhorns auf Rückenmarksschnitten	87
Abb. 25. Immunhistochemische Charakterisierung der Expression und Lokalisation von Slick in Spinalganglien	88
Abb. 26. Genotypisierung von Slick ^{-/-} -Mäusen und deren Wurfgeschwistern sowie prozentuale Verteilung der Genotypen und Geschlechterverteilung in der Slick ^{-/-} -Zucht	89
Abb. 27. Körpergewicht und Körpergröße von männlichen und weiblichen Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.....	90
Abb. 28. Immunhistochemische Charakterisierung des Rückenmarks und der DRG-Neuronen Populationen in Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.....	91
Abb. 29. Relative Expression der Slick, Slack und Slo1 mRNA im Rückenmark, in DRGs und im cerebralen Cortex von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen.....	92
Abb. 30. Verhalten von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen im <i>Open Field</i> -Test	93
Abb. 31. Anzahl an fäkalen Ausscheidungen über einen Zeitraum von 60 Minuten repräsentierend für die gastrointestinale Aktivität der Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäuse.....	93
Abb. 32. <i>Hot-Plate</i> -Test zur Untersuchung der akuten thermischen Nozizeption von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen	94
Abb. 33. Nozizeptives Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen im <i>Hot Water Tail-Immersion</i> -Test. Slick ^{-/-} -Mäuse zeigten bei Temperaturen von 46 °C bis 48 °C eine statistisch signifikant verkürzte Latenzzeit und somit eine geringere thermische Schmerzschwelle.....	95
Abb. 34. Nozizeptives Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen in Modellen zur Bestimmung der thermischen Schmerzschwelle	95
Abb. 35. Nozizeptives Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen in Modellen für akute Kälteschmerzen	96
Abb. 36. Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen in Modellen nach mechanischer Stimulation	96
Abb. 37. Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen in Modellen nach mechanischer Stimulation	97
Abb. 38. Verhalten von Slick ^{-/-} -Mäusen nach mechanischer Stimulation im <i>Tape</i> -Test	97
Abb. 39. Capsaicin-Test mit Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen	98
Abb. 40. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolokalisation von Slick und TRPV1 im Rückenmark	99
Abb. 41. Immunhistochemische Charakterisierung der Kolokalisation von Slick und TRPV1 in Spinalganglien	99
Abb. 42. Formalin-Test mit Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen	100
Abb. 43. Immunhistochemische Untersuchung der c-Fos-Expression im Rückenmark von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen nach Formalin-Injektion in eine Hinterpfote.....	101
Abb. 44. Thermische Hyperalgesie von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen nach Zymosan-Injektion.....	102
Abb. 45. Neuropathisches Schmerzverhalten von Slick ^{-/-} - und Wildtyp-Mäusen nach peripherer Nervenverletzung durch SNI	103

Abb. 46. Relative Expression der Slick mRNA im Rückenmark und in DRGs nach Nervenverletzung (SNI).....	104
Abb. 47. Schematische Darstellung der Zuchtstrategie zur Generierung konditioneller Slick-Knockout-Mäusen in Lbx ₁ -positiven Zellen	105
Abb. 48. Genotypisierung der konditionellen Slick-Knockout-Mäusen.....	106
Abb. 49. Schematische Darstellung der Primerbindung der Slick Flox- (oben) und Slick Deletion-PCR (unten).....	107
Abb. 50. Genotypisierung von Mäusen verschiedener Genotypen unter Anwendung der Slick Flox-, Slick Deletion- und Cre-PCR.....	108
Abb. 51. Relative Expression der Slick mRNA in C57BL/6N-Tieren und in Lbx ₁ -Slick-Mäusen der Genotypen, die unter Verwendung des Cre/loxP-Systems entstanden sind	109
Abb. 52. Relative Expression der Slick mRNA in Lbx ₁ -Slick ^{-/-} - und Kontroll-Mäusen	110
Abb. 53. Graphische Darstellung des SST-SST _{2A} -Slick-Signalswegs	127

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1. Chemikalien und Reagenzien.....	30
Tab. 2. Chemikalien und Reagenzien für die Zellkultur und <i>in vivo</i> Applikationen.....	32
Tab. 3. Kits	33
Tab. 4. Verbrauchsmaterialien	33
Tab. 5. Größenstandards	34
Tab. 6. Oligonukleotide für Genotypisierungs-Polymerasekettenreaktionen (PCR)	34
Tab. 7. Oligonukleotide für real-time quantitative Polymerasekettenreaktionen (qRT-PCR).....	34
Tab. 8. Polymerasen.....	35
Tab. 9. In-situ-Hybridisierungssonden.....	35
Tab. 10. Primärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen	35
Tab. 11. Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen	36
Tab. 12. Lösungen und Puffer.....	36
Tab. 13. Lösungen und Puffer für den FluxOR™ Kaliumkanal-Assay	37
Tab. 14. Geräte und Instrumente	38
Tab. 15. Ansatz für eine cDNA-Synthese-Reaktion	41
Tab. 16. Zusammensetzung des qRT-PCR-Mastermix.....	42
Tab. 17. qPCR-Programm	42
Tab. 18. Genotypisierungsansätze.....	54
Tab. 19. PCR-Programme	54
Tab. 20. Erwartete Bandengrößen	54
Tab. 21. Eigenschaften der Slack-Aktivatoren (Loxapin-Derivate).....	74

10 Wesentliche Kooperationspartner

Sofern nicht anders vermerkt, wurde diese Arbeit von mir und unter Anweisung meiner Betreuer Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtko und Dr. Ruirui Lu am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie der Goethe-Universität Frankfurt angefertigt.

Im nachfolgenden sind die wesentlichen Kooperationspartner sowie das erhaltene Material aufgeführt:

Kooperationspartner		Material
Prof. Dr. Eugen Proschak	Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt	<i>In silico</i> Bindungs-Untersuchungen und Synthese der Loxapin-Derivate
Dr. Victor Olmos Dr. Jan Heering	Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie (IME)	Synthese der Loxapin-Derivate und Unterstützung bei der Etablierung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays
Prof. Dr. Dr. Holger Stark	Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf	Synthese der Niclosamid-Derivate und Testung der Bindungsaffinitäten im Dopamin-Rezeptor-Bindungsassay
Prof. Dr. Robert Lukowski Dr. Rebekka Ehinger	Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Universität Tübingen	Heterozygote Slick-Mäuse (Slick ^{wt/-} -Mäuse) Globale Slack ^{-/-} - und Wildtyp-Mäuse
Else Kröner-Fresenius-Stiftung		Finanzielle Unterstützung

11 Danksagung

12 Lebenslauf, Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

Persönliche Daten

Name: Cathrin Flauaus

Berufliche Tätigkeit

2016 - 2020: Naturwissenschaftliche Doktorandin
Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie
Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main
Promotion unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtke und Dr.
Ruirui Lu

Studium und Schulbildung

2009 - 2014	Studium der Pharmazie an der Goethe-Universität Frankfurt, Frankfurt am Main
2014	Approbation zur Apothekerin
2014	3. Staatsexamen
2013	2. Staatsexamen
2012	1. Staatsexamen
2009	Abitur

Publikationen

Cathrin Flauaus, Patrick Engel, Fangyuan Zhou, Jonas Petersen, Peter Ruth, Robert Lukowski, Achim Schmidtko, Ruirui Lu. Slick potassium channels control pain and itch processing in distinct populations of sensory and spinal neurons in mice. *Anesthesiology*. 2022 May 1;136(5):802-822.

Ruirui Lu, Katharina Metzner, Fangyuan Zhou, **Cathrin Flauaus**, Annika Balzulat, Patrick Engel, Jonas Petersen, Rebekka Ehinger, Anne Bausch, Peter Ruth, Robert Lukowski, Achim Schmidtko. Functional coupling of Slack channels and P2X3 receptors in mouse sensory neurons contributes to neuropathic pain processing. *International journal of molecular science*. 2021 Jan; 22(1): 405.

Kerstin Hiesinger, Jan S. Kramer, Steffen Brunst, **Cathrin Flauaus**, Sandra K. Wittmann, Lilia Weizel, Astrid Kaiser, Simon B. M. Kretschmer, Sven George, Carlo Angioni, Jan Heering, Gerd Geisslinger, Achim Schmidtko, Denys Pogoryelov, Bettina Hofmann, Dieter Steinhilber, Ewgenij Proschak. Design, synthesis and structure-activity-relationship studies of dual inhibitors of soluble epoxide hydrolase and 5-lipoxygenase. *Journal of medicinal chemistry*. 2020 Oct 22;63(20):11498-11521.

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Katharina Metzner, Ruirui Lu, Jonas Petersen, Miriam S. Kuth, Sandra Heine, Oliver Drees, Mandy Paul, Elvir Becirovic, Lea Kennel, **Cathrin Flauaus**, Tilman Gross, Gesine Wack, Stephan W. Hohmann, Dina Nemirovski, Domenico Del Turco, Martin Biel, Gerd Geisslinger, Stylianos Michalakis, Achim Schmidtko. Neuropathic and cAMP-induced pain behavior is ameliorated in mice lacking CNGB1. *Neuropharmacology* 2020, Volume 171, 108087.

Simone Schierle*, **Cathrin Flauaus***, Pascal Heitel, Sabine Willems, Jurema Schmidt, Astrid Kaiser, Lilia Weizel, Tamara Goebel, Astrid S. Kahnt, Gerd Geisslinger, Dieter Steinhilber, Mario Wurglics, G. Enrico Rovati, Achim Schmidtko, Ewgenij Proschak, Daniel Merk. Boosting anti-inflammatory potency of Zafirlukast by designed polypharmacology. *J. Med. Chem.* 2018, 61, 5758-5764. *geteilte Erstautorenschaft

Ruirui Lu, **Cathrin Flauaus**, Lea Kennel, Jonas Petersen, Oliver Drees, Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Peter Ruth, Robert Lukowski, Achim Schmidtko. KCa3.1 channels modulate the processing of noxious chemical stimuli in mice. *Neuropharmacology* 2017; 125, 386-395.

Wiebke Kallenborn-Gerhardt, Christine V. Möser, Jana E. Lorenz, Mirco Steger, Juliana Heidler, Reynir Scheving, Jonas Petersen, Lea Kennel, **Cathrin Flauaus**, Ruirui Lu, Aimee L. Edinger, Irgard Tegeder, Gerd Geisslinger, Heinrich Heide, Ilka Wittig, Achim Schmidtko. Rab7 - a novel redox target that modulates inflammatory pain processing. *Pain* 2017; 158, 1354-1365.

Cathrin Flauaus und Achim Schmidtko. Gastrointestinale und kardiovaskuläre Nebenwirkungen der NSAR. *Pharmakon* 2017; 55-62.

Posterpräsentationen

- | | |
|------|--|
| 2019 | EUFEPS Annual Meeting 2019, Frankfurt am Main
Functions of sodium-activated potassium channels in pain processing |
| 2019 | The Challenge of Chronic Pain, Hinxton, Cambridgeshire, GB
Functions of sodium-activated potassium channels in pain processing |
| 2017 | Begutachtung des LOEWE-Zentrums für translationale Medizin und
Pharmakologie TMP, Frankfurt am Main
Slack-Aktivatoren zur Therapie von neuropathischen Schmerzen und
Juckreiz |
| 2017 | Neural Circuits of Pain, Heidelberg & Schwetzingen
KCa3.1 channels modulate the processing of noxious chemical
stimuli in mice |

Stipendium

- | | |
|------|--|
| 2019 | Freunde und Förderer der Goethe-Universität Frankfurt
Übernahme der Reise- und Teilnamekosten eines internationalen
Kongresses |
|------|--|