

# **Aktivatoren von $K_{Na}1.1$ -Kanälen für die Therapie von Schmerz und Pruritus**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

**Annika Sophie Balzulat**

aus Berlin

Frankfurt am Main 2024

(D 30)

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

Dekan: Prof. Dr. Clemes Glaubitz

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Achim Schmidtko

Prof. Dr. Eugen Proschak

Datum der Disputation: 20.06.2024

*“Of course, I have other interests, but on the other hand, science is a lifestyle in the sense that it's a combination of profession and hobby.”*

Erwin Neher

In Liebe meinen Eltern gewidmet

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Schmerz	1
1.1.1	Nozizeption	3
1.1.2	Periphere und zentrale Schmerzsensibilisierung	8
1.2	Pruritus	10
1.2.1	Periphere und zentrale Mechanismen der Juckreizverarbeitung	11
1.2.2	Therapeutische Optionen	17
1.3	Kaliumkanäle im somatosensorischen System	19
1.3.1	Membrantopologie und Klassifizierung	19
1.3.2	Der Natrium-abhängige Kaliumkanal Slack	22
1.4	Zielsetzung	28
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>29</b>
2.1	Material	29
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	29
2.1.2	Puffer und Lösungen	32
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	33
2.1.4	Geräte	34
2.2	Zellbiologische Methoden	36
2.2.1	Kultivierung von HEK-Slack Zellen	36
2.2.2	Primärkultur von Spinalganglien	36
2.2.3	Kryokonservierung	37
2.2.4	Beschichtung von Zellkulturplatten und Deckgläsern	37
2.2.5	Quantifizieren und Aussäen von HEK-Slack Zellen	38
2.2.6	Untersuchung der Slack-Aktivierung im FluxOR™-Kaliumkanal Assay	39
2.2.7	D <sub>2</sub> /D <sub>3</sub> -Rezeptor und H <sub>1</sub> -Rezeptor Radioligandenbindungsassays	42
2.3	Elektrophysiologische Charakterisierung ausgewählter Testsubstanzen	43
2.3.1	Patch-Clamp Technik	43
2.3.2	Setup	45
2.3.3	Messungen an HEK-Slack Zellen	46
2.3.4	Messungen an DRG-Neuronen	47
2.3.5	Auswertung	48
2.4	Tierexperimentelle Methoden	49
2.4.1	Versuchstiere	49
2.4.2	Genotypisierung	49
2.4.3	Gewebeentnahme	51

2.4.4	Ermittlung von pharmakokinetischen Eigenschaften ausgewählter Slack-Aktivatoren	51
2.4.5	Methoden zur Evaluation der motorischen Fähigkeiten nach Applikation der Testsubstanzen	52
2.4.6	Pulsoxymetrie-Messung zur Quantifizierung kardiovaskulärer Effekte der Testsubstanzen	53
2.4.7	Methoden zur Quantifizierung antinozizeptiver Effekte der Testsubstanzen	54
2.4.8	Schmerzmodelle	56
2.4.9	Methoden zur Quantifizierung antipruritischer Effekte der Testsubstanzen	57
<b>2.5</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>59</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<b>3.1</b>	<b>In-vitro-Charakterisierung neuer potentieller Slack-Aktivatoren</b>	<b>61</b>
3.1.1	Untersuchung der Slack-Aktivierung im FluxOR™-Assay	62
3.1.2	Bestimmung der Bindungsaffinitäten an Dopamin- und Histamin-Rezeptoren	67
3.1.3	Off-Target-Effekte ausgewählter Slack-Aktivatoren	68
3.1.4	Elektrophysiologische Charakterisierung ausgewählter Slack-Aktivatoren	70
<b>3.2</b>	<b>In-vivo-Charakterisierung ausgewählter Slack-Aktivatoren</b>	<b>80</b>
3.2.1	Pharmakokinetische Eigenschaften	80
3.2.2	Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten	83
3.2.3	Beeinflussung von kardiovaskulären Funktionen	86
3.2.4	Beeinflussung des Juckreizverhaltens	87
3.2.5	Beeinflussung des Schmerzverhaltens	95
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>100</b>
<b>4.1</b>	<b>Auswahl interessanter Slack-Aktivatoren</b>	<b>101</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss auf Kaliumströme und die neuronale Erregbarkeit</b>	<b>103</b>
<b>4.3</b>	<b>In-vivo-Charakterisierung von VH425 und EN12</b>	<b>107</b>
4.3.1	Nebenwirkungsprofil und pharmakokinetische Eigenschaften	107
4.3.2	Beeinflussung des Juckreizverhaltens	109
4.3.3	Beeinflussung des Schmerzverhaltens	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>116</b>
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>123</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>Wesentliche Kooperationspartner</b>	<b>126</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>127</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Schmerz

Die *International Association for the Study of Pain* (IASP) definiert Schmerz als „eine unangenehme sensorische und emotionale Erfahrung, die mit tatsächlichem oder drohendem Gewebeschaden verbunden ist oder dieser ähnelt“. Mit der im Jahr 2021 überarbeiteten Version soll die Multiplizität der physiologisch-psychischen Interaktionen hervorgehoben werden, die zur Bewertung dieser komplexen Sinneswahrnehmung beitragen. Neben der reinen Sensorik fließen auch affektive, vegetative, motorische und kognitive Komponenten mit ein (Schmidt et al. 2010). Als psychologischer Zustand ist Schmerz immer subjektiv und jeder Mensch lernt erst durch die eigenen persönlichen Lebenserfahrungen die Bedeutung des Begriffs kennen. Trotz fehlender Gewebeschädigung oder pathologischer Erkrankung können Schmerzen empfunden und sollten folglich als diese anerkannt werden. Demgegenüber darf nicht ausgeschlossen werden, dass ein Individuum keine Schmerzen verspürt, nur weil es unfähig ist, diese verbal zu kommunizieren (z.B. Neugeborene oder Tiere) (Raja et al. 2020). Als Warnfunktion sollen uns akute physiologische Schmerzen vor einer tatsächlichen oder potentiellen Gewebeschädigung schützen, was durch die Einleitung von Gegenmaßnahmen, wie z.B. dem reflexartigen Zurückziehen der Hand beim Berühren einer heißen Herdplatte, gewährleistet wird. Darüber hinaus werden Heilungsprozesse gefördert, indem die verletzte Körperregion ruhiggestellt und möglichst wenig belastet wird. Die Relevanz einer intakten Schmerzempfindung wird bei bestimmten, sehr selten auftretenden Mutationen im SCN9A-Gen deutlich, welches spannungsabhängige Natriumkanäle des Typs Nav1.7 kodiert. Sie nehmen eine tragende Rolle in der Schmerztransmission über periphere Nervenfasern ein und verlieren durch die Mutation ihre Funktionalität. Die daraus resultierende Unfähigkeit Schmerzen zu verspüren geht mit einer erhöhten Verletzungsgefahr und reduzierten Lebenserwartung einher (Peirs und Seal 2016; Drenth und Waxman 2007). Chronische Schmerzen dagegen verlieren ihre physiologische Warnfunktion und können über die Heilungsperiode einer Verletzung oder Erkrankung hinaus persistieren. Je nach Definition ist die Rede von mehr als drei bis sechs Monaten (Schmidt et al. 2010; Crofford 2015; Mills et al. 2019; Treede et al. 2019). Die Prävalenz in der erwachsenen Bevölkerung wird weltweit auf etwa 20 % geschätzt (van Hecke et al. 2013; Cohen et al. 2021; Mills et al. 2019; Breivik et al. 2006). Durch die andauernde Stimulation des Nervensystems kann es zu pathologischen Sensibilisierungsprozessen und der Entwicklung von Spontanschmerzen, einem gesteigerten Schmerzempfinden bei schmerzhaften Reizen (Hyperalgesie) und/oder Schmerzen bei normalerweise nicht-noxischen Reizen (Allodynie) kommen. Somit stellt Schmerz nicht nur ein Symptom dar, sondern kann sich während der Chronifizierung zu einer eigenständigen Erkrankung manifestieren (Clauw et al. 2019). Der damit häufig einhergehende hohe Leidensdruck

sowie psycho-soziale und ökonomische Probleme bedeuten für die Patienten eine schwere Beeinträchtigung ihrer Lebensqualität und die daraus resultierende Arbeitsunfähigkeit in Kombination mit der medizinischen Versorgung eine enorme wirtschaftliche Belastung (Cohen et al. 2021; Steglitz et al. 2012).

Seit 2019 unterscheidet die IASP zwischen drei pathologischen Schmerzarten: Nozizeptiv, neuropathisch und nozioplastisch (Cohen et al. 2021; Fitzcharles et al. 2021). Daneben existieren auch Mischformen. Ursächlich für nozizeptive Schmerzen ist meist eine Gewebeschädigung mit der einhergehenden Entzündung des umliegenden Bereichs. Durch infiltrierende Immunzellen kommt es zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren, welche die sensorischen Nervenfasern reizen. Nozizeptive bzw. inflammatorische Schmerzen begleiten oftmals chronisch-entzündliche Erkrankungen wie die rheumatoide Arthritis und können am erfolgreichsten therapiert werden durch nichtsteroidale Antirheumatika (NSAID), Coxibe, Metamizol, aber auch Opioide (Finnerup 2019; Langford 2006).

Neuropathische Schmerzen entstehen bei Läsionen oder pathologischen Veränderungen des somatosensorischen Systems entweder durch eine direkte Schädigung von Nervenfasern (z.B. bei Traumata, Amputationen) oder als Polyneuropathien beispielsweise in Folge von Diabetes mellitus, Multipler Sklerose, Virusinfektionen (Herpes Zoster), Operationen oder Chemotherapie (Colloca et al. 2017). Etwa 15 – 30 % der chronischen Schmerzen sind neuropathischer Natur (Cohen et al. 2021). Patienten berichten über anhaltende oder periodisch auftretende Spontanschmerzen, die zwischen einem brennenden, stechenden, kribbelnden oder Kältegefühl variieren können (Baron et al. 2010; Bouhassira et al. 2004). Die zugrundeliegende Pathogenese ist hochkomplex, umfasst ektopische Aktivitäten der verletzten Nerven sowie periphere und zentrale Sensibilisierungsmechanismen, die noch nicht vollständig verstanden sind. Da klassische Analgetika in der Regel wirkungslos bleiben, gestaltet sich die Therapie als überaus schwierig und bedarf oftmals einer Kombination mehrerer heterogener Wirkstoffgruppen. Als Mittel der ersten Wahl werden trizyklische Antidepressiva, Serotonin-Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer und die anti-krampfwirkenden Calciumkanal-Blocker Pregabalin und Gabapentin eingesetzt. Begrenzt sich die Neuropathie auf den peripheren Bereich, stehen als Mitteln der zweiten Wahl die topische Anwendung von Capsaicin (8 %ig) und Lidocain (5 %ig) oder eine subkutane Injektion von Botuliumtoxin Typ A als dritte Wahl zur Verfügung. Geringe Evidenzen sprechen zusätzlich für den Einsatz von Tramadol oder hochpotenten Opioiden (Finnerup et al. 2015; Colloca et al. 2017; Schlereth 2019). Trotz aller Bemühungen kann bei nur etwa 50 % der Patienten überhaupt ein Therapieansprechen mit einer maximalen Schmerzreduktion um ca. die Hälfte erzielt werden

(Finnerup et al. 2010; Moore et al. 2013). Demzufolge ist der medizinische Bedarf an innovativen und effektiven Therapieoptionen mit einer akzeptablen Verträglichkeit enorm.

Noziplastischen Schmerzen liegen keine eindeutig erkennbaren Schäden des Gewebes oder Nervensystems zugrunde und gehen vermutlich mit einer veränderten Nozizeption einher (Fitzcharles et al. 2021). Zu dieser Kategorie zählen beispielsweise die Fibromyalgie, das komplexe regionale Schmerzsyndrom und unspezifische Rückenschmerzen. Die Therapie richtet sich nach den Empfehlungen für neuropathische Schmerzen, gestaltet sich jedoch als besonders herausfordernd und wenig erfolgreich (Genc et al. 2012). Um eine Sensibilisierung des nozizeptiven Systems zu verhindern und die Entstehung noziplastischer Schmerzen einzudämmen, ist daher die frühzeitige Behandlung akuter nozizeptiver Schmerzen von essenzieller Bedeutung.

### 1.1.1 Nozizeption

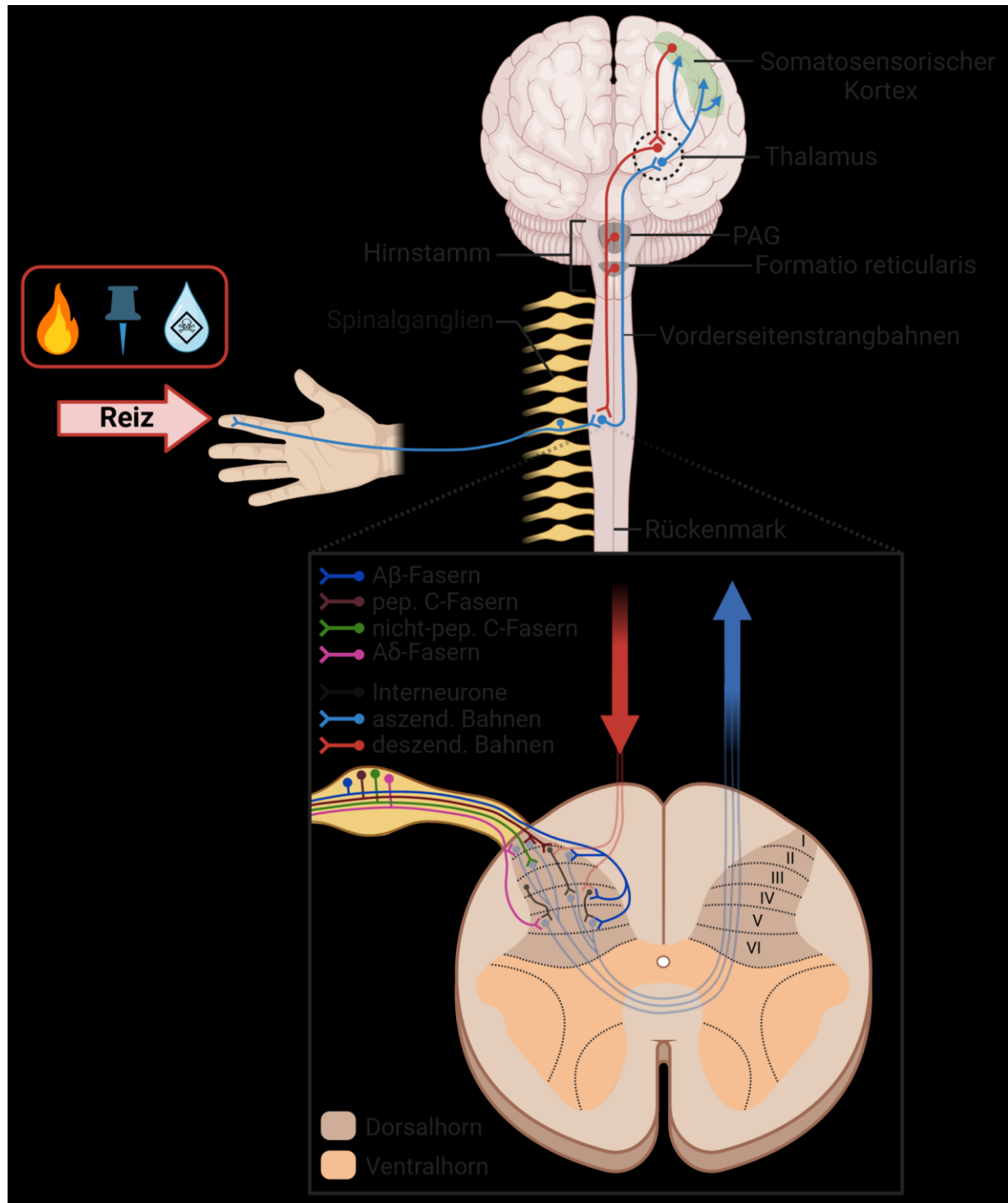
Der Prozess der objektiven Wahrnehmung und Verarbeitung von schmerzhaften Reizen wird als Nozizeption bezeichnet. Dabei umfasst das nozizeptive System einen peripheren und einen zentralen Teil. In der Peripherie werden schmerzhaft mechanische, thermische oder chemische Reize von Populationen primär afferenter Neurone, den Nozizeptoren, detektiert. Ihre Zellkörper liegen in den Spinalganglien (*dorsal root ganglia*, DRG) bzw. im *Ganglion trigeminale*, dessen Nervenfasern den Kopfbereich innervieren. Nozizeptoren zeichnen sich durch eine einzigartige Morphologie aus. Sie sind pseudo-unipolar, das heißt ausgehend von ihren Zellkörpern teilen sich ihre Axone in einen peripheren und einen zentralen Ast auf. Durch einen noxischen Reiz werden spezielle Rezeptoren auf den peripheren, frei im Gewebe liegenden Nervenendigungen stimuliert, wodurch es zur Membrandepolarisation kommt. Überschreitet dieses sogenannte Sensorpotential einen Schwellenwert, wird ein Aktionspotential nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip ausgelöst.

An der Transduktion von Wärme- und Kältereizen sind bestimmte Mitglieder der transienten Rezeptor-Potenzial-Kationenkanalfamilie (TRP-Kanäle) maßgeblich beteiligt. Lange Zeit wurde dem für Capsaicin sensitiven transienten Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie V (für Vanilloid), Subtyp 1 (TRPV1) die Schlüsselrolle in der Detektion von schmerzhaften Hitzestimuli zugesprochen (Caterina et al. 2000; O'Neill et al. 2012). Neuste wissenschaftliche Erkenntnisse deuten auf ein Zusammenspiel mit zwei weiteren TRP-Kanälen der Unterfamilie M (für Melastin), Subtyp 3 (TRPM3) und der Unterfamilie A (für Ankyrin), Subtyp 1 (TRPA1) hin (Vandewauw et al. 2018). Temperaturen unterhalb von 28 °C aktivieren den TRPM8-Kanal, welcher somit maßgeblich an der Wahrnehmung noxischer und nicht-noxischer Kältestimuli beteiligt ist. Seine chemische Aktivierung mittels des Liganden Menthol löst ein kühles Gefühl auf der Haut aus (Bautista et al. 2007; Dhaka et al. 2007). In die Mechanotransduktion sind eine Reihe von Kaliumkanälen



(Chemin et al. 2005; Ranade et al. 2015), TRP-Kanälen (Quick et al. 2012) und am bedeutendsten die Kationenkanäle Piezo1 und Piezo2 involviert (Coste et al. 2010; Coste et al. 2012; Ranade et al. 2015). Chemische Reize werden entweder über G-Protein-gekoppelte Mechanismen oder ligandengesteuerte Ionenkanäle vermittelt. So reagiert z.B. der TRPA1-Kanal neben thermischer Stimulation auch sensibel auf elektrophile Moleküle, die kovalent mit Cystein-Resten binden und durch eine Konformationsänderung seine Öffnung bewirken (Hinman et al. 2006; Macpherson et al. 2007; Bandell et al. 2004). Dazu zählen das für den scharfen Geschmack von Wasabi verantwortliche Allylsenfölyl Allylisothiocyanat (AITC), Reizstoffe wie Acrolein und Wasserstoffperoxid oder die Anästhetika Isofluran und Propofol (Macpherson et al. 2007; Matta et al. 2008).

Im Verlauf der Transformation wird die Reizstärke, welche über die Amplitude des Sensorpotentials abgebildet wird, in die Frequenz der Aktionspotentiale umkodiert. Als elektrisches Signal wird der Schmerzreiz entlang des Axons zum zentralen Ende weitergeleitet, welches in das Dorsalhorn des Rückenmarks bzw. in den Hirnstamm (Nerven des *Ganglion trigeminale*) terminiert (Schmidt et al. 2010; Basbaum et al. 2009). Anatomisch und elektrophysiologisch organisiert sich das Dorsalhorn in sechs voneinander abgrenzbare Laminae, in denen abhängig vom Nozizeptor-Typ die erste synaptische Verschaltung auf spinale Inter- und Projektionsneurone erfolgt. Die Identifizierung von jeweils 15 glutamatergen exzitatorischen und 15 GABAergen und/oder glycinergen inhibitorischen Populationen von Interneuronen in Einzelzell-RNA-Sequenzanalysen verdeutlicht die funktionale Komplexität der Signalmodulation auf Rückenmarksebene (Häring et al. 2018; Zeisel et al. 2018). Über die ascendierenden, zur kontralateralen Seite kreuzenden Bahnen des *Tractus spinothalamicus*, *Tractus spinoreticularis* und *Tractus spinohypothalamis* (Teile des Vorderseitenstrangsystems) wird die Information zum Thalamus und danach in bestimmte Gehirnareale weitergeleitet. Das auch als „Schmerzmatrix“ bezeichnete Netzwerk umfasst den primären und sekundären somatosensorischen, den anterior cingulären, insulären und präfrontalen Kortex sowie die Amygdala (Bliss et al. 2016; Basbaum et al. 2009; Schmidt et al. 2010). Erst hier wird der Reiz als Schmerz identifiziert, lokalisiert und bewertet. Die isolierte Aktivierung von Nozizeptoren resultiert folglich nicht automatisch in einer Schmerzempfindung, erst durch die supraspinale Prozessierung und psychologische Bewertung wird das Sinneserlebnis als solches wahrgenommen (Raja et al. 2020). Neben den ascendierenden Projektionsneuronen existieren descendierende, absteigende Bahnen, deren Ausgangspunkte insbesondere im *periaquäduktalen Grau* und der *Formatio reticularis* im Hirnstamm liegen und in Richtung des Rückenmarks zum Dorsalhorn verlaufen. Dort können sie die nozizeptive Verarbeitung über die Ausschüttung von Transmittern (z.B. Serotonin und Noradrenalin) modulierend hemmen oder fasilitieren und bilden ein endogenes Schmerzkontrollsystem (Schmidt et al. 2010).



**Abbildung 1: Vereinfachte schematische Darstellung des nozizeptiven Systems**

Ein schmerzhafter Reiz (thermisch, mechanisch oder chemisch) wird von primär afferenten Neuronen in der Peripherie detektiert und als elektrisches Signal zum Dorsalhorn des Rückenmarks weitergeleitet, welches sich in sechs Laminae (I – VI) gliedert (unteres Bild). Aβ-Fasern (dunkelblau) terminieren in Laminae II, IV und V, peptiderge C-Fasern in Laminae I und in der äußeren Lamina II, nicht peptiderge C-Fasern in der mittleren Lamina II und Aδ-Fasern projizieren in Laminae I und V. Nach der ersten Verschaltung auf Inter- oder Projektionsneurone wird die Information über aufsteigende Bahnen in verschiedene Gehirnareale weitergeleitet und verarbeitet. Deszendierende Bahnen und spinale Interneurone modulieren die Signalverarbeitung im Rückenmark und bilden ein endogenes Schmerzkontrollsystem. PAG: periaquäduktales Grau

### 1.1.1.1 Subpopulationen sensorischer Neurone

Die klassische Unterteilung der nozizeptiven Fasern erfolgt anhand ihrer anatomischen, funktionellen und elektrophysiologischen Eigenschaften in zwei Typen. Dünn-myelinisierte A $\delta$ -Fasern haben einen mittleren Durchmesser, sind gekennzeichnet durch eine schnelle Reizweiterleitung (5 – 30 m/s) und vermitteln die erste akute Schmerzempfindung. Dagegen zeichnen sich die nicht-myelinisierten C-Fasern durch einen kleinen Durchmesser mit einer langsamen Leitungsgeschwindigkeit (0,4 – 1,4 m/s) aus und sind für die Weiterleitung des „späten“, länger andauernden Schmerzes verantwortlich (Basbaum et al. 2009). Die Transmission taktiler Stimulationen, wie leichten Berührungen, erfolgt über eine heterogene Gruppe primär afferenter Neurone, die durch niederschwellige nicht-schmerzhaft Reize aktiviert und als *low-threshold mechanoreceptors* (LTMRs) zusammengefasst werden. Dazu zählen teilweise auch schnellleitende, stark-myelinisierte A $\beta$ -Fasern (Dubin und Patapoutian 2010) und bestimmte C-Fasern, die *C-low-threshold mechanoreceptors* (C-LTMRs) (Abraira und Ginty 2013).

Die meisten Nozizeptoren reagieren auf mechanische, thermische und chemische Reize und werden daher als polymodal bezeichnet. Jedoch gibt es auch Unterschiede im Ansprechen auf die verschiedenen Modalitäten. So können A $\delta$ -Fasern weiter unterteilt werden in zwei Gruppen. Typ I-A $\delta$ -Fasern reagieren zwar auf mechanische und chemische Stimuli, aber nur auf starke thermische Reize von über 50 °C. Dagegen werden Typ II-A $\delta$ -Fasern schon bei schwacher thermischer, allerdings erst bei starker mechanischer Stimulation aktiviert (Basbaum et al. 2009). Die Gruppe der C-Faser-Nozizeptoren lässt sich insbesondere molekularbiologisch weiter in peptiderg und nicht-peptiderg unterteilen. Peptiderge C-Fasern setzen Neuropeptide wie Substanz P, *calcitonin-gene related peptid* (CGRP) oder Somatostatin (SST) frei und exprimieren die Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA), dessen endogener Ligand der Nervenwachstumsfaktor (*nerve growth factor*; NGF) ist (Basbaum et al. 2009; Dong et al. 2001; Emery und Ernfors 2020). Dagegen lassen sich nicht-peptiderge C-Fasern durch die Expression der Rezeptor-Tyrosinkinase Ret abgrenzen, der durch die neurotrophen Faktoren *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF), Neurturin und Artemin aktiviert wird. Weiterhin exprimieren sie verstärkt Rezeptoren der Mrg-Familie (*Mas-related G-Protein-gekoppelte Rezeptoren*) sowie purinerge P2X3-Rezeptoren (Dong et al. 2001; Braz et al. 2005; Basbaum et al. 2009). Die meisten nicht-peptidergen C-Fasern binden das in *Griffonia simplicifolia* (Afrikanische Schwarzbohne) enthaltene Isoektin B4 (IB4) und können über die Konjugation an einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden (Stucky und Lewin 1999). **Abbildung 1** zeigt die Termination der verschiedenen Nozizeptortypen in die unterschiedlichen Bereiche des Dorsalorns im Rückenmark. So innervieren die A $\delta$ -Fasern primär in Laminae I und V, die peptidergen C-Fasern ebenfalls in Lamina I und den äußeren Bereich der Lamina II und die nicht-

peptidergen C-Fasern in mittlere Bereiche der Lamina II. Dagegen terminieren nicht-nozizeptive A $\beta$ -Fasern in tiefere Schichten der Laminae II, IV und V (Basbaum et al. 2009).

Eine neue, detailliertere Klassifizierung der murinen primär afferenten Neurone wurde auf molekularer Ebene durch verschiedene Einzelzell-RNA-Sequenzanalysen ermöglicht. Usoskin et al. identifizierten 2015 elf distinkte neuronale Subtypen, über die anhand des Rezeptorprofils auch eine Vorhersage über ihre funktionelle Spezialisierung getroffen werden konnte. Die zwei peptidergen Gruppen werden gebildet aus unmyelinisierten C-Fasern (PEP1) und leicht-myelinisierten A $\delta$ -Fasern (PEP2) und sind vor allem hitze- und mechanosensitiv. Die insgesamt fünf Subtypen von niederschweligen mechanosensitiven A-Fasern teilen sich auf in drei LTMR-Populationen (NF1 – 3) und in zwei Klassen von Propriozeptoren (NF4 und 5). Die drei nicht-peptidergen Populationen NP1, NP2 und NP3 können sowohl schmerzhaft mechanische als auch thermische Reize vermitteln, nehmen aber vor allem eine essenzielle Rolle in der Detektion von Juckreizstimuli ein (vergleiche Kapitel 1.2.1). Eine letzte Gruppe umfasst bestimmte Tyrosinhydroxylase (TH)-positive C-LTMR-Fasern, die an der Transduktion von angenehmen Berührungen wie z.B. sanftes Streicheln beteiligt zu sein scheinen (Usoskin et al. 2015). Eine zweite Sequenzierungsstudie von Zeisel et al. 2018 konnte annähernd identische Subtypen identifizieren und somit die Klassifizierung bestätigen. Durch die Analyse einer größeren Neuronenzahl wurden allerdings leichte Variabilitäten und Subcluster innerhalb der PEP1, NP1 und NP2 Populationen gefunden. NF4 und NF5 wurden zu einer Propriozeptor-Population zusammengefasst und drei weitere Subpopulation von C-Faser-Kälterezeptoren ergänzt, die sich durch ihre hohe Expression von TRPM8-Kanälen auszeichnen (Zeisel et al. 2018). Somit werden in der Studie von Zeisel et al. 2018 insgesamt 17 Subpopulationen sensorischer Neurone unterschieden.

Jahrzehntelang unbeantwortet blieb die Frage, wie sich neuronale Subpopulationen und die Expression von Schlüsselproteinen, die involviert sind in nozizeptive Prozesse, zwischen den verschiedenen Spezies unterscheiden. Noch immer scheitern zu viele erfolgreich in der Präklinik an Nagetieren entwickelte Therapien an der translationalen Hürde und fallen in klinischen Studien durch (Borsook et al. 2014), entweder auf Grund von mangelnder Effektivität oder dem Auftreten von zu starken Nebenwirkungen. Neuste Transkriptomanalysen konnten eine hohe Konservierung der sensorischen Neuronenpopulationen zwischen Menschen, Primaten und Mäusen bestätigen, aber auch einige wichtige Unterschiede feststellen (Kupari et al. 2021; Nguyen et al. 2021; Tavares-Ferreira et al. 2022; Ray et al. 2018). So wurden im Menschen insgesamt zwölf Subpopulationen von DRG-Neuronen identifiziert, die sich aus fünf verschiedenen C-Faser-Nozizeptoren, jeweils einer Population von C-LTMR und A $\beta$ -Nozizeptoren, jeweils zwei Populationen von A $\delta$ - und A $\beta$ -Fasern und einer Gruppe von Propriozeptoren zusammensetzen (Tavares-Ferreira et al. 2022).

### 1.1.2 Periphere und zentrale Schmerzsensibilisierung

Nozizeption ist kein starrer Prozess, denn das somatosensorische System unterliegt einer konstanten dynamischen Plastizität und kann sich unterschiedlichen Situationen anpassen. Eine veränderte Nozizeption entsteht entweder durch die Sensibilisierung von peripheren Nervenendigungen oder durch komplexe Veränderungen im Rückenmark und höheren Hirnregionen (Vardeh und Naranjo 2017).

Bei der peripheren Sensibilisierung kommt es nach einer Gewebeerletzung zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch Immunzellen, Thrombozyten und dem Plasma sowie Veränderungen des chemischen Milieus. Dadurch werden die sensorischen Nervenfasern gereizt und setzen als Reaktion weitere Entzündungsmediatoren und Neuropeptide aus ihren peripheren Endigungen frei. In dieser „inflammatorische Suppe“ können Substanz P, CGRP, Bradykinin, Eicosinoide, Prostaglandine, Leukotriene, Neurotrophine, Zytokine, extrazelluläre Proteasen und Protonen vorkommen und im Folgenden Second-Messenger-Systeme in den Nozizeptoren aktivieren. Hierzu zählt die Aktivierung der Proteinkinasen A (PKA) und C (PKC), Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), *extracellular-signal regulated kinases* (ERK), p38 und c-Jun-N-terminalen Kinasen (JNK), die durch Phosphorylierung von Ionenkanälen (überwiegend TRP- und Nav-Kanäle) ihre Erregungsschwelle reduzieren bzw. die Reizantwort verstärken (Basbaum et al. 2009; Reichling et al. 2013). Manche der genannten Signalwege initiieren außerdem die Verstärkung von Ein- oder Abbauprozessen bestimmter Ionenkanäle und Rezeptoren in die Zellmembran und verändern dadurch die Erregbarkeit der Nozizeptoren. Weiterhin können sogenannten „stumme Nozizeptoren“ aktiviert werden, die im physiologischen Zustand auf Grund ihrer sehr hohen Erregungsschwelle nicht aktiv sind (Basbaum et al. 2009). Bei der direkten Schädigung von Nervenfasern führen transkriptionelle und post-transkriptionelle Veränderungen, wie die verstärkte Proteinexpression von spannungsabhängigen Natriumkanälen an der Stelle der Verletzung, zu einer begünstigten Erregungsbildung und der Entstehung ektopter Aktionspotentiale (Colloca et al. 2017; Renthal et al. 2020). Spontanschmerzen können sich so ganz ohne periphere Stimulation ausbilden.

Die zentrale Sensibilisierung beschreibt den Prozess, bei dem sich eine dauerhafte Übererregbarkeit des ZNS ausbildet, die zu einer verstärkten Prozessierung von nozizeptiven Reizen führt (Woolf 1983). Dabei weist eine bestimmte neuronale Plastizitätsveränderung große Ähnlichkeit zu Mechanismen der Langzeitpotenzierung (LTP) auf (Drdla und Sandkühler 2008). Schmerzhaft Reize werden normalerweise über eine Glutamat-Freisetzung aus den zentralen Termini der Nozizeptoren vermittelt und führen über die Aktivierung von Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure- (AMPA)- und Kainat-Rezeptoren zur Generierung von exzitatorischen

postsynaptischen Potentialen (EPSP) in Projektionsneuronen der 2. Ordnung. Durch eine wiederholte Stimulation depolarisiert die postsynaptische Membran derart stark, dass die Magnesium-Blockade der normalerweise inaktiven N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA)-Rezeptoren gelöst wird (Woolf & Salter 2000). Aktivierte NMDA-Rezeptoren verstärken den intrazellulären Calciumeinstrom, als Folge werden Proteinkinasen (PKA, PKC, MAPK, PI3K) stimuliert und wiederum AMPA- und NMDA-Rezeptoren phosphoryliert. Es resultiert ein vermehrter Einbau in die Membran und ihre gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Glutamat lässt sie schon auf schwache, normalerweise nicht-noxische periphere Stimulation reagieren (Latremoliere und Woolf 2009).

Weiterhin untersteht die nozizeptive Verarbeitung im Rückenmark der Kontrolle von hemmenden GABAergen und glycinergen Interneuronen. Die Abnahme der inhibitorischen Modulation (Disinhibierung) resultiert in einer verstärkten Exzitation der betroffenen Projektionsneurone. Im Rahmen einer peripheren Nervenverletzungen kann es zum Niedergang von GABAergen Neuronen kommen (Moore et al. 2002), vermehrt ausgeschüttete Prostaglandine ( $\text{PGE}_2$ ) können eine Unempfindlichkeit der spinalen Neurone gegenüber Glycin induzieren (Harvey et al. 2004) und transkriptionelle Veränderungen führen zu einem reduzierten Chloridionen-Gradienten, sodass die Aktivierung von  $\text{GABA}_A$ -Rezeptoren keine Hyperpolarisation mehr auslöst (Coull et al. 2003).

Verletzte Nerven setzen außerdem eine Reihe von Signalmolekülen wie ATP, Fraktalkin und Zytokine frei, die über spezielle Mechanismen die Infiltration von Immunzellen wie Mikroglia und Astrozyten in den betreffenden Bereich des Dorsalhorns initiieren. Physiologisch dienen Gliazellen im ZNS dem Schutz vor Entzündungen und Infektionen. Durch die Aktivierung nach einer Nervenverletzung setzen sie allerdings eine Vielzahl von Zytokinen, Neurotransmittern, neurotrophen Faktoren und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) frei. Durch diese Entzündungsmediatoren werden über intrazelluläre Signalkaskaden (ERK, CREB) insbesondere spinalen Neurone in Lamina I sensibilisiert (Latremoliere und Woolf 2009; Basbaum et al. 2009). Weiterhin scheinen Mikroglia an der Modellierung synaptischer Verschaltungen beteiligt zu sein (Inoue 2018).

Zusammenfassend führen verschiedenste Regulationen im peripheren und zentralen Nervensystem zu einer verstärkten Reaktion auf nozizeptive Inputs, die sich langfristig in Form von chronischen Schmerzen manifestieren.

## 1.2 Pruritus

Primär afferente Neurone detektieren neben taktilen Stimuli und nozizeptiven Reizen auch Juckreizstimuli (Green und Dong 2016). Dabei beschreibt Pruritus (auch als Juckreiz bezeichnet) eine unangenehme Sinneswahrnehmung, die das Verlangen hervorruft, sich zu kratzen. Starkes Kratzen, also ein mechanisch erzeugter Schmerz, kann den Juckreiz kurzzeitig überlagern und dadurch hemmen. Längeres Kratzen allerdings führt zu Hautschäden und Läsionen, die wiederum Entzündungsvorgänge verstärken und die Juckempfindung fördern. Dieser Circulus vitiosus zwischen Pruritus und mechanischer Reizantwort verdeutlicht die enge Verschaltung zwischen der Schmerz- und der Juckempfindung (Ständer und Schmelz 2006; Ständer et al. 2022). Als akute Form dient Pruritus ähnlich wie Schmerz einer Warn- und Schutzfunktion, um die Haut vor potentiell schädigenden Substanzen zu befreien (Metz und Ständer 2010). Dagegen verliert länger persistierender Pruritus seine nützlichen Aufgaben und wird ab einer Dauer von sechs Wochen als chronisch definiert (Ständer et al. 2007). Aktuelle epidemiologische Studien sind nur begrenzt verfügbar, konnten aber in der Vergangenheit eine weite Verbreitung des chronischen Pruritus in der Allgemeinbevölkerung mit Prävalenzen zwischen 10 – 15 % feststellen (Matterne et al. 2011; Matterne et al. 2009; Kopyciok et al. 2016). Der Leidensdruck der Patienten ist extrem hoch und in Kombination mit Begleitsymptomen wie vermehrten Schlafstörungen, Angstzuständen oder andere psychischen Erkrankungen resultiert dieser Zustand in einer dramatischen Beeinträchtigung der Lebensqualität (Matterne et al. 2011; Steinke et al. 2018; Marron et al. 2016; Dalgard et al. 2020).

Klinisch wird chronischer Pruritus in vier Kategorien unterteilt (Ständer et al. 2007). Dermatologischer Pruritus entsteht als Folge von allergischen, entzündlichen oder infektiösen Hauterkrankungen sowie Insektenstichen und stellt eines der Leitsymptome vieler dermatologischer Erkrankungen dar. Systemischer Pruritus kann medikamentös induziert sein, wie durch das in der Malariatherapie eingesetzte Chloroquin, oder sekundär als Folge von Erkrankungen der Leber, Nieren, des Blutes oder anderen Organen entstehen. So werden viele hepatobiliäre Erkrankungen, insbesondere solche resultierend in einer Cholestase, von chronischem Jucken begleitet (Beuers et al. 2014; Beuers et al. 2023). Im Rahmen einer chronischen Niereninsuffizienz hat die Prävalenz des *Chronic Kidney Disease*-(CKD-) assoziierten Pruritus in Hämodialyse-pflichtigen Patienten zwar über die vergangenen Jahrzehnte deutlich abgenommen, betrug allerdings 2006 immer noch 20 – 40 % (Verduzco und Shirazian 2020; Pisoni et al. 2006). Neuropathischer Pruritus ist assoziiert mit neurologischen Erkrankungen und tritt insbesondere bei peripheren Neuropathien häufig auf. Psychogener Pruritus wird durch unterschiedlichste psychologische Faktoren beeinflusst und steht im Zusammenhang mit psychiatrischen Störungen. Oftmals kommen auch Mischformen

vor (Weisshaar et al. 2019). Auf Grund der Verschiedenartigkeit der zugrundeliegenden Pathogenese gestaltet sich die Therapie als äußerst herausfordernd. Daher ist es von essenzieller Wichtigkeit, die Aufklärung der komplexen peripheren und zentralen Mechanismen voranzutreiben, um potentielle neue Targets und Wirkmechanismen identifizieren zu können.

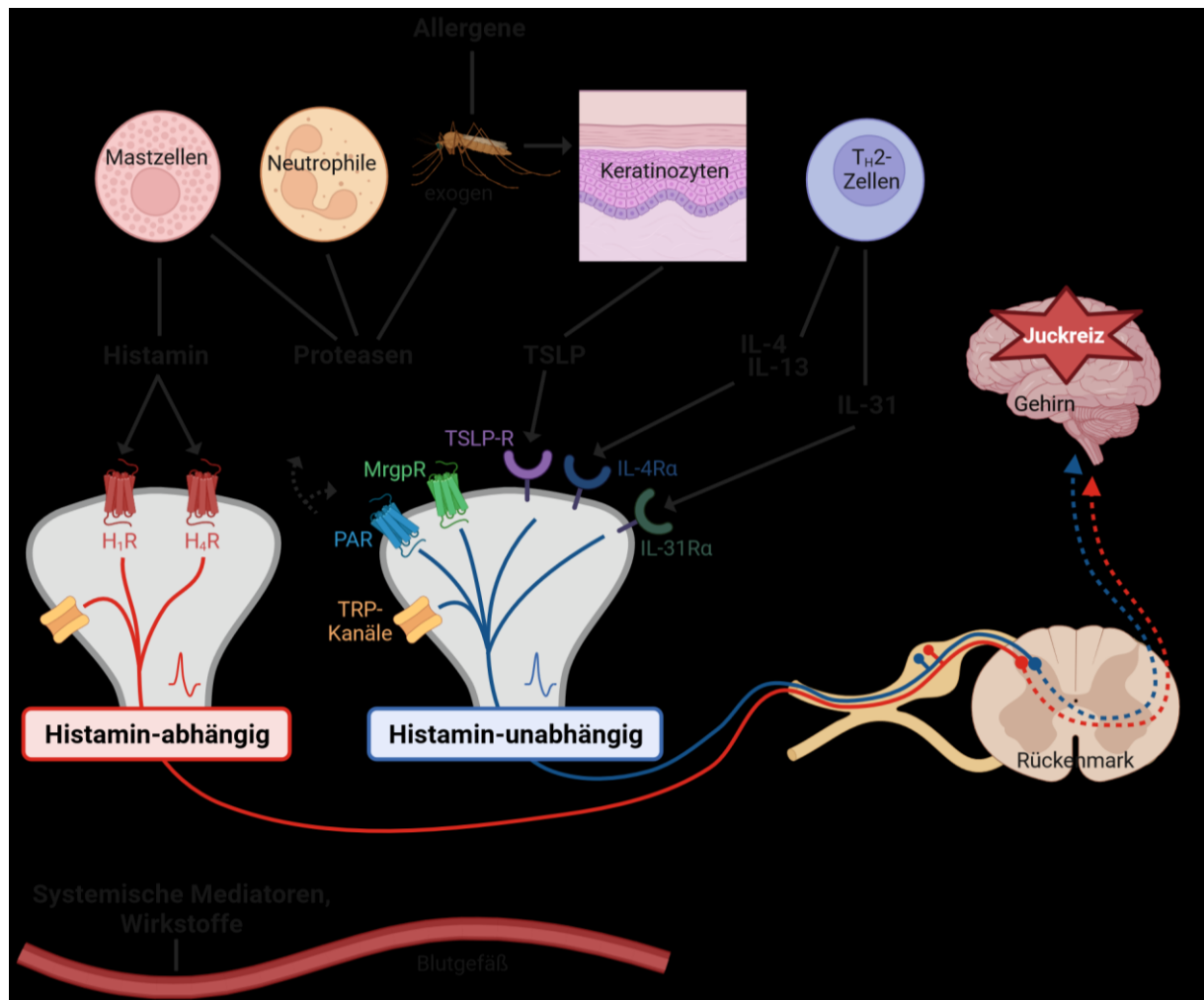
### 1.2.1 Periphere und zentrale Mechanismen der Juckreizverarbeitung

Pruritus kann ebenso wie Schmerz durch mechanische, thermische oder chemische Reize ausgelöst werden und manifestiert sich in der Haut oder den Schleimhäuten, nicht jedoch in Muskeln, Gelenken oder inneren Organen (LaMotte et al. 2014). Die freien Endigungen der juckreizvermittelnden Nerven (Prurizeptoren) reagieren auf unterschiedlichste juckreizauslösende Mediatoren. So werden als Folge einer leichten Verletzung der Epidermis (z.B. durch einen Insektenstich) oder durch den Kontakt mit einem Pathogen von neuronalen und nicht-neuronalen Zellen wie Keratinozyten und Immunzellen (vor allem Mastzellen, neutrophile Granulozyten und Typ-2-T-Helferzellen) endogene Pruritogene freigesetzt. Zusätzlich transportiert der einströmende Blutkreislauf systemische Juckreizmediatoren oder pruritogen wirkende Medikamente in die Haut. Exogen können Pruritogene durch die Umwelt aufgenommen werden (Misery und Ständer 2016; Green und Dong 2016; Dong und Dong 2018). Die meisten Pruritogen-bindenden Rezeptoren sind G-Protein-gekoppelt (Alexander et al. 2019). Über diverse Signalkaskaden führen sie downstream zur Sensibilisierung von TRP-Kanälen der Typen V1, A1, V4, C3 oder M3 sowie Nav1.7-, 1.8- oder 1.9-Kanälen und zur Generierung eines Aktionspotentials (Sun und Dong 2016; Kühn et al. 2020). Die Information wird ähnlich wie ein nozizeptiver Reiz zum Rückenmark und über die gleichen aufsteigenden Bahnen anschließend ins Gehirn weitergeleitet (vergleiche Kapitel 1.1.1). Die Lokalisation und Intensität des Juckreizes wird im primären und sekundären somatosensorischen Kortex verarbeitet. Die Aktivierung des präfrontalen Kortex und der Amygdala reguliert die emotionale Bewertung und das Kratzverhalten (Yosipovitch und Mochizuki 2015; Mochizuki und Kakigi 2015).

Das historisch wohl am besten charakterisierte Pruritogen ist Histamin, welches vor allem in Mastzellen gespeichert und während ihrer Degranulation freigesetzt wird. Es löst lokal eine Vasodilatation, Schwellung und die Rekrutierung weiterer Immunzellen aus (Dong und Dong 2018; Lay und Dong 2020). Von den vier bekannten G-Protein gekoppelten Histamin-Rezeptoren ( $H_1$  –  $H_4$ ) scheinen nur  $H_1$  und  $H_4$  an der Vermittlung von Pruritus beteiligt zu sein (Usoskin et al. 2015; Bell et al. 2004). Neben diesem histaminergen Signalweg laufen viele Formen von Pruritus über Histamin-unabhängige Mechanismen ab. Dabei wird der Familie der *Mas-related* G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Mrgpr) eine tragende Rolle zugesprochen. Sie umfasst 18 Gene im Menschen und



50 Gene in der Maus, wird exklusiv in primär afferenten Neuronen und Mastzellen exprimiert und nimmt ein breites Spektrum an Pruritogenen wahr (Misery und Ständer 2016). Forschungsergebnisse der letzten Jahre konnten eine Vielzahl spezifischer Aktivierungsmechanismen entschlüsseln. So wird der MrgprA3-Rezeptor, dessen funktionelles Homolog im Menschen MrgprX1 entspricht, durch Chloroquin aktiviert (Liu et al. 2009). Die nicht-essenzielle Aminosäure  $\beta$ -Alanin aktiviert MrgprD-Rezeptoren (Liu et al. 2012), MrgprC11-Rezeptoren reagieren auf das Pro-Enkephalin *bovine adrenal medulla 8-22 peptid* (BAM8-22) (Sikand et al. 2011) und die endogene Cysteinprotease Cathepsin S (Dong und Dong 2018; Bautista et al. 2014; McNeil und Dong 2014). Cathepsin S und andere Proteasen aktivieren außerdem Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR), eine weitere Gruppe von GPCRs, über die proteolytische Spaltung ihres extrazellulären N-Terminus. Vor allem PAR2 und PAR4 sind verstärkt im nicht-histaminergen Pruritus involviert (Akiyama et al. 2015) und ihre erhöhte Expression konnte in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis festgestellt werden (Steinhoff et al. 2003). Exogene PAR-Aktivatoren sind unter anderem Mucinain (aktive Substanz in der Juckbohne), das im Stamm der Ananaspflanze enthaltene Bromelain und das in Papayas enthaltene Papain (Akiyama et al. 2015; Reddy et al. 2008). Das Peptid Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu (SLIGRL-NH<sub>2</sub>) ist sowohl ein PAR2-Rezeptor- als auch MrgprC11-Rezeptor-Agonist (Shimada et al. 2006). Ein weiteres potentes Pruritogen ist der Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptophan, 5-HT), das Histamin-unabhängig von Mastzellen freigesetzt werden kann. Die 14 bekannten 5-HT-Rezeptoren gliedern sich in sieben Subtypen und sind mit Ausnahme der 5-HT<sub>3</sub>-Rezeptoren alle G-Protein-gekoppelt (Dong und Dong 2018). Insbesondere die Subtypen der 5-HT<sub>2</sub>- und 5-HT<sub>7</sub>-Rezeptoren scheinen stark an der Pruritusverarbeitung beteiligt zu sein (Morita et al. 2015; Lay und Dong 2020).

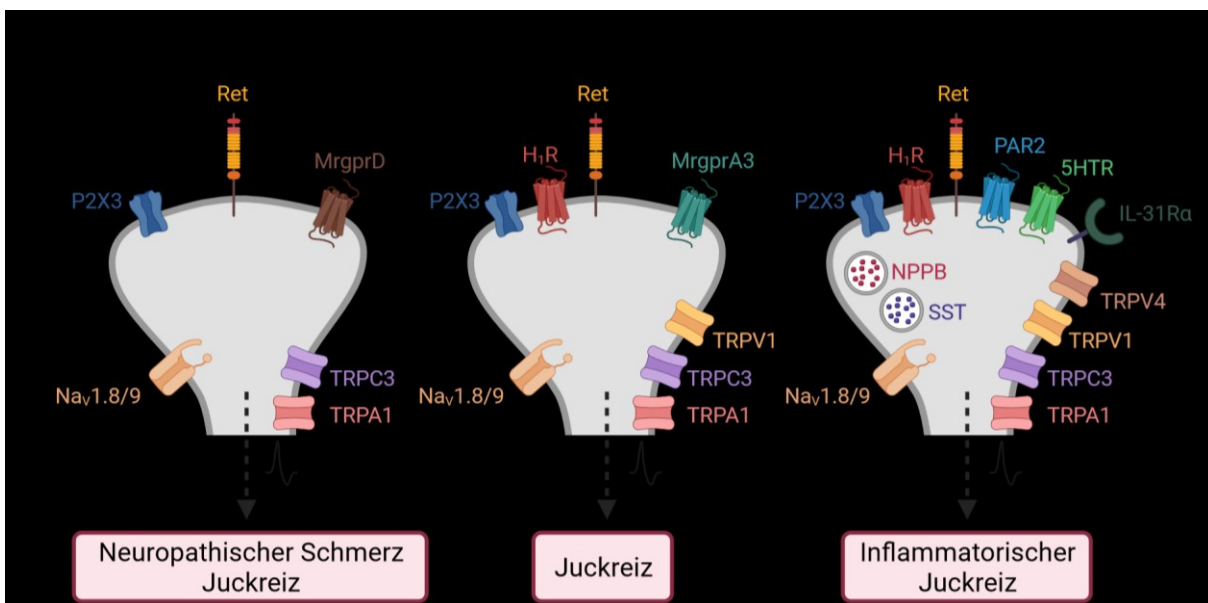


**Abbildung 2: Vereinfachte schematische Darstellung der Juckreizverarbeitung in der Haut**

Die freien Endigungen von primär afferenten Neuronen reagieren über ihre Rezeptoren auf verschiedenste Juckreizmediatoren. Endogene Pruritogene werden in der Haut von Keratinozyten und Immunzellen (wie Mastzellen, neutrophile Granulozyten oder  $T_H2$ -Zellen), exogene Pruritogene von der Umwelt freigesetzt. Über Blutgefäße können systemische Mediatoren und pruritogene Wirkstoffe in die Haut transportiert werden. Die Prurizeptoren leiten das Juckreizsignal entweder über Histamin-abhängige oder Histamin-unabhängige Signalwege zum Rückenmark und weiter ins Gehirn. Verändert nach (Misery et al. 2021). TSLP: Thymisches stromales Lymphopoietin, IL: Interleukin, TRP-Kanäle: Transiente Rezeptor-Potenzial-Kanäle, PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, MrgpR: Mas-related G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Neben GPCRs exprimieren Prurizeptoren außerdem eine Reihe von Zytokin-Rezeptoren und teilen sich somit gleiche Signalwege mit Immunzellen. Das in  $T_H2$ -Lymphozyten produzierte Interleukin-31 (IL-31) vermittelt über einen Rezeptorkomplex aus dem IL-31-Rezeptor Subtyp  $\alpha$  und dem Oncostatin M-Rezeptor Subtyp  $\beta$  die Aktivierung der JAK-STAT-Signalkaskade und eine Öffnung von TRPV1- und TRPA1-Kanälen (Cevikbas et al. 2014). Ein weiteres wichtiges Interleukin ist das thymische stromale Lymphopoietin (TSLP). Es wird von Keratinozyten sezerniert und über seine Rezeptoraktivierung werden TRPA1-Kanäle geöffnet (Wilson et al. 2013). Sowohl IL-31 als auch TSLP nehmen eine zentrale Rolle an der Entstehung von inflammatorisch bedingtem Pruritus bei atopischer Dermatitis ein (Nattkemper et al. 2016; Wilson et al. 2013).

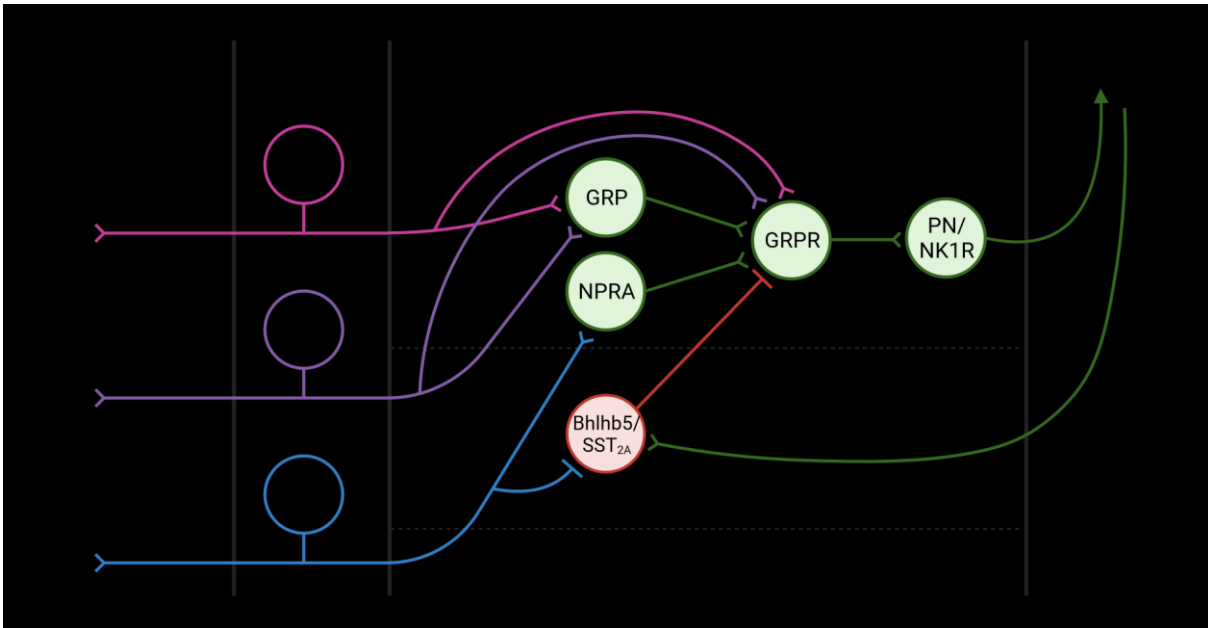
Die primär afferenten Neurone lassen sich, wie bereits in Kapitel 1.1.1.1 beschrieben, anhand ihres Expressionsprofils clustern. Insbesondere Populationen von C-Fasern können Juckreizstimuli vermitteln. Entsprechend der Einzelzell-RNA-Sequenzierungsstudien werden den drei nicht-peptideren C-Faserpopulationen NP1, NP2 und NP3 die Hauptfunktion als Pruritzeporen zugesprochen (Usoskin et al. 2015; Zeisel et al. 2018; Emery und Ernfors 2020). Neurone der NP1-Population zeichnen sich durch die Expression von MrgprD-Rezeptoren aus und NP2-Neurone exprimieren MrgprA3-Rezeptoren. Histamin-Rezeptoren werden sowohl von NP2- als auch NP3-Neuronen exprimiert, die größere Bedeutung im Histamin-abhängigen Pruritus haben aber wahrscheinlich die NP2-Neurone (Emery und Ernfors 2020). Neurone der NP3-Population scheinen vor allem in chronisch inflammatorischem Pruritus involviert zu sein und sind charakterisiert durch eine Expression von Serotonin-, PAR2- und IL-31-Rezeptoren, den Neurotransmittern Somatostatin (SST) sowie dem B-Typ natriuretischen Peptid (BNP, *natriuretic peptide B*, NPPB). Rezeptoren für IL-4 und -13 können auf allen Populationen detektiert werden (Misery et al. 2021). Eine Übersicht der Expressionsprofile von NP1 – NP3 ist in **Abbildung 3** dargestellt. Interessanterweise können gleiche Neuronenpopulationen in Abhängigkeit der Stimulusintensität unterschiedliche Empfindungen vermitteln. Demnach wird Pruritus durch eine Aktivierung von GPCRs und Schmerz durch die Stimulation von Ionenkanälen initiiert und über individuelle Signalwege im Rückenmark codiert (Sharif et al. 2020).



**Abbildung 3: Expressionsprofil von murinen Pruritzeporen (Usoskin et al. 2015)**

An der Transmission von chemischen Juckreizstimuli sind vor allem drei nicht-peptiderge Populationen von C-Faserneuronen beteiligt. Anhand ihres Expressionsprofils lassen sie sich in NP1 (Expression von MrgprD), NP2 (Expression von MrgprA3) und NP3 (Expression von NPPB, SST und IL-31R $\alpha$ ) clustern. Funktionell sind die Subpopulationen in verschiedene Arten von Pruritus involviert. Im Menschen wurde bisher nur eine juckreizleitende Population primär afferenter Neurone identifiziert (Tavares-Ferreira et al. 2022). Verändert nach (Misery et al. 2021). P2X3: Purinerge Rezeptor X3, Ret: Rezeptor-Tyrosinkinase, Mrgpr: Mas-related G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, HR: Histamin-Rezeptor, IL: Interleukin, 5-HT: 5-Hydroxytryptophan (Serotonin), PAR: Protease-aktivierter Rezeptor, TRP-Kanäle: Transiente Rezeptor-Potenzial-Kanäle, Na<sub>v</sub>-Kanäle: Spannungsabhängige Natriumkanäle

Eine Schlüsselkomponente in der Verarbeitung des Juckreizes im Rückenmark stellen exzitatorische Interneurone dar, die das *gastrin releasing peptide* (GRP) oder seinen Rezeptor (GRPR) exprimieren. Prurizeptoren terminieren in Lamina I und II des Dorsalhorns auf GRP-positive Interneurone (Misery et al. 2021; Chen und Sun 2020). Dabei setzen Neurone der NP3-Population exklusiv als Neurotransmitter NPPB frei (Solinski et al. 2019; Mishra und Hoon 2015). Interneurone der 2. Ordnung, die den NPPB-Rezeptor (NPRA) exprimieren, werden aktiviert und schütten GRP aus. Über GRPR-positive Neurone wird das Signal auf Projektionsneurone und weiter ins Gehirn geleitet. Möglicherweise können bestimmte Prurizeptoren auch direkt GRPR-positive Neurone über eine GRP-Freisetzung aktivieren (Sun und Chen 2007). Welche weiteren Neurotransmitter neben NPPB und GRP an der ersten Verschaltung der Juckreizweiterleitung beteiligt sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Es werden Substanz P, CGRP, Neuromedin B und Glutamat als Kotransmitter mit kompensatorischen oder synergistischen Effekten diskutiert (Akiyama et al. 2013; Akiyama et al. 2014; Rogoz et al. 2014; Sukhtankar und Ko 2013). Im Einklang mit der Gate-Control-Theorie können die GRPR-positiven Neurone durch Kratzen, Schmerz- und Kältereize mittels einer Stimulation von TRPV1- und TRPM8-positiven Nervenendigungen inhibiert werden (Palkar et al. 2018; Andersen et al. 2017). An diesem juckreizhemmenden Effekt des Schmerzes sind wahrscheinlich bestimmte inhibierende Interneurone beteiligt, die den Transkriptionsfaktor *basic helix-loop-helix member B5* (Bhlhb5) exprimieren und mit den Kälte- und Nozizeptoren verschaltet sind (Kardon et al. 2014). Über eine Freisetzung von Glycin, GABA und dem  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonisten Dynorphin A durch Bhlhb5-positive Interneurone werden GRPR-positive Neurone gehemmt (Foster et al. 2015; Kardon et al. 2014; Ross et al. 2010). Bhlhb5-positive Interneurone können wiederum durch das peripher von NP3-Neuronen freigesetzte Peptidhormon Somatostatin (SST) über den SST<sub>2A</sub>-Rezeptor (SST<sub>2AR</sub>) inhibiert werden, sodass der Juckreizstimulus verstärkt wird (Usoskin et al. 2015; Huang et al. 2018). Darüber hinaus üben descendierende Bahnen eine negative Kontrolle aus, indem sie z.B. durch die Freisetzung von Noradrenalin  $\alpha$ -Adrenorezeptoren auf Bhlhb5-positiven Neuronen aktivieren (Gotoh et al. 2011). Die wichtigsten spinalen Signalwege der Juckreizverarbeitung sind in **Abbildung 4** vereinfacht zusammengefasst.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der spinalen Juckreizsignalwege basierend auf dem derzeitigen Wissensstand**

Aktiviert durch einen chemischen Juckreizstimulus in der Peripherie leiten die Pruritozeptoren NP1, NP2 und NP3 das Signal auf GRP-positive Interneurone ins Rückenmark. Dabei nutzen NP3-Neurone als Neurotransmitter NPPB. Welche weiteren Transmitter involviert sind, ist nicht vollständig geklärt. Über die Freisetzung von GRP aktivieren Neurone der 2. Ordnung GRPR-positive Neurone der 3. Ordnung, die wiederum das Signal auf Projektionsneurone und weiter ins Gehirn leiten. GRPR-positive Neurone unterstehen der negativen Kontrolle von Bhlhb5-positiven Neuronen, die Dynorphin A, GABA und Glycin ausschütten. Durch NP3-Neurone freigesetztes SST inhibiert Bhlhb5-positive Neurone und verstärkt den Juckreizstimulus. Verändert nach (Dong und Dong 2018). Grüne Interneurone: exzitatorisch, Rote Interneurone: inhibitorisch. GRP: Gastrin Releasing Peptid, GRPR: Gastrin Releasing Peptid-Rezeptor, NPPB: B-Typ natriuretisches Peptid, NPRA: Natriuretischer Peptidrezeptor Typ A, SST: Stomatostatin, Bhlhb5: *Basic helix-loop-helix b5*, DYN: Dynorphin, GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure, Glu: Glutamat, PN: Projektionsneuron, NK1R: Neurokinin 1-Rezeptor, NOR: Noradrenalin

Die Phänomene der Alloknese, bei der normalerweise nicht-pruritogene Stimuli einen Juckreiz induzieren, und der Hyperknese, eine verstärkte Reaktion auf einen pruritogenen Stimulus, deuten auf Prozesse der Sensibilisierung hin (van Laarhoven et al. 2019). So lässt sich erklären, dass chronischer Pruritus nach seiner Manifestation über mehrere Wochen nicht mehr direkt an den initialen Juckreizauslöser gekoppelt sein muss. Die zugrundeliegenden Mechanismen weisen viele Parallelen zur Schmerzsensibilisierung auf. Peripher entsteht eine erhöhte Erregbarkeit der Prurizeptoren durch Veränderungen im Expressionsprofil der Rezeptoren (wie Mrgprs, PARs, TRP-Kanäle) und deren Ansprechen auf ihre Mediatoren (Han und Dong 2014). Auf spinaler Ebene kann es zur Dysregulation der inhibitorischen Verschaltung über eine reduzierte Freisetzung von Dynorphin A aus Bhlhb5-positiven Neuronen kommen (Kardon et al. 2014). Spontan auftretender mechanischer Juckreiz wird mit dem Kontrollverlust von exzitatorischen Urocortin 3-positiven Neuronen durch das Neuropeptid Y (NPY) assoziiert (Pan et al. 2019).

### 1.2.2 Therapeutische Optionen

Eine allgemeingültige Therapie des chronischen Pruritus existiert auf Grund der Verschiedenartigkeit der Ursachen, der unterschiedlichen Signalwege und der variablen Patientenkollektive nicht. Die Leitlinie spricht überwiegend Empfehlungen auf Basis von Einzelfallstudien oder -serien aus und viele Therapien bewegen sich im Off-Label-Gebrauch, da kontrollierte klinische Studien bislang selten sind (Misery und Ständer 2016). Ziel sollte sowohl die symptomatische Linderung der Juckempfindung, als auch die Behandlung der zugrundeliegenden Erkrankungen sein. Da jedoch eine ursächliche Therapie nicht immer möglich oder erfolgreich ist und selten zum Abklingen des chronischen Pruritus führt, sollte die symptomatische Therapie zeitnah und individuell nach der Schwere und Ausprägung des Pruritus, der Pathogenese der zugrundeliegenden Erkrankung, dem Patientenalter und der Ko-Medikation ausgerichtet werden (Ständer et al. 2022).

In der topischen Therapie hat bereits die wirkstofffreie Basistherapie mit Emollientien einen hohen Stellenwert, denn die Hydratisierung und Stabilisierung der physiologischen Hautbarriere kann den mit trockener Haut assoziierten Pruritus effizient lindern (Izumi et al. 2017; Tournalaki et al. 2020). Ähnlich zur Therapie von neuropathischen Schmerzen und Dysästhesien kann ein Juckreiz kurzzeitig mit topischen Lokalanästhetika behandelt werden (Leslie et al. 2015). Für größere Hautareale werden 2 – 10 % Polidocanol empfohlen (Staubach und Metz 2013). Auch der Einsatz von Capsaicincreme, bei der sich eine Konzentration von 0,025 % als gut verträglich erwiesen hat (Misery et al. 2021), oder 8 %ige Pflaster können in Erwägung gezogen werden (Misery et al. 2015). Insbesondere bei atopischer Dermatitis und Psoriasis ist die juckreizlindernde Wirkung einer UV-Phototherapie gut belegt. Durch die Beeinflussung der Freisetzung pruritogener Mediatoren und der veränderten Expression bestimmter Rezeptoren (Narbutt et al. 2013) werden die Funktionen von Prurizeptoren moduliert (Legat 2019). Eine indirekte antipruritische Wirkung kann durch topisch applizierte, entzündungshemmende Glucocorticoide und Calcineurininhibitoren bei inflammatorischen Kratzläsionen, Dermatosen und atopischen Ekzemen erzielt werden (Wollenberg et al. 2018).

Die in der systemischen Therapie immer noch am meisten verwendeten Antihistaminika sind nur bei Histamin-vermitteltem Pruritus z.B. im Zusammenhang mit einer Urtikaria oder atopischen Ekzemen moderat wirksam (Zuberbier et al. 2018). Da jedoch die Mehrheit aller chronischen Juckreizzustände über nicht-histaminerge Signalwege verlaufen, bedarf es alternative Therapieansätze. Hier sind besonders Biologika wie Nemolizumab (monoklonaler Antikörper gegen IL-31-Rezeptoren) oder Dupilumab (monoklonaler Antikörper IL-4- und IL-13-Rezeptoren)

vielversprechend, die zielgerichtet bestimmte Zytokin-Signalwege unterbrechen und bei atopischer Dermatitis bereits off-label genutzt werden (Ständer et al. 2022; Ständer et al. 2020).

In Diskussion stehen darüber hinaus die für neuropathische Schmerzen zugelassenen Gabapentinoide, die über eine Dämpfung der neuronalen Erregbarkeit laut Einzelfallberichten besonders bei neuropathischem oder nephrogenem Pruritus Therapieerfolge erzielen konnten (Gunal et al. 2004; Solak et al. 2012; Matsuda et al. 2016). Ebenfalls im Off-Label Gebrauch können Serotonin-Wiederaufnahmehemmer und die Antidepressiva Mirtazapin und Doxepin empfohlen werden (Ständer et al. 2022). Als häufige unerwünschte Nebenwirkung von  $\mu$ -Opioidrezeptor-Agonisten in der Schmerztherapie entsteht Pruritus durch eine Unterdrückung von inhibitorischen Effekte der Nozizeptoren auf die Prurizeptoren. Diesem Mechanismus können die  $\mu$ -Opioidrezeptor-Antagonisten Naltrexon und Naloxon zentralnervös entgegenwirken, allerdings sind auch die zu erwartenden Nebenwirkungen wie Müdigkeit, Schwindel, Übelkeit und Erbrechen zu berücksichtigen (Phan et al. 2010). Die erste zugelassene Therapieoption für dialysepflichtige Patienten mit mäßigem bis schwerem nephrogenen Pruritus ist der peripher wirksame  $\kappa$ -Opioidrezeptor-Agonist Difelikefalin. Seine antipruritische Wirksamkeit wird über die Aktivierung von  $\kappa$ -Opioidrezeptoren auf peripheren Neuronen und Immunzellen vermittelt und durch die geringe Passage der Blut-Hirnschranke sind zentralnervöse Nebenwirkungen selten (Shram et al. 2022; Fishbane et al. 2020). Die erforderliche intravenöse Applikation kann jedoch nicht vom Patienten eigenständig angewendet werden und das in die Zulassung eingeschlossene Patientenkollektiv umfasst nur einen Bruchteil der an chronischem Pruritus leidenden Patienten. In den letzten Jahren hat die unzureichende Therapie des chronischen Pruritus immer mehr Aufmerksamkeit bekommen. So entsteht durch die voranschreitende Aufklärung der Pathogenese und Signalwege eine große Vielfalt an potentiellen Ansätzen, die aktuell untersucht werden. Dazu gehören Antikörper und Immunsuppressiva, die spezifisch in die Interleukin-Kaskaden eingreifen (IL-31, TSLP, IL-4/13), Antagonisten von Neurokinin-1-Rezeptoren und der MrgpR-Familie aber auch Downstream-Targets wie TRP- oder Nav-Kanäle stehen im Focus (Misery et al. 2021). Diese positive Entwicklung lässt in naher Zukunft auf möglichst effektive, sichere und vorzugsweise oral oder topisch anzuwendende Therapieoptionen zur Linderung des chronischen Pruritus hoffen.

## 1.3 Kaliumkanäle im somatosensorischen System

Für die Entwicklung neuer Therapiestrategien ist das Verständnis über molekulare und zelluläre Mechanismen, welche zur Entstehung und Aufrechterhaltung von neuropathischem Schmerz bzw. pathologischem Juckreiz beitragen, essentiell. Es ist hinreichend bekannt, dass die Transmission und Verarbeitung von Schmerz- und Juckreizstimuli durch die Aktivität von Ionenkanälen reguliert wird (Waxman und Zamponi 2014). So werden zum Beispiel die erhöhte neuronale Erregbarkeit und das spontane Entladen, welche charakteristische Merkmale verschiedener neuropathischer Schmerzzustände sind, durch gemeinsame Veränderungen in der Expression und Funktionalität von Ionenkanälen in primär afferenten Neuronen hervorgerufen. Besonders stark involviert scheinen hier spannungsabhängige Calciumkanäle ( $Cav$ ), spannungsabhängige Natriumkanäle ( $Nav$ ) und die Hyperpolarisations-aktivierten Kationenkanäle (*hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels*, HCN) zu sein (Tibbs et al. 2016).

Kaliumkanäle stellen mit ca. 80 Genen im Menschen die größte Klasse von Ionenkanälen dar und zeichnen sich durch ihre hohe Diversität und ein breites Expressionsmuster aus (Ocaña et al. 2004; Tsantoulas und McMahon 2014). Sie sind die einzigen Kationenkanäle, dessen Gleichgewichtspotential in der Nähe des Membranpotentials liegt. Mit dieser Eigenschaft kontrollieren sie essentiell das zelluläre Membranpotential und damit die Erregbarkeit von Zellen. Außerdem sind sie an der Regulation der Transmitterfreisetzung an den terminalen Endigungen beteiligt (Tsantoulas und McMahon 2014; Kuang et al. 2015; Salkoff et al. 2006). Dass die Öffnung von Kaliumkanälen die Aktivität somatosensorischer Neurone reduziert, lässt sie selbst zu interessanten Zielstrukturen werden. Daher wurden über die letzten Jahre immer mehr direkte Kaliumkanalöffner in Modellen für akuten und chronischen Schmerz getestet (Ocaña et al. 2004).

### 1.3.1 Membrantopologie und Klassifizierung

Wie alle Ionenkanäle sind Kaliumkanäle integrale Membranproteine, die den transmembranären Transport von Kaliumionen durch die Lipiddoppelschicht ermöglichen. Strukturell lassen sie sich in zwei Bereiche unterteilen: die porenformende  $\alpha$ -Untereinheit und die regulatorische  $\beta$ -Untereinheit, welche unterschiedliche Stimuli wahrnimmt und die Kanalaktivität moduliert. Die Topologie der  $\beta$ -Untereinheit variiert stark zwischen den einzelnen Kanälen. Die  $\alpha$ -Untereinheit besteht aus mehreren Peptidhelices (Transmembrandomänen) und einer porenformenden Domäne (P-Schleife). Erst durch das Zusammenlagern mehrerer Untereinheiten (als Dimere oder Tetramere) entsteht ein vollständiger Kanal mit funktionsfähiger Pore. Die in allen Kaliumkanälen hochkonservierte Porenregion beinhaltet den Selektivitätsfilter. Er beschreibt die engste Stelle auf der extrazellulären Seite der Pore und wird durch eine bestimmte Aminosäuresequenz bestehend



aus Glycin-Tyrosin-Glycin-Bausteinen gebildet. Die resultierenden Carbonylsauerstoffe des Polypeptid-Rückgrats können die Hydrathülle von Kaliumionen perfekt ersetzen, sodass die Bindungsenergie größer ist als die Dehydratationsenergie. Dieses Phänomen erklärt die selektive Permeabilität für  $K^+$ , obwohl ihr Radius größer ist als der von  $Na^+$  und  $Li^+$ . Die Dehydratation kleinerer Ionen wäre energetisch ungünstiger (Kuang et al. 2015).

Anhand des strukturellen Aufbaus und der funktionellen Eigenschaften können Kaliumkanäle in vier Familien unterschieden werden. Diese umfassen die spannungsgesteuerten ( $K_V$ ), 2-Poren-Domänen ( $K_{2P}$ ), einwärts gleichrichtenden ( $K_{ir}$ ) und calciumaktivierten Kaliumkanäle ( $K_{Ca}$ ) (Waxman und Zamponi 2014; Tsantoulas und McMahon 2014; Ocaña et al. 2004).

Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle setzen sich aus sechs Transmembrandomänen (S1-S6) zusammen und bilden die größte Gruppe mit knapp 40 Genen im Menschen. Sie umfassen zwölf Familien und ihre  $\alpha$ -Untereinheit kann sowohl Homo- als auch Heterotetramere bilden. Diese Heteromultimerisierung, aber auch die unterschiedlichen Kombinationen mit  $\beta$ -Untereinheiten, Slice-Varianten und posttranslationalen Modifikationen erklärt ihre besondere Vielfältigkeit (González et al. 2012). Die Sensitivität gegenüber Spannungsänderungen wird, wie bei allen spannungsgesteuerten Kanälen, über den Spannungssensor (S1-S4) gewährleistet. In jeder dritten Position der Aminosäuresequenz des S4-Segments finden sich hier Arginin- oder Lysinreste, die bei einem physiologischen pH-Wert eine positive Nettoladung tragen. Ihre Bewegung entlang des elektrischen Feldes führt zu Konformationsänderungen in der angrenzenden porenbildenden Domäne (S5-S6 verbunden über die P-Schleife) und schlussendlich zur Öffnung des Kanals. Dabei wird der Wechsel aus geschlossenem, offenem und inaktiviertem Zustand spannungsgesteuerter Kanäle als „Gating“ bezeichnet (Kuang et al. 2015; Ocaña et al. 2004; González et al. 2012). Die meisten  $K_V$ -Kanäle zeichnen sich durch eine langsame Aktivierung aus und wirken der Depolarisation entgegen, indem sie den Schwellenwert, die Dauer und die Frequenz von Aktionspotentialen regulieren (Tsantoulas und McMahon 2014; Busserolles et al. 2016). Die umfangreiche Downregulation von  $K_V$ -Kanälen in Folge einer peripheren Axotomie ist hinreichend bekannt (Tsantoulas und McMahon 2014) und wird mit einer neuronalen Übererregbarkeit assoziiert (Waxman und Zamponi 2014; Colloca et al. 2017). Dass für den  $K_V7$ -Aktivator Retigabin eine analgetische Wirkung in neuropathischen Schmerzmodellen *in vivo* gezeigt werden konnte, ließ die  $K_V$ -Kanäle bereits als potentiell Zielstrukturen in der Schmerztherapie erscheinen (Dost et al. 2004; Blackburn-Munro und Jensen 2003; Abd-Elseyed et al. 2019).

Die 2-Poren-Domänen Kaliumkanäle bestehen aus einer großen Familie mit 15 Mitgliedern und sechs Subgruppen, welche sich durch ihre unterschiedlichen Aktivierungsmechanismen charakterisieren lassen. So spielen z.B. die mechano- und thermosensitiven TREK und TRAAK Kanäle

eine wichtige Rolle in der nozizeptiven Wahrnehmung. Gemein ist allen Mitgliedern ihre einzigartige Topologie, da sie Dimere mit je vier Transmembrandomänen und zwei porenformenden Domänen P1 und P2 bilden (Miller und Long 2012; González et al. 2012). Ihre Hauptfunktion besteht in der Generierung von hyperpolarisierenden Leckströmen, um Zellmembranen unterhalb des Schwellenpotentials zu stabilisieren und die Erregbarkeit von vielen neuronalen und nicht-neuronalen Zellen zu bestimmen (Busserolles et al. 2016; Tsantoulas und McMahon 2014).

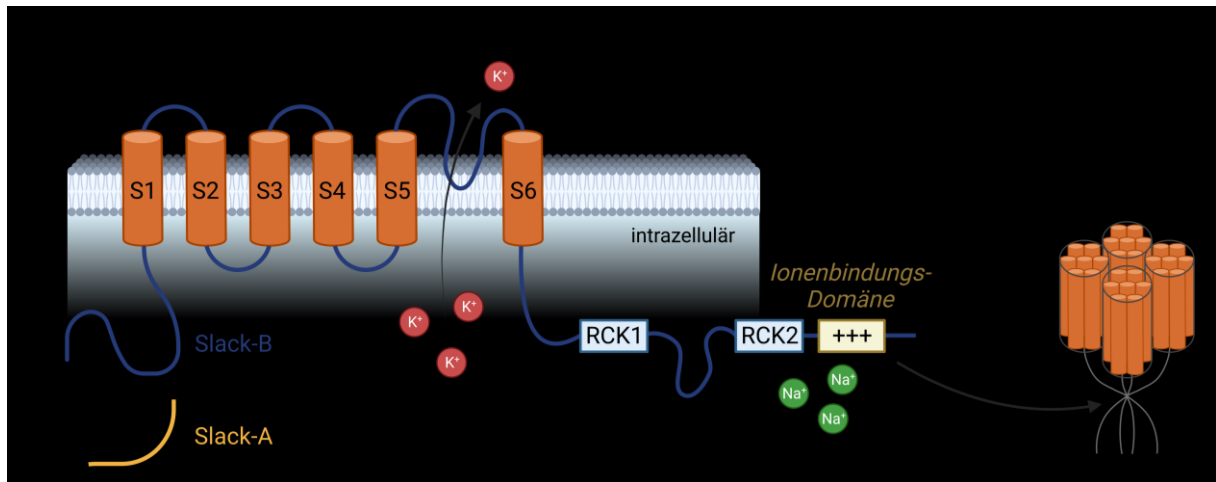
Abhängig vom Typ und der Lokalisation erfüllen die Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanäle diverse physiologische Funktionen und werden von verschiedenen Mediatoren wie Ionen, Phospholipiden (insbesondere Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate (PIP<sub>2</sub>)) und Signalmolekülen moduliert (Tucker und Baukowitz 2008; González et al. 2012). Eine hohe Expression der Kanäle findet sich vor allem in Gliazellen. Mit nur zwei Transmembrandomänen sind K<sub>ir</sub>-Kanäle durch einen einfachen Aufbau charakterisiert. Anhand ihrer Leitfähigkeiten und Eigenschaften werden sie in die sieben Subfamilien K<sub>ir</sub>1.x – K<sub>ir</sub>7.x untergliedert. Besonders ist ihre Aktivierungskinetik: Während der Depolarisation werden die Kanäle durch intrazelluläre Mg<sup>2+</sup> und Polyamine blockiert, erst bei einer Hyperpolarisation der Zelle werden die Blocker freigesetzt. Die offenen Kanäle vermitteln dann untypische, einwärts gerichtete K<sup>+</sup>-Ströme und tragen damit zur Stabilisierung des Ruhemembranpotentials bei (Tsantoulas und McMahon 2014; Hibino et al. 2010).

Die Familie der calciumaktivierten Kaliumkanäle umfasst acht Mitglieder und kann anhand ihrer Ionenleitfähigkeit und Aktivierungsmechanismen in drei Gruppen unterteilt werden. Dabei ist das zytoplasmatische C-terminale Ende aller Vertreter im Vergleich zu den K<sub>v</sub>-Kanälen besonders groß und beinhaltet zwei regulatorische Domänen (*regulator of K<sup>+</sup>-conductance*, RCK-Domäne). Darüber können Konzentrationsänderungen von intrazellulären Ionen und anderen Signalmolekülen direkt wahrgenommen und das Kanal gating beeinflusst werden. Die erste Gruppe umfasst die ubiquitär vorkommenden K<sub>Ca</sub>1.1-Kanäle (Slo1, Maxi K) sowie K<sub>Ca</sub>5.1-Kanäle (Slo3), welche ausschließlich in Samenzellen exprimiert werden. Sie benötigen sowohl eine Membrandepolarisation als auch intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> zur Aktivierung und zeichnen sich durch eine hohe Leitfähigkeit von über 200 pS aus (*big K<sup>+</sup> channels*, BK-Kanäle). Interessanterweise setzen sie sich im Gegensatz zu den anderen zwei Gruppen nicht aus sechs, sondern sieben Transmembrandomänen zusammen. Die zusätzliche S0-Domäne ist der S1-Domäne vorhergehend, sodass sich der N-Terminus extrazellulär befindet. Zu der zweiten Gruppe gehören Kanäle mit einer geringen (*small K<sup>+</sup> channels*, SK: K<sub>Ca</sub>2.1, K<sub>Ca</sub>2.2 und K<sub>Ca</sub>2.3), sowie mittleren Leitfähigkeit (*intermediate K<sup>+</sup> channels*, IK: K<sub>Ca</sub>3.1). Ihre S4-Domäne ist weniger positiv geladen und diese Kanäle zeigen im Gegensatz zu allen anderen aus der Familie keine Spannungsabhängigkeit. Die Aktivierung durch Ca<sup>2+</sup> wird über die Bindung an Calmodulin vermittelt, mit welchem SK und IK Komplexe bilden. Die letzte Gruppe umfasst zwei Kanäle, die

aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu  $K_{Ca}1.1$  der Familie der  $K_{Ca}$ -Kanäle zugeordnet wurden, allerdings vielmehr durch intrazelluläre Konzentrationsänderungen von  $Na^+$  und  $Cl^-$  aktiviert werden. Die ursprünglich als  $K_{Ca}4.1$  und  $K_{Ca}4.2$  bezeichneten Kanäle werden nach neuer Nomenklatur als  $K_{Na}1.1$  (KCNT1, Slo2.2, Slack) und  $K_{Na}1.2$  (KCNT2, Slo2.1, Slick) benannt. Funktionell nehmen die  $K_{Ca}$ -Kanäle eine Schlüsselrolle in der Nachhyperpolarisation ein, welche in vielen Neuronen auf ein Aktionspotential folgt und der Kontrolle neuronaler Erregung sowie Feuerungsfrequenzen dient. Durch die Öffnung der  $K_{Ca}$ -Kanäle während einer Depolarisation in Folge eines intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Anstiegs hyperpolarisiert die Membran. Dieser Rückkopplungsmechanismus hemmt den weiteren  $Ca^{2+}$ -Einstrom und reguliert die synaptische Transmission (Kaczmarek et al. 2017; Ocaña et al. 2004; Faber und Sah 2003; González et al. 2012; Waxman und Zamponi 2014).

### 1.3.2 Der Natrium-abhängige Kaliumkanal Slack

In den 1980er Jahren wurden erstmals in Kardiomyozyten bestimmte Kaliumkanäle beschrieben, die durch hohe intrazelluläre Level von Natriumionen aktiviert werden und der Slo-Familie angehören (González et al. 2012; Kameyama et al. 1984). Aufgrund der Analogie zur Porendomäne von  $K_{Ca}1.1$ -Kanälen wurde der Slack-Kanal ( $K_{Na}1.1$ ) als „*Sequence like a calcium-activated  $K^+$  channel*“ bezeichnet, obwohl die tatsächliche Homologie beider Kanäle zueinander nur 7 % beträgt. Das Akronym des eng verwandten Slick-Kanals ( $K_{Na}1.2$ ) steht für „*Sequence like an intermediate conductance  $K^+$  channel*“. Bei einer identischen Proteinstruktur zwischen Slack und Slick von 74 % finden sich die größten Abweichungen im distalen C-Terminus (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005). Die vollständige Struktur von Slack in seinen verschiedenen Konformationen konnte mittels Kryoelektronenmikroskopie bestimmt werden (Hite et al. 2015; Hite und MacKinnon 2017). Mit einer Länge von 1237 Aminosäuren ist die  $\alpha$ -Untereinheit deutlich größer als die von  $K_V$ -Kanälen und die zwei RCK-Domänen scheinen annähernd denen der  $K_{Ca}1.1$ -Kanäle zu entsprechen (Kaczmarek 2013; Yuan et al. 2003). Ähnlich wie in  $K_{ir}3$ -Kanälen wurde eine bestimmte Region in der Nähe der RCK2-Domäne als  $Na^+$ -Bindestelle identifiziert (Zhang et al. 2010). Die Sensitivität gegenüber  $Cl^-$  ist stärker ausgeprägt in Slick-Kanälen, als potentielle Bindestelle im Slack-Kanal konnte ein Bereich innerhalb der RCK1-Domäne festgestellt werden (González et al. 2012; Kaczmarek 2013; Xu et al. 2023). Interessanterweise werden beide  $K_{Na}$ -Kanäle durch bivalente Kationen in ihrer Aktivität allosterisch gehemmt. Dabei sind  $Zn^{2+}$  am stärksten und  $Mg^{2+}$  am wenigsten effektiv (Budelli et al. 2016). Alternatives RNA-Splicing und posttranslationale Modifikationen führen zur Entstehung verschiedener Slack-Isoformen. Sie unterscheiden sich vor allem in ihren N-Termini und erhöhen die funktionale Heterogenität weiter (Brown et al. 2008; Joiner et al. 1998). In **Abbildung 5** ist die Topologie des Slack-Kanals schematisch dargestellt.



**Abbildung 5: Schematischer Aufbau der  $\alpha$ -Untereinheit des Slack-Kanals**

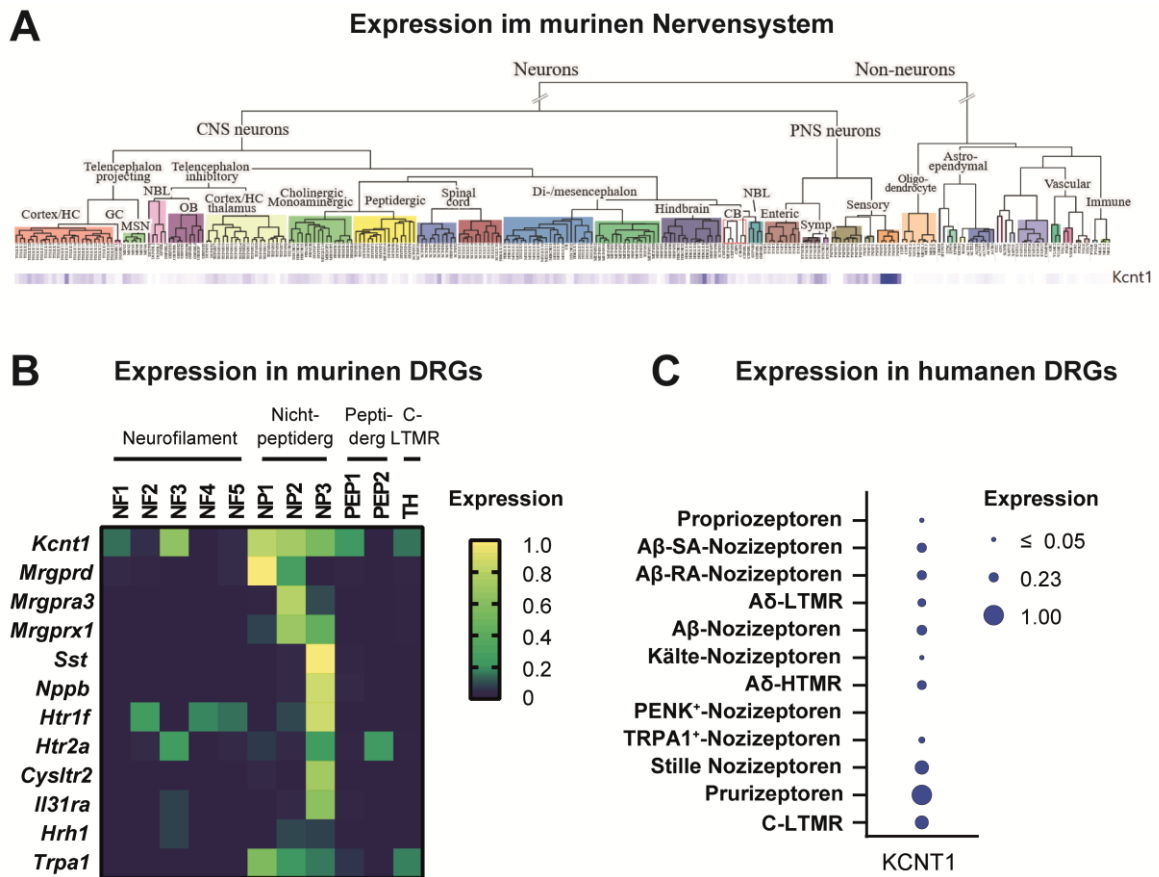
Die sechs Transmembrandomänen S1-S6 (orange dargestellt) der  $\alpha$ -Untereinheit lagern sich als Tetramere zu einem funktionsfähigen Slack-Kanal zusammen. Zwischen S5 und S6 befindet sich die P-Schleife und die Porenregion. Die zwei Isoformen Slack-A und Slack-B unterscheiden sich durch ihr N-terminales Ende, beiden gemeinsam ist der lange zytosolische C-Terminus mit zwei regulatorischen Domänen (RCK). Die  $\text{Na}^+$ -Bindestelle wird in der Nähe der RCK2 vermutet. Verändert nach Bhattacharjee und Kaczmarek 2005; Salkoff et al. 2006.

Seine niedrige intrinsische Spannungsabhängigkeit erlaubt eine Kanalöffnung in großen Spannungsbereichen (Kaczmarek et al. 2017; Bhattacharjee und Kaczmarek 2005). Als Reaktion auf eine Depolarisation zeigen Slack-Kanäle typischerweise einen unmittelbaren sowie einen zeitverzögerten Stromanstieg. Unter konstanten  $\text{K}^+$ -Spiegeln konnte ein  $\text{EC}_{50}$ -Wert für  $\text{Na}^+$  von 41 mM mit einer Leitfähigkeit von ca. 180 pS ermittelt werden (Yuan et al. 2003; Bhattacharjee et al. 2003), was weit über der normalen zytoplasmatischen Konzentration liegt. In ruhenden Neuronen betragen die  $\text{Na}^+$ -Spiegel nur etwa 4 – 15 mM (Rose 2002). Erst nach einer Stimulation kommt es zum  $\text{Na}^+$ -Einstrom durch  $\text{Na}_V$ -Kanäle oder den ionotropen Glutamatrezeptoren NMDA bzw. AMPA. Insbesondere während starken neuronalen Entladungen akkumulieren  $\text{Na}^+$ , sodass die intrazelluläre Konzentration kurzzeitig auf 45 – 100 mM ansteigen kann. Weil derart hohe Spiegel ebenfalls während hypoxischen Zuständen auf Grund des Ausfallens von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen erreicht werden können, leisten  $\text{K}_{\text{Na}}$ -Kanäle hier möglicherweise eine protektive Funktion (Bhattacharjee und Kaczmarek 2005; Yuan et al. 2003; Kameyama et al. 1984). Dass Slack-Kanäle außerhalb dieser pathologischen Zustände auch eine wichtige physiologische Rolle einnehmen, zeigen die vielfältigen zellulären Regulationsmechanismen, denen sie unterliegen. So wird eine positive allosterische Modulation durch  $\text{NAD}^+$  innerhalb der RCK2-Domäne vermutet, da sich die  $\text{Na}^+$ -Sensitivität in Anwesenheit des Coenzym in Konzentrationsbereiche verschiebt, die für Neurone normal sind (Tamsett et al. 2009). Darüber hinaus führt die Phosphorylierung eines Serin-Rests (S407) zwischen S6 und der RCK1-Domäne durch die Proteinkinase C (PKC) zu einer gesteigerten Stromamplitude (Santi et al. 2006; Barcia et al. 2012). Demgegenüber phosphoryliert die Proteinkinase A (PKA) nicht direkt den Kanal, sondern induziert seine Internalisierung über die Clathrin-vermittelte Endozytose

mittels des Adapterkomplex 2 (AP2), welcher mit dem Slack C-Terminus interagiert (Gururaj et al. 2017; Nuwer et al. 2009, 2010). Eine Reihe weiterer Modulatoren, die das Ausmaß der Membranexpression und damit die Funktionalität von Slack regulieren, konnten in den letzten Jahren identifiziert werden. Dazu gehören der calciumaktivierte Chloridionenkanal TMEM16C (Huang et al. 2013), die Membran-assoziierte Guanylatzyklase Magi-1 (Pryce et al. 2019) und die p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) (Gururaj et al. 2016). Die Interaktion mit dem RNA-bindenden *fragile X mental retardation protein* (FMRP) resultiert ebenfalls in einer gesteigerten Slack-Aktivität und liefert Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen neuronaler Erregbarkeit und Veränderungen in der Proteintranslation (Brown et al. 2010).

### 1.3.2.1 Expression im sensorischen System

Die Expression von Slack in Nagetieren ist gut charakterisiert und zeigt eine weite Verbreitung im zentralen sowie peripheren Nervensystem sowie in einigen nicht-neuronalen Geweben. Im Gehirn konnten besonders hohe Proteinlevel im Bulbus olfactorius, im Mesencephalon und im Hirnstamm identifiziert werden (Bhattacharjee et al. 2002; Zeisel et al. 2018). In der Peripherie werden Slack-Kanäle überwiegend in den nicht-peptidergen Nervenfasern von kleinem bis mittlerem Durchmesser exprimiert. In 93,2 % muriner IB4-positiver Neurone konnte eine Slack-Expression festgestellt werden, dagegen waren nur 12,6 % der Slack-positiven Zellen positiv für CGRP (Marker für peptiderge Nervenfasern). Im Rückenmark zeigt sich die höchste Expression in den oberflächlichen Bereichen des Dorsalhorns (Lu et al. 2015). Neueste Einzelzell-RNA-Sequenzierungsstudien der letzten Jahre konnten das Expressionsmuster weiter differenzieren. Interessanterweise wird Slack besonders hoch in den juckreizvermittelnden Neuronenpopulationen NP1, NP2 und NP3 exprimiert (Uosokin et al. 2015; Sharma et al. 2020). Auch in nichtmenschlichen Primaten (Kupari et al. 2021) und im Menschen (Tavares-Ferreira et al. 2022; Nguyen et al. 2021) wurde die stärkste Expression in peripheren Nervenfasern festgestellt, die sich gleichzeitig durch eine hohe Expression von Pruritogen-Rezeptoren auszeichnen (siehe **Abbildung 6**). Außerhalb des peripheren Nervensystems wird Slack im Menschen hoch exprimiert in bestimmten Gehirnregionen (Großhirnrinde, Amygdala, Basalganglien) sowie in Skelettmuskeln und der Milz (Uhlén et al. 2015).



**Abbildung 6: Expressionsmuster von KCNT1 (Slack) in verschiedenen Einzelzell-RNA-Sequenzierungsstudien**

(A) Expressionsmuster von KCNT1 im Nervensystem der Maus (6 – 8 Wochen alt) (Zeisel et al. 2018). Runtergeladen von <http://mousebrain.org/adolescent/genesearch.html>. (B) Expressionsmuster von KCNT1 mit verschiedenen Juckreiz-Rezeptoren in murinen DRG-Neuronen (6 – 8 Wochen alt) (Usoskin et al. 2015). (C) Expressionsmuster in humanen DRG-Neuronen (24 – 65 Jahre alt) (Tavares-Ferreira et al. 2022).

### 1.3.2.2 Rolle in der Schmerz- und Juckreizverarbeitung

Eine Reihe tierexperimenteller Verhaltensversuche lässt darauf schließen, dass Slack eine wichtige Rolle in der Verarbeitung von Schmerzsignalen einnimmt. So zeigen globale *Slack*<sup>-/-</sup>-Mäuse eine erhöhte Überempfindlichkeit gegenüber verschiedenen schmerzauslösenden Reizen (Tamsett et al. 2009; Nuwer et al. 2010; Huang et al. 2013; Lu et al. 2015; Martinez-Espinosa et al. 2015). Slack scheint dabei besonders die mechanische und thermische Schmerzschwelle zu modulieren (Evely et al. 2017; Lu et al. 2015). In neuropathischen Schmerzmodellen führt neben einem globalen Slack-Knockout auch die Deletion begrenzt auf das periphere Nervensystem zu einem erhöhten mechanischen Schmerzverhalten. Die hohe Kolo­kalisierung mit dem ATP-sensitiven P2X3-Rezeptor sowie dem transienten Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie A (TRPA1) deutet auf die Beteiligung in zwei weitere Regulationsmechanismen der nozizeptiven Verarbeitung hin. Dabei wird eine bidirektionale Kanalmodulation durch die P2X3-Aktivierung postuliert (Lu et al. 2021) und eine antinozizeptive Rolle für Slack während der TRPA1-Stimulation angenommen (Zhou et al. 2022). Neben dem erhöhten Schmerzverhalten wurde bei *Slack*<sup>-/-</sup>-Mäusen ebenfalls ein gesteigertes

Juckreizverhalten nach Stimulation mit den Pruritogenen Chloroquin sowie Histamin festgestellt (Martinez-Espinosa et al. 2015). Diese Erkenntnisse im Zusammenhang mit der hohen Slack-Expression in den juckreizvermittelnden Nervenfasern lassen seine Schlüsselrolle als Modulator in der Juckreizverarbeitung annehmen. Aktuelle tierexperimentelle Ergebnisse der Arbeitsgruppe Prof. Achim Schmidtko (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt) zeigen, dass Slack insbesondere an der Verarbeitung von nicht-histaminergen Juckreizstimuli beteiligt ist.

Aller Wahrscheinlichkeit nach kann das erhöhte Schmerz- und Juckreizverhalten in Abwesenheit von Slack durch die gesteigerte neuronale Erregbarkeit der Spinalganglien erklärt werden. In Patch-Clamp Versuchen zeigen DRG-Neurone mit einem Slack-Knockout eine signifikant erhöhte neuronale Erregbarkeit und die Tendenz zum Feuern (Lu et al. 2015; Nuwer et al. 2010; Martinez-Espinosa et al. 2015). Damit einhergehend ist das Ausmaß der Slack-vermittelten Ströme in wildtypischen Mäusen nach einer peripheren Nervenverletzung signifikant reduziert (Lu et al. 2015). Bei der ersten Signalverschaltung in oberflächlichen Bereichen des Dorsalhorns im Rückenmark ist Slack außerdem in die synaptische Transmission involviert. In Interneuronen der Lamina II, die glutamaterge Inputs von primär afferenten DRG-Neuronen erhalten, sind die spontanen exzitatorischen postsynaptischen Potentiale (EPSP) in Abwesenheit von Slack erhöht. Dabei ist der zugrunde liegende Mechanismus noch weitestgehend ungeklärt (Evely et al. 2017).

### **1.3.2.3 Rolle in der Epilepsie**

Mutationen des humanen KCNT1-Gens sind mit schweren frühkindlichen Epilepsieformen assoziiert, die sich häufig durch eine Therapieresistenz auszeichnen (Kim und Kaczmarek 2014; Gao et al. 2022). Hierzu zählen die maligne migrierende Säuglingsepilepsie (Barcia et al. 2012) sowie die nächtliche Frontallappenepilepsie, welche durch motorische Anfälle während des Schlafs charakterisiert wird (Heron et al. 2012). Weiterhin wurden die seltener auftretenden Ohtahara- (Martin et al. 2014), West- (Ohba et al. 2015) und Lennox-Gastaut-Syndrome (Jia et al. 2019) mit Mutationen im Slack-Kanal in Verbindung gebracht. Darüber hinaus können Patienten unter massiven geistigen oder psychischen Behinderungen, Entwicklungsstörungen und Autismus leiden (Lim et al. 2016). Die meist de-novo auftretenden Missense-Mutationen führen zum Austausch einer Aminosäure im C-Terminus und resultieren in einer Überfunktion des Kanals (*Gain-of-Function*, GoF-Mutation). Durch Veränderungen in der Spannungsabhängigkeit und/oder Na<sup>+</sup>-Sensitivität erhöht sich seine Öffnungswahrscheinlichkeit (Kim und Kaczmarek 2014; Tang et al. 2016). Wie diese verstärkte Slack-Aktivität paradoxerweise prokonvulsive Zustände mit erhöhter neuronaler Erregbarkeit induziert, ist noch nicht ausreichend verstanden, es existieren jedoch

verschiedene Hypothesen. So konnte gezeigt werden, dass in exzitatorischen Neuronen ein Anstieg der Slack-vermittelten Ströme in einer schnelleren Nachhyperpolarisation resultiert. Die dadurch verkürzte Refraktärperiode führt zu einer höherfrequenten Aktionspotentialgenerierung (Quraishi et al. 2019; Wu et al. 2023). Möglicherweise begrenzt sich das Vorkommen der mutierten GoF-Kanäle auch nur auf inhibitorische GABAerge Neurone, sodass der hemmende Tonus reduziert wird (Shore et al. 2020). Darüber hinaus werden unterschiedliche Splice-Varianten, Spannungsabhängigkeiten und kompensatorische Mechanismen diskutiert, die das resultierende Ungleichgewicht zwischen der verstärkten Exzitation und einer reduzierten Inhibition innerhalb der Großhirnrinde erklären (Barcia et al. 2012; Kim und Kaczmarek 2014; Shore et al. 2020; Wu et al. 2023). Eine pharmakologische Hemmung dieser hyperaktiven Slack-Kanäle ist unter anderem durch das Antiarrhythmikum Chinidin möglich. Es wurde bereits in ersten Fallstudien bei Patienten mit verschiedenen KCNT1-vermittelten Epilepsieformen eingesetzt, jedoch zeigte sich nur ein limitierter Therapieerfolg auf Grund der geringen Selektivität (Yang et al. 2006; Bethan A. Cole et al. 2020). Mehrere Forschungsgruppen arbeiten zur Zeit an der Entwicklung selektiverer Slack-Inhibitoren, von denen einige bereits erfolgreich antikonvulsive Effekte *in vivo* zeigen (Bethan A. Cole et al. 2020; Griffin et al. 2021; Spitznagel et al. 2020).

#### **1.3.2.4 Pharmakologische Aktivierung durch Loxapin**

Slack-Kanäle regulieren über die Modulation des Ruhemembranpotentials und der Re- und Nachhyperpolarisation die neuronale Erregbarkeit. Eine gezielte pharmakologische Aktivierung könnte pathologisch erhöhte Erregungszustände dämpfen und einen innovativen Therapieansatz zur Behandlung von neuropathischen Schmerzen und Pruritus darstellen. Das Anthelminthikum Bithionol und das bei amyotropher Lateralsklerose angewendete Riluzol zeigen zwar moderate Slack-aktivierende Eigenschaften, aber keine hohe Spezifität und aktivieren darüber hinaus eine Reihe weiterer Kaliumkanäle (Yang et al. 2006). In einem *in vitro* Screening einer Library pharmazeutisch aktiver Substanzen (LOPAC®1280) konnten ein weiteres Anthelminthikum Niclosamid sowie das Neuroleptikum Loxapin als zwei neue Slack-Aktivatoren identifiziert werden (Biton et al. 2012). Interessanterweise scheint bereits niedrig dosiertes Loxapin (0,13 mg/kg) die mechanische Hyperalgesie in neuropathischen Schmerzmodellen *in vivo* zu reduzieren. Das Schmerzverhalten von Slack-defizienten Mäusen wurde dagegen nicht beeinflusst, was auf einen Slack-abhängigen Wirkmechanismus hindeutet (Lu et al. 2015). In einer ersten Pilotstudie konnte die analgetische Wirksamkeit von Loxapin bei Patienten mit therapierefraktären neuropathischen Schmerzen tendenziell bestätigt werden, jedoch musste die Studie auf Grund der schlechten Verträglichkeit frühzeitig beendet werden (Schmiedl et al. 2019). Als Vertreter der 1. Generation führt Loxapin zu einer starken Antagonisierung an Dopamin- ( $D_2$ ,  $D_3$  und  $D_3$ ), Serotonin- ( $5\text{-HT}_{2A}$  und



5-HT<sub>2c</sub>) und Histamin- (H<sub>1</sub>) Rezeptoren und ruft typische Nebenwirkungen der klassischen Antidepressiva hervor (Chakrabarti et al. 2007). So weist Loxapin unter den trizyklischen Antipsychotika die höchste Wahrscheinlichkeit für das Auslösen von extrapyramidalmotorischen Störungen (EPMS) auf (Yang et al. 2007). Weiterhin können Somnolenz, Benommenheit, anticholinerge, kardiovaskuläre und gastrointestinale Beschwerden auftreten (Popovic et al. 2015). Der therapeutische Einsatz bleibt somit limitiert, aber die Weiterentwicklung von Loxapin-Derivaten mit einem verbesserten pharmakologischen Profil könnte klinisch einsetzbare Slack-Aktivatoren als innovative neue Wirkstoffgruppe hervorbringen.

### 1.4 Zielsetzung

Wirksame und unbedenkliche Arzneimittel zur Therapie von chronischen Schmerzen und chronischem Pruritus sind nur unzureichend vorhanden. Für die betreffenden Patienten bedeutet das einen sehr hohen Leidensdruck mit starken Einschränkungen in der Lebensqualität. Beide Erkrankungen zeichnen sich durch pathologisch erhöhte neuronale Erregungszustände aus, an denen Slack-Kaliumkanäle modulierend beteiligt sind (Lu et al. 2015; Martinez-Espinosa et al. 2015; Kaczmarek et al. 2017; Evely et al. 2017). Die gezielte Aktivierung von Slack wurde bereits in Vorarbeiten als innovative Therapiestrategie identifiziert. Eine analgetische Wirksamkeit des Slack-Aktivators Loxapin konnte in zwei Mausmodellen für neuropathische Schmerzen und in einer humanen Pilotstudie bestätigt werden, jedoch ist der Therapieeinsatz des Neuroleptikums auf Grund der starken Nebenwirkungen limitiert (Lu et al. 2015; Schmiedl et al. 2019). In Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Eugen Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) wurden daher neue Loxapin-Derivate synthetisiert, die möglichst selektiv und potent Slack-Kanäle aktivieren und ein verbessertes pharmakologisches Nebenwirkungsprofil aufweisen.

Das Ziel dieser Arbeit war es, unter den neu synthetisierten Loxapin-Derivaten die potentiellen Slack-Aktivatoren zu identifizieren und interessante Kandidaten weitreichend *in vitro* zu charakterisieren. Im Anschluss sollten sie auf ihre analgetische und antipruritische Wirksamkeit untersucht werden, um somit den Slack-Kanal gleichzeitig als Target *in vivo* zu validieren. Außerdem sollte die Frage geklärt werden, ob eine ZNS-Gängigkeit für die erwünschten Wirkungen erforderlich ist. Darüber hinaus wurde das Auftreten von motorischen und kardiovaskulären Nebenwirkungen sowie die pharmakologischen Eigenschaften analysiert, sodass eine fundierte Auswahl der geeignetsten Kandidaten für eine weitere präklinische Entwicklung ermöglicht werden kann. Übergeordnetes Ziel ist die klinische Entwicklung von Slack-Aktivatoren als innovative sowie effektive Therapieoption zur Behandlung von Schmerzen und Juckreiz.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

**Tabelle 1:** Verwendete Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller	Ort
(2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -cyclodextrin	AppliChem GmbH	Darmstadt
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Backdrop Reagenz (Invitrogen™)	Thermo Fisher Scientific, Co.; Life Technologies Corporation	Waltham, USA
Borsäure	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Aceton	Merck KGaA	Darmstadt
Agarose	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Allylthiocyanat (AITC)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
B-27™ Plus Supplement (50x)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
$\beta$ -Alanin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Bradykinin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Calciumchloriddihydrat	Merck KGaA	Darmstadt
Carbogen (95 % O <sub>2</sub> + 5 % CO <sub>2</sub> )	Praxair Deutschland GmbH	Biebesheim am Rhein
Chloroquin-Diphosphat	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Cholinchlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Collagenase, Typ I	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Dimethylsulfoxid (DMSO), steril	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Dispase II	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (DMEM), mit GlutaMAX™	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA

Ethanol, absolut	Merck KGaA	Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
FluxOR™ Potassium Ion Channel Assay (F10017, Invitrogen™)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Geneticin (50 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
GeneRuler 100 bp	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Glukose, wasserfrei	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Glukose-Monohydrat	Merck KGaA	Darmstadt
<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i> (HBSS), mit Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Histamin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Isothesia 1000 mg/g (Isofluran)	Piramal Critical Care B.V.	Voorschoten, NL
Isolectin GS-IB4 Alexa Fluor™ 488-Konjugat	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH & Co.	Kars
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Kaliumhydroxid (0,1 M)	Merck KGaA	Darmstadt
Kaliumhydroxid, Plätzchen	Merck KGaA	Darmstadt
Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Kohlendioxid (CO <sub>2</sub> )	Praxair Deutschland GmbH	Biebesheim am Rhein
Komplettes Freund-Adjuvans ( <i>complete Freund's adjuvant</i> , CFA)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
L-Glutamin (200 mM)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
LY344864-Hydrochlorid	Merck KGaA	Darmstadt
Magnesiumchlorid	AppliChem GmbH	Darmstadt
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck KGaA	Darmstadt
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Natriumhydroxid (1 M)	VWR International S.A.S.	Fontenay sous Bois, Frankreich
Natriumhydroxid, Plätzchen	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim

Neurobasal™-A Medium	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Olivenöl	Peter Kölln KGaA	Elmshorn
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i> (DPBS)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Poly-D-Lysin (0,1/1 mg/ml)	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA
Polysorbat 20 (Tween®-20)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Polyethylenglycol-15-hydroxystearat (Kolliphor® HS 15)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Pregabalin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Prostaglanin E2	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Proteinase K Lösung (20 mg/ml)	Genaxxon bioscience GmbH	Ulm
Red MasterMix (2x) Taq PCR MasterMix mit rotem Farbstoff	Genaxxon bioscience GmbH	Ulm
Rimadyl® (Carprofen)	Zoetis Deutschland GmbH	Berlin
ROTI®GelStain	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
ROTI®Liquid Barrier Marker	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
ROTI®Quant	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Salzsäure, rauchend (37 %)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Salzsäure (1 M)	Merck KGaA	Darmstadt
Serotonin	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
SLIGRL-NH <sub>2</sub> -Trifluoroacetat	Cayman Chemical	Ann Arbor, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (TRIS HCl)	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Trypan-Blau (0,1 %)	Sigma-Aldrich GmbH	Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05/0,25 %), mit Phenolrot	Thermo Fisher Scientific, Co.	Waltham, USA

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

**Tabelle 2:** Verwendete Lösungen und Puffer aus eigener Herstellung

Lösung und Puffer	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen
Collagenase/Dispase-Suspension	Collagenase, Typ I Dispase II	500 U/ml 2,5 U/ml in HBSS, mit Phenolrot
NB-Kulturmedium	B-27™ Plus Supplement Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml) L-Glutamin (200 mM) Neurobasal™-A Medium	1 ml 500 µl 125 µl 48.5 ml
Normal-Tyrode (pH-Wert 7,4 mit NaOH Plättchen)	NaCl KCl CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub> HEPES	140 mM 5 mM 2 mM 2 mM 10 mM in Reinstwasser
Inflammatorische Suppe (25x)	Histamin Bradykinin Prostaglandin E2 Serotonin	250 µM 250 µM 250 µM 250 µM in HBSS
Intrazelluläre Lösung (pH-Wert 7,4 mit KOH- Plättchen)	KCl MgCl <sub>2</sub> EGTA HEPES	140 mM 2 mM 5 mM 10 mM in Reinstwasser
Lyse-Puffer	TRIS HCl (pH 8,5) EDTA Nonidet P-40 Tween-20	50 mM 1 mM 0,2 % 0,2 %
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	137 mM 2,7 mM 10 mM 1,8 mM in Reinstwasser
Tris-Borat-EDTA (TBE)- Puffer	TRIS Borsäure EDTA Demineralisiertes Wasser	100 mM 100 mM 2 mM Ad 1 l
Waschmedium	Fetales Kälberserum L-Glutamin (200 mM) Neurobasal™-A Medium	50 ml 1,25 ml 448,75 ml

**Tabelle 3:** Lösungen und Puffer zur Verwendung im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay

Lösung und Puffer	Zusammensetzung	Konzentration/Volumen
Assay-Puffer (pH-Wert 7,4 mit KOH-Plättchen)	Autoklaviertes Reinstwasser Cholin-Puffer (10 x) HEPES 1 M Probenecid (0,27 M) Backdrop Reagenz	7,7 ml 1 ml 200 µl 100 µl 1 ml
Cholin-Puffer (10 x) (pH-Wert 7,4 mit KOH-Plättchen)	Cholinchlorid KCl CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O HEPES Glukose x H <sub>2</sub> O	140 mM 5 mM 2 mM 2 mM 10 mM 5,55 mM
HEPES	HEPES	1 M in Reinstwasser
Lade-Puffer	PowerLoad™-Konzentrat (100 x) FluxOR™- Reagenz (gelöst in DMSO) Autoklaviertes Reinstwasser Cholin-Puffer (10 x) Probenecid (0,27 mM) Backdrop Reagenz	100 µl 10 µl 7,8 ml 1 ml 100 µl 1 ml
Stimulus-Puffer	Autoklaviertes Reinstwasser Ti <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (50 mM)	9 ml 1 ml

### 2.1.3 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 4:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller	Ort
Cellstar® 5 ml, 10 ml, 25 ml serologische Pipetten	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Cellstar® 96 well plates 655090	Greiner Bio-One GmbH	Frickenhausen
Cellstar® Zellkulturplatten, 24 Well	Carl Roth GmbH & Co.	Karlsruhe
Kryorohre	Sigma-Aldrich Laborchemikalien GmbH	Steinheim
Deckgläser (Ø 10 mm)	Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH	Sondheim
Einmalskalpelle (Cutfix Nr. 11)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Einmalspritzen (Injekt®-F, 1 ml)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Spritzenvorsatzfilter Millex-GP (0,22 µm)	Merck KGaA	Darmstadt
Borosilikat-Glas mit Filament GB150F-8P (Glaskapillare)	Sciences Products GmbH	Hofheim

Kanülen (Sterican®; 25 G, 30 G, 27 ½ G)	B. Braun Melsungen AG	Melsungen
Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Plus™ Adhesion slides)	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000, 5000 µl)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Pipettenspitzen low-retention (100 µl)	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
PCR-Platte (Hard-Shell® 96-Well PCR Plate und Microseal® PCR Plate Sealing Film)	Bio-Rad Laboratories GmbH	Feldkirchen
Reaktionsgefäß 0,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Reaktionsgefäß 2 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Reaktionsgefäß 5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Reagenz-Reservoir Bio-pure™ 25 ml	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe
SafeSeal Gefäß 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Schraubröhre 15 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
Schraubröhre 50 ml	Sarstedt AG & Co. KG	Nümbrecht
T75 cm² Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA
T175 cm² Zellkulturflasche	Thermo Fisher Scientific	Waltham, USA

## 2.1.4 Geräte

**Tabelle 5:** Verwendete Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller, Ort
Brutschrank	Heracell™ 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Dynamic Plantar Aesthesiometer	Modell 37450	Ugo Basile, Gemonio, Italien
Elektrophorese-Kammer	OwlScientific, B1 Electrophoresis Systems	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Hargreaves-Apparatur	Plantar Analgesia Meter	IITC Life Science, Woodland Hills, USA
Lichtmikroskop Zellkultur	Nikon Eclipse Ts2	Nikon GmbH, Düsseldorf
Narkosegerät	UniVet Porta	Groppler medizintechnik, Deggendorf
PCR-Cycler	T100 Thermal Cycler, BioRad, Kalifornien Primus25 advanced®, PeqLab, Erlangen CFX96 Touch™ Real-Time System	BioRad, Kalifornien, USA
Platten-Reader mit Injektor	Tecan Infinite M200 Reader mit Injektor	Tecan, Männedorf, Schweiz

Pulsoxymeter	MouseOX® Plus Pulse Oximeter for Rodents	Hugo Sachs Elektronik GmbH, March
Rotarod	Modell 47600	Ugo Basile, Gemonio, Italien
Spannungsgeber	PowerPac™ Basic Power Supply Power Supply EPS 301	BioRad, Kalifornien, USA  GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Sicherheitswerkbank	HeraSafe™ HS18	Heraeus Instruments, Hanau
Ultraschallbad	Sonorex Super RK 510H	Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin
Wasserbad	Lauda-GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel
Zentrifuge	Centrifuge 5810 R Heraeus Multifuge 1S-R	Eppendorf, Wesseling Heraeus Instruments, Hanau

**Tabelle 6:** Komponenten des Patch-Clamp Setups

<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller, Ort</b>
Kapillaren-Ziehgerät	P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller	Sutter Instrument, Novato, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200	Carl Zeiss AG, Oberkochen
Membranpumpe	Modell 850	SCHEGO Schemel & Goetz GmbH & Co. KG, Offenbach
Mikromanipulator (mit Vorverstärker)	PatchStar	Scientifica, Clarksburg, USA
Peristaltikpumpe	LabS3,	Innufluid Co., Shanghai, China



## 2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten mit Zelllinien erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sicherheitswerkbank (Herasafe™ HS18, Heraeus Instruments). Zur Herstellung von Lösungen und zum Waschen von Glasplättchen wurde autoklaviertes Reinstwasser verwendet.

### 2.2.1 Kultivierung von HEK-Slack Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Versuche mit adhärenenten HEK293-Zellen durchgeführt, welche mit dem humanen KCNT1-Gen stabil transfiziert wurden. Diese HEK-Slack Zelllinie wurde von SB Drug Discovery (Glasgow, UK) erworben und in Vorarbeiten von Cathrin Flauaus (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) auf ihre Slack-Expression validiert. Als Kulturmedium wurde DMEM + GlutaMAX (Gibco) unter Zusatz von 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Die Zellen wurden in T75 cm<sup>2</sup>- oder T175 cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One) im Brutschrank (Thermo Fisher Scientific) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Beim Erreichen einer Konfluenz von 70 – 80 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden zunächst alle Medien und Zusätze auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Das überstehende Medium in der Zellkulturflasche wurde abgesaugt und der Zellrasen mit 5 ml DPBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Trypsinierung der Zellen für ein bis zwei Minuten (1,5 ml von 0,05 % Trypsin-EDTA, Gibco), bis sie sich leicht vom Flaschenboden lösten. Durch Zugabe von frischem Medium wurde die Trypsinierung gestoppt und die Zellsuspension in ein 15 ml Kulturröhrchen überführt. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 800 rpm für fünf Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Je nachdem, wann die Zellen weiterverwendet werden sollten, wurden sie 1:5, 1:10 oder 1:20 gesplittet. Zur Selektion wurde das Antibiotikum Geneticin in einer Konzentration von 0,6 mg/ml nach dem Splitten frisch in die Kulturflasche gegeben. Die Zellen wurden maximal bis Passage 35 verwendet.

### 2.2.2 Primärkultur von Spinalganglien

Nach der Entnahme der lumbalen Spinalganglien (siehe Kapitel 2.4.3) und deren Aufbewahrung in 10 ml *Hanks' Balanced Salt Solution* (HBSS) in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen wurde der Überstand nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1000 rpm abgenommen. Die Neurone wurden in 1 ml HBSS und 2 ml einer Mischung aus Collagenase I und Dispase II suspendiert. Für den Proteinverdau wurden die Spinalganglien für eine Stunde bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C inkubiert und die sedimentierten Zellen alle 20 Minuten vorsichtig aufgeschüttelt. Im Anschluss wurde die Suspension für 3 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und 5 ml Waschmedium

dazugegeben. Durch mehrmalige Trituration mit zwei flammpolierten Pasteur-Pipetten unterschiedlicher Öffnungsdurchmesser wurden die Zellen dissoziiert. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation und der Verwurf des Überstands. Die am Boden des Zentrifugenröhrchens pelletierten Zellen wurden in 240 µl Waschmedium resuspendiert und jeweils 60 µl vorsichtig mit einer Low-Retention-Pipettenspitze auf die mit PDL-beschichteten Deckgläschen (verteilt in 24-Well Zellkulturplatten) pipettiert. Nach zwei bis dreistündiger Inkubation bei 5 % CO<sub>2</sub> und 37 °C wurden 500 µl NB Kulturmedium pro Well dazugegeben und die Kultur weiter über Nacht kultiviert. Um einen pathologischen Zustand mit einer erhöhten neuronalen Erregbarkeit für die Current-Clamp Messungen zu induzieren, wurden für diesen Versuchsaufbau nur 480 µl NB Kulturmedium pro Well supplementiert und jedes Well mit 20 µl einer „Inflammatorischen Suppe“ stimuliert (Grundy et al. 2018). Die Stammlösung enthielt die Entzündungsmediatoren Histamin, Bradykinin, Prostaglandin E<sub>2</sub> sowie Serotonin jeweils in einer Konzentration von 250 µM, sodass die Endkonzentration im Well nach der Verdünnung von 1:25 10 µM ergab.

Am Folgetag wurden die Neurone vor Beginn der Patch-Clamp Messungen mit dem AF488-konjugierten *Griffonia simplicifolia* Isolectin B4 für 5 – 10 Minuten bei 37 °C unter Lichtschutz inkubiert (1:200), um die Slack-positiven Neurone zu selektieren. Nur 31,6 % der murinen DRG Neurone exprimieren Slack-Kanäle, allerdings liegt der Anteil in nicht-peptidergen IB4-positiven Neuronen bei 93,2 % (Lu et al. 2015).

### 2.2.3 Kryokonservierung

Für die Langzeitlagerung der Zellen im flüssigen Stickstoff wurden Kryokonservierungen von möglichst niedrigen Passagen angefertigt. Dafür wurden die Zellen nach dem Passagieren gezählt (siehe Kapitel 2.2.5), erneut abzentrifugiert und so in dem Einfriermedium resuspendiert, dass die resultierende Konzentration ca. 5 Millionen Zellen/ml betrug. Die Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen überführt, in einem Mr. Frosty™ Gefrierbehälter bei -80 °C für zwei bis fünf Tage langsam eingefroren und danach in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfriermedium setzte sich zusammen aus 37,5 ml Kulturmedium, 7,5 ml FCS und 5 ml DMSO.

### 2.2.4 Beschichtung von Zellkulturplatten und Deckgläsern

Die Adhäsion von Zellen an Oberflächen aus Kunststoff oder Glas kann durch eine Beschichtung von Poly-D-Lysin (PDL) verbessert werden. Durch die positive Ladung des Aminosäurepolymers wird das Anheften an die anionische Zelloberfläche unterstützt. Dies ist insbesondere beim Aussäen der semiadhärenten HEK-Slack Zellen in die 96-Well Zellkulturplatten für die Durchführung des FluxOR™

Kaliumkanal-Assays wichtig. Daher wurden die Platten mit je 100 µl pro Well einer 75 µg/ml PDL-Lösung (verdünnt mit DPBS) über Nacht im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> beschichtet. Am nächsten Tag wurden die Platten zweimal mit je 100 µl DPBS pro Well gewaschen und bei offenem Deckel unter der Sicherheitswerkbank getrocknet.

Für Patch-Clamp Versuche wurden sowohl die HEK-Slack Zellen als auch die Spinalganglien von C57BL/6N-Mäusen auf Deckgläsern (Durchmesser 10 mm) kultiviert, welche zur verbesserten Adhärenz ebenfalls vorher mit PDL beschichtet wurden. Dazu wurden die Deckgläser einzeln auf eine 24-Well Zellkulturplatte verteilt und für mindestens eine Stunde mit 500 µl einer PDL-Lösung mit einer Konzentration von 100 µg/ml behandelt. Anschließend wurden die Deckgläser zweimal mit je 1 ml Reinstwasser gewaschen und vollständig getrocknet. Die vorbereiteten, beschichteten Deckgläser konnten, falls nicht direkt verwendet, bei 4 °C für eine Woche gelagert werden.

### 2.2.5 Quantifizieren und Aussäen von HEK-Slack Zellen

Zur Durchführung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays wurden einen Tag vor der Messung 50 000 HEK-Slack Zellen pro Well auf die vorher mit Poly-D-Lysin beschichteten 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Dafür wurden die Zellen zunächst, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, passagiert und die Konzentration der resultierenden Zellsuspension, welche nach dem Splitten übrigblieb, manuell quantifiziert. 10 µl der Suspension wurden 1:10 mit einer Trypanblau-Lösung (0,1 %) verdünnt und wiederum 10 µl der Verdünnung in eine Neubauer Zählkammer appliziert. Die Anzahl der viablen Zellen pro Eckquadrat wurde unter einem Lichtmikroskop mit einem Handstückzähler bestimmt, der Mittelwert aus allen vier Quadraten berechnet und die Zellzahl/ml anhand folgender Formel ermittelt:

$$\text{Mittelwert (Zellzahl Eckquadrate)} \times 10\,000 \times 10 = \text{Zellzahl/ml}$$

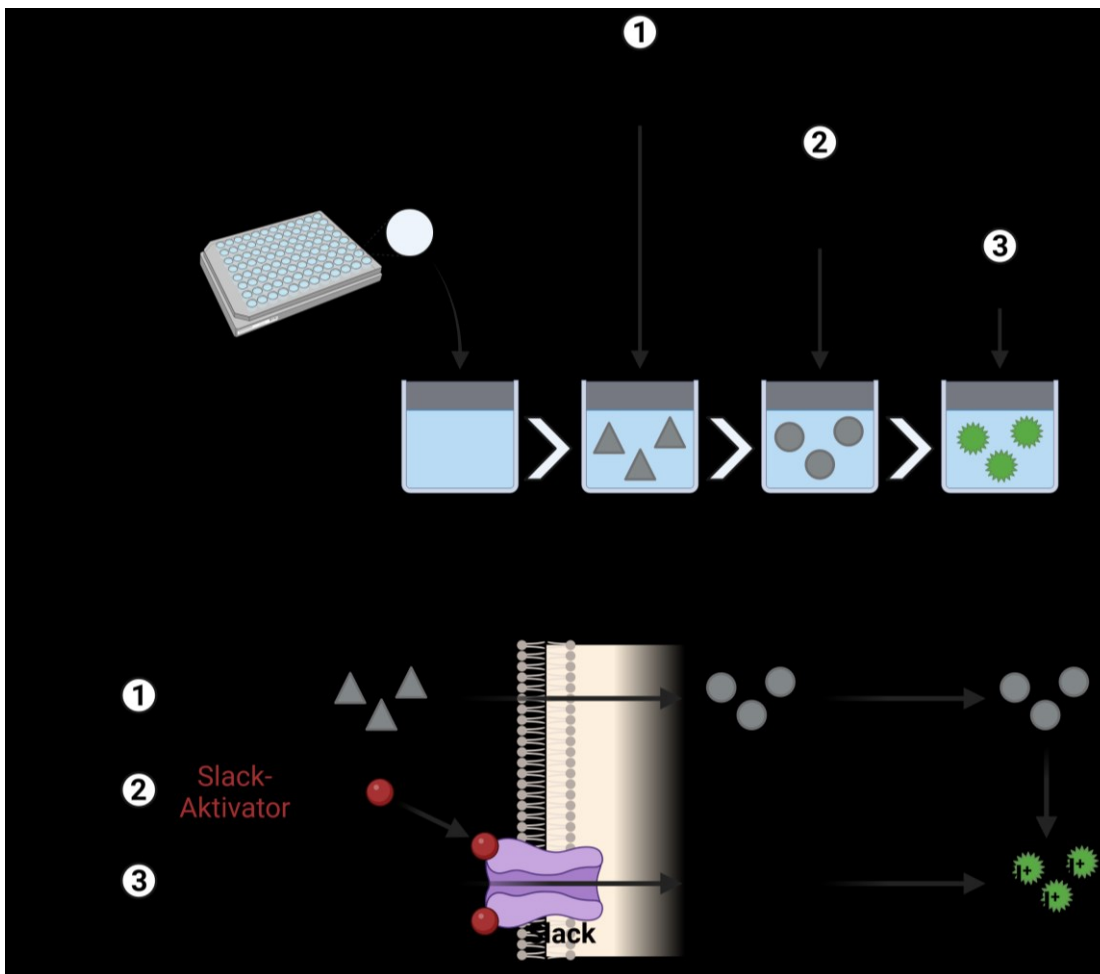
Die Zellsuspension wurde mit dem entsprechendem Volumen Kulturmedium auf 500 000 Zellen/ml verdünnt, jeweils 100 µl mittels einer Mehrkanalpipette (Eppendorf) in die 96-Well Zellkulturplatten ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> über Nacht inkubiert.

Für Patch-Clamp Versuche zur Bestimmung der Slack-Aktivierung durch Testsubstanzen wurden die HEK-Slack Zellen ebenfalls nach dem Passagieren (Kapitel 2.3.1) auf die vorher mit Poly-D-Lysin beschichteten Deckgläser (verteilt in 24-Well Zellkulturplatten) ausgesät. Die Zellsuspension wurde je nach Konzentration 1:2 bis 1:4 mit Kulturmedium verdünnt, je 60 µl auf ein Deckglas gegeben und für mindestens eine Stunde bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Im Anschluss wurde 1 ml Kulturmedium zu jedem Well gegeben und über Nacht weiter bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

## 2.2.6 Untersuchung der Slack-Aktivierung im FluxOR™-Kaliumkanal Assay

Die neuen Testsubstanzen wurden mittels des FluxOR™-Kaliumkanal Assays auf ihre potentiellen Slack-aktivierenden Eigenschaften gescreent sowie mit Hilfe von Dosis-Wirkungs-Kurven deren  $EC_{50}$ - und  $E_{Max}$ -Werte bestimmt. Der kommerziell erhältliche FluxOR™-Assay (Invitrogen™) ist speziell zur Quantifizierung der Ionendurchlässigkeit von Kaliumkanälen entwickelt worden und basiert auf dessen Permeabilität für Thallium-Ionen, wodurch das Ausmaß eines Thalliumioneneinstroms direkt mit der Kanalaktivität korreliert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die vom Hersteller empfohlenen Puffer teilweise durch eigens hergestellte Natrium-freie Puffer ersetzt, sodass die Natrium-abhängige Aktivierung des Slack-Kanals unterbunden werden konnte. Die Einstellung des pH-Wertes erfolgte mit KOH (0,1 M) oder KOH-Plättchen anstatt mit einer NaOH-Lösung.

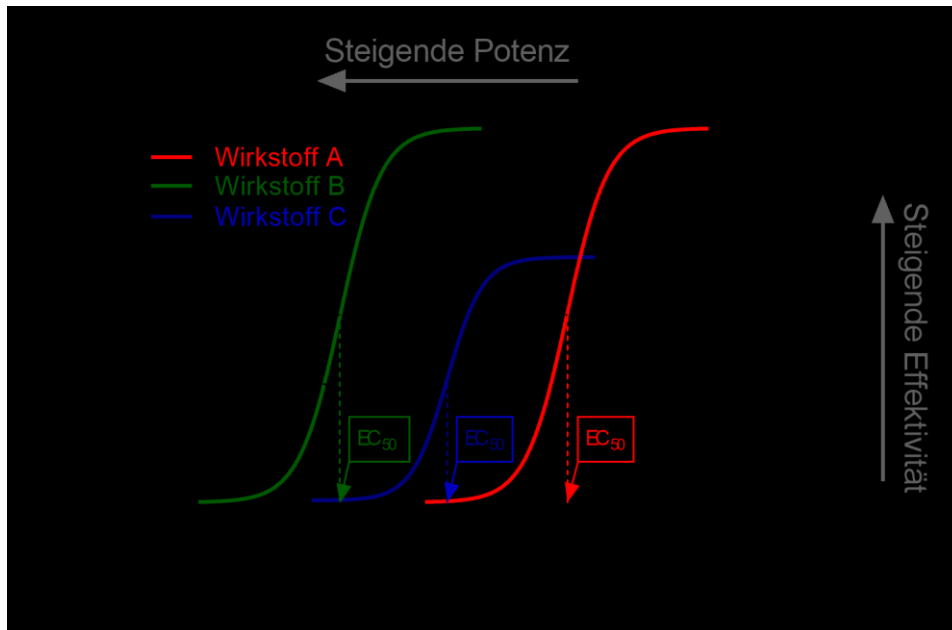
Das Prinzip des FluxOR™-Assays ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt. Im ersten Schritt wurden die Zellen mit dem FluxOR™-Fluoreszenzfarbstoff beladen, welcher im Folgenden als Thallium-Sensor fungiert. Dafür wurde das Kulturmedium aus den Wells durch vorsichtiges Ausschütteln der Zellkulturplatte entfernt, damit es zu keiner Beeinträchtigung des Zellrasens kam. Es wurden pro Well 80  $\mu$ l des Ladepuffers mit einer Mehrkanalpipette hinzugegeben und die Zellen bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 60 Minuten inkubiert. Der im Ladepuffer enthaltene Farbstoff liegt zunächst als nicht-fluoreszierender Acetoxymethylester (AM-Ester) vor und ist in seiner unpolaren Form gut membranpermeabel. Das Powerload™-Reagenz verbessert zusätzlich den Transport in die Zellen, indem es als nichtionisches Tensid die Dispersion und Stabilisierung von AM-Estern in wässrigen Lösungen verbessert. Im Zytoplasma wird der Farbstoff durch endogene Esterasen in einen negativ geladenen, fluoreszierenden Thallium-Sensor gespalten. Seine Ausscheidung aus der Zelle wird weiterhin durch die Zugabe von Probenecid, einem starken Hemmer des organischen Anionen-Transporters Typ 1, im Lade- sowie im Assaypuffer blockiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen zweimal mit je 100  $\mu$ l Assaypuffer pro Well gewaschen, um extrazellulär zurückgebliebenen FluxOR™-Farbstoff zu entfernen. Das im Lade- und Assaypuffer enthaltene Backdrop™-Reagenz (Thermo Fischer Scientific) reduziert die Hintergrundfluoreszenz und erhöht somit das Thallium-abhängige Fluoreszenzsignal während der Messung. Nach dem Waschen wurden die Wells mit je 80  $\mu$ l Assaypuffer beladen und die Zellen mit 10  $\mu$ l/Well der Testsubstanz-Lösungen oder des Vehikels stimuliert. Um eventuell entstandene Luftblasen zu entfernen, wurde die Zellkulturplatte bei 500 rpm für zwei Minuten zentrifugiert und die Zellen bei Raumtemperatur unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert. Für Messungen mit dem Slack-Inhibitor wurden die Zellen zuerst für 10 Minuten mit je 5  $\mu$ l/Well einer Loxapin- oder VH425-Lösung stimuliert und im Anschluss mit je 5  $\mu$ l/Well der Inhibitor-Verdünnungsreihe inkubiert.



**Abbildung 7: Prinzip des FluxOR™-Kaliumkanal Assays**

Einen Tag vor der Messung werden 50 000 HEK-Slack Zellen pro Well auf die 96-Well Zellkulturplatten ausgesät. Im ersten Schritt werden die Zellen mit dem FluxOR™-Fluoreszenzfarbstoff beladen, der zunächst als nicht-fluoreszierender AM-Ester vorliegt und gut membranpermeabel ist. Im Zytoplasma wird der Farbstoff durch endogene Esterasen in einen fluoreszierenden Thallium-Sensor gespalten. Im zweiten Schritt werden die Zellen für 30 Minuten mit einem Slack-Aktivator inkubiert. Nach Zugabe von Thallium-Ionen im dritten Schritt strömen sie bei geöffneten Slack-Kanälen entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle und führen unter Bindung an den Thallium-sensitiven Farbstoff zu einem Fluoreszenzsignal.

Das Ausmaß der Slack-Aktivierung wurde mittels der Fluoreszenzmessung durch einen Tecan Infinite M200 Reader (Tecan) quantifiziert. Zu Beginn wurde über eine viermalige Messung ein Mittelwert der Baseline-Fluoreszenz bestimmt. Im Anschluss wurden durch den Tecan Reader nacheinander in jedes Well 20 µl des Thallium-Ionen enthaltenen Stimuluspuffers injiziert und die Fluoreszenz über 100 Sekunden in einsekündigen Intervallen gemessen. Bei geöffneten Slack-Kanälen strömen die Thallium-Ionen entlang ihres Konzentrationsgradienten in die Zelle und führen unter Bindung an den Thallium-sensitiven Farbstoff zu einem Fluoreszenzsignal, dessen Emissionsmaximum bei einer Wellenlänge von 525 nm mit einer Exzitationswellenlänge von 485 nm liegt. Das Ausmaß des Fluoreszenzanstiegs korreliert proportional zu der Anzahl der geöffneten Slack-Kanäle.



**Abbildung 8: Schematische Übersicht der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von drei Wirkstoffen**

Wirkstoff A und B zeigen einen gleichem Maximalwert ( $EC_{Max}$ ), allerdings ist Wirkstoff B aufgrund des niedrigeren  $EC_{50}$ -Werts potenter als Wirkstoff A. Wirkstoff C ist potenter als Wirkstoff A, hat aber einen geringeren Maximalwert als die Wirkstoffe A und B.

Alle im FluxOR<sup>TM</sup>-Assay verwendeten Puffer wurden jeweils frisch am Versuchstag hergestellt. Der Cholinpuffer wurde in einer 10-fachen Konzentration als Aliquot bei -20 °C gelagert und ebenfalls frisch am Versuchstag aufgetaut. Da es bei der Stimulation der Zellen mit den Testsubstanzen-Lösungen zu einem Verdünnungsschritt von 1:9 kam, wurden die Lösungen der Verdünnungsreihe sowie der Positiv- und Negativkontrollen in einer 9-fachen Konzentration hergestellt. Bei jeder Messung wurden eine Vehikel-Kontrolle (0,03 % DMSO in Cholinpuffer) und eine Positivkontrolle (50  $\mu$ M Loxapin) mitgeführt. Die Testsubstanzen wurden zuerst in DMSO gelöst, anschließend mit der entsprechenden Menge Cholinpuffer verdünnt und gegebenenfalls zur Löslichkeitsverbesserung für einige Minuten im Ultraschallbad erwärmt. Bei unzureichender Löslichkeit wurden statt der freien Basen ihre HCl- bzw. Formiat-Salze verwendet. Die Konzentrationen der Testsubstanzen beziehen sich auf die Endkonzentration im Well. Standardmäßig wurde eine 1:2-Verdünnungsreihe mit 100; 50; 25; 12,5; 6,25 und 3,125  $\mu$ M hergestellt. Wurden die Plateaus der resultierenden Dosis-Wirkungs-Kurve nach der ersten Messung noch nicht erreicht, wurde für manche Testsubstanzen der Konzentrationsbereich angepasst. Alle Bedingungen wurden in Triplikaten gemessen.

Für die Auswertung wurde der Fluoreszenzanstieg über die Zeit bezogen auf die Baseline-Fluoreszenz ( $F/F_B$ ) berechnet. Dabei wurde zuerst der Mittelwert der Baseline-Fluoreszenz jedes Wells aus den vier Messwerten gebildet und jeder Wert eines Wells pro Messzyklus auf seinen entsprechenden Mittelwert referenziert:

$$F_{Zyklus\ X}/F_B = \frac{F_{Zyklus\ X}}{(F_{B1} + F_{B2} + F_{B3} + F_{B4})/4}$$

Zur Berechnung der Dosis-Wirkungs-Kurven wurden die Ergebnisse des letzten Messzyklus nach 100 Sekunden verwendet. Für die Bestimmung des maximal möglichen Effekts der Slack-Aktivierung ( $E_{Max}$ ) einer Testsubstanz wurden die  $F/F_B$ -Werte prozentual auf den Effekt der Positivkontrolle (Loxapin 50  $\mu$ M) normiert. Dabei wurde der Effekt von Loxapin auf 100 % und der Effekt der Negativkontrolle (Vehikel) auf 0 % gesetzt. Die Konzentration, bei der ein halbmaximaler Effekt beobachtet wird ( $EC_{50}$ ), kann auch als die Potenz einer Testsubstanz bezeichnet werden und wurde anhand der Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt, welche sich durch das Auftragen der  $F/F_B$ -Werte gegen die logarithmierten Konzentrationen ergibt. Folgende Formel wurde mit Hilfe von GraphPad Prism, Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA), angewendet:

$$Y = Bottom + \frac{(Top + Bottom)}{1 + 10^{(logEC_{50} - X) \times d}}$$

(Top = Maximaler Effekt, Bottom = Geringster Effekt,  $d$  = Hill-Koeffizient)

Die Bedeutung der  $EC_{50}$ - und  $E_{Max}$ -Werte sind in **Abbildung 8** für drei Beispielwirkstoffe graphisch visualisiert.

### 2.2.7 D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>-Rezeptor und H<sub>1</sub>-Rezeptor Radioligandenbindungsassays

Nachdem die Testsubstanzen auf ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften gescreent wurden, sollten im nächsten Schritt interessante Kandidaten auf ihre Affinität an D<sub>2</sub>-, D<sub>3</sub> und H<sub>1</sub>-Rezeptoren untersucht werden. Die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten potentiell unerwünschter Nebenwirkungen sollte bei Substanzen mit geringeren Affinitäten als Loxapin *in vivo* reduziert sein. Die Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Dr. Holger Stark (Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) durch Mariam Dubiel und Annika Frank durchgeführt.

## 2.3 Elektrophysiologische Charakterisierung ausgewählter Testsubstanzen

### 2.3.1 Patch-Clamp Technik

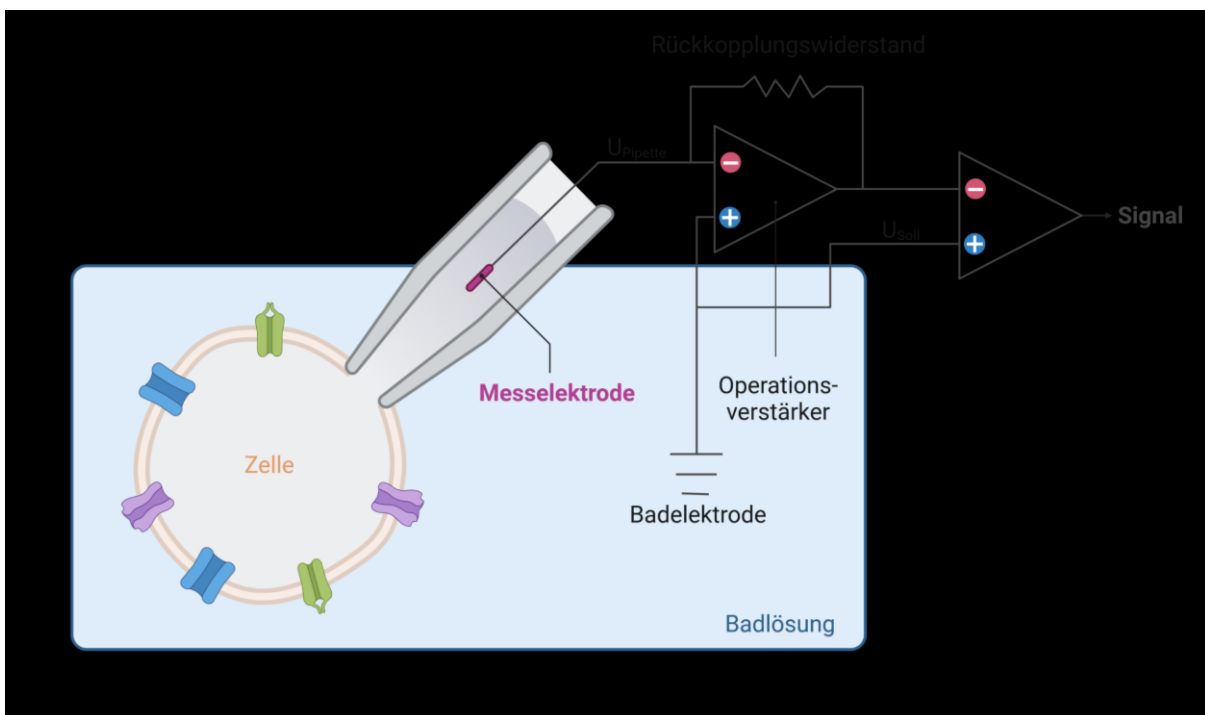
Zur Untersuchung der Eigenschaften und Funktionen von Ionenkanälen in Membranen lebender Zellen hat sich die Patch-Clamp Technik zu einer der wichtigsten neurophysiologischen Arbeitsmethoden etabliert. Die Weiterentwicklung der Zwei-Elektroden-Spannungsklemme von Erwin Neher und Bert Sakmann 1976 revolutionierte die elektrophysiologische Forschung und wurde 1991 mit dem Nobelpreis für Physiologie und Medizin ausgezeichnet. Erstmals war es möglich, Ströme von einzelnen Ionenkanälen im Picoampere-Bereich zu messen sowie Ganzzellströme von sehr kleinen Zellen abzuleiten.

Anders als bei der Spannungsklemme (Voltage-Clamp) benötigt die Patch-Clamp Methode nur noch eine Messelektrode, die nicht mehr in die Zelle eingestochen, sondern auf die Zellmembran aufgesetzt wird und somit einen geschlossenen Stromkreis mit der Zelle bildet. Dafür wird die Messelektrode (Mikropipette/Patch-Pipette) aus einer Glaskapillare hergestellt, welche unter Hitzezufuhr auseinandergezogen wird, sodass ihr Durchmesser ca. 1  $\mu\text{M}$  beträgt und der elektrische Widerstand im  $\text{M}\Omega$  Bereich liegt. Sie wird mit einer leitfähigen Lösung befüllt und der elektrische Kontakt zum Vorverstärker wird über einen chlorierten Silberdraht, welcher in die Lösung getaucht wird, hergestellt. Als Referenzelektrode in der Badlösung, mit welcher die Zellen umspült werden, dient eine weitere Silberdraht-Elektrode. Mittels eines Mikromanipulators wird die Messelektrode in der Nähe der Zellmembran positioniert und durch das Anlegen eines leichten Unterdrucks angesaugt. Die Öffnung der Pipette wird dicht verschlossen und es entsteht eine stabile Verbindung zwischen Glaswand und Membran, welche Abdichtwiderstände von bis zu 100  $\text{G}\Omega$  zwischen Bad und Pipette erreicht. Der auch als „*Gigaseal*“ bezeichnete Zustand reduziert das Hintergrundrauschen und gewährleistet die extrem hohe Auflösung der Messung. Es ist darauf zu achten, dass keine sogenannten „Leckströme“ zwischen der Membran und der Pipette fließen, da sie zu systematisch erhöhten Werten führen würden. Wird der Membranfleck unter der Pipette durch einen starken Unterdruck zerstört, befindet man sich im Whole-cell Modus. In dieser Konfiguration wird der Strom durch die gesamte Zellmembran gemessen und entspricht der konventionellen intrazellulären Ableitung.

Wie auch bei der Spannungsklemme basiert das Messprinzip der Patch-Clamp Technik darauf, Änderungen des Membranpotentials zu verhindern, um den dazu notwendigen Kompensationsstrom zu messen. Durch die Bildung eines geschlossenen Stromkreises zwischen Mess- und Badelektrode über die Zelle kann der Membran vom Vorverstärker eine gewünschte Sollspannung vorgegeben werden. Ändert sich die tatsächliche Membranspannung durch



Ladungsbewegungen in Form von Ionen entlang geöffneter Kanäle, registriert der Vorverstärker die entstandene Potentialdifferenz und funktioniert als Strom-Spannungs-Wandler. Über einen negativen Rückkopplungsmechanismus wird ein entgegengerichteter Strom von gleicher Stärke vom Operationsverstärker (Teil des Vorverstärkers) durch die Messelektrode in die Zelle injiziert, um zurück zur Sollspannung zu gelangen. Dieser Kompensationsstrom lässt Rückschlüsse auf die Leitfähigkeit der Membran zu, die unmittelbar von den Ionenkanälen beeinflusst wird. Ein schematischer Schaltkreis eines Patch-Clamp Vorverstärkers in der Whole-cell Konfiguration ist in **Abbildung 9** dargestellt.



**Abbildung 9: Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp Vorverstärkers in Whole-cell Konfiguration**

Die Messelektrode innerhalb der Patch-Pipette ist mit dem Vorverstärker verbunden. Seine wichtigsten Elemente sind der Operationsverstärker, an dessen Eingängen die Spannung der Pipette ( $U_{\text{Pipette}}$ ) und die vorgegebene Sollspannung ( $U_{\text{Soll}}$ ) anliegen, und der Rückkopplungswiderstand. Der Operationsverstärker liefert am Ausgang eine Spannung, die proportional der Potentialdifferenz zwischen  $U_{\text{Pipette}}$  und  $U_{\text{Soll}}$ , aber sehr viel größer, ist. Über den Feedback-Mechanismus des Rückkopplungswiderstandes wird die Potentialdifferenz solange durch eine Strominjektion von der Messelektrode kompensiert, bis  $U_{\text{Pipette}}$  und  $U_{\text{Soll}}$  ausgeglichen sind. Durch den zweiten Differenzverstärker wird  $U_{\text{Soll}}$  von der gemessenen Potentialdifferenz abgezogen und das Ausgangssignal wird an die Steuereinheit des Verstärkers weitergeleitet, wo es in den entsprechenden Strom umgerechnet wird.

Neben der Whole-cell Konfiguration, bei der die Summe aller Ionenbewegungen über die Plasmamembran abgeleitet wird, gibt es noch weitere Messmöglichkeiten. Unmittelbar nach Erreichen des Gigaseals befindet man sich in der Cell-attached Konfiguration. Die Zelle ist intakt und es können Ionenkanäle innerhalb des kleinen Membranflecks (Patch) unterhalb der Pipette untersucht werden. Die physiologischste Konfiguration bringt allerdings auch Messunsicherheiten mit sich, da keine direkte Bestimmung des Membranpotentials und folglich keine Möglichkeit der Kontrolle erlaubt. Einzelkanalmessungen werden durch das Heraustrennen eines Membranflecks

ermöglicht, ohne dass dieser dabei zerstört wird. Die Inside-out Konfiguration erreicht man durch das Zurückziehen der Pipette im Cell-attached Modus. Somit ist die zytoplasmatische Seite der Zellmembran in Richtung der Badlösung exponiert. Andersherum ist in der Outside-out Konfiguration die Außenseite der Zellmembran der Badlösung zugewandt. Erreicht wird der Zustand durch langsames Abziehen der Pipette im Whole-cell Modus, wodurch sich ein Stück der Membran von der Zelle ablöst und die Pipettenmündung umstülpt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ausschließlich im Whole-cell Modus gemessen, der neben der Voltage-Clamp Messung auch eine Current-Clamp Konfiguration (Stromklemme) zulässt. Um Potentialänderungen von erregbaren Zellen abzuleiten, kann im Current-Clamp der Stromfluss durch die Membran vorgeben und das variabel angepasste Potential bestimmt werden. Durch die gezielte Injektion von unterschiedlich langen und hohen Strompulsen können verschiedene Parameter einzelner Aktionspotentiale und die allgemeine neuronale Erregbarkeit untersucht werden.

### 2.3.2 Setup

Um mechanische Erschütterungen zu vermeiden, waren das inverse Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200, Zeiss), der Mikromanipulator, an den der Vorverstärker mit Pipettenhalter und Patch-Pipette (PatchStar, Scienetifica) angeschlossen ist, und die Messkammer auf einem schwingungsgedämpften und luftgefederten Tisch angebracht. Alle Komponenten waren von einem Faraday'schen Käfig umgeben, damit äußere elektrische Felder abgeschirmt und das Signal-Rausch-Verhältnis optimiert wurde. Mit Hilfe des Mikromanipulators (mechanisch und motorisiert) wurde die präzise Steuerung und Positionierung der Patch-Pipette ermöglicht. Die Zu- und Ablaufvorrichtung an der Messkammer erlaubten in Kombination mit einer Peristaltikpumpe (LabS3, Innofluid) eine kontinuierliche Perfusion der Zellen mit der Badlösung (Normal-Tyrode), welche von einer Membranpumpe (Modell 850, SCHEGO) abgesaugt wurde. Der an den Vorverstärker angeschlossene Hauptverstärker (EPC 9, HEKA Elektronik) gewährleistete die Verstärkung und Filterung des Signals und umfasste die Bedienoberfläche. Die Herstellung der Patch-Pipetten erfolgte durch das Auseinanderziehen von Glaskapillaren mit Hilfe eines Kapillaren-Ziehgeräts (P-97, Sutter Instrument) unter Hitzezufuhr. Geeignete Patch-Pipetten sind essentiell für das Gelingen einer Gigaseal-Bildung und wurden daher immer am jeweiligen Versuchstag frisch hergestellt. Befüllt wurden sie mit einer sterilfiltrierten, isoosmolaren Elektrolytlösung, die an das intrazelluläre Milieu von Zellen angepasst war. Die Zusammensetzung der verwendeten intrazellulären Lösung sowie der Normal-Tyrode sind der **Tabelle 2** zu entnehmen. Alle Messungen wurden mit der Software Patchmaster, Version 2x19 (HEKA Elektronik) durchgeführt.

### 2.3.3 Messungen an HEK-Slack Zellen

Hinsichtlich unterschiedlicher pharmakologischer sowie -pharmakokinetischer Fragestellungen wurden die neun interessantesten Testsubstanzen mit Slack-aktivierenden Eigenschaften nach der Untersuchung der Struktur-Wirkungsbeziehung im FluxOR-Assay ausgewählt und elektrophysiologisch charakterisiert. Dafür wurden Voltage-Clamp Messungen in der Whole-cell Konfiguration an HEK-Slack Zellen durchgeführt, um Veränderungen in der Stromantwort und das Maß der Slack-Aktivierung nach Stimulation mit den Testsubstanzen zu ermitteln.

Die Zellen wurden, wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben, auf PDL-beschichtete Glasplättchen (Durchmesser 10 mm) ausgesät und am Folgetag adhärent gepatcht. Die Messungen der Testsubstanzen VH408, VH423, VH425 und VHP93 sowie teilweise der Positivkontrolle Loxapin wurden von Maureen Hebchen im Rahmen ihrer Masterarbeit am Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie (Goethe-Universität Frankfurt) durchgeführt. Ein mit Zellen besätes Glasplättchen wurde in die Messkammer gelegt und kontinuierlich mit der Badlösung (Normal-Tyrode) durch eine Mehrkanal-Peristaltikpumpe umspült. Glaspipetten mit einem Widerstand von 7 – 9 M $\Omega$  wurden unmittelbar vor der Messung frisch hergestellt. Mit Hilfe des Mikromanipulators wurde zunächst die Cell-Attached Konfiguration erzeugt und nach Erreichen des Gigaseals in den Whole-Cell Modus mit einem Kommandopotential von -70 mV gewechselt.

Zuerst wurde die basale Slack-abhängige Stromantwort der Zelle auf einen 500 Millisekundenlangen Depolarisationsreiz von +80 mV (Testpuls-Protokoll) gemessen. Danach wurde durch das Anlegen von Testpulsen in 20 mV Intervallen, die von -120 bis +120 mV reichten, eine Strom-Spannungskurve (IV) ausgelöst. Die Ströme wurden mit 20 kHz aufgenommen und mit 5 kHz gefiltert. Im Anschluss wurde die Peristaltikpumpe ausgeschaltet und die Zelle während einer Testpuls-Messung mit der Testsubstanz stimuliert. Dafür wurden 100  $\mu$ l einer 8-fach konzentrierten Lösung (Volumen in der Messkammer wurde auf ca. 700 – 800  $\mu$ l eingestellt) der entsprechenden Testsubstanz vorsichtig in die Kammer pipettiert, sodass die Endkonzentration in der Kammer 25  $\mu$ M oder 50  $\mu$ M betrug. Nachdem das Maximum der Stromantwort während der Testpuls-Messung erreicht war, wurde erneut eine Strom-Spannungskurve aufgenommen. Bei stabil geklemmten Zellen wurde im Anschluss die Peristaltikpumpe wieder angeschaltet und die Dauer ermittelt, bis die Stromantwort wieder auf Baseline-Niveau abgefallen war (Washout). Des Weiteren wurden an jedem Versuchstag einige Zellen mit Loxapin als Positivkontrolle und mit dem Vehikel als Negativkontrolle stimuliert. Die Konzentrationen wurden weitestgehend an das Setting des FluxOR-Assays angepasst. Als Vehikel diente Normal-Tyrode mit 0,24 % DMSO, sodass sich bei einer Verdünnung von 1:8 die Endkonzentration von 0,03 % DMSO in der Messkammer ergab.

Um zu ermitteln, ob diese Methodik ebenfalls für die Untersuchung von Dosis-Wirkungs-Beziehungen geeignet ist und ergänzende EC<sub>50</sub>-Bestimmungen zu den FluxOR-Assay Messungen möglich sind, wurden verschiedene Konzentrationen Loxapin getestet. Dieser Versuchsteil wurde von Maureen Hebchen durchgeführt.

### 2.3.4 Messungen an DRG-Neuronen

Die lumbalen Spinalganglien (L1 – L5) von C57BL/6N-Mäusen wurden, wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, entnommen und aufbereitet, um verschiedene Fragestellungen zu untersuchen. Zum einen sollte festgestellt werden, ob sich der Effekt der Slack-Aktivierung über einen Anstieg des Kaliumausstroms aus den DRG-Neuronen überhaupt quantifizieren lässt, da eine Vielzahl von Kaliumkanälen in sensorischen Neuronen exprimiert sind und zum Ausmaß des Kaliumstroms beitragen. Dafür wurden Voltage-Clamp Messungen an IB4-positiven DRG-Neuronen am Tag der Isolation von Maureen Hebchen durchgeführt. Die dissoziierten Neurone wurden in die Messkammer pipettiert und für mindestens eine Stunde inkubiert, um ihr Adhären an den Kammerboden zu gewährleisten. Das weitere Messvorgehen wurde wie bei den HEK-Slack Zellen beschrieben durchgeführt. Nach Erreichen der Whole-cell Konfiguration wurde sowohl der basale Strom als auch die Stromantwort nach Zugabe von 50 µM Loxapin bzw. Vehikel gemessen.

Zum anderen sollten die Effekte von Slack-Aktivatoren auf die Erregbarkeit von DRG-Neuronen charakterisiert werden, da eine Reduktion der neuronalen Erregbarkeit mit analgetischen und/oder antipruritischen Eigenschaften assoziiert sein können. Um die dissoziierten DRG-Neurone zu sensibilisieren, wurden sie über Nacht in einer „inflammatorischen Suppe“ inkubiert. Am Folgetag wurde nach der Inkubation mit IB4 das Deckgläschen mit den adhären DRG-Neuronen in die Messkammer überführt und wie zuvor die HEK-Slack Zellen mit Normal-Tyrode zwischen den Messungen umspült. Nach Ausbildung eines Gigaseals und Erreichen der Whole-cell Konfiguration wurde in den Current-Clamp Modus gewechselt. Durch die gezielte Injektion einer bestimmten Strommenge wurde das Ruhemembranpotential auf ca. -60 mV gebracht. Dann wurden zunächst Baseline-Messungen durchgeführt. Evozierte Aktionspotentiale wurden durch niedrige Strominjektionen beginnend von 0 pA in 20 pA-Intervallen über eine Dauer von 10 Millisekunden ausgelöst. Im Anschluss wurde getestet, ob die Zelle während eines längeren Stimulus ein neuronales Feuern zeigt, welches durch die Bildung von mehreren Aktionspotentialen hintereinander charakterisiert ist. Dafür wurden einsekündige depolarisierende Strompulse (200 – 950 pA in 150 pA-Intervallen) injiziert. Nur wenn das Neuron feuerte wurde der Versuch fortgesetzt und die Zelle mit 50 µM Loxapin, 50 µM VH425 oder Vehikel für mindestens 30 Sekunden inkubiert.

Im Anschluss wurden erneut evozierte Aktionspotentiale und das neuronale Feuern gemessen. Bei stabil geklemmten Neuronen wurde danach die Peristaltikpumpe wieder angeschaltet (Washout) und getestet, ob und wie lange nach dem Washout die Zelle wieder Aktionspotentiale bilden kann.

### 2.3.5 Auswertung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software Fitmaster, Version 2x91 (HEKA Elektronik), Excel 2016 (Microsoft Office) und GraphPad Prism, Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). Bei allen Voltage-Clamp Messungen wurde die resultierende Stromantwort (pA) einer Strom-Spannungskurve zur Berücksichtigung der Zellgröße auf die Zellkapazität (pF) normiert, um die Stromdichte (pA/pF) zu erhalten. Zur Vergleichbarkeit der Effekte der Testsubstanzen miteinander, wurde der relative Anstieg der Stromdichte nach Stimulation mit einer Testsubstanz bezogen auf die basale Stromdichte bei + 80 mV kalkuliert. Ergab sich für den relativen Stromanstieg ein Wert unterhalb von eins wurde die Messung ausgeschlossen, da hier von einer fehlerhaften Durchführung auszugehen ist. Zur Ermittlung der mittleren effektiven Konzentration von Loxapin wurde der relative Anstieg der Stromdichte gegen die logarithmierte Konzentration aufgetragen und wie in Kapitel 2.2.6 beschrieben eine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellt.

Bei Current-Clamp Messungen wurde zunächst die neuronale Erregbarkeit in Form der Anzahl an gebildeten Aktionspotentialen quantifiziert. Es wurden nur Zellen in die Analyse eingeschlossen, die basal ein stabiles neuronales Feuern zeigten. Die Anzahl an Aktionspotentialen während der Baseline-Messung und nach Inkubation mit der Testsubstanz bei gleichem pA-Intervall wurde gezählt. Als Rheobase wird die minimale Reiz- bzw. Stromstärke bezeichnet, welche gerade noch zur Bildung eines Aktionspotentials führt. Dafür wurde das Stromintervall, welches das erste stabil evozierte Aktionspotential ausgelöst hat, jeweils vor und nach Applikation der Testsubstanzen bestimmt. Bei den jeweils entsprechenden Sweeps konnten mittels Fitmaster weitere elektrophysiologische Parameter wie das Ruhemembranpotential, die Amplitude, die Zeit bis zum maximalen AP-Anstieg, die Anstiegszeit und die AP-Dauer bzw. die Dauer bis zur 90 %igen Repolarisation (APD90) kalkuliert werden.

## 2.4 Tierexperimentelle Methoden

### 2.4.1 Versuchstiere

Alle im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen tierexperimentellen Versuche erfolgten gemäß den Guidelines der „*International Association for the Study of Pain*“ sowie den ARRIVE-Richtlinien (Animal Research: Reporting on In Vivo Experiments). Die Versuche wurden von der zuständigen Behörde, dem Regierungspräsidium Darmstadt, begutachtet sowie genehmigt. Alle Verhaltensversuche wurden während des Hell-Zyklus eines Tages bei Raumtemperatur (20 – 24 °C) durchgeführt und der/die Experimentator/in war verblindet gegenüber der Behandlung und/oder des Genotyps.

Für die Untersuchung potentiell analgetischer oder antipruritischer Effekte der Slack-Aktivatoren sowie deren Einfluss auf die Beeinträchtigung motorischer und kardiovaskulärer Funktionen *in vivo* wurden wildtypische Mäuse des Inzuchtstamms C57BL/6N verwendet. Die Tiere wurden entweder direkt von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) oder aus der hauseigenen Mauszucht (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie) bezogen und in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit kontinuierlich freiem Zugang zu Futter und Wasser *ad libitum* gehalten. Auch für die Gewebeentnahmen für die Patch-Clamp Experimente an DRG-Neuronen wurden C57BL/6N-Mäuse genutzt. Generell wurden Verhaltensversuche an Tieren im Alter von 8 – 16 Wochen durchgeführt, für die *ex vivo* Patch-Clamp-Versuche wurden nach Möglichkeit jüngere Tiere im Alter von vier bis acht Wochen verwendet.

Des Weiteren wurden zur fortlaufenden Charakterisierung der Funktionalität des Slack-Kanals im sensorischen System eine Slack-Knockout-Mauslinien verwendet. Slack-Knockout- ( $Slack^{-/-}$ ) sowie Wildtyp-Mäuse (Lu et al. 2015) wurden von Prof. Dr. Robert Lukowski, Prof. Peter Ruth und Dr. Anne E. Bausch (Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Universität Tübingen) zur Verfügung gestellt. Für die Zucht von Knockout-, Wildtyp- und heterozygoten Wurfgeschwister wurden heterozygote Slack-Tiere ( $Slack^{+/-}$ ) miteinander verpaart.

Grundsätzlich wurde darauf geachtet, bei möglichst allen Verhaltensversuchen Tiere beider Geschlechter sowie bei den Knockout-Linien Wurfgeschwister zu verwenden.

### 2.4.2 Genotypisierung

Um die Genotypen der Mäuse einer Mauslinie zu bestimmen, wurden Biopsien verwendet, welche bei der Ohrlochmarkierung anfallen. Für die DNA-Extraktion wurde das Gewebe zunächst mit 50 µl Lyse-Puffer und 1 % Proteinase K versetzt und über vier Stunden bis über Nacht bei 55 °C und 550 rpm inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinkinase K wurde der Ansatz nach erfolgreicher Lyse für

30 Minuten bei 95 °C inkubiert und danach bei 13.000 g für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entweder direkt weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert. Für die anschließende Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde ein RedTaq Mastermix (2X) (Genaxxon bioscience) verwendet, der eine Taq-Polymerase und Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) enthält. Die exponentielle Amplifikation eines gezielten DNA-Abschnitts, der durch spezifische Primer von beiden Seiten flankiert wird, erfolgt über das zyklische Denaturieren des Doppelstrangs, der Hybridisierung der Primer-Paare und der Elongation durch die Polymerase. Dabei ist die optimale Hybridisierungstemperatur abhängig von der Schmelztemperatur der Primer und die Länge der zu vervielfältigenden DNA-Abschnitte bestimmt die Polymerisationszeit.

Um die PCR-Produkte nach ihrer Bandengröße zu separieren, erfolgte im Anschluss eine Agarose-Gelelektrophorese in TBE-Puffer bei 120 V. Die Amplifikate wurden auf ein mit ROTI®GelStain (Carl Roth) versetztes 2 %iges Gel aufgetragen und die DNA-Banden im UV-Licht durch einen ChemiDoc™ UV-Scanner (Bio-Rad, Hercules) analysiert. Die Zusammensetzung des Genotypisierungsansatzes, die verwendeten Primer sowie das PCR-Temperaturprogramm sind im Folgenden aufgeführt.

<b>Genotypisierungsansatz:</b>	je 1,5 µl	Primer (10 µM)
	10 µl	REExtract
	4 µl	DNA-Extrakt
	ad 20 µl	Gereinigtes Wasser

**Tabelle 7:** Verwendete Primer mit erwarteten Bandengrößen

Nachgewiesenes Gen	Primersequenz	Fragmentgröße
Slack	Fwd 5'-agg ggc tga gag ggg tct cg-3'	WT 277 bp
	Rew 5'-tgg gta ggg ctg cca caa gc-3'	Flox 392 bp
	Rew 5'-gcc aca atc tgt tcc ttg gca c-3'	KO 210 bp

**Tabelle 8:** PCR-Temperaturprogramm

Slack		
Temperatur	Zeit (mm:ss)	Zyklen
95 °C	03:00	1
95 °C	00:30	30
59,7 °C	00:30	
72 °C	00:30	1
72 °C	05:00	
4 °C	∞	

### 2.4.3 Gewebeentnahme

Zur DRG-Entnahme für die anschließenden *ex vivo* Patch-Clamp Experimente wurden C57BL/6N-Mäuse in einer CO<sub>2</sub>-Kammer getötet und anschließend zervikal disloziert. Mit Hilfe eines Skalpells wurde der Rücken geöffnet, die Wirbelsäule freipräpariert und zwischen T1 – T5 durchtrennt. Die Wirbelbögen wurden in kaudaler Richtung seitlich geöffnet, um das Rückenmark frei zu präparieren und im Anschluss zu entfernen. Die Spinalganglien (L1 – L6) wurden entnommen und in 10 ml gekühlter HBSS bis zur weiteren Verwendung (siehe Kapitel 2.2.2) aufbewahrt.

### 2.4.4 Ermittlung von pharmakokinetischen Eigenschaften ausgewählter Slack-Aktivatoren

Die pharmakokinetischen Eigenschaften der Slack-Aktivatoren Loxapin, VH425 und EN12 wurden extern über eine Auftragsstudie von Enamine/Bienta (Kiew, Ukraine) ermittelt. Das Studiendesign, die Auswahl der Tiere, Handhabung und Behandlung entsprachen den Enamine-PK-Studienprotokollen und den „Institutional Animal Care and Use Guidelines“. Die Behandlung der Tiere und die Vorbereitung der Proben wurden von den Mitarbeitern des Tierlabors bei Enamine/Bienta durchgeführt. Für alle Versuche wurden männliche C57BL/6J-Mäuse (12 – 16 Wochen alt, 19,5 – 28,2 g Körpergewicht) verwendet. Die Tiere wurden vor den Studien nach dem Zufallsprinzip den Behandlungsgruppen zugewiesen und alle Tiere wurden vor der Verabreichung 4 Stunden lang nüchtern gehalten. Für den intravenösen (i.v.) und peroralen (p.o.) Applikationsweg wurden jeweils sechs Zeitpunkte (intravenös: 5, 15, 30, 60, 120 und 240 Minuten; peroral: 15, 30, 60, 120, 240 und 480 Minuten), für den intraperitonealen (i.p.) Applikationsweg fünf Zeitpunkte (15, 30, 60, 120 und 240 Minuten) festgelegt. Jede der Behandlungsgruppen zu den einzelnen Zeitpunkten umfasste 3 Tiere. Außerdem gab es jeweils eine Kontrollgruppe mit einem Tier. Die Dosierung erfolgte nach dem **Tabelle 9** dargestellten Behandlungsschema, als Vehikel wurde 25 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl verwendet.

**Tabelle 9:** Behandlungsschema der C57BL/6J-Mäuse in den pharmakokinetischen Studien

	intravenös		peroral		intraperitoneal		
Slack-Aktivator	VH425	EN12	VH425	EN12	VH425	EN12	Loxapin
Dosis (mg/kg)	1	1	10	10	10	10	2,5



## **2.4.5 Methoden zur Evaluation der motorischen Fähigkeiten nach Applikation der Testsubstanzen**

Die Verfahren zur Untersuchung des Schmerz- und Juckreizverhaltens setzen eine intakte Motorik der Versuchstiere voraus, sodass beispielsweise das reflexartige Wegziehen der Hinterpfote nach einem Stimulus uneingeschränkt ausgeführt werden kann. Sollten die motorischen Fähigkeiten nach Applikation der Testsubstanzen beeinträchtigt werden, so ist eine korrekte Interpretation der Verhaltensversuche nicht mehr möglich. Daher wurde die motorische Konstitution der Versuchstiere nach intraperitonealer Applikation aller *in vivo* untersuchten Testsubstanzen in jeweils den höchsten verwendeten Dosierungen in folgenden Modellen untersucht.

### **2.4.5.1 Rotarod-Test**

Der Rotarod-Test besteht aus einer sich rotierenden Stange (RotaRod; Ugo Basile), auf welche die Mäuse gesetzt werden. Durch das Laufen entgegen der Rotationsbewegung können sich die Versuchstiere auf der Stange halten. Es wird die Verweildauer und/oder die Rotationsgeschwindigkeit ermittelt, bei der die Maus herunterfällt. Der Test dient der Überprüfung von motorischer Koordinations- und Balancefähigkeit sowie der Greifkraft und ist besonders sensitiv, um Dysfunktionen im Zerebellum festzustellen (Shiotsuki et al. 2010).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Variante des Rotarod-Tests durchgeführt, bei der sich die Stange gleichmäßig innerhalb von 300 Sekunden von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute beschleunigt. Die Mäuse wurden an mindestens vier bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen an die Versuchsapparatur trainiert. Es wurden nur Tiere in das Experiment eingeschlossen, welche die 300 Sekunden erreichten, ohne herunterzufallen. Am Versuchstag wurde morgens eine Baseline-Messung durchgeführt, dann wurde den Mäusen die Testsubstanz oder Vehikel i.p. appliziert und nach 15 und 45 Minuten die Verweildauer auf dem Rotarod bestimmt. Die Sensitivität für motorische Defizite ist bei dieser Variante des Rotarod-Tests im Vergleich zu einem Setup mit konstanter Umdrehungsgeschwindigkeit erhöht (Shiotsuki et al. 2010; Yin et al. 2009).

### **2.4.5.2 Vertical Pole Test**

Der Vertical Pole Test untersucht Beeinträchtigungen der Bewegungsinitiation und -abläufe, welche überwiegend durch die Basalganglien gesteuert werden (Matsuura *et al.*, 1997; Fernagut *et al.*, 2003). Er umfasst einen vertikal aufgerichteten Stab (Durchmesser 1 cm, Höhe 40 cm), welcher mittig in einem Haltungskäfig mit Einstreu positioniert wird. Um die Grifffähigkeit der Maus am Stab zu erhöhen, wurde dieser mit einer rauen Beschichtung aus Viskosefasergewebe umwickelt. Die Maus wird am oberen Ende des Stabs seitlich mit dem Kopf nach oben platziert und es wird die Zeit

bis zur Abwärtsausrichtung des Tieres sowie die Dauer bis zum Erreichen des Bodens gemessen. Dabei gilt als Endpunkt das Aufsetzen beider Hinterbeine der Maus auf dem Boden. Es wurden sowohl für die Baseline-Messung als auch 15 und 45 Minuten nach Applikation der Testsubstanzen oder Vehikel jeweils drei Versuche unmittelbar hintereinander durchgeführt und der Mittelwert aus allen Messungen gebildet. Bei einer Verweildauer am Stab von mehr als 20 Sekunden wurde der Versuch abgebrochen.

### **2.4.5.3 Open Field Test**

Der Open Field Tests ist ein weitverbreitetes Verfahren, um das lokomotorische, explorative sowie das Ängstlichkeitsverhalten von Nagetieren zu untersuchen. Insbesondere durch Wirkstoffe hervorgerufene motorische, sedierende oder anxiolytische Effekte lassen sich durch Änderungen im Verhalten der Tiere gut charakterisieren. Die im Rahmen dieser Arbeit für Mäuse ausgerichtete Versuchsanordnung besteht aus einer nach oben offenen, grauen und quadratischen Kunststoffbox mit einer Kantenlänge von 49 cm. Fünfzehn Minuten nach Applikation der Testsubstanzen oder des Vehikels wurden die Mäuse einzeln in die rechte untere Ecke der Box gesetzt und über 30 Minuten ihr Bewegungsverhalten von oben mit einer Videokamera aufgezeichnet. Mittels einer Software (VideoMot2, TSE Systems) wurden die Lokomotionszeit, die durchschnittliche Geschwindigkeit sowie die Aufenthaltsdauer am Rand und in der Mitte der Box aufgezeichnet und analysiert. Das Verhalten der Mäuse im Open Field Test unterliegt starken Gewöhnungseffekten an die neue Umgebung und beginnt bereits innerhalb der ersten Minuten (Bolivar et al. 2000). Daher wurde der Test mit jedem Versuchstier nur einmal durchgeführt.

### **2.4.6 Pulsoxymetrie-Messung zur Quantifizierung kardiovaskulärer Effekte der Testsubstanzen**

Die Pulsoxymetrie ist ein nicht-invasives Verfahren, welches standardmäßig der Ermittlung der Sauerstoffsättigung im arteriellen Blut sowie der Bestimmung der Herzfrequenz dient. Das photometrische Messprinzip basiert auf den unterschiedlichen Lichtabsorptionsspektren von oxygeniertem zu desoxygeniertem Hämoglobin. Von zwei Leuchtdioden (LEDs) wird Licht der Wellenlängen 660 nm (Absorptionsmaximum Desoxyhämoglobin) und 940 nm (Absorptionsmaximum Oxyhämoglobin) emittiert. Es durchdringt das Gewebe, bis seine Intensität auf der gegenüberliegenden Seite von einer Photodiode detektiert wird.

Zur pulsoxymetrischen Messung an Mäusen wurde das MouseOX<sup>®</sup> Plus Gerät (STARR Life Sciences<sup>®</sup> Corp.) entwickelt, welches im Rahmen dieser Arbeit in der Version zur Messung an wachen Tieren verwendet wurde. Dafür wurden Sensor-Clips genutzt, welche am Hals der Tiere angebracht

werden, während diese sich frei bewegen können. Somit können die arterielle Sauerstoffsättigung, die Herzfrequenz sowie die Atmungsfrequenz ermittelt werden. An vier bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen vor der Messung wurden die Tiere für jeweils 30 Minuten an die Sensor-Clips gewöhnt. Um die Sensitivität des Sensors zu erhöhen, sollten Mäuse mit dunklem Fell im Hals- und Nackenbereich rasiert werden. Da für die Ermittlung der kardiovaskulären Effekte der Testsubstanzen ausschließlich C57BL/6N-Mäuse verwendet wurden, erfolgte einen Tag vor der ersten Gewöhnung eine Rasur im Bereich des Nackens in kurzzeitiger Isofluran-Narkose. Im Anschluss wurde auch das Fell im seitlichen und unteren Bereich des Halses mittels einer Enthaarungscreme (Veet) entfernt. Am Versuchstag wurden die Tiere zunächst für 30 Minuten an den Sensor-Clip und die Versuchsapparatur gewöhnt. Diese besteht aus einem zylinderförmigen Haltungskäfig, welcher nach oben hin mit einem Kommutator verbunden ist. Dadurch wird die Entwindung des austretenden Sensorkabels gewährleistet. Nach der Gewöhnung wurde eine Baseline-Messung über 15 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurden die Testsubstanzen oder Vehikel intraperitoneal appliziert und für 30 Minuten die kardiovaskulären Funktionen gemessen. Da die Tiere unmittelbar nach jedem erneuten Anlegen des Sensor-Clips sehr unruhig waren und starke Bewegungen zu Artefakten in der Messung führen, wurden die ersten fünf Minuten jedes Datensets ausgeschlossen. Die Messpunkte wurden in einer Frequenz von 1 Hz aufgenommen und gemäß der Angaben des Herstellers von Messfehlern mit Hilfe von MATLAB (Version R2019b) bereinigt. Es wurden die Mittelwerte aller resultierenden Datenpunkte über 5-Minuten-Intervalle berechnet.

### **2.4.7 Methoden zur Quantifizierung antinozizeptiver Effekte der Testsubstanzen**

#### **2.4.7.1 Dynamic Plantar Aesthesiometer**

Mittels des Dynamic Plantar Aesthesiometers (DPA, Ugo Basile, Comerico, Italien) wird die mechanische Sensitivität einer Hinterpfote quantifiziert. Zunächst wurden die Mäuse an die Versuchsapparatur gewöhnt. Dafür wurden sie mindestens 45 Minuten vor Messbeginn auf ein engmaschiges Metallgitter unter ein Glas gesetzt, welches das Weglaufen verhinderte. Ein dünnes Filament aus Edelstahl (Durchmesser 0,5 mm) wurde mit ansteigender Kraft (0,5 g/s) von unten an die plantare Seite einer Hinterpfote appliziert. Nach 10 Sekunden wird die maximale Kraft von 5 g erreicht und danach konstant gehalten. Es wurde die Zeit bis zum reflexartigen Wegziehen der Hinterpfote ermittelt (Latenzzeit), welches die Stimulation beendet. Jede Hinterpfote wurde mit einem Mindestabstand von 20 Sekunden vier bis fünf Mal gemessen und aus den Werten ein Mittelwert gebildet. Zeigte ein Tier nach 20 Sekunden keine Reaktion, wurde der Versuch beendet

und der Wert aus der Analyse ausgeschlossen (Kallenborn-Gerhardt et al. 2012; Schmidtko et al. 2008).

#### **2.4.7.2 Von Frey-Filamente**

Die von Frey-Filamente stellen eine Methode zur Quantifizierung taktiler mechanischer Sensitivität dar und können als Surrogatparameter für das Auftreten einer Allodynie oder einer Hyperalgesie dienen. Sie bestehen aus einem Set von Monofilamenten unterschiedlicher Stärke, bei der die jeweils kalibrierte Kraft erst vollständig appliziert wird, sobald sich das Filament biegt.

Zur Bestimmung der Allodynie bzw. Hyperalgesie wurden die Versuchstiere zunächst auf ein engmaschiges Metallgitter gesetzt und für mindestens 30 Minuten akklimatisiert. Dann erfolgten jeweils 10 Stimulationen der Hinterpfoten mit neun Filamenten der Stärke 0,04 g – 4 g oder mit nur einem dünnen (0,07 g), mitteldicken (0,6 g) und dicken (1,4 g) von Frey-Filament (Delfini et al. 2013; François et al. 2015). Jedes Filament wurde für eine Sekunde an der Hinterpfote appliziert und der prozentuale Anteil an positiven Reaktionen an der Gesamtzahl der Stimulationen pro Filament berechnet. Als positive Reaktion wurde das reflexartige Wegziehen, Lecken oder Schütteln der Hinterpfote gewertet (Dixon, 1965; Chaplan et al., 1994).

#### **2.4.7.3 Hargreaves-Test**

Der Hargreaves-Test dient der Quantifizierung der thermischen Sensitivität der Hinterpfoten (Hargreaves et al. 1988). Zunächst wurden die Versuchstiere auf einer beheizten Plexiglasplatte (32 °C) in Plexiglaskammern für 30 Minuten akklimatisiert. Dann wurde mittels eines Hargreaves-Aesthesiometers (IITC Life Science) die basale thermische Schmerzschwelle bestimmt und 15 Minuten nach i.p. Applikation von VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel erfolgte eine zweite Messung. Die Wärmequelle wurde so unter der Glasplatte platziert, dass die plantare Seite einer Hinterpfote mit dem Infrarotlicht (Intensität 25) stimuliert werden konnte. Die Zeit bis zum reflexartigen Wegziehen der Hinterpfote wurde bestimmt und der Hitzestimulus sofort beendet. Jede Hinterpfote wurde vier bis fünf Mal mit einem Mindestabstand von 20 Sekunden gemessen und die Werte gemittelt. Zeigte ein Tier nach 20 Sekunden keine Reaktion, wurde der Versuch beendet und der Wert aus der Analyse ausgeschlossen.

## 2.4.8 Schmerzmodelle

### 2.4.8.1 Spared nerve injury (SNI)-Modell der peripheren Nervenverletzung

Mit dem Modell der *Spared nerve injury* wird eine konstant anhaltende Neuropathie induziert, in dem zwei Äste des *Nervus ischiadicus* durchtrennt werden, während der dritte Ast (*Nervus suralis*) intakt bleibt (Decosterd and Woolf, Pain 2000). Dadurch entwickelt sich eine mechanische Allodynie der lateralen, durch den *Nervus suralis* innervierten Seite der operierten Hinterpfote. Das Ausmaß sowie analgetische Effekte von Testsubstanzen auf die Allodynie können mit unterschiedlichen Methoden quantifiziert werden.

Zunächst wurden die Versuchstiere präoperativ mit Carprofen (5 mg/kg) subkutan analgesiert und 30 Minuten später wurde mit inhalativem Isofluran (3 – 4 Vol.-% Einleitung, 2 – 3 Vol.-% Aufrechterhaltung) die Narkose eingeleitet. Zur Reduktion des akuten Operationsschmerzes wurde nach dem Einleiten ein Lokalanästhetikum (Emla Creme mit 2,5 % Lidocain + 2,5 % Prilocain) auf die rasierte Haut aufgetragen. Durch einen ca. 1 cm langen Hautschnitt auf Höhe des Kniegelenks und einer stumpfen Präparation des *Musculus biceps femoris* wurde der *Nervus ischiadicus* freigelegt. Bei dem *Nervus peroneus communis* sowie dem *Nervus tibialis* erfolgte eine Ligation mit anschließender distaler Durchtrennung. Zur Verhinderung eines erneuten Zusammenwachsens wurde zusätzlich an beiden Nervi ein etwa 2 mm langes Stück entfernt. Im Anschluss wurde mittels Wundnahtfaden (0,08 mm; FST 18020-60) der *Musculus biceps femoris* mit einer Einzelknopfnah und die Haut mit zwei bis drei Nähten verschlossen. Auf die Wunde wurde wiederum das Lokalanästhetikum appliziert, um den postoperativen Wundschmerz zu reduzieren. Die erste Quantifizierung der mechanischen Sensitivität erfolgte frühestens am siebten Tag postoperativ. An Tag 14 wurde zuerst eine Baseline-Messung durchgeführt und im Anschluss die Testsubstanzen oder Vehikel intraperitoneal appliziert sowie die mechanische Sensitivität über mehrere Stunden bis maximal 24 Stunden post-Injektion ermittelt.

### 2.4.8.2 AITC-Modell

Zur Untersuchung akuter nozizeptiver Schmerzen kann das Allylthiocyanat (AITC)-Modell verwendet werden (Han et al., Neuron 2018). AITC, der Hauptbestandteil des Senföls, wirkt agonistisch am transienten Rezeptor-Potenzial-Kationenkanal der Unterfamilie A (TRPA1), dessen Aktivierung eine direkte Stimulation sowie eine Sensibilisierung von TRPA1-positiven Nervenfasern hervorruft. Zunächst wurden die Tiere in einen Plexiglaszylinder gesetzt und für 30 Minuten an die Versuchsausrüstung gewöhnt. Danach wurde den Tieren 20 µl einer 10 mM AITC-Lösung in PBS mit 2 % DMSO mittels einer Hamilton-Spritze intraplantar in eine Hinterpfote injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurde das akute nozizeptive Verhalten für 30 Minuten mit einer Videokamera

aufgezeichnet, um die Dauer des Leckens und Beißens der Hinterpfote (Leckzeit) innerhalb von Intervallen über fünf Minuten zu bestimmen. Im Anschluss wurden die Tiere in die von Frey-Apparatur gesetzt, 30 Minuten akklimatisiert und danach wurde die mechanische Hypersensitivität mittels von Frey-Filamenten, wie in Kapitel 2.4.7.2 beschrieben, über drei Stunden quantifiziert.

## 2.4.9 Methoden zur Quantifizierung antipruritischer Effekte der Testsubstanzen

### 2.4.9.1 Akute Juckreizmodelle

Chemisch induzierter, akuter Juckreiz kann durch die Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren hervorgerufen werden (Dong and Dong 2018; Lay and Dong 2020). Die potentiell juckreizlindernden Effekte der Testsubstanzen wurden nach Applikation verschiedener Pruritogene untersucht. Zunächst wurden die Tiere mindestens zwei Tage vor dem jeweiligen Versuchsbeginn in kurzzeitiger Isofluran-Narkose im Bereich des Nackens rasiert und in die Haltungskäfige zurückgesetzt, um eventuell entstandene Hautrisse abklingen zu lassen. Am Versuchstag wurden die Tiere in einen Plexiglaszylinder gesetzt und für 30 Minuten akklimatisiert. Danach erfolgte die intraperitoneale oder perorale Applikation der Testsubstanzen oder Vehikel und 15 Minuten später wurde das jeweilige Pruritogen subkutan in die Nackenfalte injiziert. Folgende Konzentrationen und Vehikel wurden verwendet:

- Histamin: 800 µg in 20 µl 0,9 % NaCl (Hu et al. 2021)
- Chloroquin: 200 µg in 20 µl 0,9 % NaCl (Liu et al. 2009)
- LY344864: 40 µg in 20 µl PBS (Solinski et al. 2019)
- β-Alanin: 100 µg in 20 µl 0,9 % NaCl (Liu et al. 2012)
- SLIGRL-NH<sub>2</sub>: 100 µg in 20 µl 0,9 % NaCl (Kühn et al., Sci Reports 2020)

Histamin aktiviert unter anderem den H<sub>1</sub>-Rezeptor, welcher von NP2 und NP3-Populationen sensorischer Neurone (Usoskin et al. 2015) sowie nicht-neuronalen Zellen exprimiert wird. Die anderen hier verwendeten Substanzen unterliegen Histamin-unabhängigen Juckreizmechanismen. Dabei führt Chloroquin zu einer Aktivierung des MrgprA3-Rezeptors (Liu et al. 2009) und stimuliert Neurone der NP2-Population. Der selektive 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptor-Agonist LY344864 aktiviert Neurone der NP3-Population (Solinski et al. 2019) und das Peptid Ser-Leu-Ile-Gly-Arg-Leu SLIGRL-NH<sub>2</sub> führt zu einer Stimulation des Protease-aktiviertem-Rezeptors 2 (PAR<sub>2</sub>) sowie MrgprC11-Rezeptoren (Shimada et al. 2006). Die Aminosäure β-Alanin führt zu einer Aktivierung von MrgprD-Rezeptoren (Liu et al. 2012), welche von NP1-Neuronen exprimiert werden. Unmittelbar nach der Injektion der Pruritogene wurden die Tiere zurück in den Plexiglaszylinder gesetzt und das Kratzverhalten wurde

mittels einer Videokamera für 30 Minuten aufgezeichnet. Die Anzahl an Kratzreaktionen wurde in Intervallen von fünf Minuten bestimmt.

Um zu bestätigen, dass der Wirkmechanismus tatsächlich auf einer gezielten Slack-Aktivierung beruht, wurde der antipruritische Effekt der Testsubstanz VH425 in Slack-Knockout-Mäusen sowie in kombinierter Applikation mit einem Slack-Inhibitor im Chloroquin-Modell untersucht. Dafür wurde den Tieren nach der Akklimatisierungszeit im Plexiglaszylinder nacheinander im Abstand von fünf Minuten zuerst der Slack-Inhibitor (Compound 31; (Griffin et al. 2021) in einer Dosis von 30 mg/kg (gelöst in 0,9 % NaCl mit 2 % DMSO und 10 % Kolliphor® HS 15) und anschließend VH425 in 10 oder 30 mg/kg (gelöst in 0,9 % NaCl mit 10 %  $\beta$ -Cyclodextrin) intraperitoneal appliziert. Fünfzehn Minuten später wurde wie bereits beschrieben Chloroquin subkutan (s.c.) injiziert und das Kratzverhalten für 30 Minuten aufgezeichnet.

### **2.4.9.2 Chronische Juckreizmodelle**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche dermatologische Modelle zur Induktion eines chronischen Juckreizes durchgeführt. Neben dem allergischen Kontaktdermatitis- (AKD) Modell wurde ein Modell für atopische Dermatitis (AD) etabliert. In beiden Modellen wurden mindestens zwei Tage vor dem jeweiligen Versuchsbeginn die Tiere in kurzzeitiger Isofluran-Narkose im Bereich des Nackens rasiert und in die Haltungskäfige zurückgesetzt, um eventuell entstandene Hautrisse abklingen zu lassen.

Im AKD-Modell wurde die Haut der Tiere mit dem Hapten 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzol (DNFB) sensibilisiert. Dafür wurde in kurzzeitiger Isofluran-Narkose zweimal im Abstand von 14 Tagen je 100  $\mu$ l einer 0,15 %igen DNFB-Lösung in einem Gemisch aus Aceton/Olivenöl (Verhältnis 3:1) auf die rasierte Haut im Bereich des Nackens der Tiere aufgetragen (Kitamura et al., 2018). 90 Minuten nach der zweiten Sensibilisierung an Tag 14 wurden die Tiere in einen Plexiglaszylinder gesetzt und für 15 Minuten akklimatisiert. Danach erfolgte die intraperitoneale Applikation der Testsubstanzen oder Vehikel und 15 Minuten später wurde das Juckreizverhalten mittels einer Videokamera für 30 Minuten aufgezeichnet. Die Anzahl der spontanen Kratzreaktionen sowie des Kopfschüttelns wurden in Intervallen von fünf Minuten bestimmt.

Im AD-Modell wurde die Haut der Tiere mit dem Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon MC903 (Calcipotriol; 0,2 mM gelöst in 20  $\mu$ l absolutem Ethanol) jeden Morgen über sieben Tage in kurzzeitiger Isofluran-Narkose behandelt. An Tag acht wurden die Tiere in einen Plexiglaszylinder gesetzt und für 15 Minuten akklimatisiert. Danach erfolgte die intraperitoneale Applikation der Testsubstanzen oder Vehikel und 15 Minuten später wurde das Juckreizverhalten mittels einer Videokamera für 30 Minuten

aufgezeichnet. Die Anzahl der spontanen Kratzreaktionen sowie des Kopfschüttelns wurden in Intervallen von fünf Minuten bestimmt.

### 2.4.9.3 Applikation von Testsubstanzen

Um die Effekte der Testsubstanzen VHP93, VH425 und EN12 in den verschiedenen *in vivo* Modellen zu testen, wurden diese in unterschiedlichen Konzentrationen in einem Vehikel aus 10 % (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl gelöst und intraperitoneal appliziert. Für eine ausreichende Löslichkeit wurden alle Testsubstanzen als Hydrochloridsalze verwendet. In den Verhaltenstests zur Evaluierung der motorischen Fähigkeiten wurde Loxapin (als Succinatsalz) in drei Konzentrationen, gelöst in 10 % (2-Hydroxypropyl)- $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl, intraperitoneal appliziert. Alle Lösungen wurden frisch am jeweiligen Versuchstag und für ein Injektionsvolumen von 5 ml/kg KG hergestellt, sodass unabhängig der verschiedenen Konzentrationen einer Testsubstanz das zu applizierende Volumen immer gleich gehalten wurde und eine Verblindung somit gewährleistet werden konnte.

Der Slack-Inhibitor Compound 31 wurde für die Testung im Chloroquin-Modell in einem Vehikel aus physiologischer Kochsalzlösung mit 2 % DMSO und 10 % Kolliphor® HS 15 gelöst. Dafür wurde Compound 31 zunächst in dem entsprechenden Volumen DMSO angelöst, mit dem zuvor im Wasserbad erwärmten Kolliphor gevortext und im Anschluss auf das Gesamtvolumen mit der physiologischen Kochsalzlösung verdünnt.

## 2.5 Statistische Auswertung

Die Wahl der Stichprobengrößen in den Verhaltensversuchen richtete sich generell nach Erfahrungswerten und den im Tierversuchsvorhaben genehmigten Versuchstieren pro Gruppe. Die statistische Auswertung sowie die Erstellung der Abbildungen erfolgte mit der Software GraphPad Prism, Version 9.3.1 (GraphPad Software, San Diego, USA). Zunächst wurden die erhobenen Messwerte eines jeden Versuchs auf ihre Normalverteilung mittels der Testverfahren nach Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk und Anderson-Darling geprüft. Falls nicht anders angegeben wurden normalverteilte Daten als arithmetischer Mittelwert und dem Standardfehler ( $\pm$  SEM; *standard error of the mean*) oder der Standardabweichung ( $\pm$ SD, *standard deviation*) angegeben. Konnte keine Normalverteilung angenommen werden, wurden die Variablen als Median oder Box-Plots mit Interquartilsabständen (äußere Grenzen der Box) und dem Median als Querbalken innerhalb der Box dargestellt. Die Spannbreite der Messwerte wird durch die Fehlerbalken gezeigt. Sollten Unterschiede zwischen zwei Gruppen untersucht werden, bei denen die Normalverteilung



angenommen werden konnte, wurde der zweiseitige t-Test (für abhängige oder nicht-abhängige Stichproben) durchgeführt. Nicht-parametrische Daten wurden mittels des Mann-Whitney-Tests untersucht. Beim Vergleich von mehr als zwei Gruppen, die einer Normalverteilung folgten, wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit einem geeigneten Post-hoc-Test (Dunnett-Mehrhypothesentest) durchgeführt. Bei nicht-parametrischen Daten wurde der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Wurden Gruppen mit mehr als zwei Messparametern (z.B. mehr als zwei Behandlungen über mehrere Zeitpunkte) miteinander verglichen, erfolgte die Auswertung mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit oder ohne Messwiederholungen und anschließendem Post-hoc-Test (Dunnett- oder Šídák-Mehrhypothesentest). Lag bei mehr als zwei Stufen der Messwiederholungen keine Homoskedastizität vor, wurde zusätzlich eine Greenhouse-Geissner-Korrektur durchgeführt.

Für alle Tests wurde ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  festgelegt. Angaben zu den verwendeten Tests und der untersuchten Stichprobengrößen sind unter den jeweiligen Abbildungen aufgeführt.

## 3 Ergebnisse

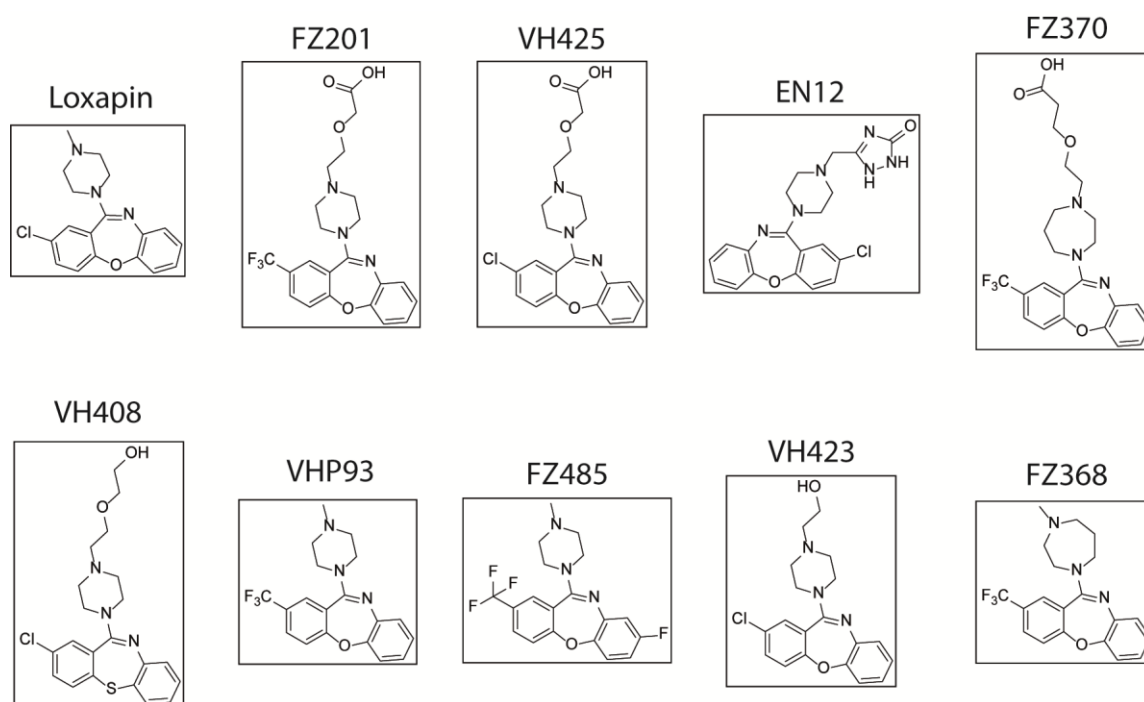
### 3.1 In-vitro-Charakterisierung neuer potentieller Slack-Aktivatoren

Als Leitstruktur für die Entwicklung neuer potentieller Slack-Aktivatoren diente das Neuroleptikum Loxapin, welches durch Biton et al. in einem High-Throughput-Screening (HTS) der LOPAC®1280-Wirkstoffbibliothek als potenter Slack-Aktivator identifiziert werden konnte (Biton et al. 2012). Das Design und die Synthese der neuen Testsubstanzen wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt am Main), insbesondere von Wenxin Felix Zhu, in Kooperation mit dem Fraunhofer-Institut für Translationale Medizin und Pharmakologie (ITMP, Dr. Victor Hernandez-Olmos und Dr. Jan Heering) durchgeführt. Basierend auf der Kryo-Elektronenmikroskopie-Struktur des Slack-Kanals vom Haushuhn (Hite et al. 2015) wurde *in silico* ein möglicher Bindungsmodus für Loxapin am humanen Slack-Kanal entwickelt. Dafür wurden in der Kryo-EM-Struktur innerhalb der RCK2-Domäne die beteiligten Aminosäuren im Bereich der regulatorischen Bindestelle für die Natrium-abhängige Aktivierung des Kanals *in silico* durch die entsprechenden humanen Isoformen ersetzt. Somit konnten die elektrostatischen und statischen Protein-Ligand-Wechselwirkungen in der Leitstruktur-Optimierung berücksichtigt werden.

In Vorarbeiten von Cathrin Flauaus (Institut für Pharmakologie und Klinische Pharmazie, Goethe-Universität Frankfurt am Main) wurden bereits die ersten 68 neu synthetisierten Loxapin-Derivate mittels des FluxOR-Assays charakterisiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden weiterhin insgesamt 77 Loxapin-Derivate auf das Ausmaß ihrer Slack-Aktivierung gescreent. Auf Grund leichter Modifizierungen am FluxOR-Assay-Setup wurden 14 von den bereits durch Cathrin Flauaus charakterisierten Testsubstanzen erneut gemessen, um die Vergleichbarkeit zwischen den Messwerten gewährleisten zu können. Es wurden die vielversprechendsten Kandidaten ausgewählt, um die Bindungsaffinitäten an Off-Targets in verschiedenen In-vitro-Modellen zu untersuchen. Anschließend wurden die elektrophysiologischen Eigenschaften der vielversprechendsten Kandidaten in Patch-Clamp-Experimenten mit HEK-Slack Zellen sowie *ex vivo* an sensibilisierten DRG-Neuronen untersucht.

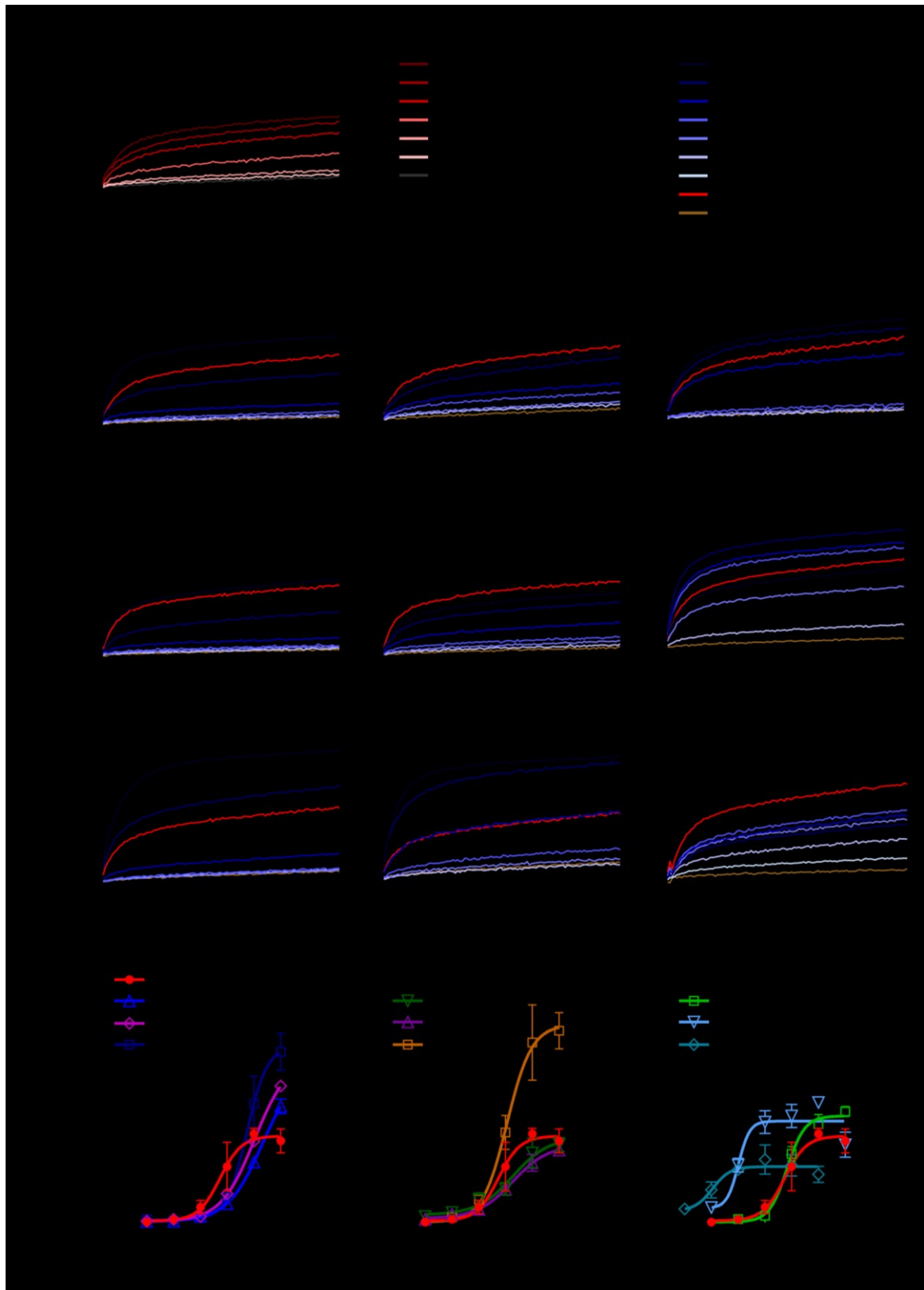
### 3.1.1 Untersuchung der Slack-Aktivierung im FluxOR™-Assay

Um die neuen Testsubstanzen auf ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften zu screenen, wurde der FluxOR™-Kaliumkanal Assay mit HEK-Slack Zellen in einem Na<sup>+</sup>-freien Puffer durchgeführt. Die Etablierung des Assays erfolgte in Vorarbeiten von Cathrin Flauaus und das Setup wurde im Rahmen dieser Arbeit weiter angepasst. Von den insgesamt 77 gemessenen Testsubstanzen zeigten 39 im FluxOR™-Assay Slack-aktivierende Eigenschaften in unterschiedlichem Ausmaß. In **Abbildung 11** sind exemplarisch die Messergebnisse für die neun Kandidaten dargestellt, welche für weitere Versuche zur *in vitro*- bzw. *in vivo*-Charakterisierung ausgewählt wurden. Ihre Strukturformeln sind in **Abbildung 10** gezeigt. In **Abbildung 11 A** ist der zeitliche Verlauf des Fluoreszenzanstiegs relativ zur Baseline-Fluoreszenz für die verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen gezeigt. Durch das Auftragen des maximalen Loxapineffekts gegen die logarithmierten Konzentrationen ergeben sich die Dosis-Wirkungs-Kurven (**Abbildung 11 B**), aus denen sich mit Hilfe von GraphPad Prism die halbmaximale effektive Konzentration (EC<sub>50</sub>) sowie der Maximizeffekt (E<sub>Max</sub>) berechnen lassen. Die ermittelten EC<sub>50</sub>- sowie E<sub>Max</sub>-Werte sind unter Angabe des 95 %-Konfidenzintervalls für alle Slack-aktivierenden Testsubstanzen in **Tabelle 10** aufgeführt.



**Abbildung 10: Strukturformeln ausgewählter Slack-Aktivatoren**

Dargestellt sind Loxapin und die neun interessantesten Kandidaten, die für eine weitere *in vitro*- bzw. *in vivo*-Charakterisierung ausgewählt wurden



**Abbildung 11: Bestimmung der  $EC_{50}$ - und  $E_{Max}$ -Werte ausgewählter Testsubstanzen im FluxOR™-Assay in HEK-Slack Zellen**

**(A)** Zeitlicher Verlauf des Fluoreszenzanstiegs relativ zur Baseline-Fluoreszenz ( $F/F_{Baseline}$ ) von Loxapin und ausgewählten Slack-Aktivatoren in verschiedenen Konzentrationen. In allen Messungen dienten 50  $\mu$ M Loxapin als Positivkontrolle und das Vehikel (0,03 % DMSO in Cholin-Puffer 1:10) als Negativkontrolle. **(B)** Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem Fluoreszenzanstieg relativ zum Effekt von 50  $\mu$ M Loxapin (Maximaler Loxapineffekt) zur 100. Sekunde Messzeit und der logarithmierten Stoffmengenkonzentration der Testsubstanzen. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Well. Dargestellt sind die Mittelwerte **(A)** bzw. Mittelwerte  $\pm$  SD **(B)** aus Triplikat-Bestimmungen.

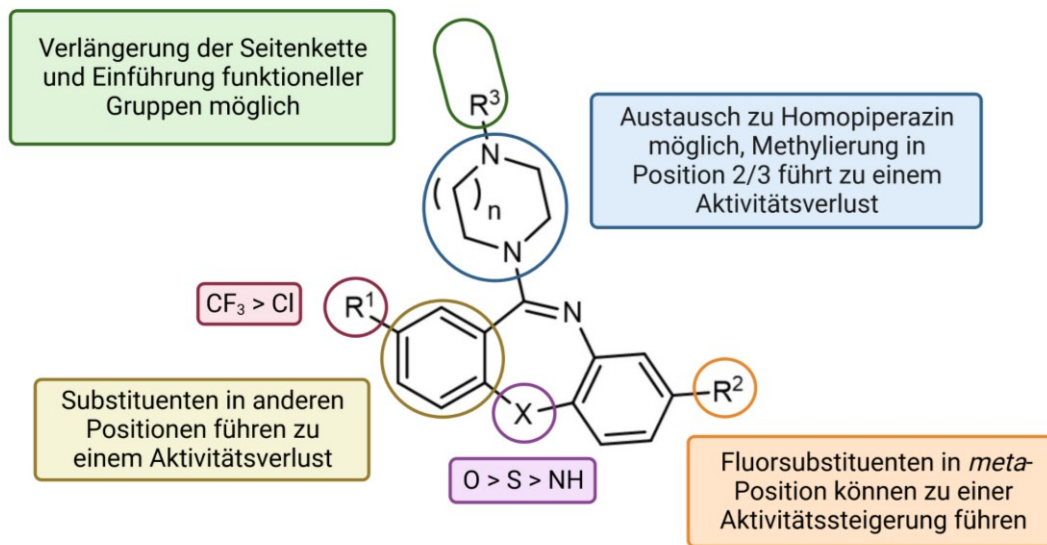
**Tabelle 10:** EC<sub>50</sub>- und E<sub>Max</sub>-Werte der im FluxOR™-Assay identifizierten Slack-Aktivatoren

Bezeichnung <sup>1</sup>	EC <sub>50</sub> (95 %-KI)	E <sub>Max</sub> (95 %-KI)
Loxapin	16,6 ± 3,1 µM <sup>2</sup>	100 %
VHP93	7,3 (5,6 - 9,6) µM	114,3 (101,0 – 127,5) %
VH404	8,8 (6,1 - 12,9) µM	116,7 (103,5 - 129,8) %
VH408	30,0 (23,9 - 37,7) µM	87,4 (73,9 - 101,0) %
VH410	10,1 (8,4 - 12,1) µM	82,9 (69,2 - 96,5) %
Clotiapin	24,7 (22,3 - 27,5) µM	126,8 (113,5 - 140,1) %
VH417	21,9 (18,0 - 26,5) µM	141,0 (123,9 - 158,0) %
VH422	30,2 (23,3 - 39,1) µM	87,3 (72,1 - 102,6) %
VH423	26,0 (21,7 - 31,1) µM	222,8 (193,6 - 252,0) %
VH425	30,3 (20,8 - 44,1) µM	96,2 (72,4 - 120,0) %
VHP156	14,8 (12,2 - 17,9) µM	135,8 (121,7 - 149,9) %
VH482	6,3 (4,9 - 8,1) µM	67,0 (60,3 - 73,6) %
VH483	131,9 (75,7 - 229,8) µM	139,0 (89,6 - 188,3) %
VH487	99,5 (77,6 - 127,5) µM	171,9 (152,7 - 191,1) %
VH509	9,1 (0,1 - 780,4) µM	42,8 (-7,7 - 93,3) %
FZ201	62,5 (49,3 - 79,2) µM	177 (138,7 - 215,3) %
FZ202	69,7 (45,8 - 106,2) µM	186,4 (103,0 - 269,7) %
FZ235	24,9 (21,9 - 28,3) µM	27,3 (24,1 - 30,4) %
FZ271	385,4 (273,4 - 543,2) µM	258,5 (158,0 - 358,9) %
FZP8	60,0 (47,9 - 75,0) µM	73,3 (55,5 - 91,1) %
FZ363	26,6 (22,1 - 32,0) µM	65,6 (56,4 - 74,9) %
FZ364	37,5 (33,1 - 42,6) µM	61,8 (55,8 - 67,8) %
FZ365	9,1 (6,5 - 12,8) µM	51,7 (42,5 - 61,0) %
FZ366	51,7 (37,6 - 71,2) µM	199,7 (134,5 - 264,9) %
FZ367	12,6 (11,6 - 13,8) µM	86,4 (80,7 - 92,2) %
FZ368	3,2 (2,3 - 4,5) µM	63,1 (55,0 - 71,3) %
FZ370	50,9 (46,0 - 56,3) µM	186,4 (169,7 - 203,2) %
FZ392	16,7 (5,3 - 53,4) µM	61,1 (-7,5 - 129,6) %
FZ443	82,0 (28,0 - 240,0) µM	112,7 (-20,8 - 246,2) %
FZ485	41,5 (36,2 - 47,6) µM	199,1 (174,8 - 223,4) %
FZ486	30,3 (14,7 - 62,4) µM	52,4 (23,7 - 81,1) %
FZ525	70,2 (25,4 - 194,3) µM	242,4 (37,4 - 447,4) %
EN4	38,9 (16,2 - 93,5) µM	127,8 (32,9 - 222,7) %
EN12	22,1 (19,1 - 24,5) µM	120,2 (112,0 - 128,4) %
FZ606	10,5 (8,9 - 12,3) µM	264,2 (247,9 - 280,4) %
FZ621	10,7 (9,0 - 12,9) µM	199,4 (184,7 - 214,2) %
FZ622	26,2 (21,0 - 32,8) µM	128,8 (109,5 - 148,1) %
FZ632	27,9 (19,8 - 39,5) µM	43,5 (38,5 - 48,4) %
FZP69	21,1 (18,1 - 24,5) µM	117,4 (106,9 - 127,9) %
FZP70	11,2 (8,4 - 14,9) µM	126,8 (110,2 - 143,3) %

<sup>1</sup> Interne Bezeichnung der Testsubstanzen, die von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak synthetisiert wurden

<sup>2</sup> Für Loxapin wurden drei FluxOR™-Assays durchgeführt. Daher ist anstelle des 95 %-KI ± SEM angegeben.

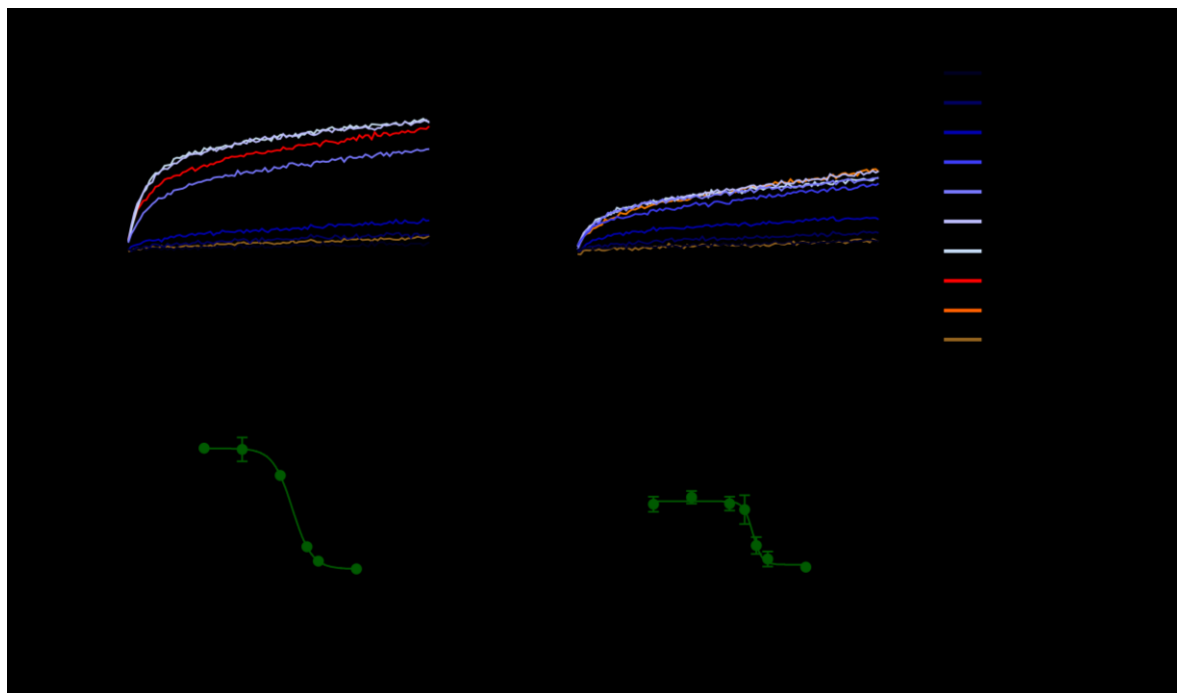
Je niedriger die  $EC_{50}$  einer Testsubstanz ist, desto höher ist ihre Potenz und die Dosis-Wirkungs-Kurve verschiebt sich nach links. Darüber hinaus lässt sich anhand des  $E_{Max}$  eine Aussage über die Wirksamkeit bzw. Aktivität der Substanz am Slack-Kanal treffen. Die ermittelten Potenzen der neuen Slack-Aktivatoren reichten von 3,2  $\mu M$  (FZ368) bis 385,4  $\mu M$  (FZ271) und das Ausmaß der Maximalaktivierung im Vergleich zu Loxapin von 27,3 % (FZ235) bis 264,2 % (FZ606). Dabei wurde für Loxapin eine  $EC_{50}$  von  $16,6 \pm 3,1 \mu M$  bestimmt. Insgesamt ergaben die Ergebnisse aus den FluxOR™-Assays Erkenntnisse einer anspruchsvollen Struktur-Wirkungsbeziehung (siehe **Abbildung 12**). Modifikation am trizyklischen Ring wurden generell nur sehr begrenzt akzeptiert. Der Austausch des 8-Chlorsubstituenten an  $R^1$  durch eine Trifluormethylgruppe führte zu einer Aktivitätsverbesserung (VHP93, FZ368, FZ485, FZ606, FZ621), Substituenten in anderen Positionen dagegen führten zu einer reduzierten Slack-Aktivierung bis hin zum vollständigen Aktivitätsverlust. Die zusätzliche Einführung eines Fluorsubstituenten am gegenüberliegenden Arylring erhöhte nur in *meta*-Position zum Stickstoff ( $R^2$ ) die Wirksamkeit, führte allerdings gleichzeitig zu einer erhöhten  $EC_{50}$  (Vergleich FZ485 mit VHP93). Ein Austausch der Sauerstoffbrücke durch Stickstoff wurde nur schlecht toleriert und Schwefelbrücken resultierten teilweise in vergleichbarer Aktivität und Potenz (Vergleich VH408 mit VH422). Methylierungen am Piperazinring in Position 2 oder 3 wurden nicht akzeptiert und reduzierten die Slack-aktivierenden Eigenschaften. Ein Austausch von Piperazin zu Homopiperazin wie bei FZ368 senkte im Vergleich zu VHP93 die  $EC_{50}$ , aber verringerte ebenfalls die  $E_{Max}$ . Im Falle von FZ622 führte der Austausch zur generellen Aktivitätsreduktion. Die meisten Modifikationen wurden vom Slack-Kanal an der Seitenkette an  $R^3$  toleriert und es konnten verschiedene funktionelle Gruppen eingeführt werden, um die pharmakologischen bzw. pharmakokinetischen Eigenschaften der Testsubstanzen zu verändern. Die Derivate mit aliphatischen Hydroxyl- oder Carboxylgruppen zeigten grundsätzlich eine gute Wirksamkeit mit einer durchschnittlichen Potenz (VH422, VH423, VH425), wobei nur eine bestimmte Linkerlänge akzeptiert wurde. Das Hinzufügen oder Entfernen von weiteren Ethoxyeinheiten resultierte in einem vollständigen Aktivitätsverlust. Derivate mit sterisch anspruchsvolleren Seitenketten verloren ebenfalls ihre Aktivität. Ein Sub-Screening diverser Heterozyklen mit H-Brücken-Donoren und -akzeptoren zeigte eine gute Akzeptanz für die Einführung eines Triazolon-Rings (EN4, EN12). Im Vergleich zu Loxapin zeigte EN12 eine ähnliche  $EC_{50}$  mit einer erhöhten Wirksamkeit von 120,2 %. Eine Kombination aus mehreren vorteilhaften Modifikationen führte nicht zwingend zu einer kumulativen Aktivitätssteigerung, beispielsweise zeigte sich für FZ201 (Kombination aus Trifluormethylgruppe an  $R^1$  und aliphatischer Carboxylinker) und FZ370 zwar ein erhöhter Maximaleffekt aber eine niedrige Potenz. FZ606 und die Triazolon-Derivate FZ621 und FZP70 profitierten dagegen von der kombinierten Einführung mehrerer Modifikationen, welche die Potenz reduzierten und die maximale Slack-Aktivierung steigern konnten.



**Abbildung 12: Struktur-Wirkungsbeziehung der neuen Slack-Aktivatoren**

Schematische Darstellung der möglichen Modifikationen im Loxapin-Grundgerüst, die zu einer Aktivitätssteigerung oder -minderung am Slack-Kanal führen. Modifiziert aus einem Projektantrag der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak.

Um zu bestätigen, dass potentielle *in vitro* und *in vivo* gemessene antipruritische und analgetische Effekte tatsächlich auf der gezielten Aktivierung von Slack beruhen, kann als wichtiges Kontrollexperiment versucht werden, die Wirkung durch einen Slack-Inhibitor zu antagonisieren. Die dafür von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Eugen Proschak synthetisierte Verbindung „Compound 31“ (Griffin et al. 2021) wurde zunächst im FluxOR™-Assay validiert. HEK-Slack Zellen wurden entweder mit 25  $\mu\text{M}$  Loxapin oder mit 50  $\mu\text{M}$  VH425 für 10 Minuten präinkubiert, um die Slack-Kanäle zu aktivieren, und im Anschluss erfolgte die 30-minütige Inkubation mit Compound 31 in verschiedenen Verdünnungsschritten gefolgt von der Fluoreszenzmessung. Die Ergebnisse beider Versuche sind in **Abbildung 13** dargestellt. In beiden Experimenten führte die alleinige Stimulation der HEK-Slack Zellen mit Loxapin (**Abbildung 13 links**) oder VH425 (**Abbildung 13 rechts**) zu einem starken Fluoreszenzanstieg. Erfolgte eine Ko-Inkubation mit Compound 31 zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Abfall des relativen Fluoreszenzsignals und es konnte die Konzentration bestimmt werden, bei der es zu einer halbmaximalen Inhibition ( $\text{IC}_{50}$ ) der Slack-Aktivierung kam. Die ermittelten Werte der  $\text{IC}_{50}$  sind bei vorheriger Stimulation durch Loxapin (2,08  $\mu\text{M}$ ; 95 %-KI: 1,712  $\mu\text{M}$  – 2,527  $\mu\text{M}$ ) bzw. VH425 (4,02  $\mu\text{M}$ ; 95 %-KI: 3,28  $\mu\text{M}$  – 5,020  $\mu\text{M}$ ) vergleichbar und bestätigen, dass Compound 31 ein potenter Slack-Inhibitor ist und die Slack-Aktivierung durch Loxapin bzw. VH425 *in vitro* antagonisieren kann.



**Abbildung 13: Validierung des Slack-Inhibitors Compound 31 im FluxOR™-Assay**

(A) Verlauf des Fluoreszenzanstiegs relativ zur Baseline-Fluoreszenz ( $F/F_{\text{Baseline}}$ ) von Compound 31 (Griffin et al. 2021) in verschiedenen Konzentrationen mit vorheriger Stimulation der HEK-Slack-Zellen mit 25 µM Loxapin (links) und 50 µM VH425 (rechts). In beiden Messungen diente das Vehikel (0,03 % DMSO in Cholin-Puffer 1:10) als Negativkontrolle. (B) Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen dem relativen Fluoreszenzanstieg zur 100. Sekunde Messzeit und der logarithmierten Stoffmengenkonzentration von Compound 31. Die ermittelte  $IC_{50}$  von Compound 31 betrug bei Stimulation mit Loxapin 2,08 µM bzw. mit VH425 4,02 µM. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Endkonzentration im Well. Dargestellt sind die Mittelwerte (A) bzw. Mittelwerte  $\pm$  SD (B) aus Triplikat-Bestimmungen.

### 3.1.2 Bestimmung der Bindungsaffinitäten an Dopamin- und Histamin-Rezeptoren

Die häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen von Loxapin, welche zu Therapielimitationen führen können, werden über die antagonistische Wirkung an Dopaminrezeptoren (im Besonderen  $D_2$ -Rezeptoren) im ZNS vermittelt. Bei den daraus resultierenden Extrapyramidal-motorischen Störungen (EPMS) kommt es zu Beeinträchtigungen im Bewegungsablauf mit typischen Früh- und Spätdyskinesien, Akathisien und parkinsonoiden Symptomen, die als Folge der Neuroleptika-Einnahme durch eine Blockade des nigrostriatalen dopaminergen Systems hervorgerufen werden. Daher bildete ein primäres Ziel in der Entwicklung der neuen Slack-Aktivatoren, Derivate mit einer im Vergleich zu Loxapin verringerten Affinität zu Dopamin-Rezeptoren zu synthetisieren. Zur Charakterisierung der Rezeptoraffinitäten an  $D_2/D_3$ -Rezeptoren sowie  $H_1$ -Rezeptoren wurde ein [ $^3H$ ]-Spiperon- bzw. [ $^3H$ ]-Mepyramin-Ligandenbindungsassay von Mariam Dubiel und Annika Frank (Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Holger Stark, Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf) mit den vielversprechendsten Kandidaten durchgeführt. Wie zu erwarten zeigte sich für Loxapin ein ausgeprägter Antagonismus an beiden Dopamin-Rezeptoren mit Inhibitorkonstanten ( $K_i$ -Wert) von 32 nM ( $D_2$ ) und 112 nM ( $D_3$ ). Hervorzuheben sind die beiden

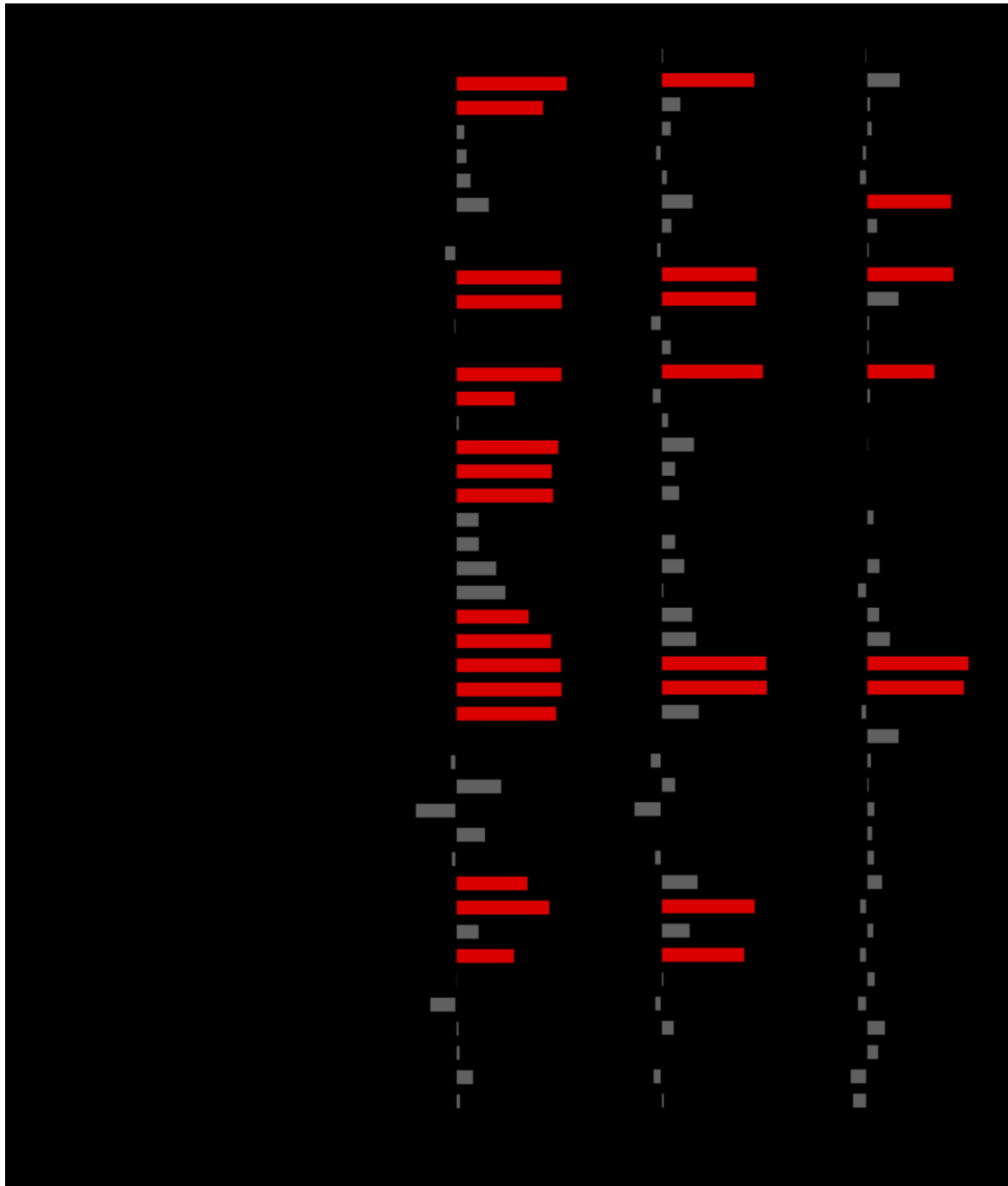


Kandidaten VH425 und EN12. VH425 zeigte eine ca. 40-fach niedrigere Affinität zu D<sub>2</sub>R und ca. 31-fach niedrigere Affinität zu D<sub>3</sub>R im Vergleich zu Loxapin. Die Affinität von EN12 wurde sogar um das ca. 63- bzw. 35-fache vermindert. Damit stellen diese beiden Substanzen besonders interessante Kandidaten für die weitere *in vivo* Charakterisierung dar, weil die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von unerwünschten, dopaminantagonistisch vermittelten Nebenwirkungen stark reduziert ist. Für Loxapin und VH425 wurde außerdem von der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Holger Stark die Affinität an H<sub>1</sub>-Rezeptoren untersucht. Für Loxapin ergab sich ein K<sub>i</sub>-Wert von 2,72 nM, VH425 zeigte im Vergleich mit einem K<sub>i</sub>-Wert von 575 nM eine ca. 211-fach niedrigere Affinität. Somit ist zusätzlich die Wahrscheinlichkeit für das Auftreten von sedierenden Effekten von VH425 *in vivo* deutlich reduziert.

### 3.1.3 Off-Target-Effekte ausgewählter Slack-Aktivatoren

Um Off-Target-Effekte und das pharmakologische Nebenwirkungsprofil der neuen Slack-Aktivatoren VH425 und EN12 im Vergleich zu Loxapin zu charakterisieren, wurde von der Firma Eurofins das SafetyScreen44<sup>TM</sup> Panel bestehend aus Radioliganden-Bindungs-, Enzym- und Aufnahmeassays durchgeführt. Die Auswahl der in dem Panel eingeschlossenen 44 Targets umfasst ein breites Spektrum an relevanten G-Protein-gekoppelten und nukleären Rezeptoren, Transportern, Ionenkanälen und Enzymen (Bowes et al. 2012). VH425, EN12 und Loxapin wurden in einer Konzentration von 10 µM inkubiert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 14** dargestellt. Loxapin zeigte bei 17 der 44 Targets eine Bindungsaffinität von mehr als 50 % und somit eine signifikante Wirkung in den entsprechenden Assays. Als Neuroleptikum der ersten Generation bindet es erwartungsgemäß an D<sub>1</sub>- und D<sub>2s</sub>-Rezeptoren, aber auch an adrenerge (α<sub>1A</sub> und α<sub>2A</sub>), histaminerge (H<sub>1</sub> und H<sub>2</sub>), muskarinerge (M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub> und M<sub>3</sub>) sowie serotonerge (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> und 5-HT<sub>3</sub>) Rezeptoren und bestätigt damit die typischen Eigenschaften eines sogenannten „dirty drugs“. Darüber hinaus zeigte Loxapin eine hohe Bindungsaffinität an der Bindestelle 2 von spannungsabhängigen Natriumkanälen (Na<sub>v</sub>) sowie an Noradrenalin- und Serotonintransportern (NAT und SET). Der Slack-Aktivator VH425 (10 µM) dagegen zeigte nur noch an acht Off-Targets (α<sub>1A</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2s</sub>, H<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub>, NAT und SET) eine signifikante Hemmung der Ligandenbindung und verlor seine Wirkung an α<sub>2A</sub>, H<sub>2</sub>, 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub> und den muskarinergen Rezeptoren im Vergleich zu Loxapin. Darüber hinaus bindet VH425 nicht mehr an die Bindestelle 2 von Na<sub>v</sub>-Kanälen. Die Ergebnisse für EN12 (10 µM) zeigten nur noch bei fünf der Off-Targets eine signifikante Bindungsaffinität, mit eingeschlossen waren der Cannabinoid-Rezeptor 1 (CB1), D<sub>1</sub>-, H<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> und 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren. Weder Loxapin noch die neuen Slack-Aktivatoren zeigten eine Bindungsaffinität zu spannungsaktivierten, auswärtsgerichteten h-ERG-Kaliumkanälen (Gen: Ether-ago-go-Related)

oder anderen spannungsabhängigen ( $K_v$ ) Kaliumkanälen, was dafürspricht, dass keine der Verbindungen zu einer unspezifischen Moduliererung von Kaliumkanälen führt.



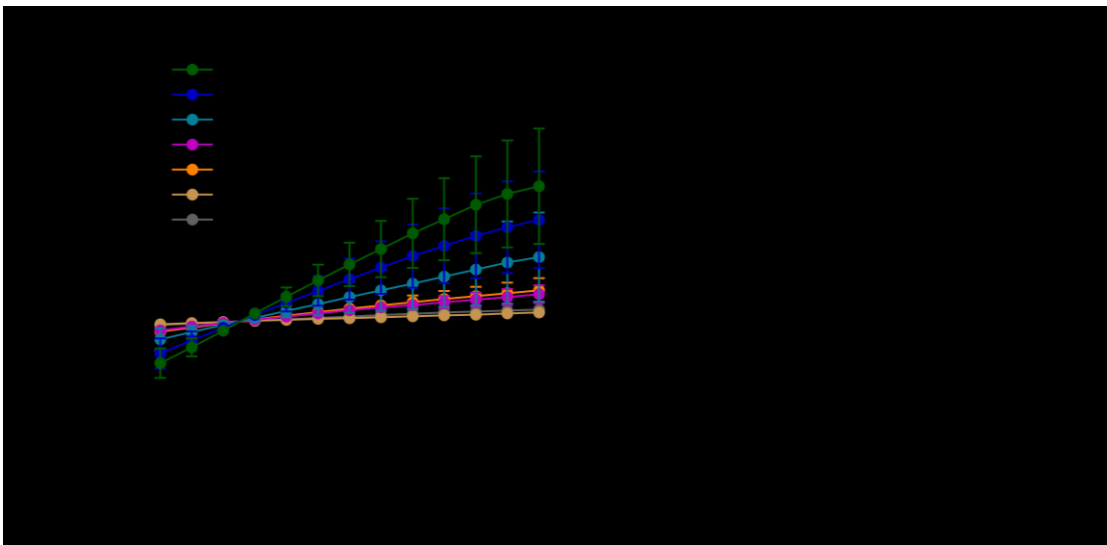
**Abbildung 14: *In vitro* Pharmakologie-Profil (Eurofins SafetyScreen44™ Panel) ausgewählter Slack-Aktivatoren**

Die Slack-Aktivatoren Loxapin, VH425 und EN12 wurden in einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  in Radioligand-Bindungs-, Enzym- und Aufnahmeassays auf ihre spezifische Bindungsaffinität zum jeweiligen Target untersucht. Die meisten Targets entsprachen der humanen Sequenz; mit Ausnahme von BZD, NMDA, MAO-A,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal,  $\text{K}_v$ -Kanal und  $\text{Na}^+$ -Kanal, bei welchen die Sequenz der Ratte entsprachen. Die Bindungsaffinität der Slack-Aktivatoren wurde als prozentuale Hemmung der spezifischen Bindung eines radioaktiv markierten Liganden (Agonist oder Antagonist) für jedes Target berechnet. Die hemmende Wirkung der Slack-Aktivatoren auf das jeweilige Enzym wurde als prozentuale Hemmung der Enzymaktivität des Liganden berechnet. Ergebnisse, die eine Hemmung (oder Stimulation) von mehr als 50 % aufweisen, werden als signifikante Wirkung betrachtet und sind rot dargestellt. Ergebnisse einer hemmenden oder stimulierenden Wirkung zwischen 25 % und 50 % (schwache bis mittlere Wirkung) und solche, die unter 25 % liegen (meist auf die Streuung des Signals um den Kontrollwert herum zurückzuführen) sind grau dargestellt. Die Messungen wurden als Duplikate durchgeführt.

### 3.1.4 Elektrophysiologische Charakterisierung ausgewählter Slack-Aktivatoren

#### 3.1.4.1 Effekte auf Kaliumströme von HEK-Slack Zellen

Aufgrund verschiedener pharmakologischer Eigenschaften und der Ergebnisse der FluxOR™-Assay Messungen sowie der *in vitro* Charakterisierung wurden neun Kandidaten ausgewählt, um deren Effekte auf die Slack-abhängigen Kaliumströme ( $I_{\text{Slack}}$ ) genauer zu untersuchen. Dafür sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob sich die Patch-Clamp Methode auch zur Bestimmung der  $EC_{50}$ -Werte von Slack-Aktivatoren eignet. Es wurde ein Protokoll an HEK-Slack Zellen mit der Positivkontrolle Loxapin von Maureen Hebchen etabliert. Das Setup wurde dabei möglichst genau an die Testbedingungen des FluxOR™-Assays angepasst, um eine bessere Vergleichbarkeit der resultierenden  $EC_{50}$ -Werte zu gewährleisten. **Abbildung 15 A** zeigt die konzentrationsabhängigen IV-Relationen nach Applikation von Loxapin, **Abbildung 15 B** die resultierende Dosis-Wirkungs-Beziehung der relativen Stromdichte bei +80 mV. Der ermittelte  $EC_{50}$ -Wert für Loxapin im FluxOR™-Assay ( $16,6 \mu\text{M} \pm 3,1$ ) ist vergleichbar mit dem Wert aus den Patch-Clamp Messungen ( $13,30 \mu\text{M}$ ; 95 %-KI:  $13,12 \mu\text{M} - 5,71 \mu\text{M}$ ) und spricht für eine gute Eignung beider Methoden zur Bestimmung der mittleren effektiven Konzentration.

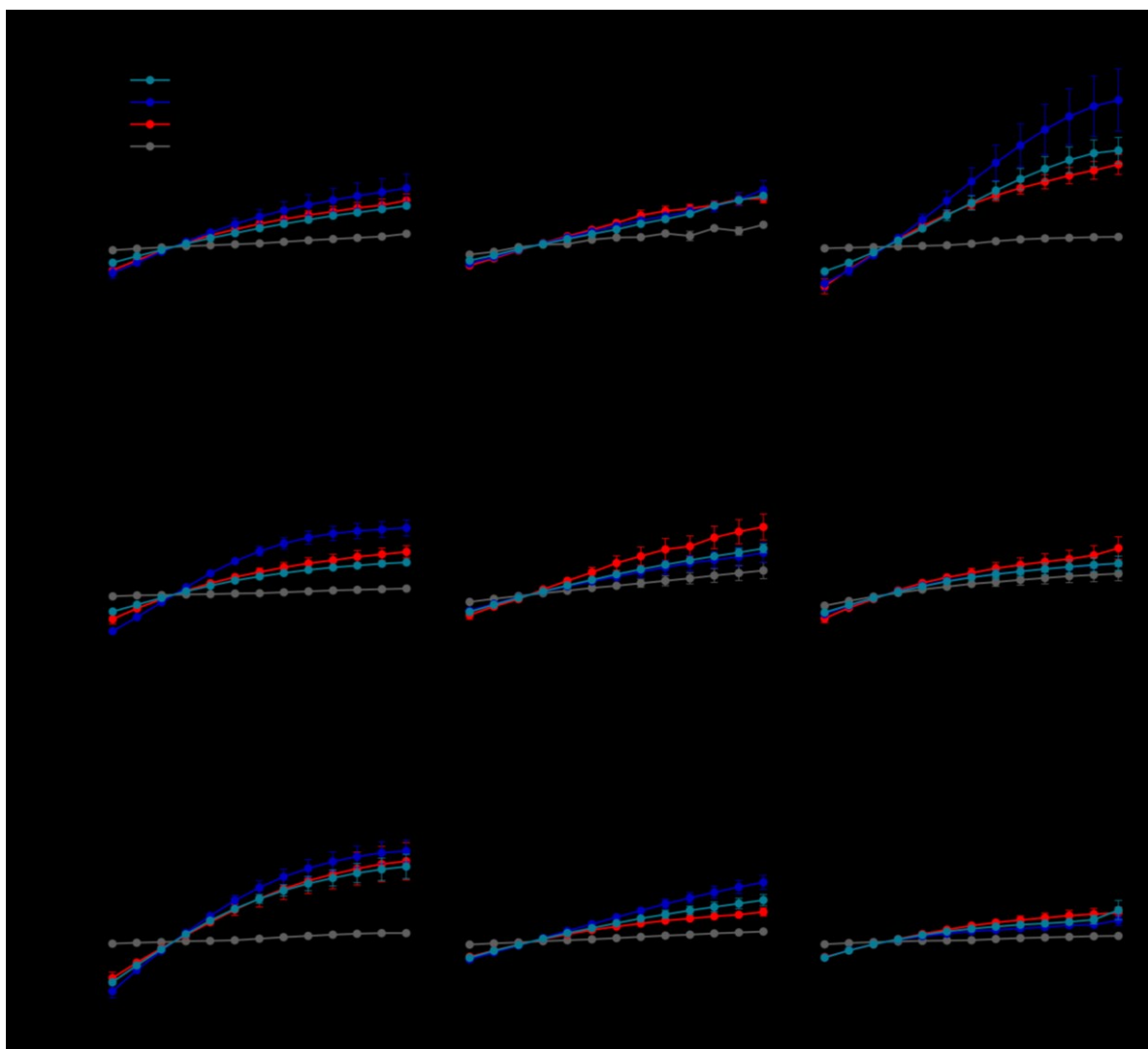


**Abbildung 15: Bestimmung der  $EC_{50}$  von Loxapin in Whole-cell Voltage-Clamp Messungen an HEK-Slack Zellen**

**(A)** Dargestellt ist die Stromdichte (pA/pF) nach Applikation von Loxapin in sechs Konzentrationen aufgetragen gegen die angelegte Spannung in Intervallen von 20 mV. Als Negativkontrolle wurden Messungen mit dem Vehikel (0,03 % DMSO in Normal-Tyrode) an jedem Messtag durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Messkammer. **(B)** Dosis-Wirkungs-Beziehung der mittleren Stromdichte bei +80 mV (nach Applikation von Loxapin relativ zur Baseline) zur Ermittlung der  $EC_{50}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 14-21$  Zellen/Kondition.

Allerdings wurde aufgrund des großen Zeitaufwands die ausgewählten Slack-Aktivatoren in nur zwei Konzentrationen in Patch-Clamp Messungen getestet. Auf Grundlage der FluxOR™-Assay Ergebnisse wurden  $25 \mu\text{M}$  bzw.  $50 \mu\text{M}$  ausgewählt, da bei diesen Konzentrationen erwartbare Effekte auftreten

sollten. Als Standards wurden 50  $\mu\text{M}$  Loxapin als Positivkontrolle sowie das Vehikel als Negativkontrolle bei jeder Messung miteingeschlossen (**Abbildung 16**). Es wurden die Membranströme, gemessen bei Spannungen von -120 mV bis +120 mV in Intervallen von 20 mV, gegeneinander aufgetragen, um die sogenannte Strom-Spannungs-Relation (IV-Relation) zu erhalten. Daraus ergeben sich verschiedene Parameter wie das Umkehrpotential, bei dem sich die Richtung des Stroms verändert, und die Steigung der IV-Relation, welche die Einzelkanalleitfähigkeit charakterisiert (Hermey 2011). Mit zunehmender Spannung zeigte sich ein annähernd linearer Anstieg der Stromantwort (Stromdichte) von Slack-Kanälen. Teilweise ist die maximale Stromdichte bereits ab +60 mV erreicht (FZ370, FZ485), was darauf hindeutet, dass ein Maximum der Slack-Aktivierung und des resultierenden  $I_{\text{Slack}}$  erzielt wurde.



**Abbildung 16: IV-Relation von Whole-cell Patch-Clamp Messungen mit ausgewählten Slack-Aktivatoren**

Die Stromdichte (pA/pF) von HEK-Slack Zellen wurde auf Baseline-Niveau und nach Applikation von 25  $\mu\text{M}$  oder 50  $\mu\text{M}$  Slack-Aktivator gemessen und gegen die angelegte Spannung in Intervallen von 20 mV aufgetragen. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden an jedem Versuchstag Messungen nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Loxapin bzw. Vehikel (0,03 % DMSO in Normal-Tyrode) durchgeführt. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Messkammer. In die Baseline-IV-Relationen sind die basalen Stromdichten aller Messungen pro Slack-Aktivator eingeschlossen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 8 - 20$  Zellen/Kondition.

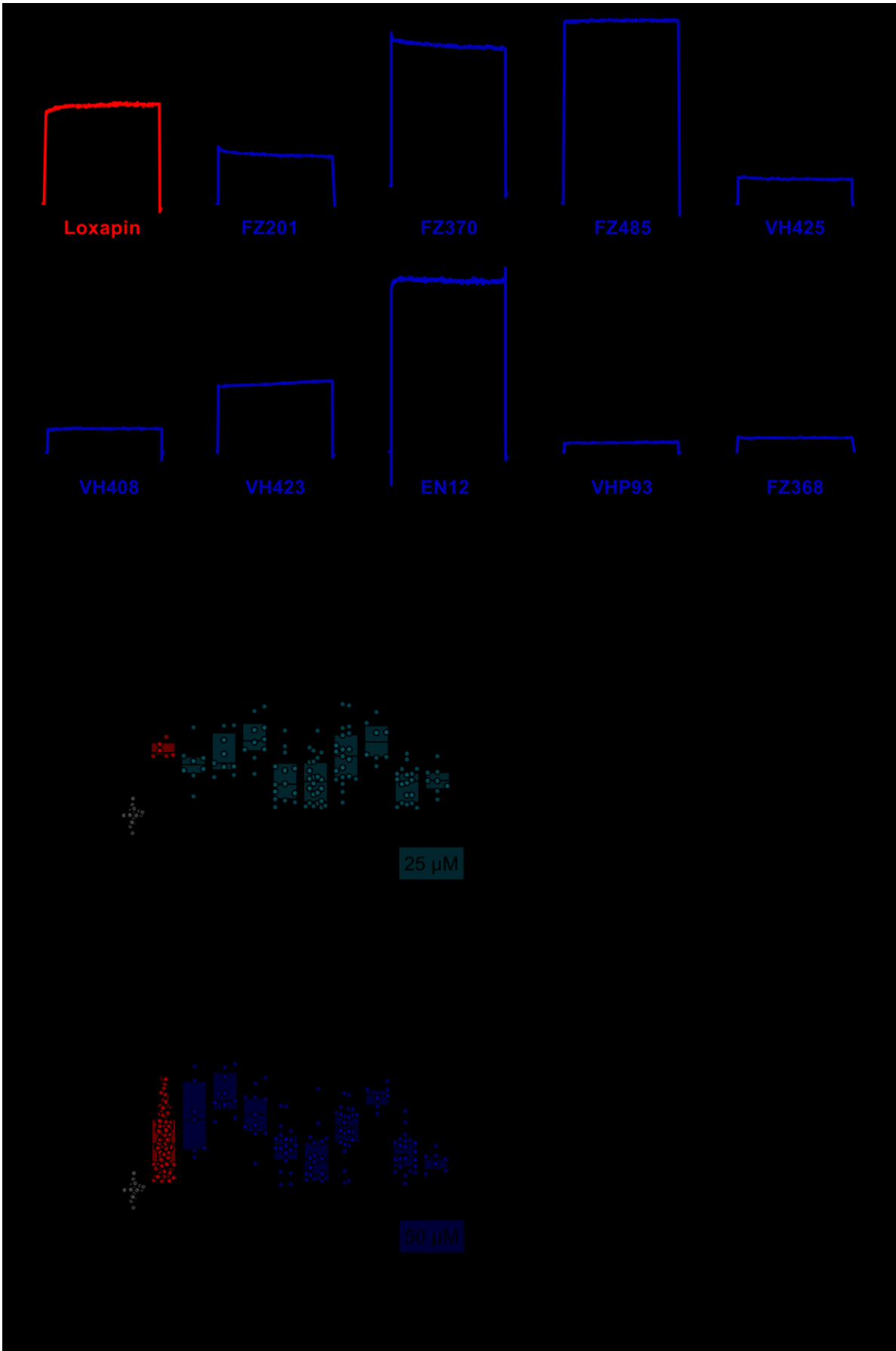
Loxapin führte als Positivkontrolle in allen Messungen zu einem Anstieg der Stromdichte, allerdings zeigten sich Schwankungen im Ausmaß zwischen den Messungen. So lag die maximale Stromdichte bei 120 mV beispielsweise bei den Messungen mit EN12 oder FZ485 deutlich über 200 pA/pF, bei den Messungen mit VH423 oder FZ368 nur bei etwa 100 pA/pF. Dieses Ergebnis lässt auf eine variable Slack-Expression der verschiedenen Zellpassagen schließen, welche an den jeweiligen Messtagen für die Testsubstanzen verwendet wurden. Vergleicht man die Aktivierungskurve mit der nach Vehikel-Inkubation, so ist kein Unterschied festzustellen. Alle Testsubstanzen führten zu einem stärkeren Anstieg der Stromdichte im Vergleich zum Vehikel, der Effekt im Vergleich zu Loxapin war für die meisten Slack-Aktivatoren entweder vergleichbar oder höher. Die größten Stromdichten wurden durch 50  $\mu\text{M}$  EN12, FZ370, FZ485 und VH423 generiert. VH425, VH408 und FZ368 führten in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu keinem stärkeren Anstieg der Stromdichten im Vergleich zu 25  $\mu\text{M}$ . Möglicherweise wurde bei diesen Testsubstanzen die maximal mögliche Slack-Aktivierung erreicht, sodass eine Konzentrationssteigerung zu keinem stärkeren Effekt mehr führt. Generell zeigte sich die stärkste Aktivierung im positiven Depolarisationsbereich, was mit den spannungsabhängigen Eigenschaften von Slack zusammenhängen könnte. Das Umkehrpotential wurde von keinem der Slack-Aktivatoren signifikant beeinflusst und lag zwischen -80 und -60 mV in allen Messungen. Die Daten zeigen, dass die ausgewählten Slack-Aktivatoren in unterschiedlichem Ausmaß zu einem Anstieg des Slack-abhängigen  $I_K$  in Whole-cell Messungen an HEK-Slack Zellen führen und bestätigen somit die Ergebnisse der FluxOR<sup>TM</sup>-Assay Messungen.

Da die Stromantwort trotz Normierung auf die Zellgröße basale Unterschiede zwischen den einzelnen Zellen aufwies und somit die Vergleichbarkeit der Effekte der Slack-Aktivatoren beeinflusst wäre, wurde der relative Anstieg der Stromdichte aller Testbedingungen berechnet. Die Stromdichte bei einer Depolarisation von -80 mV nach Stimulation mit einem Slack-Aktivator, Loxapin oder dem Vehikel wurde auf die basale Stromdichte nivelliert und ist für 25  $\mu\text{M}$  in **Abbildung 17 B** und für 50  $\mu\text{M}$  in **Abbildung 17 D** als Box-Plot dargestellt. Repräsentative Strom-Ableitungen bei +80 mV sind in **Abbildung 17 A** präsentiert. Alle untersuchten Slack-Aktivatoren und Loxapin zeigten sowohl in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  als auch 25  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung des relativen Anstiegs der Stromdichte im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle. Interessanterweise scheint der Maximaleffekt, welcher aus den FluxOR<sup>TM</sup>-Messungen berechnet wurde, signifikant mit dem relativen Anstieg der Stromdichte aus den Patch-Clamp Messungen zu korrelieren (**Abbildung 17 C, E**). Beide Größen sind in **Tabelle 11** für jede Testsubstanz sowie Loxapin und Vehikel angegeben.

**Tabelle 11:** Maximaleffekt und relativer Anstieg der Stromdichte bei 25  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  von ausgewählten Slack-Aktivatoren

Slack-Aktivator	$E_{\text{Max}}$ (95 %-KI)	Relativer Anstieg der Stromdichte (25 $\mu\text{M}$ ) $\pm$ SEM	Relativer Anstieg der Stromdichte (50 $\mu\text{M}$ ) $\pm$ SEM
<b>Loxapin</b>	100 %	5,5830 $\pm$ 0,5403	4,9840 $\pm$ 0,4343
<b>Vehikel</b>	0 %	0,9132 $\pm$ 0,0364	0,9132 $\pm$ 0,0364
<b>FZ368</b>	63,1 (55,0 - 71,3) %	2,5130 $\pm$ 0,3524	2,0360 $\pm$ 0,2086
<b>VH408</b>	87,4 (73,9 - 101,0) %	2,8320 $\pm$ 0,4090	2,8590 $\pm$ 0,6512
<b>VH425</b>	96,2 (72,4 - 120,0) %	3,0550 $\pm$ 0,6287	3,5080 $\pm$ 0,5270
<b>VHP93</b>	114,3 (101,0 - 127,5) %	2,3180 $\pm$ 0,2584	2,8140 $\pm$ 0,3448
<b>EN12</b>	120,2 (112,0 - 128,4) %	7,7450 $\pm$ 1,5250	12,5400 $\pm$ 1,395
<b>FZ201</b>	177,0 (138,7 - 215,3) %	4,2100 $\pm$ 0,9355	9,7290 $\pm$ 3,7100
<b>FZ370</b>	186,4 (169,7 - 203,2) %	5,4890 $\pm$ 1,1000	14,7700 $\pm$ 2,9340
<b>FZ485</b>	199,1 (174,8 - 223,4) %	8,6410 $\pm$ 1,6070	9,0660 $\pm$ 1,7520
<b>VH423</b>	222,8 (193,6 - 252,0) %	6,1140 $\pm$ 1,1220	5,7100 $\pm$ 0,6576

Der Pearson-Korrelationskoeffizient  $r$  gilt als Maß für die Stärke einer Korrelation. Ein  $r$  von 1 bzw. -1 kennzeichnet einen perfekt positiven bzw. negativen Zusammenhang, bei einem  $r = 0$  besteht kein linearer Zusammenhang zwischen den beiden Variablen. Die berechneten Koeffizienten für die Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  ( $r = 0,7277$ ;  $p = 0,0111$ ) und 50  $\mu\text{M}$  ( $r = 0,6668$ ;  $p = 0,0300$ ) liegen beide zwischen 0 und 1 und deuten damit auf einen linearen Zusammenhang hin. Somit lässt sich schlussfolgern, dass je höher der Maximaleffekt einer Testsubstanz im FluxOR™-Assay ist, desto größer ist der Anstieg der relativen Stromdichte in Patch-Clamp Messungen.



**Abbildung 17: Der relative Anstieg der Stromdichte ausgewählter Slack-Aktivatoren korreliert mit dem  $E_{Max}$  aus FluxOR™-Assay**

(A) Repräsentative Strom-Ableitungen von Whole-cell Voltage-Clamp Messungen an HEK-Slack Zellen auf Baseline-Niveau (schwarz) und nach Stimulation mit 50  $\mu$ M Loxapin (rot) oder 50  $\mu$ M der ausgewählten Slack-Aktivatoren (blau) bei +80 mV Depolarisation. Die Daten entsprechen den Messungen aus **Abbildung 16**. Die Stromdichte nach Inkubation mit einem Slack-Aktivator, Loxapin oder Vehikel wurde bei +80 mV relativ zur basalen Stromdichte berechnet (relativer Anstieg der Stromdichte, logarithmisch skaliert auf der x-Achse) und für 25  $\mu$ M (**B**) bzw. 50  $\mu$ M (**D**) als Box-Plot dargestellt. Median und Interquartilsabstand sind durch die Box abgebildet, die Fehlerbalken umfassen das Minimum bis Maximum. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Vehikel (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Mehrfachvergleichstest).  $n = 8 - 20$  Zellen/Kondition. (C, E) Pearson Korrelation zwischen dem Maximaleffekt ( $E_{Max}$ ) berechnet aus den FluxOR™-Assay und dem relativen Anstieg der Stromdichte von 25  $\mu$ M (**C**) bzw. 50  $\mu$ M (**D**) aus den Patch-Clamp Messungen.  $r =$  Pearson-Korrelationskoeffizient

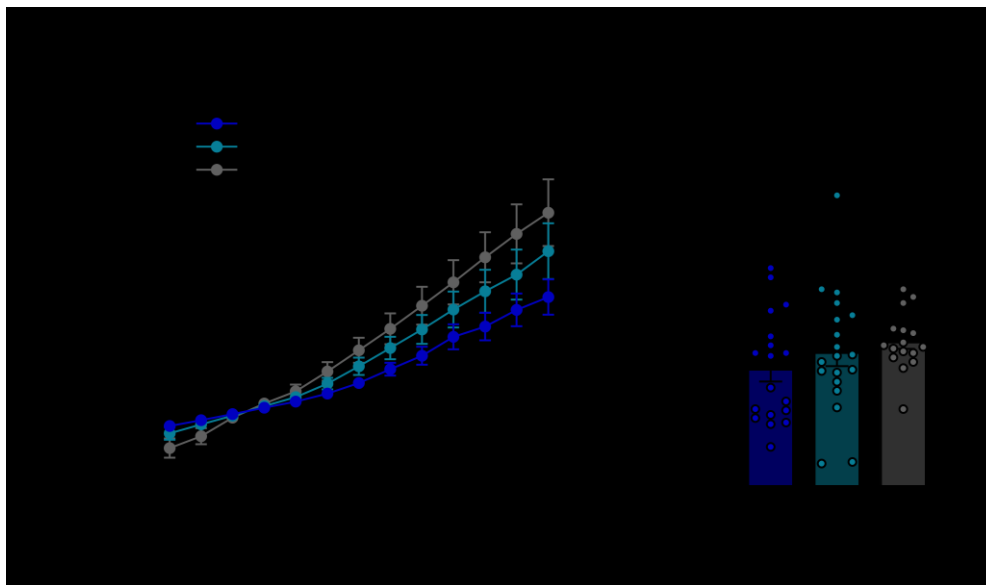
### 3.1.4.2 Effekte auf Kaliumströme von DRG-Neuronen

Die Patch-Clamp Messungen an HEK-Slack Zellen konnten bestätigen, dass die ausgewählten Slack-Aktivatoren signifikant den Slack-vermittelten Kaliumausstrom erhöhen. Als nächster Schritt sollte überprüft werden, ob die gleichen Effekte *ex vivo* in DRG-Neuronen der Maus festgestellt werden können. Da Slack in nur 31,6 % der DRG-Neurone exprimiert wird, sollten die zur Messung ausgewählten Zellen vorher selektiert werden. Eine 10-minütige Inkubation mit dem Marker für nicht-peptiderge Neurone *Griffonia simplicifolia* Isolektin B4 (IB4) eignet sich aufgrund der hohen Expression von Slack (93,2 %) in IB4-positiven Zellen besonders gut (Lu et al. 2015). Außerdem muss beachtet werden, dass DRG-Neurone neben Slack-Kanälen zahlreiche verschiedene spannungsabhängige Kaliumkanäle exprimieren, die nicht alle spezifisch gehemmt werden können. Somit spiegelt der gemessene Gesamtstrom die Leitfähigkeit aller im Neuron exprimierten Kaliumkanäle wieder und kann nicht als spezifische Slack-abhängige Stromantwort betrachtet werden. Die in **Abbildung 18 A** dargestellten IV-Relationen nach Inkubation mit Loxapin in den Konzentrationen 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M wurden mit den resultierenden Stromdichten nach einer Vehikel-Inkubation verglichen. Interessanterweise führten 50  $\mu$ M Loxapin bei einer Depolarisation von +80 – +120 mV zu einer signifikanten Reduktion der Stromdichte im Vergleich zu Vehikel-stimulierten Zellen. Vergleicht man allerdings die relativen Anstiege der Stromdichte bei +80 mV, ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen (**Abbildung 18 B**). Das könnte darauf schließen lassen, dass Loxapin an DRG-Neuronen neben einer Slack-Aktivierung auch weitere Effekte vermittelt, die einen Einfluss auf Kaliumströme zu haben scheinen.

Da eine Aktivierung von Kaliumkanälen zu einer Verschiebung des Ruhemembranpotentials in Richtung des Kaliumgleichgewichtspotentials führt sowie eine verstärkte Repolarisation und Hyperpolarisation bewirken kann, sollten als nächstes die Einflüsse von Slack-Aktivatoren auf die neuronale Erregbarkeit charakterisiert werden. Um einen pathologischen Zustand mit erhöhter Erregbarkeit zu generieren wurden die kultivierten DRG-Neurone wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben über Nacht in einer „inflammatorischen Suppe“ sensibilisiert. In **Abbildung 19** sind die Effekte von Loxapin und dem Slack-Aktivator VH425 auf das neuronale Feuern im Vergleich zur Vehikel-



Kontrolle dargestellt. Basal zeigen die Neurone nach 1-sekündigen depolarisierenden Strompulsen (200 – 950 pA in 150 pA-Intervallen) ein konstantes und starkes Feuern, welches durch die Ausbildung vieler Aktionspotentialen hintereinander gekennzeichnet ist. Repräsentative Spannungsänderungen der Membran sind in **Abbildung 19 A** gezeigt. Nach Inkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Loxapin oder VH425 kommt es zu einer ausgeprägten Hemmung der Aktionspotentialbildung bei gleicher Strominjektion. Das neuronale Feuern wird durch Loxapin und VH425 nahezu vollständig unterdrückt, während das Ruhmembranpotential (RMP) dabei nicht signifikant verändert wird (**Abbildung 19 B**). Einen statistisch signifikanten Einfluss zeigt nur VH425 ( $p = 0,0020$ ), für Loxapin dagegen konnte kein signifikanter Effekt festgestellt werden ( $p = 0,0625$ ). Das Vehikel führt ebenfalls zu keiner Veränderung des neuronalen Feuerns und der Anzahl der gebildeten Aktionspotentiale. Die Ergebnisse lassen schlussfolgern, dass die Slack-Aktivierung durch VH425 die Erregbarkeit von sensorischen Neuronen durch eine Blockade der Aktionspotentialbildung reduzieren kann.

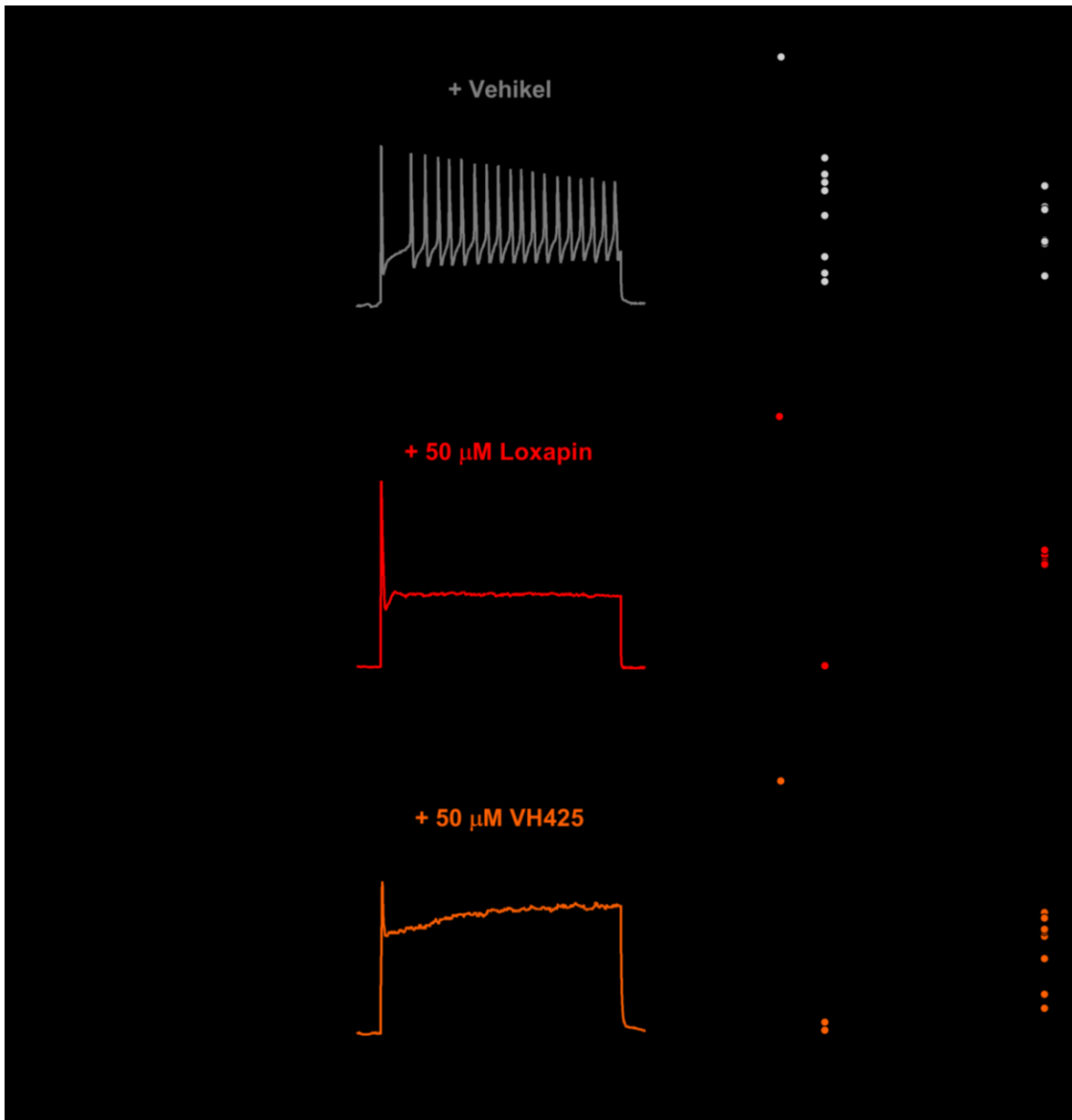


**Abbildung 18: Einfluss von Loxapin auf Kaliumströme muriner Spinalganglien**

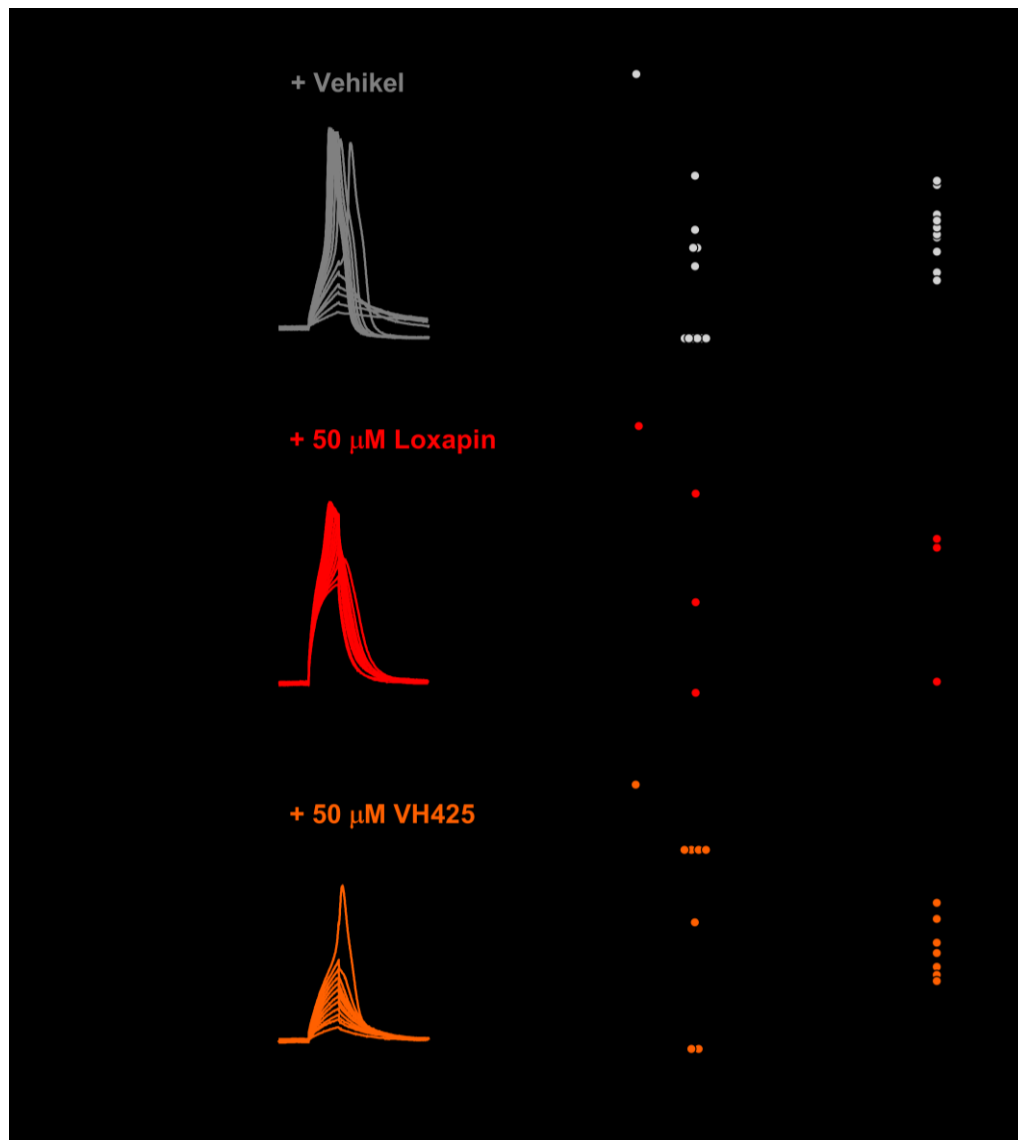
Whole-cell Voltage-Clamp Messung von DRG-Neuronen naiver C57BL/6N-Mäuse nach Applikation des Vehikels (0,03 % DMSO in Normal-Tyrode) oder 25  $\mu\text{M}$  bzw. 50  $\mu\text{M}$  Loxapin. **(A)** Strom-Spannungs-Beziehung, aufgetragen ist die mittlere Stromdichte ( $\text{pA/pF}$ ) gegen die angelegte Spannung in Intervallen von 20 pA. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Endkonzentration in der Messkammer. In die Baseline-IV-Relationen sind die basalen Stromdichten aller Messungen eingeschlossen. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 18 - 20$  Zellen/Kondition. **(B)** Anstieg der Stromdichten von 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  Loxapin und Vehikel relativ zur Baseline-Stromdichte bei +80 mV Depolarisation. Dargestellt sind die Einzelwerte sowie Mittelwerte  $\pm$  SEM. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; 50  $\mu\text{M}$  Loxapin versus Vehikel (ungepaarter t-Test mit Holm-Sidak-Mehrfachvergleichstest).

Durch das Injizieren kurzer und niedriger Strompulse (0 – 220 pA in 20 pA-Intervallen über eine Dauer von 10 Millisekunden) können einzelne, evozierte Aktionspotentiale vom Neuron ausgelöst und Veränderungen in den elektrophysiologischen Parametern analysiert werden. Repräsentative Ableitungen vor sowie nach Inkubation mit Vehikel, 50  $\mu\text{M}$  Loxapin oder VH425 sind in **Abbildung 20 A** gezeigt. Infolge der Präinkubation mit der „inflammatorischen Suppe“ bildeten

einige Neurone bereits bei 0 pA ein Aktionspotential aus und nach Zugabe von Loxapin oder VH425 wurde das Aktionspotential in den meisten Neuronen erst ab höheren Strominjektionen evoziert. Dabei konnte in nur drei von sechs Zellen in Gegenwart von Loxapin und in nur sieben von dreizehn Zellen in Gegenwart von VH425 überhaupt ein Aktionspotential initiiert werden. Das Vehikel beeinflusste die Ausbildung sowie die Eigenschaften der Aktionspotentiale nicht. In den Zellen, die nach Applikation von Loxapin oder VH425 ein Aktionspotential ausgebildet haben, ist die Rheobase gegenüber dem basalen Zustand sichtbar erhöht (**Abbildung 20 B**). Sie beschreibt die geringste elektrische Reizstärke, die zur Generierung eines Aktionspotentials benötigt wird. Dass die Unterschiede statistisch nicht signifikant sind kann durch die geringe n-Zahl und die große Streuung erklärt werden (Loxapine:  $p = 0,5000$ ; VH425:  $p = 0,0625$ ). Es muss beachtet werden, dass bei den Zellen, die sogar bei einer maximalen Strominjektion von 220 pA kein Aktionspotential ausbildeten, die Rheobase nicht bestimmt werden konnte. Weder die Testsubstanzen noch das Vehikel beeinflussten das Ruhemembranpotential signifikant. Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse, dass VH425 als Slack-Aktivator die Erregungsbildung- und Weiterleitung an sensorischen Neuronen modulieren kann.



**Abbildung 19: Untersuchung der Erregbarkeit sensibilisierter Spinalganglien nach Inkubation mit Slack-Aktivatoren**  
 Whole-cell Current-Clamp Messungen an Spinalganglien von naiven C57BL/6N-Mäusen. Die Neurone wurden über Nacht in einer inflammatorischen Suppe sensibilisiert und nur IB4-positive Zellen für die Messungen ausgewählt. **(A)** Dargestellt sind repräsentative Spannungsänderungen der Membran (Dauer der Strominjektion: 1 Sekunde) auf Baseline-Niveau und nach min. 30-sekündiger Inkubation mit Vehikel (0,03 % DMSO in Normal-Tyrode), 50  $\mu$ M Loxapin oder 50  $\mu$ M VH425. **(B)** Die Anzahl der resultierenden Aktionspotentiale (APs) sowie das Ruhemembranpotential (RMP) vor und nach Applikation der Testsubstanzen bei gleicher Strominjektion sind als Einzeldaten mit  $n = 5 - 10$  Zellen/Kondition in den Before-After-Graphen dargestellt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert. \*\*  $p < 0,01$  (Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test).



**Abbildung 20: Veränderungen elektrophysiologischer Parameter von evozierten Aktionspotentialen sensibilisierter DRG-Neurone nach Inkubation mit Slack-Aktivatoren**

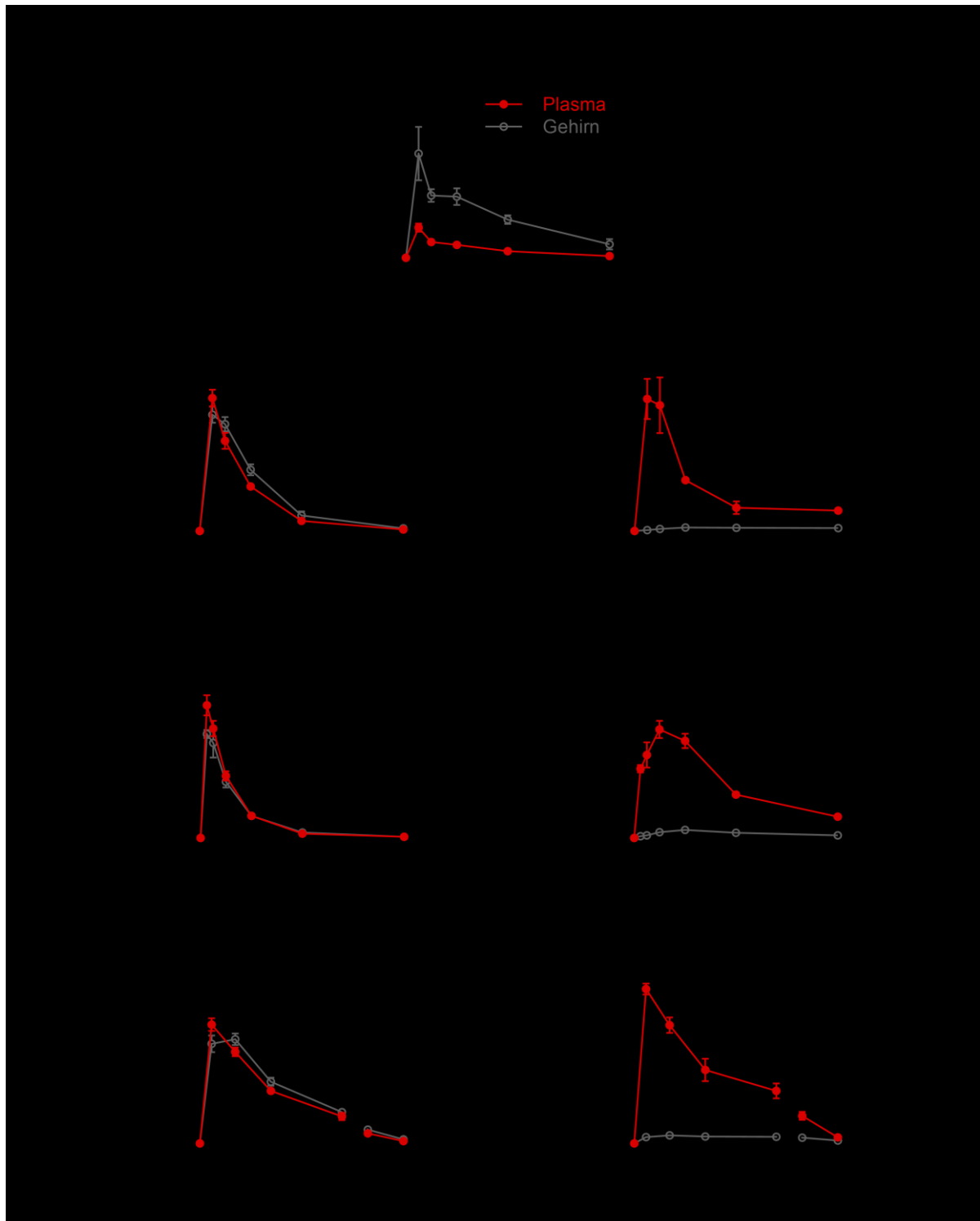
Whole-cell Current-Clamp Messungen an DRG-Neuronen von naiven C57BL/6N-Mäusen. Die Neurone wurden über Nacht in einer inflammatorischen Suppe sensibilisiert und nur IB4-positive Zellen für die Messungen ausgewählt. **(A)** Dargestellt sind repräsentative Spannungsänderungen der Membran (Dauer der Strominjektion: 10 Millisekunden) auf Baseline-Niveau und nach min. 30-sekündiger Inkubation mit Vehikel (0,03 % DMSO in Normal-Tyrode), 50 µM Loxapin oder 50 µM VH425. Aktionspotentiale wurden in nur drei von sechs Zellen in Gegenwart von Loxapin und in nur sieben von dreizehn Zellen in Gegenwart von VH425 evoziert, jedoch in elf von elf Zellen in Gegenwart vom Vehikel. **(B)** Die Veränderungen in der Rheobase und dem RMP vor und nach Applikation von Loxapin, VH425 oder Vehikel von den Zellen, die ein AP ausgebildet haben, sind als Einzeldaten mit  $n = 3 - 11$  Zellen/Kondition in den Before-After-Graphen dargestellt. Die Balken repräsentieren den Mittelwert (Mittelwert  $\pm$  SEM für die Rheobase).

## 3.2 In-vivo-Charakterisierung ausgewählter Slack-Aktivatoren

### 3.2.1 Pharmakokinetische Eigenschaften

Um die pharmakokinetischen (PK) Eigenschaften der interessantesten Slack-Aktivatoren abschätzen und somit geeignete Dosierungen und Messzeitpunkte festlegen zu können, wurden pharmakokinetische Studien in C57BL/6J-Mäusen durch die Auftragsfirma Enamine/Bienta durchgeführt. Die Pharmakokinetik von Loxapin, VH425 und EN12 wurden zunächst nach intraperitonealer Applikation über vier Stunden untersucht. Dabei wurde die Dosierung von Loxapin auf Grund des Auftretens motorischer Störungen auf 2,5 mg/kg reduziert, VH425 und EN12 wurden jeweils in 10 mg/kg appliziert. Im Anschluss wurde das PK-Profil für VH425 und EN12 zusätzlich nach intravenöser (über vier Stunden) und peroraler (über acht Stunden) Applikation analysiert (**Abbildung 21**). In allen Versuchen wurden sowohl die Konzentrationen im Plasma als auch im Gehirn bestimmt sowie deren Verhältnisse berechnet, um die ZNS-Gängigkeit der Testsubstanzen über die Blut-Hirn-Schranke abschätzen zu können (**Abbildung 22**). In **Tabelle 12** sind ausgewählte pharmakokinetischen Parameter berechnet aus den Plasmakonzentrationen aufgeführt.

Die Maximalkonzentration ( $c_{\max}$ ) von 2,5 mg/kg Loxapin (143 ng/ml) wurde bereits 15 Minuten nach intraperitonealer Applikation erreicht, es wurde eine Halbwertszeit ( $t_{1/2}$ ) von 1,03 Stunden ermittelt. Auch für VH425 und EN12 (jeweils in 10 mg/kg Dosierung) wurde nach 15 Minuten i.p. Applikation eine  $c_{\max}$  von 6280 ng/ml (VH425) bzw. 7810 ng/ml (EN12) erreicht. Die Halbwertszeit von VH425 liegt mit 0,58 Stunden deutlich unter der von EN12 mit 1,35 Stunden. Demgegenüber sind die Halbwertszeiten nach peroraler Applikation für beide Substanzen (VH425: 1,12 Stunden; EN12: 2,85 Stunden) deutlich länger. Die Maximalkonzentration von EN12 wurde erst nach einer Stunde erreicht, für VH425 wurde sie wie bereits nach i.p. Applikation nach 15 Minuten erzielt. Die perorale Bioverfügbarkeit bezogen auf die *Area under the curve* (AUC) nach intravenöser Applikation beträgt für VH425 86 %, für EN12 interessanterweise sogar 219 %. Dass eine Bioverfügbarkeit über 100 % erreicht wurde, könnte möglicherweise durch den großen Unterschied der applizierten Dosen (10 mg/kg p.o. versus 1 mg/kg i.v.), durch einen enterohepatischen Kreislauf oder über eine Resorption durch aktive Transporter im Gastrointestinaltrakt erklärt werden (Ward et al. 2004).



**Abbildung 21: Konzentration im Plasma und Gehirn nach intraperitonealer, peroraler und intravenöser Applikation von Slack-Aktivatoren in C57BL/6J-Mäusen**

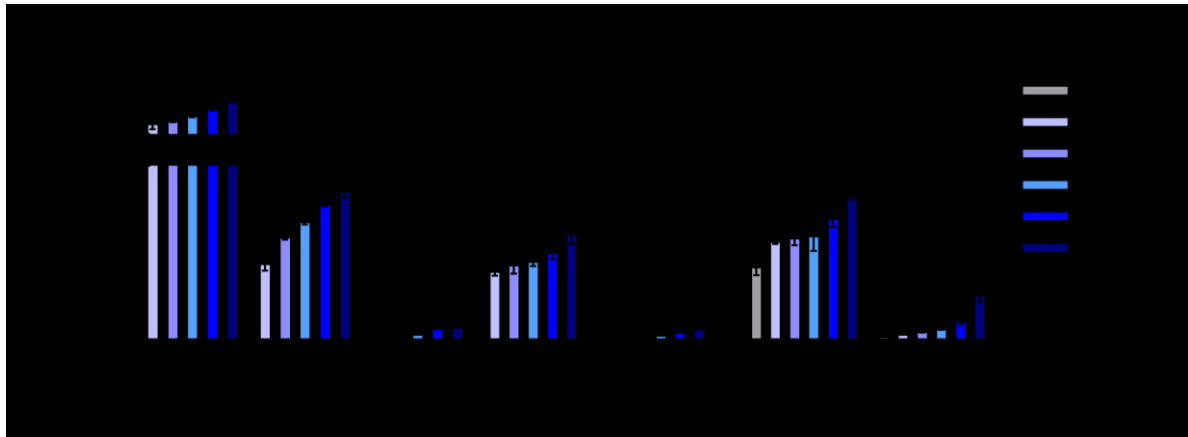
Loxapin, VH425 oder EN12 wurden in den angegebenen Dosierungen über verschiedene Applikationsrouten in C57BL/6J-Mäusen appliziert und Plasma- sowie Gehirnproben zu mehreren Zeitpunkten entnommen. Mittels HPLC-MS/MS wurden die Konzentrationen der Slack-Aktivatoren gemessen. Aufgetragen sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Plasmakonzentration (linke y-Achse) sowie der Gehirnkonzentrationen (rechte y-Achse) mit  $n = 3$  Versuchstieren/Zeitpunkt.

Betrachtet man die Verteilung der Slack-Aktivatoren zwischen Gehirn und Plasma, fällt auf, dass sich Loxapin bereits nach 15 Minuten stark im Gehirn anzureichern scheint, die Konzentration ist im Vergleich zu der im Plasma um das 3,5-fache erhöht. Überraschenderweise überwindet auch VH425 trotz seines zwitterionischen Charakters gut die Blut-Hirn-Schranke und zeigt eine nahezu 1:1 Verteilung zwischen Gehirn und Plasma unabhängig von der Applikationsroute. Möglicherweise kommt es wie bei dem Antihistaminikum Cetirizin zur Ausbildung intramolekularer Wasserstoffbrückenbindungen, sodass ein Ladungsausgleich stattfindet und die Polarität dadurch abnimmt (Pagliara et al. 1998). Für EN12 wurden erwartungsgemäß nur sehr geringe Konzentrationen im Gehirn detektiert, da es durch den Triazolonring eine hohe Polarität aufweist und somit die Blut-Hirn-Schranke schlecht überwinden kann.

Insgesamt zeigen sowohl VH425 als auch EN12 im Vergleich zu Loxapin ein vielversprechendes PK-Profil mit hohen peroralen Bioverfügbarkeiten, einer ausreichend langen Halbwertszeit und einer reduzierten ZNS-Gängigkeit. Unter diesem Aspekt könnte jedoch vor allem EN12 ein besonders interessanter Kandidat sein, da das Potential für zentralnervöse Nebenwirkungen deutlich reduziert ist.

**Tabelle 12:** Pharmakokinetische Parameter ermittelt aus den Plasmakonzentrationen

Parameter	intravenös		peroral		intraperitoneal		
	VH425	EN12	VH425	EN12	VH425	EN12	Loxapin
Dosis (mg/kg)	1	1	10	10	10	10	2,5
$c_{max}$ (ng/ml)	562	183	3140	962	6280	7810	143
$t_{max}$ (h)	/	/	0,25	1	0,25	0,25	0,25
$t_z$ (h)	4	4	8	8	4	4	4
$t_{1/2z}$ (h)	0,88	0,94	1,12	2,85	0,58	1,35	1,03
AUC (0 – $t_z$ ) (ng*h/ml)	460	203	4017	3883	5550	10283	167
AUC (0 – inf) (ng*h/ml)	473	213	4067	4667	5600	12633	178
$K_{el}$ (1/min)	0,0132	0,0123	0,0103	0,0040	0,0198	0,0086	0,0112
$V_d$ (ml/kg)	3000	6000	/	/	/	/	/
CL (ml/(min*kg))	35	78	/	/	/	/	/
Bioverfügbarkeit (%)	100	100	86	219	/	/	/



**Abbildung 22: Verhältnisse der Gehirn-/Plasmakonzentrationen von Slack-Aktivatoren nach intraperitonealer, peroraler und intravenöser Applikation**

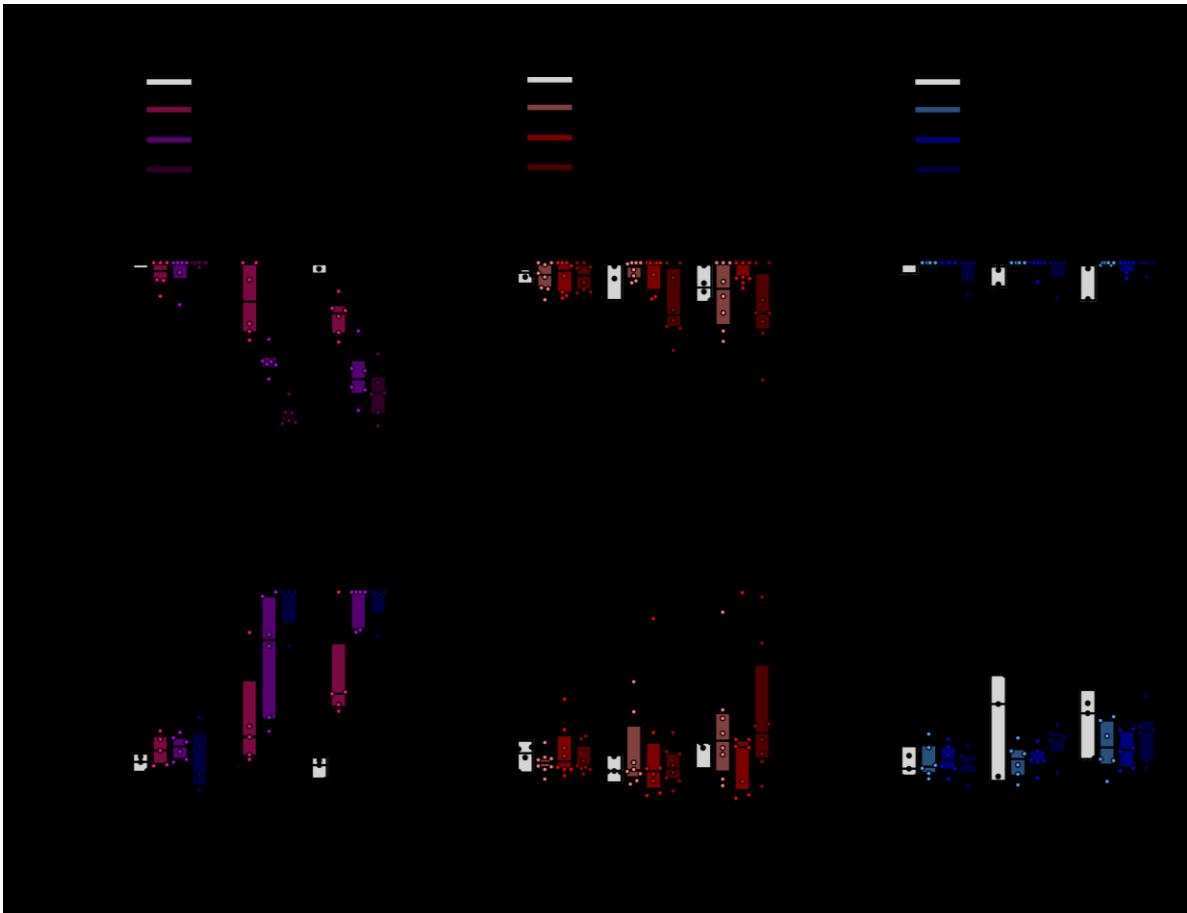
Dargestellt sind die Verhältnisse der Konzentrationen im Gehirn zu den Plasmakonzentrationen von Loxapin, VH425 und EN12 über mehrere Zeitpunkte nach intraperitonealer, peroraler und intravenöser Applikation als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 3$  Versuchstieren/Zeitpunkt.

### 3.2.2 Beeinflussung der motorischen Fähigkeiten

Da die Verhaltensversuche zur Beurteilung der antipruritischen und analgetischen Wirkung von Slack-Aktivatoren eine intakte motorische Koordination der Mäuse zur korrekten Interpretation der Ergebnisse voraussetzen, wurde diese nach Applikation der Testsubstanzen mittels des beschleunigenden Rotarod-Tests, des Vertical Pole Tests und des Open Field Tests untersucht. Loxapin als Neuroleptikum der 1. Generation kann typischerweise Störungen im extrapyramidalmotorischen System als Folge des  $D_2$ -Antagonismus auslösen. Darüber hinaus zeigt es eine gute ZNS-Gängigkeit und kann zu einer starken Sedierung führen (Heel et al. 1978; Popovic et al. 2015). Da es sich bei den neuen Slack-Aktivatoren um Loxapin-Derivate handelt, ist zwingend erforderlich, die motorische Beeinträchtigung nach ihrer Applikation in verschiedenen Konzentrationen zu testen, um die Aussagekraft der später durchgeführten Verhaltenstests gewährleisten zu können. Die zwei vielversprechendsten Kandidaten VH425 und EN12, welche für die weiteren *in vivo* Versuche ausgewählt wurden, sind in den Konzentrationen 3 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg getestet worden. Da aus Vorversuchen von Cathrin Flauaus bekannt war, dass Loxapin bereits in niedrigen Dosen zu einer starken Beeinträchtigung der Motorkoordination führt, wurden die Dosen 0,13 mg/kg, 0,39 mg/kg und 1,17 mg/kg ausgewählt. Zunächst erfolgte die Gewöhnung der Tiere an die Versuchsausrüstung und es wurden Baseline-Messungen im beschleunigenden Rotarod-Test und im Vertical Pole Test durchgeführt. Im Anschluss wurden die Slack-Aktivatoren oder das Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal appliziert und nach 15 und 45 Minuten erneut Messungen durchgeführt. Die Zeitpunkte wurden so gewählt, dass sie möglichst die Dauer der später durchgeführten Verhaltensversuche umspannen. In **Abbildung 23** ist die Verweildauer der Tiere auf dem Rotarod (**Abbildung 23 A**) und auf dem Vertical Pole (**Abbildung 23 B**) dargestellt. Erwartungsgemäß zeigten die Loxapin-behandelten Tiere eine



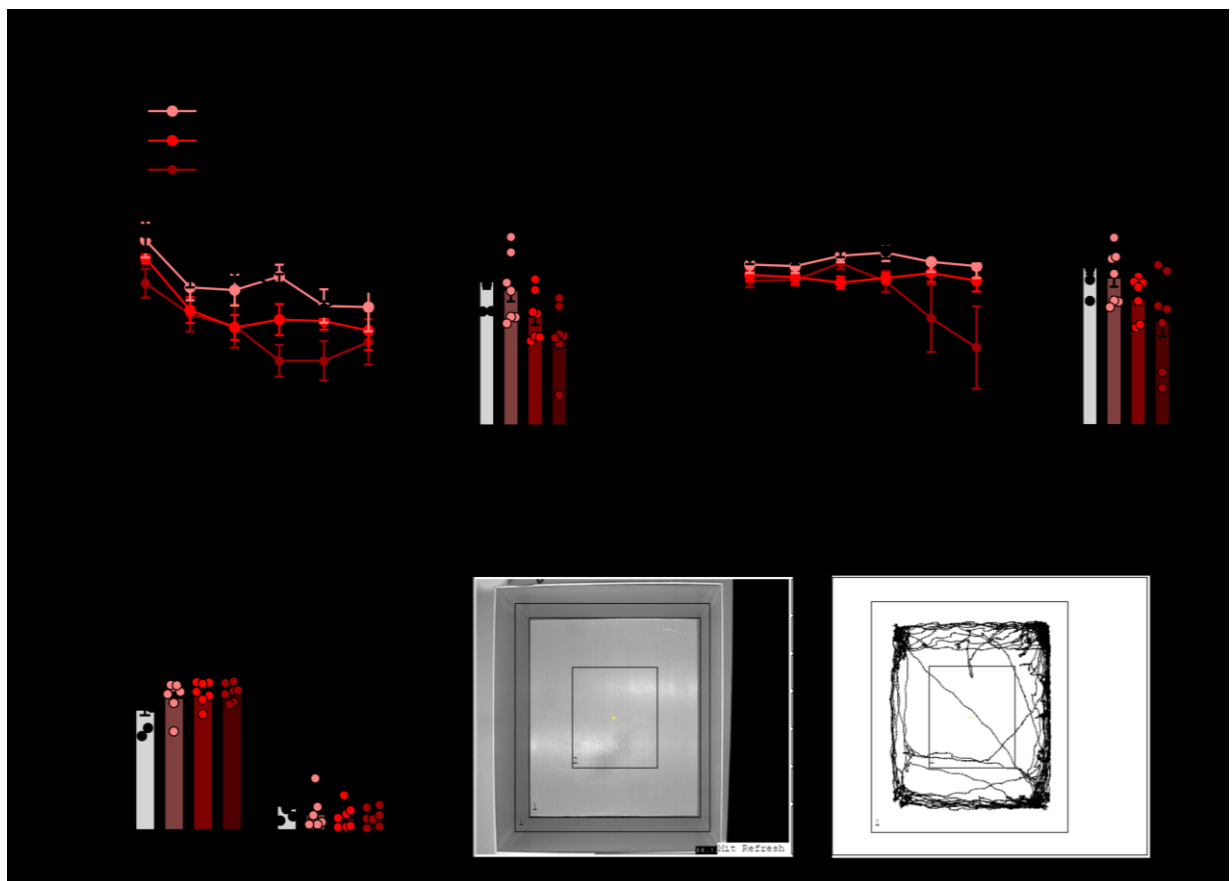
signifikante und dosisabhängige Beeinträchtigung der motorischen Koordination ab einer Dosis von 0,39 mg/kg gegenüber den Vehikel-behandelten Tieren über beide Messzeitpunkte in sowohl dem Rotarod- als auch dem Vertical Pole Test. Nach Applikation der neuen Slack-Aktivatoren VH425 und EN12 hingegen zeigte sich für keine der getesteten Dosierungen eine signifikante Reduktion der Verweildauer in beiden Tests. Somit kann davon ausgegangen werden, dass VH425 und EN12 bis zu einer Dosis von 30 mg/kg die motorischen Fähigkeiten der Versuchstiere nicht beeinträchtigen.



**Abbildung 23: Untersuchung der Motorkoordination von C57BL/6N nach Applikation von Loxapin, VH425 und EN12**  
 Dargestellt ist die Verweildauer auf dem beschleunigenden Rotarod (A) und dem Vertical Pole (B) jeweils als Einzelwerte und als Box-Plot vor sowie 15 und 45 Minuten nach der Applikation von Loxapin, VH425 oder EN12 in drei Dosierungen. Jede Testsubstanz wurde mit einer Vehikel-Gruppe (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) verglichen. Die Cut-Off Zeiten nach 300 Sekunden im Rotarod-Test und nach 20 Sekunden im Vertical Pole Test sind durch die gestrichelte Linie gekennzeichnet. Median und Interquartilsabstand sind durch die Box abgebildet, die Fehlerbalken umfassen das Minimum bis Maximum. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Vehikel (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Mehrfachvergleichstest).  $n = 6 - 8$  Versuchstiere/Gruppe.

Für VH425 wurde außerdem das explorative Verhalten und die motorische Aktivität der Tiere nach Applikation von 3 mg/kg, 10 mg/kg und 30 mg/kg im Open Field Test untersucht. Da eine wiederholte Exposition der Tiere im Open Field von starken Gewöhnungseffekten geprägt ist, wurde keine Baseline-Messung durchgeführt und das Verhalten jedes Tieres nur einmal im Open Field analysiert. VH425 oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) wurden intraperitoneal appliziert,

15 Minuten später wurden die Tiere in die Versuchsapparatur gesetzt und die Messung sofort gestartet. Ein Bild der Versuchsapparatur von oben ist in **Abbildung 24 C** gezeigt. Analysiert wurde zum einen die Zeit, welche die Tiere in Bewegung verbrachten relativ zur Gesamtmessdauer (**Abbildung 24 A**) und zum anderen die Geschwindigkeit, mit der sich die Tiere im Open Field bewegten (**Abbildung 24 B**). Die Applikation von VH425 führte zu einer dosisabhängigen Abnahme in der prozentualen Zeit in Bewegung sowie der durchschnittlichen Bewegungsgeschwindigkeit. Verglichen mit den Vehikel-behandelten Tieren war der Effekt für die Dosierung von 30 mg/kg statistisch signifikant. Möglicherweise kommt es durch VH425 ab höheren Dosen zu Sedierungseffekten, welche das explorative Verhalten der Mäuse im Open Field unterdrücken. Eine Hemmung der Motorkoordination kann auf Grund der Ergebnisse aus dem Rotarod-Test und dem Vertical Pole Test ausgeschlossen werden.

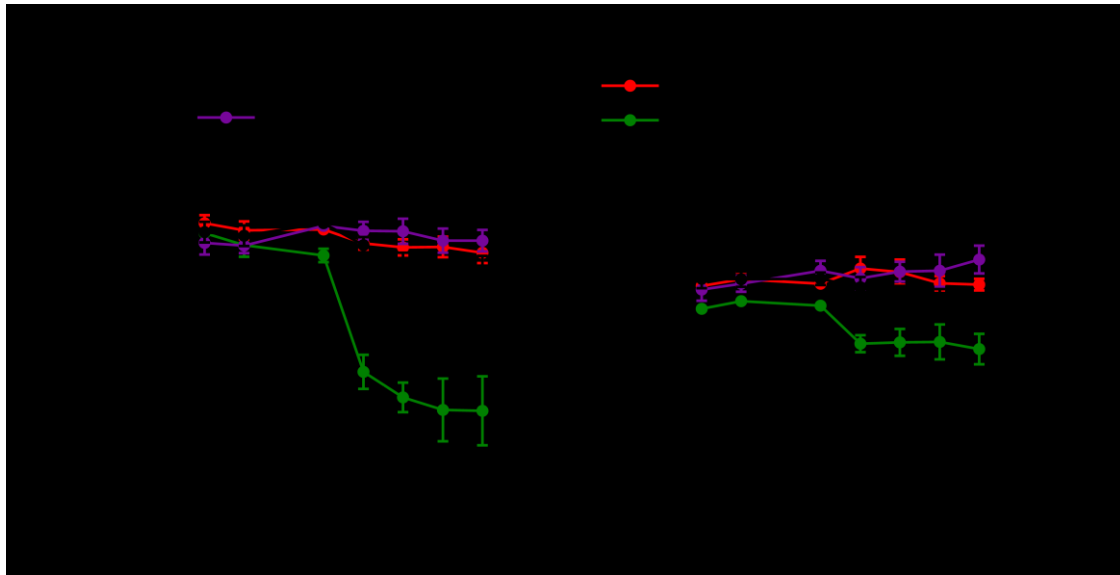


**Abbildung 24: Untersuchung des lokomotorischen und explorativen Verhaltens von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425 im Open Field Test**

(A) Links ist der prozentuale Anteil der Zeit, welche die Versuchstiere im Open Field in Bewegung verbrachten, und rechts ihre Geschwindigkeit über jeweils 5-Minuten-Intervalle aufgetragen. In den Balkendiagrammen sind jeweils die Durchschnittswerte über die gesamte Messdauer von 30 Minuten als Einzeldaten sowie als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. \*\*  $p < 0,01$  versus Vehikel (Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett-Mehrhypothesentest). (B) Dargestellt ist die prozentuale Aufenthaltszeit der Versuchstiere in der inneren und der äußeren Zone des Open Fields über die gesamte Messdauer als Einzelwerte sowie Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 7$  Versuchstieren/Gruppe. (C) Aufnahme des Open Fields von oben mit eingezogenen Linien, welche die innere von der äußeren Zone trennt. Rechts ist exemplarisch die zurückgelegte Spur eines Versuchstiers, getrackt durch die Analysesoftware VideoMot3D, dargestellt.

### 3.2.3 Beeinflussung von kardiovaskulären Funktionen

Bekanntermaßen bindet Loxapin an eine Vielzahl von Off-Targets, wie auch das SafetyScreen44™ Panel zur Charakterisierung des pharmakologischen Nebenwirkungsprofils zeigen konnte (**Abbildung 14**). Die Modulierung adrenerger ( $\alpha_{1A}$  und  $\alpha_{2A}$ ) und muskarinerner Rezeptoren (insbesondere M1 und M3) sowie eine Verschiebung der Noradrenalinpiegel durch eine Beeinflussung am Noradrenalintransporter könnten zu kardiovaskulären Nebenwirkungen führen. Zwar zeigte sich für den Slack-Aktivator VH425 im SafetyScreen44™ Panel ein reduziertes Bindungsprofil an den untersuchten Off-Targets ohne Aktivität an muskarinergen Rezeptoren, allerdings noch immer eine signifikante Bindung an  $\alpha_{1A}$ -Rezeptoren sowie dem Noradrenalintransporter. Daher sollten mögliche Effekte auf das kardiovaskuläre System in naiven C57BL/6N-Mäusen durch VH425 (10mg/kg) und Loxapin (0,13 mg/kg) im Vergleich zum Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) und der Positivkontrolle Morphin (10 mg/kg) untersucht werden. Darüber hinaus wird der zu Slack strukturell verwandelte Natrium-abhängige Kaliumkanal Slick in einer hohen Dichte im Herz exprimiert und ist wahrscheinlich an der Modulierung des Ruhemembranpotentials von Kardiomyozyten beteiligt (Bhattacharjee et al. 2003). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass manche der Slack-Aktivatoren möglicherweise auch eine Modulierung von Slick-Kanälen bewirken, was im Hinblick auf die Untersuchung kardialer Nebenwirkungen berücksichtigt werden sollte. Für die pulsoxymetrischen Messungen wurden die Versuchstiere zunächst über mehrere Tage an den Sensor, welcher als Clip am Hals angebracht wurde, gewöhnt. Dann wurde zuerst eine Baseline-Messung über 10 aufgenommen, im Anschluss die Testsubstanzen intraperitoneal appliziert und unmittelbar danach die Messung fortgesetzt. **Abbildung 25** zeigt die gemessene Herzfrequenz aufgetragen als Herzschläge pro Minute und die Atemfrequenz als Atemzüge pro Minute über eine Messdauer von 30 Minuten. Da die anfänglich starken Bewegungen der Tiere nach erneutem Anlegen des Sensor-Clips zu Artefakten in der Messung führten, wurden die ersten fünf Minuten nach Applikation der Testsubstanzen ausgeschlossen. Weder die Herzfrequenz noch die Atemfrequenz, welche stabil messbar waren, wurden von Loxapin oder VH425 verändert. Einzig Morphin führte als Positivkontrolle zu einer starken und statistisch signifikanten Abnahme der Herz- sowie der Atemfrequenz. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass weder Loxapin noch VH425 in den applizierten Dosen kardiovaskuläre Funktionen beeinträchtigen.



**Abbildung 25: Untersuchung kardiovaskulärer Funktionen in C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425, Loxapin und Morphin**

Dargestellt sind die Herzfrequenz und die Atemfrequenz von C57BL/6N-Mäusen aus Pulsoxymetrie-Messungen vor und nach Applikation von Loxapin, VH425, Morphin und Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) über 30 Minuten als Mittelwerte  $\pm$  SEM über 5-Minuten-Intervalle mit  $n = 6$  Versuchstieren/Gruppe. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus Vehikel (Zweifaktorielle ANOVA mit Dunnett-Mehrhypothesentest und Geisser-Greenhouse-Korrektur).

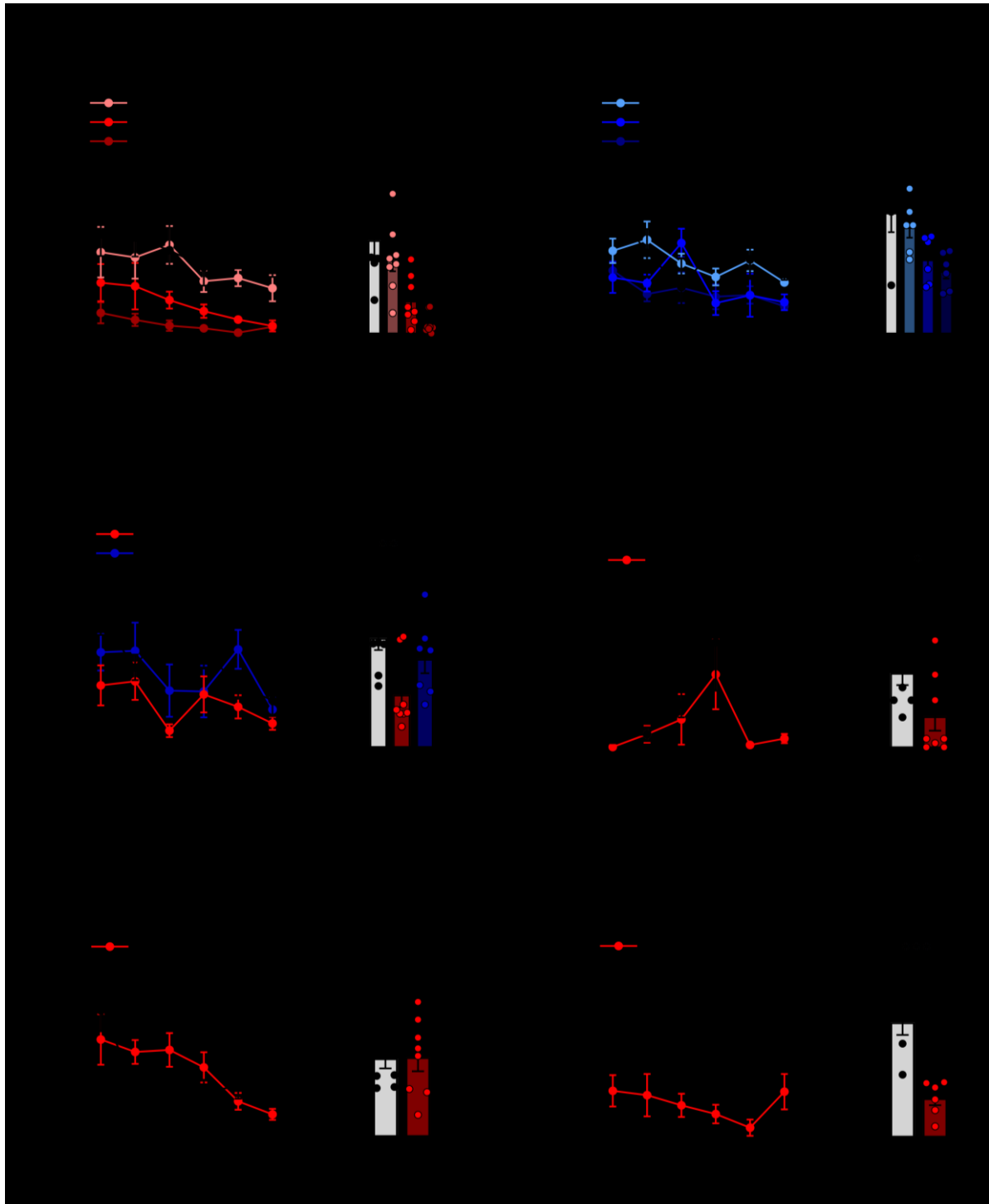
### 3.2.4 Beeinflussung des Juckreizverhaltens

#### 3.2.4.1 Akutes Juckreizverhalten

Da die Expression von Slack-Kanälen in den juckreizvermittelnden Neuronenpopulationen NP1, NP2 und NP3 besonders hoch ist und Vorarbeiten von Dr. Ruirui Lu und Fangyuan Zhou darauf hindeuten, dass Slack<sup>-/-</sup>-Tiere in einer Vielzahl von Juckreizmodellen ein verstärktes Kratzverhalten im Vergleich zu Wildtyp-Tieren zeigen (unveröffentlichte Daten), sollten im Folgenden die potentiell antipruritischen Effekte ausgewählter Slack-Aktivatoren untersucht werden. Dafür wurden VH425 und EN12 in verschiedenen Modellen des akuten histaminergen und nicht-histaminergen Juckreizes getestet. Zunächst wurde jeweils VH425, EN12 oder das Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal bzw. peroral appliziert und 15 Minuten später ein Pruritogen subkutan in die Nackenfalte der Tiere injiziert. Das Juckreizverhalten wurde als die Anzahl der Kratzreaktionen über 30 Minuten quantifiziert. Die Ergebnisse sind in **Abbildung 26** dargestellt. Im Chloroquin-vermittelten Juckreiz zeigte sich eine deutliche, dosisabhängige Abnahme der Kratzreaktionen nach sowohl der Applikation von VH425 als auch EN12. Beide Substanzen wurden in den Dosierungen 3, 10 und 30 mg/kg getestet, ein statistisch signifikanter antipruritischer Effekt zeigte sich jeweils ab der Dosierung von 10 mg/kg (**Abbildung 26 A und B**). VH425 führte insgesamt zu einer stärkeren Hemmung des Juckreizverhaltens im Vergleich zu EN12. In den weiteren Modellen des akuten Juckreizes wurde auf Grund des signifikanten Effekts beider Slack-Aktivatoren die intraperitoneale Dosierung von 10 mg/kg verwendet. Da Chloroquin über die Stimulation von MrgprA3-Rezeptoren

die Neurone der NP2-Population aktiviert (Liu et al. 2009), wurden weitere Modelle ausgewählt, bei denen das Pruritogen die Neurone der NP1- sowie NP2-Population aktiviert. Durch die Injektion des Peptids SLIGRL-NH<sub>2</sub> kommt es zur Stimulation des Protease-aktivierten-Rezeptors 2 (PAR<sub>2</sub>) sowie MrgprC11-Rezeptoren und einer Aktivierung von NP3-Neuronen (Shimada et al. 2006). Die mit VH425 behandelten Tiere kratzen sich signifikant weniger als die Vehikel-behandelte Kontrollgruppe. EN12 hingegen führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu keiner signifikanten Veränderung im Juckreizverhalten (**Abbildung 26 C**). Alle weiteren Versuche dienten daher der näheren Charakterisierung von VH425. Im  $\beta$ -Alanin-induzierten Juckreizmodell, welches durch Stimulation von MrgprD-Rezeptoren sensorische Neurone der NP1-Population aktiviert (Liu et al. 2012), führte VH425 ebenfalls zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Kratzreaktionen im Vergleich zur Vehikel-Gruppe (**Abbildung 26 D**). Interessanterweise zeigte sich kein hemmender Effekt von VH425 im Histamin-induzierten Juckreiz (**Abbildung 26 E**). Somit scheint die Slack-Aktivierung mittels VH425 ab einer Dosis von 10 mg/kg effektiv den akuten nicht-histaminergen Juckreiz zu hemmen, allerdings den Histamin-abhängigen Juckreiz nicht zu beeinflussen. Dass EN12 im SLIGRL-NH<sub>2</sub>-vermittelten Juckreizmodell keine Wirkung gezeigt hat, könnte an einer zu geringen Dosis liegen, da der Effekt bereits im Chloroquin-Modell weniger stark ausgeprägt war als bei einer gleichen Dosis VH425.

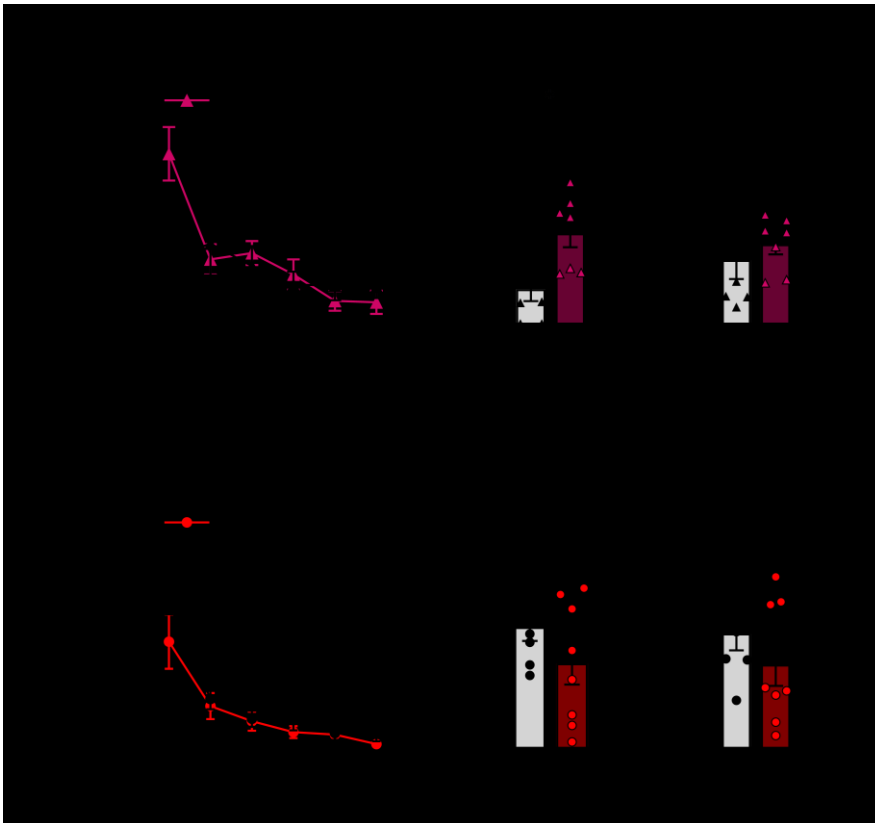
In der translationalen Entwicklung stellt die intraperitoneale Applikation keine geeignete Applikationsroute am Patienten dar, deshalb wurde das Chloroquin-Modell erneut nach peroraler Applikation von VH425 durchgeführt. Um ähnliche Plasmaspiegel wie nach i.p. Applikation zu erreichen, wurde bei der ermittelten oralen Bioverfügbarkeit von 86 % (Ergebnisse PK) die Dosierung auf 15 mg/kg erhöht. Die in **Abbildung 26 F** dargestellten Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante, antipruritische Wirkung von peroral appliziertem VH425 auf den Chloroquin-vermittelten Juckreiz. Somit konnte der hemmende Effekt des Slack-Aktivators auf akuten nicht-histaminergen Juckreiz auch bei einer Änderung der Applikationsroute bestätigt werden.



**Abbildung 26: Effekte von VH425 und EN12 in verschiedenen akuten Juckreiz-Modellen**

Zeitlicher Verlauf der Kratzreaktionen von C57BL/6N-Mäusen nach subkutaner Injektion eines Pruritogens in die Nackenfalte. Die Tiere wurden 15 Minuten vorher mit VH425, EN12 oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal (A-E) bzw. peroral (F) behandelt. (A, B) Konzentrationsabhängiger Effekt nach Applikation von 3, 10 und 30 mg/kg VH425 bzw. EN12 oder Vehikel nach s.c. Injektion von 200  $\mu$ g Chloroquin in 20  $\mu$ l NaCl 0,9 %. (C) Effekte von 10 mg/kg VH425 bzw. EN12 versus Vehikel nach s.c. Injektion von 100  $\mu$ g SLIGRL-NH<sub>2</sub> in 20  $\mu$ l NaCl 0,9 %. (D) Effekt von 10 mg/kg VH425 versus Vehikel nach s.c. Injektion von 100  $\mu$ g  $\beta$ -Alanin in 20  $\mu$ l NaCl 0,9 %. (E) Effekt von 10 mg/kg VH425 versus Vehikel nach s.c. Injektion von 800  $\mu$ g Histamin in 20  $\mu$ l NaCl 0,9 %. (F) Effekt von p.o. applizierten 15 mg/kg VH425 versus Vehikel nach s.c. Injektion von 200  $\mu$ g Chloroquin in 20  $\mu$ l NaCl 0,9 %. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen über 30 Minuten als Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  SEM mit n = 6 – 8 Tiere. \* p < 0,01; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 versus Vehikel (Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett-Mehrhypothesentest (A,B), ungepaarter t-Test (C-F)).

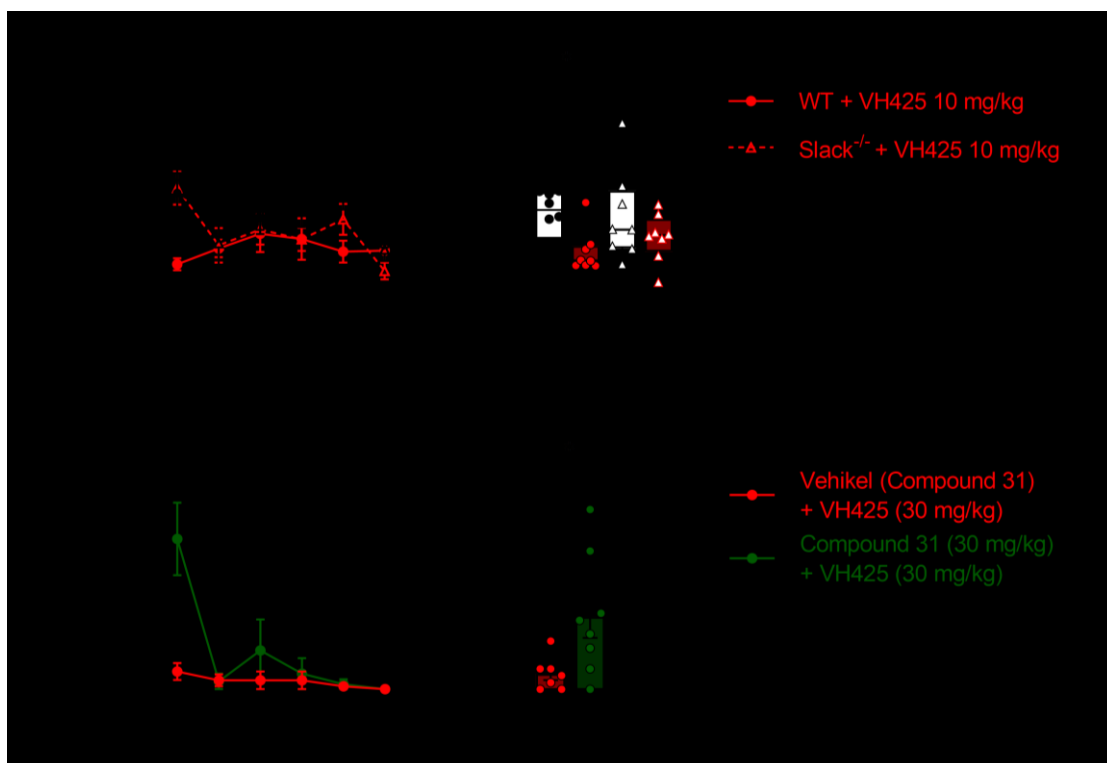
Neben der Injektion von SLIGRL-NH<sub>2</sub> gibt es eine weitere Möglichkeit, NP3-Neurone zu aktivieren. Der 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptor wird nahezu ausschließlich von NPPB-positiven Neuronen exprimiert, welche die NP3-Population umfasst (Usoskin et al. 2015). Mittels der subkutanen Injektion des 5-HT<sub>1F</sub>-Rezeptor-Agonisten LY344864 kann ein stabiles Juckreizverhalten in Mäusen induziert werden, da es zu einer Aktivierung Nbbp-positiver Neurone kommt, welche im Rückenmark GRP freisetzen (Solinski et al. 2019). Zunächst sollte untersucht werden, ob Slack generell an der Modulation des NPPB-vermittelten Juckreizes beteiligt ist. Dafür wurden 40 µg LY344864 subkutan in die Nackenfalte von Slack<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen injiziert und unmittelbar danach die Kratzreaktionen quantifiziert (**Abbildung 27 A**). Die Anzahl der Kratzreaktionen der Slack<sup>-/-</sup>-Mäuse war in den ersten fünf Minuten im Vergleich zu denen der Wildtyp-Tiere signifikant erhöht. Über die Dauer von 30 Minuten bleibt dieser Trend jedoch nicht statistisch signifikant. Somit scheint Slack nur in den ersten Minuten an der Verarbeitung des LY344864-induzierten Juckreizes beteiligt zu sein.



**Abbildung 27: Untersuchung des LY344864-induzierten Juckreizverhaltens von Slack<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen und von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425**

(A) Zeitlicher Verlauf der Kratzreaktionen von Slack<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach subkutaner Injektion mit dem Pruritogen LY344864 (40 µg in 20 µl PBS) in die Nackenfalte. (B) Zeitlicher Verlauf der Kratzreaktionen von C57BL/6N-Mäusen nach subkutaner Injektion mit dem Pruritogen LY344864 (40 µg in 20 µl PBS) in die Nackenfalte. Die Tiere wurden 15 Minuten vorher mit 10 mg/kg VH425 oder Vehikel (10 % β-Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen innerhalb der ersten 5 Minuten und über die gesamte Messdauer von 30 Minuten als Einzelwerte und Mittelwerte ± SEM mit n = 7 – 8 Versuchstieren/Gruppe. \* p < 0,01 (ungepaarter t-Test).

Nach Vorbehandlung von naiven C57BL/6N-Mäusen mit VH425 (10 mg/kg) und anschließender Stimulation mit LY344864 15 Minuten später zeigte sich zwar eine Hemmung der Kratzreaktionen innerhalb der ersten fünf Minuten, diese ist aber im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren statistisch nicht signifikant (**Abbildung 27 B**). Somit scheint Slack nur in einem geringen Maße an der Verarbeitung des über 5HT<sub>1F</sub>-Rezeptoren vermittelten Pruritus beteiligt zu sein, sodass eine Slack-Aktivierung mittels VH425 keinen starken Effekt ausüben kann. Um zu bestätigen, dass der Wirkmechanismus von VH425 tatsächlich auf einer gezielten Aktivierung von Slack-Kanälen beruht, wurden abschließend zwei mechanistische Versuche im Chloroquin-Modell durchgeführt. Zunächst wurde die Wirksamkeit von VH425 in Slack<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen gegen Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) verglichen, die Ergebnisse sind in **Abbildung 28 A** gezeigt. Es konnte die Hypothese bestätigt werden, dass VH425 bei fehlender Expression des Slack-Kanals in Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen keinen signifikanten juckreizhemmenden Effekt zeigt. In Wildtyp-Mäusen dagegen wurde erwartungsgemäß das akute Chloroquin-induzierte Juckreizverhalten signifikant im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Wildtyp-Mäusen gehemmt.



**Abbildung 28: Mechanistische Untersuchung des Slack-aktivierenden Effekts von VH425**

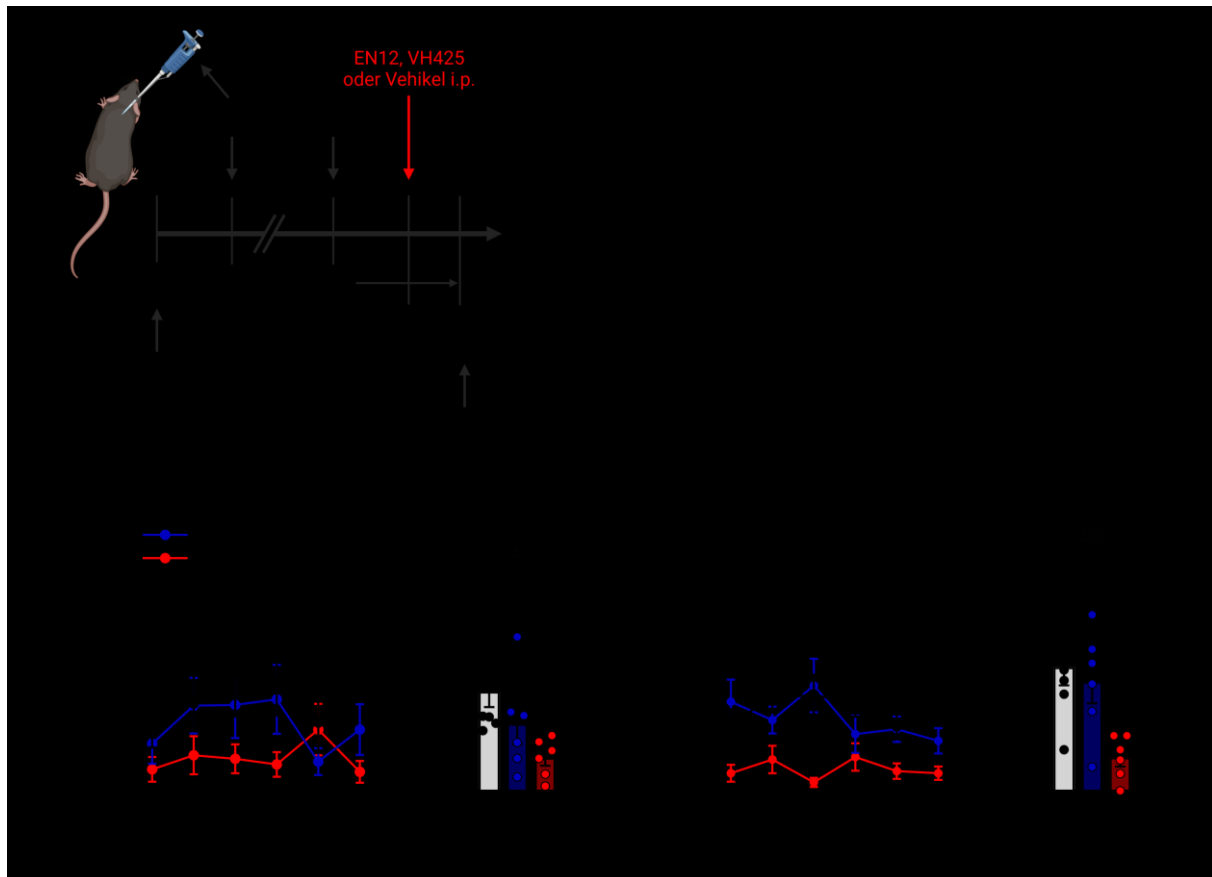
**(A)** Zeitlicher Verlauf der Kratzreaktionen von Slack<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Mäusen nach subkutaner Injektion mit 200  $\mu$ g Chloroquin in 20  $\mu$ l 0,9 % NaCl in die Nackenfalte. Die Tiere wurden 15 Minuten vorher mit 10 mg/kg VH425 oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen über 30 Minuten als Einzelwerte und als Boxplot mit n = 8 Versuchstieren/Gruppe. Median und Interquartilsabstand sind durch die Box abgebildet, die Fehlerbalken umfassen das Minimum bis Maximum. \* p < 0,05 (Kruskal-Wallis-Test mit Dunn-Mehrfachvergleichstest). **(B)** Zeitlicher Verlauf der Kratzreaktionen von C57BL/6N-Mäusen nach subkutaner Injektion mit 200  $\mu$ g Chloroquin in 20  $\mu$ l 0,9 % NaCl in die Nackenfalte. Die Tiere wurden 15 Minuten vorher mit 30 mg/kg Compound 31 oder dem entsprechenden Vehikel (2 % DMSO mit 10 % Kolliphor® HS 15 in 0,9 % NaCl) intraperitoneal behandelt, 5 Minuten später wurde allen Tieren 30 mg/kg VH425 intraperitoneal appliziert. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen über 30 Minuten als Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  SEM. \* p < 0,05 (ungepaarter t-Test).



Im zweiten Kontrollexperiment sollte untersucht werden, ob die VH425-vermittelte Wirkung pharmakologisch antagonisierbar ist, was zur weiteren Bestätigung des postulierten Wirkmechanismus beitragen würde. Daher wurden C57BL/6N-Mäusen zunächst der Slack-Inhibitor Compound 31 in einer Dosis von 30 mg/kg intraperitoneal appliziert und fünf Minuten später der Slack-Aktivator VH425 in gleicher Dosierung. 15 Minuten später wurde Chloroquin s.c. in die Nackenfalte appliziert. Bei den ausschließlich mit VH425-behandelten Tieren wurde das Chloroquin-induzierte Juckreizverhalten nahezu vollständig gehemmt, was die Ergebnisse des in **Abbildung 26 A** beschriebenen Versuchs bestätigen. Die vorher zusätzlich mittels Compound 31 behandelten Tiere zeigten dagegen signifikant mehr Kratzreaktionen (**Abbildung 28 B**), was auf eine Interaktion von Compound 31 und VH425 am gleichen Target schlussfolgern lässt. Auffällig ist, dass der juckreizhemmende Effekt von VH425 durch Compound 31 nicht vollständig antagonisiert werden konnte, da sich die Tiere insgesamt trotzdem sehr wenig kratzten. Möglicherweise führen unterschiedliche kinetische Verteilungsprozesse von Compound 31 und VH425 zu einer ungleichen Modulation des Slack-Kanals. Außerdem könnte die zusätzliche Aktivität an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren von Compound 31 eine Sedierung der Tiere verursacht haben, welche das Juckreizverhalten indirekt beeinflusst (Griffin et al. 2021).

### 3.2.4.2 Chronisches Juckreizverhalten

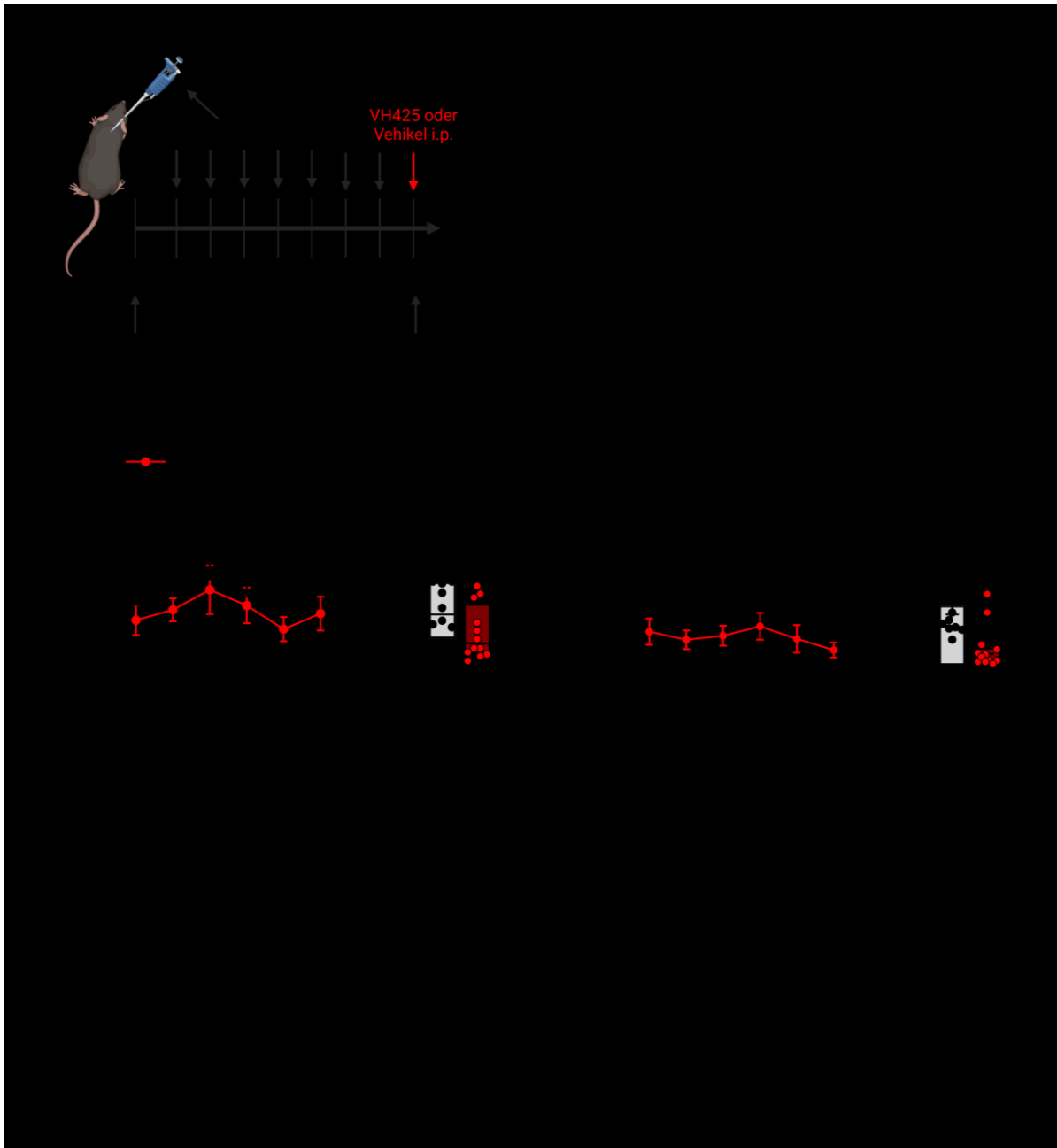
In der klinischen Praxis stellt besonders der chronische Juckreiz, welcher überwiegend durch nicht-histaminerge Signalwege vermittelt wird, eine schwer therapierbare Erkrankung dar. Um zu überprüfen, ob Slack-Aktivatoren neben einer Wirksamkeit im akuten, Histamin-unabhängigem Juckreiz auch zu einer Hemmung von chronischem Juckreiz führen können, wurden die Effekte von VH425 und EN12 auf das spontane Juckreizverhalten von C57BL/6N-Mäusen in zwei unterschiedlichen Modellen für dermatologische Erkrankungen untersucht. In **Abbildung 29** sind die Ergebnisse aus dem Modell der allergischen Kontaktdermatitis dargestellt. In diesem Modell wurde die rasierte Haut im Bereich des Nackens der Mäuse mit 100 µl einer 0,15 %igen DNFB-Lösung sensibilisiert. Die zweite Sensibilisierung erfolgte 14 Tage später, nach 105 Minuten wurden VH425 (10 mg/kg), EN12 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 % β-Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal appliziert und 15 Minuten später das spontane Juckreizverhalten mittels der Anzahl der Kratzreaktionen und der Kopfschüttelbewegungen analysiert (**Abbildung 29 B, C**). Ein charakteristisches Kopfschütteln der Tiere wurde während der Durchführung der chronischen Juckreizmodelle entdeckt und aufgrund der signifikanten Korrelation mit der Anzahl an Kratzreaktionen in beiden Modellen als ein zweites spontanes Juckreizverhalten identifiziert (**Abbildung 30 D**).



**Abbildung 29: Effekte von VH425 und EN12 im Modell der allergischen Kontaktdermatitis**

**(A)** Experimenteller Aufbau des AKD-Modells in C57BL/6N-Mäusen. Die Versuchstiere wurden fünf Tage nach der Rasur im Bereich des Nackens zweimal im Abstand von 14 Tagen mit 1-Fluor-2,4-dinitrobenzol (je 100  $\mu$ l einer 0,15 %igen Lösung in einem Gemisch aus Aceton/Olivenöl (Verhältnis 3:1)) sensibilisiert. 105 Minuten nach der zweiten Sensibilisierung erfolgte die intraperitoneale Applikation von EN12 (10 mg/kg), VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl), 15 Minuten später wurde das spontane Juckreizverhalten über 30 Minuten quantifiziert. **(B, C)** Zeitlicher Verlauf der spontanen Kratzreaktionen bzw. Kopfschüttler als Mittelwerte  $\pm$  SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen bzw. Kopfschüttler über 30 Minuten. \*  $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$  versus Vehikel (Einfaktorielle ANOVA mit Dunnett-Mehrhypothesentest).  $n = 6 - 7$  Versuchstiere/Gruppe.

Die Behandlung mit VH425 in einer Dosierung von 10 mg/kg konnte sowohl die Anzahl der Kratzreaktionen als auch die Kopfschüttelbewegungen statistisch signifikant reduzieren im Vergleich zu den Vehikel-behandelten Tieren. EN12 dagegen zeigte keine Effekte im spontanen Juckreizverhalten und wurde daher im chronischen Juckreizmodell der atopischen Dermatitis nicht weiter untersucht. Die atopische Dermatitis wurde mittels einer 7-tägigen, topischen Behandlung mit dem Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon MC903 (Calcipotriol) induziert (**Abbildung 30 A**), worauf hin die Mäuse ein rotes, trocken-schuppiges Hautekzem ausbildeten. In **Abbildung 30 B** und **C** ist zu erkennen, dass VH425 ebenfalls das spontane Juckreizverhalten im AD-Modell hemmt, da sich die behandelten Tiere signifikant weniger kratzten und mit dem Kopf schüttelten als die Kontrolltiere. Zusammenfassend kann davon ausgegangen werden, dass der Slack-Aktivator VH425 in einer Dosierung von 10 mg/kg starke antipruritische Effekte im akuten, nicht-histaminergen Pruritus sowie in chronischen dermalen Juckreizzuständen ausübt.



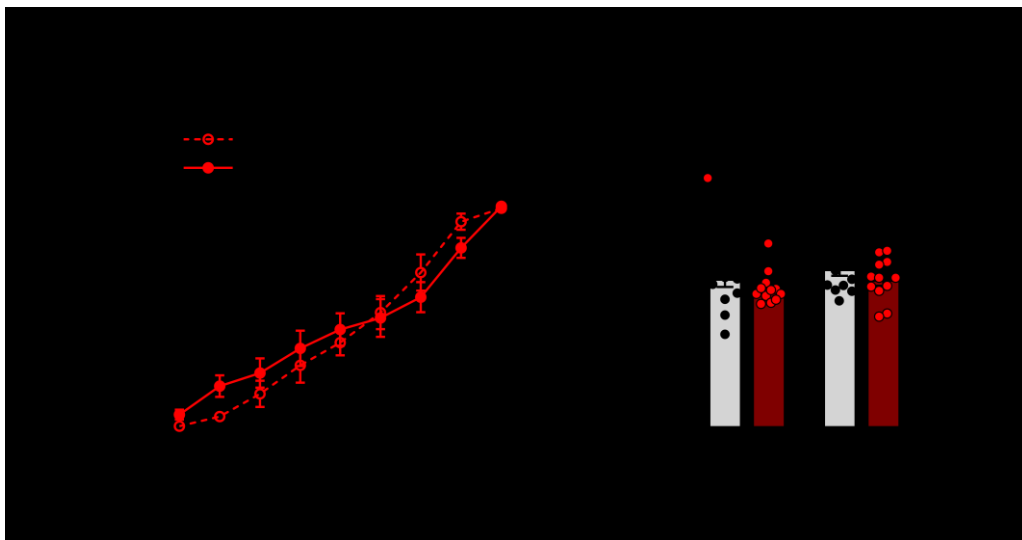
**Abbildung 30: Effekte von VH425 im Modell der atopischen Dermatitis**

**(A)** Experimenteller Aufbau des AD-Modells in C57BL/6N-Mäusen. Die Versuchstiere wurden fünf Tage nach der Rasur im Bereich des Nackens jeden Morgen über sieben Tage mit dem Vitamin D<sub>3</sub>-Analogon MC903 (Calcipotriol; 0,2 mM gelöst in 20 µl absolutem Ethanol) behandelt. Am Tag 8 erfolgte die intraperitoneale Applikation von VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 % β-Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) und 15 Minuten später wurde das spontane Juckreizverhalten über 30 Minuten quantifiziert. **(B, C)** Zeitlicher Verlauf der spontanen Kratzreaktionen bzw. Kopfschüttler als Mittelwerte ± SEM sowie die Summe der Kratzreaktionen bzw. Kopfschüttler über 30 Minuten mit n = 12 Versuchstieren/Gruppe. \* p < 0,01 (Mann-Whitney-Test); \*\*\* p < 0,001 (ungepaarter t-Test). **(D)** Pearson-Korrelation zwischen der Anzahl an Kopfschüttlern und den Kratzreaktionen aus dem DNFB-induzierten AKD-Modell, dem MC903-induzierten AD-Modell sowie den gepoolten Daten aus beiden Modellen zusammen. r = Pearson-Korrelationskoeffizient.

### 3.2.5 Beeinflussung des Schmerzverhaltens

#### 3.2.5.1 Mechanische und thermische Schmerzschwelle

Slack-Kanäle werden in einer Population sensorischer Nervenfasern exprimiert, die unter anderem an der Detektion mechanischer und thermischer Stimuli beteiligt sind. Um zu untersuchen, ob die Applikation eines Slack-Aktivators die basale mechanische oder thermische Sensitivität der Versuchstiere beeinflusst, wurden Messungen mit von Frey-Filamenten und einer Hargreaves-Apperatur mit naiven C57BL/6N-Mäusen vor sowie 15 Minuten nach intraperitonealer Applikation von VH425 (10 mg/kg) durchgeführt. Dabei wurden für jedes Tier beide Hinterpfoten gemessen und die Ergebnisse gepoolt analysiert. Die mit VH425-behandelten Tiere zeigten keinen Unterschied in der mechanischen oder thermischen Sensitivität (**Abbildung 31**) und es kann geschlussfolgert werden, dass die basale sensorische Wahrnehmung durch VH425 nicht verändert wird.



**Abbildung 31: Untersuchung der mechanischen und thermischen Sensitivität von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425**

(A) Bestimmung der mechanischen Sensitivität mittels Frey-Filamenten. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an positiven Reaktionen nach 10 Stimulationen pro Filament vor und 15 Minuten nach Applikation von VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl). (B) Bestimmung der thermischen Sensitivität mittels einer Hargreaves-Apperatur bei einer Intensität von 25. Die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der Hinterpfote wurde vor und 15 Minuten nach Applikation von VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) bestimmt. (A, B) Von jedem Tier wurden beide Hinterpfoten gemessen und die Ergebnisse gepoolt als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 6$  Versuchstieren/Gruppe dargestellt.

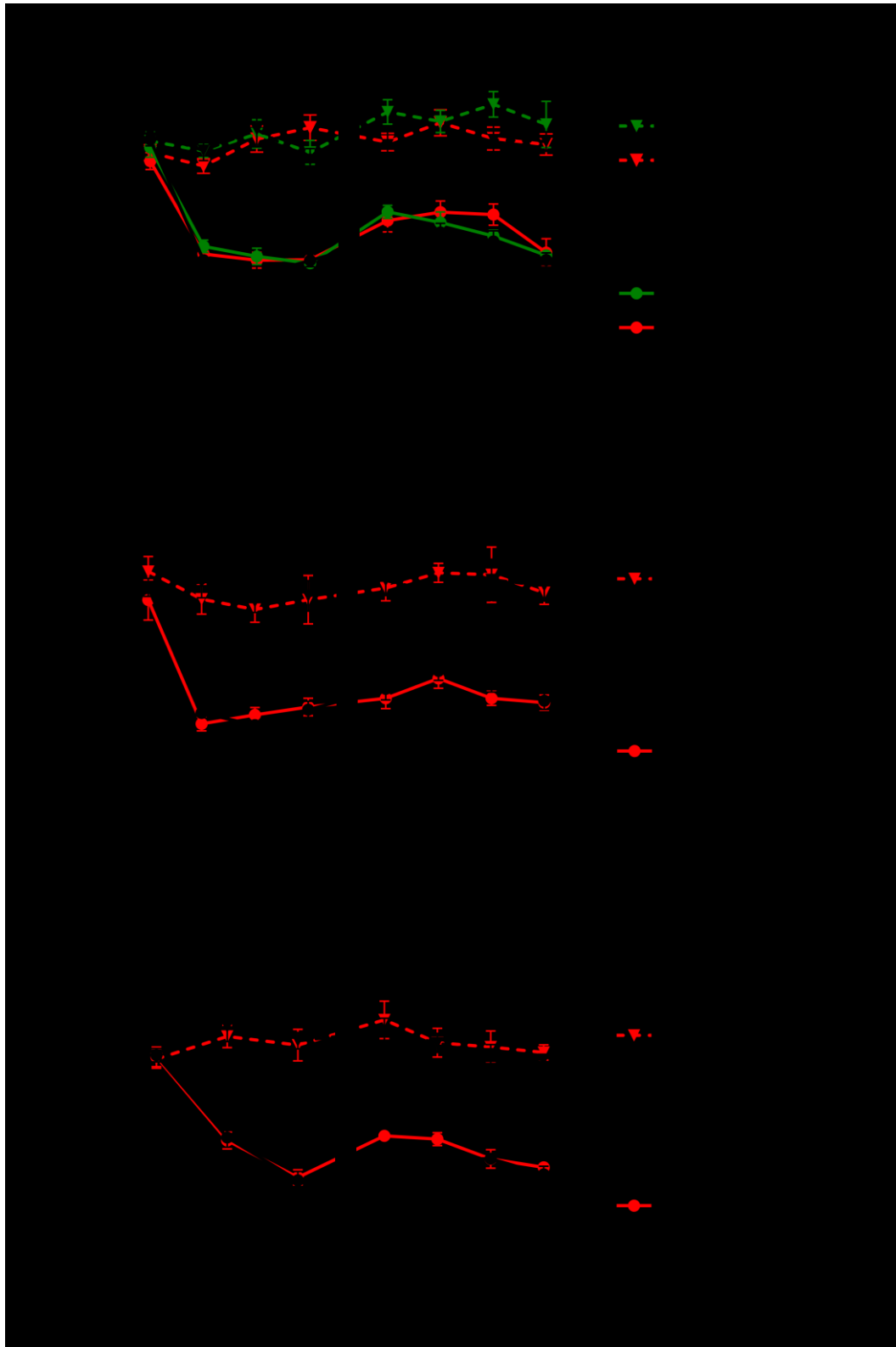
#### 3.2.5.2 Neuropathisches Schmerzverhalten

In Vorarbeiten von Dr. Ruirui Lu konnte gezeigt werden, dass eine Slack-Aktivierung durch die intraperitoneale Applikation von Loxapin bereits in einer Dosis von 0,17 mg/kg (als Succinat-Salz, entspricht 0,13 mg/kg freier Base) das neuropathische Schmerzverhalten von Wildtyp-Mäusen im *Spared nerve injury* (SNI)-Modell der peripheren Nervenverletzung signifikant reduziert (Lu et al. 2015). Zunächst sollte ermittelt werden, ob und in welcher Dosis VH425 ebenfalls das Schmerzverhalten im SNI-Modell beeinflusst. Nach Durchtrennung der zwei Äste des

*Nervus ischiadicus* entwickelt sich 14 Tage nach der Operation auf der lateralen Seite der Hinterpfote, welche durch den intakt gebliebenen dritten Ast (*Nervus suralis*) innerviert wird, eine stabile mechanische Allodynie aus. VH425 in verschiedenen Dosierungen (0,26; 3 und 10 mg/kg), Loxapin (0,13 mg/kg) oder Vehikel (2 % DMSO in 0,9 % NaCl bzw. 10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) wurden intraperitoneal appliziert und die mechanische Sensitivität wurde über 1 – 24 Stunden bestimmt. Dafür wurden die Latenzzeiten bis zum Zurückziehen der Hinterpfote (ipsi- und kontralateral) nach mechanischer Stimulation im Dynamic Plantar Aesthesiometer gemessen. Als Anfangsdosis für VH425 wurde die doppelte Dosierung von Loxapin gewählt (0,26 mg/kg), es zeigte sich jedoch keine statistisch signifikante Veränderung der Latenzzeiten im Vergleich zur Vehikelgruppe (**Abbildung 32 A**). Die Positivkontrolle Loxapin führte zwar nach einer Stunde zu einem tendenziellen, aber ebenfalls statistisch nicht signifikanten ( $p = 0,0853$ ) Anstieg der Latenzzeit. Jedoch zeigten bereits die Vehikel-behandelten Tiere eine leichte Veränderung in der mechanischen Sensitivität.

Da eine Dosis von 3 mg/kg VH425 die mechanische Hypersensitivität ebenfalls nicht beeinflusste, wurde diese weiter erhöht (**Abbildung 32 B**). In einer Dosis von 10 mg/kg führte VH425 nach einer Stunde zu einer statistisch signifikant erhöhten Latenzzeit im Vergleich zur Vehikelgruppe, allerdings war der Effekt nur gering ausgeprägt (**Abbildung 32 C**). Somit kann geschlossen werden, dass VH425 in höheren Dosen eine moderate Senkung der mechanischen Hypersensitivität im SNI-Modell bewirkt. Die über den Messzeitraum unveränderten Latenzzeiten der kontralateralen Pfote weisen außerdem darauf hin, dass die motorischen Fähigkeiten der Tiere nicht durch die Applikation von VH425 eingeschränkt werden.

Der zweite Slack-Aktivator EN12 sollte ebenfalls im SNI-Modell untersucht werden. Da die antipruritischen Effekte im Chloroquin-Modell (**Abbildung 26 B**) bei gleicher Dosierung im Vergleich zu VH425 schwächer ausgeprägt waren, wurde für EN12 im SNI-Modell eine höhere Konzentration von 30 mg/kg ausgewählt. Auf die Zeitpunkte 5 und 24 Stunden nach Applikation wurde verzichtet, da die Halbwertszeit nach intraperitonealer Applikation bei nur 1,35 Stunden liegt (**Tabelle 12**). Eine halbe Stunde nach Applikation zeigte sich ein tendenzieller, jedoch statistisch nicht signifikanter ( $p = 0,1412$ ) Anstieg der Latenzzeiten im Vergleich zur Vehikelgruppe (**Abbildung 33**). Bis zu einer Dosierung von 30 mg/kg kann folglich von keiner Hemmung des neuropathischen Schmerzverhaltens durch EN12 nach i.p. Applikation ausgegangen werden



**Abbildung 32: Effekte von VH425 im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung**

Zeitlicher Verlauf der mechanischen Hypersensitivität von C57BL/6N-Mäusen im SNI-Modell. Dargestellt ist die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der stimulierten Hinterpfote im Dynamic Plantar Aesthesiometer vor und nach verschiedenen Zeitpunkten post-SNI. Nach 30 Tagen (A, B) bzw. 14 Tagen (C) wurden unterschiedlichen Dosen VH425 (0,26 mg/kg (A); 3 mg/kg (B) und 10 mg/kg (C)), Vehikel (2 % DMSO in 0,9 % NaCl (A, B) oder 10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl (C)) oder Loxapin (0,13 mg/kg (A)) intraperitoneal appliziert und die Latenzzeiten über 1 – 24 Stunden bestimmt. Von jedem Tier wurde sowohl die linke (ipsilaterale) als auch rechte (kontralaterale) Pfote gemessen und als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 6 - 8$  Versuchstieren/Gruppe dargestellt. \*\*  $p < 0,01$  versus Vehikel der ipsilateralen Seite (Zweifaktorielle ANOVA mit Šídák-Mehrhypothesentest und Geisser-Greenhouse-Korrektur).

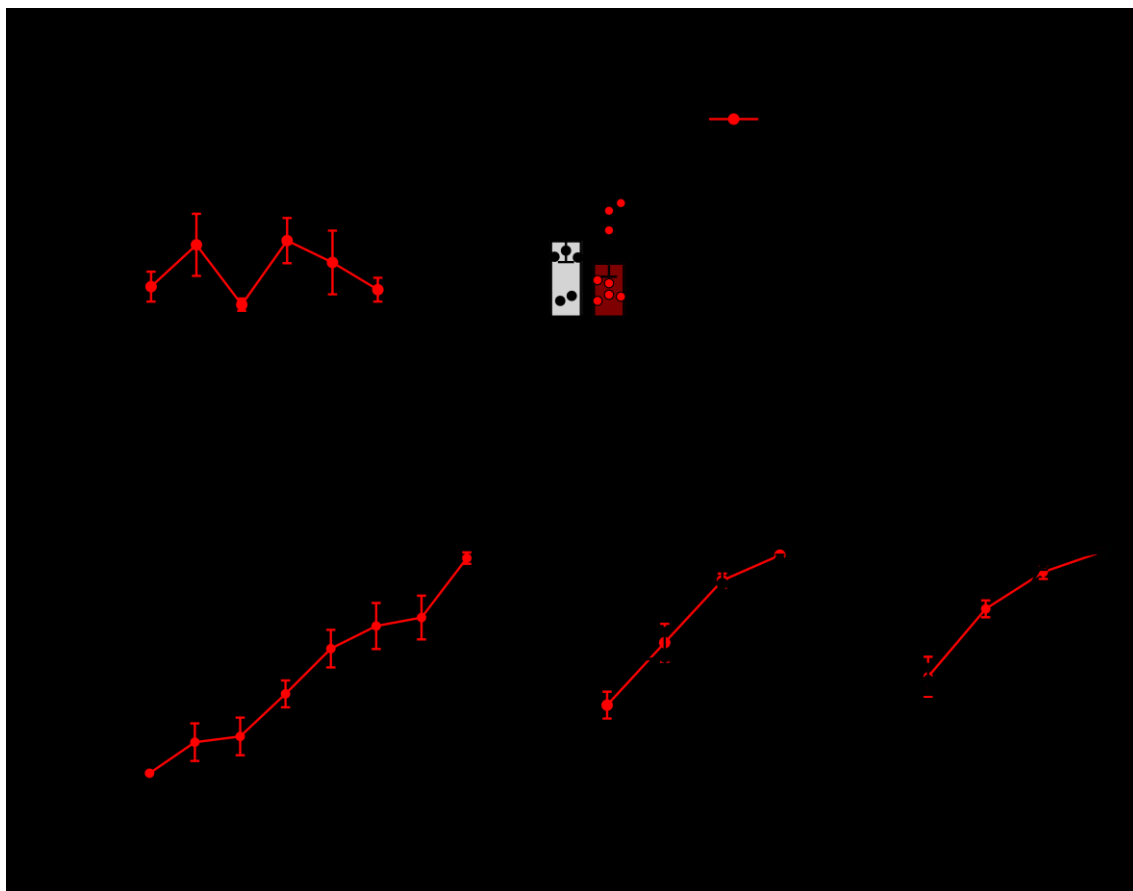


**Abbildung 33: Effekte von EN12 im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung**

Zeitlicher Verlauf der mechanischen Hypersensitivität von C57BL/6N-Mäusen im SNI-Modell. Dargestellt ist die Latenzzeit bis zum Zurückziehen der stimulierten Hinterpfote im Dynamic Plantar Aesthesiometer vor und nach verschiedenen Zeitpunkten post-SNI. Nach 28 Tagen wurde EN12 (30 mg/kg) oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal appliziert und die Latenzzeiten über drei Stunden bestimmt. Von jedem Tier wurde sowohl die linke (ipsilaterale) als auch rechte (kontralaterale) Pfote gemessen und als Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n = 8$  Versuchstieren dargestellt.

### 3.2.5.3 Schmerzverhalten nach TRPA1-Aktivierung

In einem zweiten Schmerzmodell wurde der TRPA1-Aktivator AITC in die plantare Seite einer Hinterpfote von C57Bl/6N-Mäusen injiziert, um das TRPA1-vermittelte Schmerzverhalten der Tiere nach 15-minütiger Vorbehandlung mit VH425 oder Vehikel zu untersuchen. Zunächst wurde das Leckverhalten unmittelbar nach AITC-Injektion über 30 Minuten bestimmt und im Anschluss die mechanische Hypersensitivität mittels von Frey-Filamenten nach einer und dreieinhalb Stunden quantifiziert. Die in **Abbildung 34** dargestellten Ergebnisse zeigen eine leichte, jedoch statistisch nicht signifikante, Abnahme des Leckverhaltens und keine Beeinflussung der mechanischen Sensitivität durch die Behandlung mit 10 mg/kg VH425 gegenüber Vehikel. Somit scheint VH425 in einer Dosierung von 10 mg/kg keine antinozizeptive Wirkung im AITC-induzierten Schmerzverhalten aufzuweisen.



**Abbildung 34: Effekte von VH425 im AITC-induziertem Schmerzmodell**

**(A)** Zeitlicher Verlauf des Leckverhaltens nach Injektion von AITC (20  $\mu$ L einer 10 mM Lösung mit 2 % DMSO in PBS) in die plantare Seite einer Hinterpfote von C57Bl/6N-Mäusen. Den Versuchstieren wurde 15 Minuten vor der AITC-Injektion VH425 (10 mg/kg) oder Vehikel (10 %  $\beta$ -Cyclodextrin in 0,9 % NaCl) intraperitoneal appliziert. Rechts ist die Summe der Leckzeiten über die gesamte Messzeit von 30 Minuten als Einzelwerte und Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt. **(B)** Bestimmung der mechanischen Sensitivität vor sowie ein und dreieinhalb Stunden nach AITC-Injektion und vorheriger Behandlung mit VH425 oder Vehikel mittels von Frey-Filamenten als prozentualer Anteil an positiven Reaktionen nach 10 Stimulationen. **(A,B)** Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von  $n = 12$  Versuchstieren.



## 4 Diskussion

Sowohl die Therapie von neuropathischen Schmerzen als auch chronischem Pruritus ist bisher nur unzureichend erfolgreich und es bedarf dringend neuer Behandlungsansätze. Gekennzeichnet durch pathologische Veränderungen im peripheren oder zentralen Nervensystem sind beides unangenehme Sinneswahrnehmungen, die mit einer Hypersensibilität einhergehen. Diese neuronale Übererregbarkeit wird maßgeblich durch die Aktivität und das Zusammenspiel von Ionenkanälen reguliert. Darunter gewinnen insbesondere Kaliumkanäle als Stabilisatoren des Ruhemembran-potentials und Regulatoren der neuronalen Erregbarkeit immer mehr Aufmerksamkeit als potentielle Arzneistofftargets, da durch ihre gezielte Aktivierung die Reizweiterleitung gedämpft werden kann (Andres-Bilbe et al. 2020; Busserolles et al. 2016; Tsantoulas und McMahon 2014). So ist die analgetische Wirksamkeit von  $K_v7$ -Aktivatoren wie Flupirtin oder Retigabin bereits bekannt. Andere Forschungsarbeiten beobachteten beispielsweise einen antipruritogenen Effekt der ATP-abhängigen Kaliumkanalöffner Pinacidil und Minoxidil in nicht-histaminergen Juckreizmodellen (Ostadhadi et al. 2017; Takano et al. 2004).

Trotz ihres Potentials stellen Kaliumkanäle aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zwischen Mitgliedern einer Kanalfamilie die Entwicklung spezifischer *small molecules* (Molekulargewicht zwischen 200 – 500 Da) vor eine Herausforderung (Wulff et al. 2009). Außerdem verkompliziert ihre enorme Vielfältigkeit die Aufklärung von spezifischen Funktionen einzelner Kanäle und deren „Druggability“. Die Identifizierung eines geeigneten Arzneistofftargets legt den Grundstein für eine erfolgreiche Wirkstoffentwicklung, denn nur ca. 10 % der Gene im Menschen sind pharmakologisch modulierbar und nur etwa 5 % zusätzlich pathophysiologisch relevant (Hopkins und Groom 2002). Schätzungsweise 60 % der Entwicklungsversuche scheitern auf Grund eines ungeeigneten Targets oder einer fehlenden Leitstruktur (Brown 2003). Vor diesem Hintergrund stellt die Entwicklung von Slack-Aktivatoren einen vielversprechenden Ansatz dar. Forschungsergebnisse der letzten Jahre deuten auf eine relevante Beteiligung von Slack sowohl an der Verarbeitung von neuropathischem Schmerz als auch Pruritus (Lu et al. 2015; Evely et al. 2017; Martinez-Espinosa et al. 2015). Mit dem Neuroleptikum Loxapin konnte eine geeignete Leitstruktur für weitere Optimierungsschritte identifiziert werden (Biton et al. 2012). Vorteilhaft an der Substanz ist, dass sie bereits seit über 40 Jahren zugelassen und ihr Sicherheitsprofil gut erprobt ist (Popovic et al. 2015). Für die Entwicklung der Slack-Aktivatoren wurde im Rahmen dieser Arbeit der Ansatz der „selektiven Optimierung von Nebenaktivitäten“ (SOSA) durchgeführt, bei dem die Nebenaktivitäten eines bereits zugelassenen Wirkstoffs identifiziert und soweit optimiert werden, dass dieser in einem neuen Indikationsgebiet therapeutisch genutzt werden kann. Die ursprüngliche Hauptaktivität des Wirkstoffs soll weitestgehend reduziert werden. Im Falle der Optimierung von Loxapin wurde versucht, die Slack-

aktivierenden Eigenschaften der neuen Derivate beizubehalten, während die Affinität an D<sub>2</sub>- und D<sub>3</sub>-Rezeptoren weitestgehend verloren gehen sollte. Die pharmakodynamischen und -kinetischen Eigenschaften wurden soweit verändert, dass die neuen Testsubstanzen nur noch in einem geringen Ausmaß an Off-Targets binden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die neuen Loxapin-Derivate *in vitro* auf ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften gescreent, interessante Kandidaten wurden auf ihre Affinität zu Dopamin-Rezeptoren und weiteren Off-Targets getestet und zusätzlich ihre Effekte elektrophysiologisch untersucht. Zwei Kandidaten, VH425 und EN12, wurden für die In-Vivo-Charakterisierung ausgewählt, bei der pharmakokinetische Eigenschaften und das Ausmaß der analgetischen sowie antipruritischen Effekte ermittelt wurde.

## 4.1 Auswahl interessanter Slack-Aktivatoren

Das pharmakologische Profil eines präklinischen Wirkstoffkandidaten kann in primäre und sekundäre Effekte differenziert werden. Dabei sind erstere direkt verknüpft mit der Interaktion am Target, sekundäre Effekte werden hervorgerufen durch die Modulation von anderen Strukturen außerhalb des angestrebten Wirkmechanismus (Off-Targets) und sind oftmals der Grund für unerwünschte Arzneimittelwirkungen. Der FluxOR™ Kaliumkanal-Assay konnte als geeignetes Testverfahren zur Untersuchung des primären Effekts etabliert werden. Zur Bewertung der Assayqualität kann als statistischer Parameter der Z-Faktor herangezogen werden, welcher die Varianz zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Signal betrachtet (Hughes et al. 2011). Für die Etablierungsversuche mit Loxapin wurden die Z-Faktoren berechnet und ergaben im Mittel einen Wert von 0,5. Somit kann das System als ausreichend robust betrachtet werden (mind. > 0,4 – 0,6). Der ermittelte EC<sub>50</sub>-Wert für Loxapin mit  $16,6 \pm 3,1 \mu\text{M}$  weicht leicht von vergleichbaren Messungen ab, bei denen EC<sub>50</sub>-Werte von  $14,59 \mu\text{M}$  (Yurtseven und Kuzikov 2018) oder  $3 \mu\text{M}$  (Biton et al. 2012) ermittelt wurden, was die Abhängigkeit von den experimentellen Bedingungen und dem Expressionssystem verdeutlicht. Direkte Vergleiche sollten daher nur innerhalb eines Assaysystems gezogen werden. Eine gewisse Variabilität zwischen den einzelnen Assayplatten kann erklärt werden durch verschiedene Zellpassagen, geringe Abweichungen in der Zusammensetzung und Qualität der Puffer und Inhomogenitäten der Wells beim Aussäen der Zellen. Um die Genauigkeit der EC<sub>50</sub>-Werte jeder Testsubstanz zu erhöhen, hätten optimalerweise die Mittelwerte aus mindestens drei Messungen bestimmt werden müssen. Aus Zeitgründen war das im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, für weitere Screeningvorhaben könnte die Umstellung auf einen High-Troughput-Prozess in Betracht gezogen werden. Obwohl die Primärstruktur von Slack größtenteils hochkonserviert ist, können bereits kleine Abweichungen in der Bindetasche zu Veränderungen in der

Pharmakodynamik der Testsubstanzen führen. Da alle Wirksamkeitsstudien in Mausmodellen durchgeführt wurden, wären außerdem Messungen an murinen Slack-Kanälen eine sinnvolle Ergänzung.

Von den insgesamt 77 Loxapin-Derivaten konnten 39 als Slack-Aktivatoren identifiziert und eine weitreichende Struktur-Wirkungs-Analyse (vergleiche Kapitel 3.1.1) durchgeführt werden. Als besonders interessant wurden Testsubstanzen angesehen, wenn sie eine hohe Potenz in Form eines geringen  $EC_{50}$ -Wertes aufwiesen und ihr Maximaleffekt deutlich über dem von Loxapin lag. Bei vielen Kandidaten zeigten sich allerdings gegenläufige Eigenschaften. So wiesen einige Testsubstanzen zwar niedrige  $EC_{50}$ -Werte  $< 10 \mu\text{M}$  auf, jedoch beläuft sich ihr maximal erreichbarer Effekt auf  $< 70 \%$  im Vergleich zu Loxapin. Selbst hohe Konzentrationen würden somit nur einen moderaten Anstieg des Slack-abhängigen Kaliumstroms generieren. Viele Testsubstanzen, die zwar hohe Maximaleffekte aber gleichzeitig auch hohe  $EC_{50}$ -Werte zeigten, sind klinisch ebenso wenig von Nutzen, da ausreichend hohe Plasmaspiegel *in vivo* schwer erreichbar werden. Besonders selektive, sogenannte „Hit-Substanzen“, weisen typischerweise eine  $EC_{50}$  zwischen  $100 \text{ nM} - 5 \mu\text{M}$  auf (Hughes et al. 2011). Bei der Auswahl der interessantesten Kandidaten wurde daher oftmals ein Kompromiss aus einem tolerierbaren  $EC_{50}$ -Wert und einem möglichst hohen Maximaleffekt eingegangen und sich daher für VHP93, VH408, VH423, VH425, FZ201, FZ368, FZ370, FZ485 und EN12 entschieden. Es wurde vermutet, dass polarere Slack-Aktivatoren, die einen Carboxylrest oder einen Triazolring in der Seitenkette des Piperazins aufweisen, vorteilhaft hinsichtlich einer geringeren ZNS-Penetration sein könnten. Da die Blut-Hirnschranken-Permeabilität im Allgemeinen bei Substanzen mit geringerer Lipophilie, einer steigenden Anzahl an Wasserstoffbrücken-Donatoren oder -Akzeptoren und einem höheren Ionisierungsgrad abnimmt (Geldenhuis et al. 2015; Waterhouse 2003), wurden VH425, FZ201, FZ370 und EN12 in die Auswahl inkludiert, obwohl vergleichsweise potentere bzw. effektivere Slack-Aktivatoren zur Verfügung standen. Interessanterweise konnte die Affinität zu  $D_2$ - und  $D_3$ -Rezeptoren am stärksten bei VH425 und EN12 reduziert werden (vergleiche Kapitel 3.1.2), was auf ein deutlich geringeres Nebenwirkungspotential *in vivo* im Vergleich zu den anderen Kandidaten schließen lässt. Mit der Testsubstanz FZ621 wurde ein weiterer interessanter Kandidat identifiziert, der jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr näher charakterisiert werden konnte.

Ein generelles Risiko bei der Entwicklung neuer Wirkstoffkandidaten stellen unvorhersehbare und unspezifische Effekte dar, die durch Toxizität oder einer Störung von zellulären Funktionen hervorgerufen werden. Daher wurde die Auswirkung der neun ausgewählten Slack-Aktivatoren und Loxapin auf allgemeine Zellfunktionen und die Viabilität in einem Multiplex-Assay mehrdimensional charakterisiert (Tjaden et al. 2022). Die Versuche wurden im Rahmen einer Kooperation mit der

Arbeitsgruppe Prof. Stefan Knapp und Dr. Susanne Müller-Knapp (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) von Amelie Tjaden durchgeführt. Bis zu einer Konzentration von 50  $\mu$ M beeinflusste keine der Testsubstanzen die generellen Zellfunktionen (Zellviabilität, Mitochondriale Masse, Membranintegrität), was auf eine niedrige zelluläre Zytotoxizität schließen lässt.

Um frühzeitig die pharmakokinetischen Eigenschaften von Wirkstoffkandidaten einschätzen zu können, ist die Untersuchung der metabolischen Stabilität eine sinnvolle Ergänzung der In-vitro-Charakterisierung. Im Rahmen der Kooperation mit der Arbeitsgruppe Prof. Schubert-Zsilavec (Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt) wurden von Astrid Kaiser Stabilitätstests der ausgewählten Slack-Aktivatoren in Lebermikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Loxapin wird über Cytochrom P450 (CYP)-Enzyme schnell zu seinen Metaboliten Amoxapin, 7-Hydroxyloxapin, 8-Hydroxyloxapin und Loxapin-N-oxid metabolisiert (Heel et al. 1978; Wong et al. 2012) und zeigte erwartungsgemäß nur eine geringe metabolische Stabilität mit 6 % verbleibender Ausgangssubstanz nach 15 Minuten. Es wurde vermutet, dass eine Besetzung der hydroxylierbaren Stellen am aromatischen Kern und die Verringerung der Elektronendichte am oxidierbaren Stickstoff des Piperazinrings eine Erhöhung der metabolischen Stabilität bewirken. Diese Hypothese konnte insbesondere durch die Testsubstanzen VH425 und FZ201 bestätigt werden, bei denen ein elektronenziehender Carbonsäure-Linker eingeführt und der 8-Chlorsubstituent an R<sup>1</sup> durch eine Trifluormethylgruppe bzw. einen Fluorsubstituenten ausgetauscht wurde. Nach 60 Minuten verblieben sie mit 51 % (VH425) und 49 % (FZ201) am stärksten unmetabolisiert, gefolgt von EN12 mit 16 %.

Unter Berücksichtigung aller In-vitro-Ergebnisse schienen die Kandidaten VH425 und EN12 am geeignetsten, um die Effekte einer Slack-Aktivierung *in vivo* zu untersuchen und die potentiell analgetische und antipruritische Wirksamkeit zu testen. Von allen Kandidaten zeigten sie die niedrigsten Affinitäten an D<sub>2</sub>- und D<sub>3</sub>-Rezeptoren, während ihre Potenz und Effektivität vergleichbar zu der von Loxapin geblieben ist. Die metabolische Stabilität konnte deutlich erhöht werden, was auf eine vorteilhafte Pharmakokinetik hoffen lässt und es gibt keine Anzeichen für zytotoxische Effekt.

## 4.2 Einfluss auf Kaliumströme und die neuronale Erregbarkeit

Die Effekte der ausgewählten Loxapin-Derivate auf die Slack-abhängigen Kaliumströme wurden in Patch-Clamp Experimenten in HEK-Slack Zellen charakterisiert. Dabei sind HEK293-Zellen besonders geeignet für elektrophysiologische Studien, da sie nur wenige Ionenkanäle exprimieren (Thomas

und Smart 2005; Ponce et al. 2018) und eine Beeinflussung der durch transfizierte Kanäle gemessenen Ströme vernachlässigt werden kann. Mittels der  $EC_{50}$ -Bestimmung von Loxapin wurde die Methodik erfolgreich validiert. Die ermittelte Konzentration von  $13,30 \mu\text{M}$  (95 %-KI:  $13,12 \mu\text{M} - 5,71 \mu\text{M}$ ) ist vergleichbar mit dem Wert aus den FluxOR<sup>TM</sup>-Messungen ( $16,6 \mu\text{M} \pm 3,1 \mu\text{M}$ ). Abweichungen von Ergebnissen aus anderen Methoden sind normal und erwartbar (Wang et al. 2004), so ergaben beispielsweise Einzelkanal-Messungen in CHO-Zellen eine  $EC_{50}$  von  $4,4 \mu\text{M}$  (Biton et al. 2012). Alle ausgewählten Kandidaten führten zu einem signifikanten Anstieg der Stromdichte gegenüber dem Vehikel (siehe **Abbildung 17**) und ihre Slack-aktivierenden Eigenschaften konnten bestätigt werden. Eine Ausnahme bildete FZ368, dass paradoxerweise bei einer niedrigeren Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  einen signifikanten Stromanstieg generierte, der Effekt in der höheren Konzentration von  $50 \mu\text{M}$  allerdings schwächer und nicht mehr signifikant ausfiel. Eine wichtige pharmakodynamische Eigenschaft des  $E_{\text{Max}}$  ist, dass er niemals direkt gemessen werden kann und nur die Kalkulation aus dem asymptotischen Effekte eines Wirkstoffs bei unendlich hoher Konzentration widerspiegelt. Sogar eine 10-fache Erhöhung der  $EC_{50}$ -Konzentration erreicht nur 90 % des  $E_{\text{Max}}$  und je höher die Konzentration ansteigt, desto langsamer verändert sich der Effekt (Holford 2017). Mit 63,1 % ist der  $E_{\text{Max}}$  von FZ368 bereits der niedrigste unter den gemessenen Kandidaten und die Verdopplung der Konzentration von  $25 \mu\text{M}$  auf  $50 \mu\text{M}$  führt bei einer  $EC_{50}$  von  $3,2 \mu\text{M}$  zu einem vernachlässigbaren Anstieg des  $E_{\text{Max}}$ . Schlussfolgerend ist das Ausmaß des Stromanstiegs durch FZ368 in beiden Konzentrationen erwartungsgemäß gleich, unterlag aber möglicherweise der hohen Variabilität der Messung. Generell auffällig ist die variable Stromantwort der einzelnen Zellen, was zu den hohen Standardabweichungen der Stromdichten führt. Durch die Normierung des Stroms auf die Kapazität zur Analyse der Stromdichte entfällt die Zellgröße als Faktor. Wahrscheinlich ist das Ausmaß der Slack-Expression entscheidend. Zwar wurden die HEK-Slack Zellen während der Kultivierung dauerhaft mittels Geneticin unter Selektionsdruck gehalten, es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass verschiedene Zellklone unterschiedliche Mengen an Plasmid-DNA tragen und das Level der exprimierten Slack-Kanäle zwischen den Zellen variiert. Dieser Effekt ist im FluxOR<sup>TM</sup>-Assay nicht bemerkbar, da die Reaktion von 50000 Zellen gemittelt betrachtet wird. An dem unterschiedlichen Ansprechen der Zellen könnten außerdem die verschiedenen Splice-Varianten von Slack und die Einflüsse posttranslationaler Modifikationen beteiligt sein, da beispielsweise eine Phosphorylierung von Slack durch die PKC, welche in verschiedenen Isoformen in HEK293-Zellen exprimiert wird (David et al. 2012), die Stromamplitude verdoppeln bis verdreifachen kann (Santi et al. 2006).

Die positive Korrelation zwischen dem relativen Anstieg der Stromdichte und dem Maximaleffekt der Testsubstanzen konnte die Hypothese bestätigen, dass das Ausmaß der Slack-Aktivierung nicht von der Potenz des Aktivators, sondern seinem  $E_{\text{Max}}$  abhängt. Dabei muss beachtet werden, dass ein

direkter Vergleich der Effekte schwierig ist, da von allen Kandidaten die gleichen zwei Konzentrationen (25 und 50  $\mu\text{M}$ ) getestet wurden. Interessant wäre zu untersuchen, ob der Korrelationskoeffizient noch größer wird, wenn jede Testsubstanz bei ihrer  $\text{EC}_{50}$ -Konzentration gemessen werden würde, um die exakte halbmaximale Slack-Aktivierung zu erzielen.

Der Verlauf der IV-Relationen zeigt, dass Slack-Aktivatoren keinen Einfluss auf das Umkehrpotential von Slack-Kanälen nehmen und sie somit wahrscheinlich nicht die Spannungsabhängigkeit verändern. Auch die zeitverzögerte Aktivierungskinetik blieb erhalten. Möglicherweise ist ihr Aktivierungsmechanismus trotzdem vergleichbar mit dem  $\text{K}_v7$ -(KCNQ)-Kanal-Aktivator Retigabin. Als positiver allosterischer Modulator erhöht er die Öffnungswahrscheinlichkeit der  $\text{K}_v7$ -Kanäle durch eine Verschiebung der Spannungsabhängigkeit in negativere Bereiche (Wuttke et al. 2005; Gunthorpe et al. 2012). Da sich Slack-Kanäle in Abhängigkeit der Natriumionenkonzentration öffnen (Hite und MacKinnon 2017), könnten die Loxapin-Derivate als allosterische Modulatoren die Natrium-Sensitivität steigern und somit die Öffnungswahrscheinlichkeit erhöhen. Darüber hinaus wäre eine Stabilisierung geöffneter Slack-Kanäle nach einem *use-dependent* Mechanismus denkbar (Budelli et al. 2016), wodurch sich die Öffnungsdauer erhöht. Möglich wäre auch eine direkte Aktivierung des Kanals unabhängig vom  $\text{Na}^+$ -Einstrom. Für diesen Mechanismus sprechen die Ergebnisse aus dem FluxOR-Assay, da es zu einer Öffnung der Slack-Kanäle durch die Aktivatoren kam, obwohl alle verwendeten Puffer  $\text{Na}^+$ -frei waren. Um das Verständnis des genauen Aktivierungsmechanismus der Loxapin-Derivate zu verbessern, könnte beispielsweise mit Hilfe von Kryoelektronenmikroskopie die exakte Bindestelle identifiziert werden. Eine Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie könnte zudem Informationen über die Affinität, Spezifität und Bindungskinetik der Slack-Aktivatoren ermittelt.

Die signifikante Reduktion des Kaliumausstroms durch 50  $\mu\text{M}$  Loxapin in murinen nicht-peptidergen DRG-Neuronen (**Abbildung 18**) steht im Widerspruch mit dem zu erwartendem Effekt einer Slack-Aktivierung. DRG-Neurone exprimieren eine Vielzahl von spannungsabhängigen Ionenkanälen und Loxapin scheint dem Ergebnis des SafetyScreen44<sup>TM</sup> Panels nach unter anderem signifikant an Natriumkanälen zu binden. Dieser möglicherweise indirekte Effekt auf eine Slack-Aktivierung sollte jedoch im verwendeten Setup keine Rolle spielen, da die Zusammensetzung der verwendeten Tyrode nur die Öffnung von Kaliumkanälen erlaubt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass unbekannte Off-Target-Effekte von Loxapin einen Einfluss auf weitere Kaliumkanäle nehmen und dadurch der Effekt der Slack-Aktivierung auf den Gesamtkaliumausstrom maskiert wird. Bisher sind allerdings keine Interaktionen von Loxapin mit anderen Kaliumkanälen außer Slack in der Literatur bekannt. Um diese Hypothese zu überprüfen könnte eine Messwiederholung mit einem selektiveren

Slack-Aktivator wie EN12 in Betracht gezogen werden, bei dem die Wahrscheinlichkeit für Off-Target-Effekte im Vergleich zu Loxapin reduziert ist.

Die reduzierte Erregbarkeit der sensibilisierten DRG-Neurone nach Applikation von Loxapin oder VH425 (siehe **Abbildung 19**) geht einher mit den Ergebnissen aus Publikationen anderer Arbeitsgruppen. So zeigten bereits Lu et al. 2015, dass Slack-defiziente DRG-Neurone auf 1000 ms lange Strominjektionen mit einer verstärkten Aktionspotentialbildung reagieren und eine Adaption wie in Slack-exprimierenden Neuronen ausbleibt. Kongruent zu diesen Ergebnissen ergaben Messungen einer zweiten Forschungsgruppe, dass die Abwesenheit von Slack in DRG-Neuronen in einer erhöhten Feuerfrequenz und einer Abnahme des Schwellenwerts bis zum Erreichen eines Aktionspotentials (Rheobase) im Vergleich zur Wildtypkontrolle resultiert (Martinez-Espinosa et al. 2015). Da die Slack-vermittelten Kaliumströme vom Ausmaß und den zeitlichen Änderungen der intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration abhängen schlussfolgerten die Autoren, dass die  $I_{\text{Slack}}$  der Initiation eines Aktionspotentials vorangehen könnten und so neuronales Feuern unterbrechen. Zu dieser Überlegung passt die Erhöhung der Rheobase nach Applikation von Loxapin oder VH425 sowie das komplette Ausbleiben einer Aktionspotentialbildung in 50 % (nach Applikation von Loxapin) bzw. 46 % (nach Applikation von VH425) der Zellen (siehe **Abbildung 20**). Öffnen sich Slack-Kanäle bereits während des  $\text{Na}^+$ -Einstroms, wird die Membrandepolarisation durch den entgegengesetzten Kaliumausstrom gehemmt und das Schwellenpotential möglicherweise nicht erreicht. Dadurch wären die gescheiterten Aktionspotential-Initiationen erklärbar. Diese Hypothese wird durch aktuelle Forschungsergebnisse von Messungen an hippocampalen Neuronen von Slack<sup>-/-</sup>- und Slack<sup>+/+</sup>-Mäusen unterstützt. Skrabak et al. 2023 zeigten, dass in Abwesenheit von Slack die Steigung des Aktionspotentialanstiegs nach einem Depolarisationsreiz signifikant steiler ist als in Slack-exprimierenden Neuronen. Die bei einer Depolarisation erzeugten Tetrodotoxin (TTX)-sensitiven  $\text{Na}^+$ -Einwärtsströme sind signifikant verstärkt in Slack-defizienten Neuronen aufgrund des reduzierten Auswärtsstroms, was wahrscheinlich das Ausbleiben des  $\text{Na}^+$ -abhängigen Kaliumausstroms wiederspiegelt. Folglich wird durch eine pharmakologische Slack-Aktivierung ein verstärkter Nettoausstrom generiert, durch den die Kinetik des Aktionspotentials so beeinflusst wird, dass sich der Anstieg verzögert und der Grad der maximalen Depolarisation reduziert. Um auszuschließen, dass die Veränderungen in der Aktionspotentialbildung nicht durch eine Modulation von  $\text{Na}_v$ -Kanälen hervorgerufen werden, könnten in einem Kontrollexperiment die Effekte der Testsubstanzen auf  $I_{\text{Na}}$  in naiven DRG-Neuronen untersucht werden.

Die Versuche wurden mit einer relative hohen Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  der Testsubstanzen durchgeführt. Da nach i.p. Applikation von 10 mg/kg VH425 eine  $c_{\text{max}}$  von 6280 ng/ml ermittelt wurde (vergleiche Kapitel 3.2.1), was einer Konzentration von  $\sim 15 \mu\text{M}$  entspricht, wären weitere

Messungen nach Applikation von 15  $\mu\text{M}$  VH425 für eine bessere In-vitro-in-vivo-Korrelation der Effekte sinnvoll. Um zu bestätigen, dass die reduzierte neuronale Erregbarkeit tatsächlich durch die selektive Aktivierung von Slack-Kanälen hervorgerufen wird, wären Kontrollversuche in DRG-Neuronen von Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen nötig. In Slack-defizienten DRG-Neuronen sollte es nach Applikation von VH425 zu keiner Veränderung der Erregbarkeit in Form einer Abnahme von Aktionspotentialen kommen.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass Slack-Kanäle eine Art „Gate-Keeper“-Rolle in der Regulation neuronaler Erregbarkeit einnehmen und diese Funktion durch Slack-Aktivatoren weiter verstärkt werden kann.

## 4.3 In-vivo-Charakterisierung von VH425 und EN12

### 4.3.1 Nebenwirkungsprofil und pharmakokinetische Eigenschaften

Um eine breite Risikoeinschätzung vornehmen und potentielle Nebenwirkungen der ausgewählten Kandidaten VH425 und EN12 besser vorhersagen zu können, wurde ihre Bindung an sekundären Off-Targets untersucht. Beide Kandidaten sind aufgrund ihres Selektivitätsprofil gegenüber Loxapin deutlich geeigneter, Slack als Target validieren zu können. Trotzdem bindet im SafetyScreen44<sup>TM</sup> Panel VH425 noch an acht, EN12 an fünf der 44 ausgewählten Off-Targets (siehe **Abbildung 14**). Hervorzuheben ist, dass keine der Testsubstanzen eine Affinität zu K<sub>v</sub>-Kanälen der Subfamilie H Mitglied 2 (hERG) zeigt. Eine hERG-Kanalblockade kann potentiell kardiale Arrhythmien auslösen und würde den sofortigen Ausschluss eines Kandidaten von der weiteren präklinischen Entwicklung laut der *International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH)-Guidelines bedeuten (Redfern et al. 2003). Weiterhin muss berücksichtigt werden, dass die Ergebnisse nur die Bindungsaffinitäten von einer getesteten Konzentration bei 10  $\mu\text{M}$  betrachten. Zur genaueren Untersuchung der Off-Target-Interaktionen sollten Aktivitätsassays mit verschiedenen Konzentrationen durchgeführt werden, um Dosis-Wirkungs-Kurven berechnen zu können. Dies erfolgte bereits für die D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>- sowie H<sub>1</sub>-Rezeptoren. Die deutlich reduzierten Rezeptoraffinitäten beider Kandidaten lassen vermuten, dass ihre Wahrscheinlichkeit für das Hervorrufen von über D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>- und H<sub>1</sub>-Rezeptor-vermittelten Nebenwirkungen im Vergleich zu Loxapin stark abgenommen hat. Trotzdem sind die *in vitro* Ergebnisse keine Garantie für ein ausreichend großes therapeutisches Fenster, zumal die Konzentration von VH425 im Gehirn nach i.p. Applikation von 10 mg/kg bis zu 5490 ng/ml erreicht. Bei einem Molekulargewicht von 415,87 g/mol entspricht das 13,2  $\mu\text{M}$  und einer deutlichen Überschreitung der ermittelten Inhibitionskonstanten der D<sub>2</sub>/D<sub>3</sub>- und H<sub>1</sub>-Rezeptoren. Das reduzierte explorative Verhalten im Open Field Test nach i.p. Applikation von 30 mg/kg VH425 könnte daher vermutlich auf eine H<sub>1</sub>-Rezeptor-



vermittelte Sedierung zurückzuführen sein (Pádua-Reis et al. 2021), da die Ergebnisse der Motorkoordinationstests schlussfolgern lassen, dass weder VH425 noch EN12 in einer Dosis bis zu 30 mg/kg die motorischen Funktionen hemmen bzw. eine Wirkung auf die extrapyramidale Motorik ausüben. Unterstützt wird diese Annahme dadurch, dass sowohl die Latenzzeiten der kontralateralen Hinterpfote während der DPA-Messungen als auch das Kratzverhalten im Histamin-induzierten Juckreizmodell nicht beeinträchtigt waren. Das ursprüngliche Grundgerüst der Loxapin-Derivate ist stark lipophil und die Substituenten der Seitenkette am Piperazinring können die Penetration über die Blut-Hirn-Schranke nur begrenzt beeinflussen. Unter dem Aspekt der potentiellen zentralnervösen Nebenwirkungen wäre EN12 auf Grund der geringeren ZNS-Penetrationsfähigkeit deutlich vorteilhafter gegenüber VH425 und sollte ebenfalls im Open Field Test untersucht werden. Dass die Applikation von VH425 die mechanische und thermische Sensitivität sowie die kardiovaskulären Funktionen nicht beeinflusst deutet auf eine gute Verträglichkeit der Substanz hin. Da Slack zu 74% mit der Proteinstruktur des  $K_{Na}$ -Kanals Slick übereinstimmt, der wiederum eine hohe Expression am Herzen aufweist, sollte darüber hinaus das Ausmaß einer Slick-Aktivierung evaluiert werden, um potentielle kardiale Effekte auszuschließen. Weiterhin zu beachten gilt das prokonvulsive Potential von Slack-Aktivatoren, da Slack nicht nur in der Peripherie, sondern auch in zentralen Neuronen im Gehirn die Erregbarkeit reguliert (Bhattacharjee et al. 2002) und GoF-Mutationen im KCNT1-Gen mit verschiedenen Epilepsieformen im Zusammenhang stehen (Gao et al. 2022). So kann auch Loxapin die Anfallsschwelle herabsetzen und ist somit bei Epilepsiepatienten mit Vorsicht einzusetzen. Im Rahmen der weiteren präklinischen Entwicklung wäre daher die Untersuchung der prokonvulsiven Eigenschaften ZNS-gängiger Slack-Aktivatoren sinnvoll. Bisher gab es allerdings keine Hinweise auf das Auslösen von Krampfanfällen durch die Applikation von VH425 oder EN12 in naiven Wildtyp-Mäusen.

Hinsichtlich der pharmakokinetischen Eigenschaften sollte ein idealer Wirkstoffkandidat angemessen lange und in ausreichend hohen Spiegeln im Blutplasma verbleiben, um den gewünschten Effekt zu erzielen und im Anschluss eliminiert zu werden, ohne toxisch zu wirken. Für die Dauer der durchgeführten akuten Schmerz- und Juckreizversuche erfüllen sowohl VH425 als auch EN12 diese Voraussetzungen. Für die Therapie eines chronischen Pruritus wäre eine möglichst lange Halbwertszeit wünschenswert, um die wiederholte Einnahme des Medikaments zu vermeiden, und EN12 daher der geeignetere Kandidat. Durch eine modifizierte Freisetzung könnte die Wirkdauer aber auch für Kandidaten mit kürzeren Halbwertszeiten verlängert werden. Eine translatorische Vorhersage über die Pharmakokinetik von VH425 und EN12 im Menschen ist zwar schwierig, in der Regel kann von längeren Halbwertszeiten als in der Maus ausgegangen werden, da biochemische Prozesse in Nagern grundsätzlich schneller ablaufen (Agoston 2017). So beträgt die  $t_{1/2}$  von Loxapin im Menschen zwischen 4 – 8 Stunden (Popovic et al. 2015), die gemessene  $t_{1/2}$  nach

i.v. Applikation in der Maus dagegen nur 1,03 Stunden. Eine mathematische Kalkulation schlägt zur näherungsweise Abschätzung eine Multiplikation mit dem Faktor 7,69 vor (Bachmann et al. 2007). Demnach könnten die Halbwertszeiten von sowohl VH425 als auch EN12 nach oraler Gabe mehr als acht Stunden betragen, was ein angemessenes Therapieintervall zur Behandlung eines chronischen Erkrankungszustands ermöglichen würde. Die orale Bioverfügbarkeit eines präklinischen Wirkstoffkandidaten sollte mindestens 20 % betragen (Bowes et al. 2012), um ausreichend hohe Konzentrationen am Wirkort erzielen zu können. Da unterschiedliche Dosen von VH425 und EN12 nach i.v. (1 mg/kg) und p.o. (10 mg/kg) Applikation in den pharmakokinetischen Tests untersucht wurden, sollte für die näherungsweise Berechnung der oralen Bioverfügbarkeit besser die AUC (0 – inf) mit der i.p. Applikation von ebenfalls 10 mg/kg verglichen werden. Mit 72,6 % (VH425) und 36,9 % (EN12) zeigen beide Kandidaten eine ausreichend hohe orale Bioverfügbarkeit. Trotz ihrer höheren metabolischen Stabilität gegenüber Loxapin sollte in der weiteren pharmakokinetischen Charakterisierung untersucht werden, ob es zur Bildung aktiver Metabolite kommt und ob potentielle CYP-Interaktionen durch Induktion oder Inhibition entstehen können.

### 4.3.2 Beeinflussung des Juckreizverhaltens

Die signifikante und dosisabhängige Hemmung des Chloroquin-vermittelten Pruritus durch die Applikation von VH425 und EN12 lässt auf einen ausgeprägten antipruritischen Effekt schließen. Für VH425 konnte die juckreizhemmende Wirksamkeit in weiteren Modellen des akuten, nicht-histaminergen (SLIGRL,  $\beta$ -Alanin) sowie chronischen Pruritus (AKD-Modell, AD-Modell) bestätigt werden. Unter Anbetracht der gemessenen Plasmaspiegel nach i.p. Applikation von 10 mg/kg ergibt sich allerdings eine Diskrepanz zwischen der In-vitro-in-vivo-Korrelation, denn die *in vitro* ermittelte EC<sub>50</sub>-Konzentration von 30,3  $\mu$ M wird *in vivo* bei einer  $c_{max}$  von 15,1  $\mu$ M nicht erreicht. Das wirft die Frage auf, ob der primäre Wirkmechanismus, der verantwortlich ist für den antipruritischen Effekt, tatsächlich durch die Slack-Aktivierung erklärt werden kann. Generell zeigen nur wenige In-vitro-Assays einen hohen Grad an Vorhersagekraft (Bowes et al. 2012) und so müssen auch bei der Interpretation des FluxOR™ Assays einige Punkte berücksichtigt werden. Bekanntermaßen weisen Surrogationen, wie TI<sup>+</sup>, eine unterschiedliche Permeabilität gegenüber physiologischen Ionen auf, was zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurven nach rechts führen kann (Zou et al. 2010). Um eine Substanz-unabhängige Slack-Aktivierung durch Na<sup>+</sup> zu verhindern, wurden ausschließlich Na<sup>+</sup>-freie Assaypuffer verwendet. Kommt es allerdings *in vivo* zu einem intrazellulären Na<sup>+</sup>-Anstieg in Folge einer Depolarisation, könnten die Slack-Aktivatoren möglicherweise potenter wirken als in den Na<sup>+</sup>-freien In-Vitro-Bedingungen. Zur Überprüfung dieser Hypothese könnte in Patch-Clamp Versuchen der Effekt eines Slack-Aktivatoren mit und ohne Na<sup>+</sup> in der intrazellulären Lösung

gegeneinander verglichen werden. Weiterhin waren im Assaypuffer 2 mM  $\text{Ca}^{2+}$  enthalten. In Inside-Out Patch-Clamp Experimenten wurde jedoch für  $\text{Ca}^{2+}$  eine  $\text{IC}_{50}$  von 0,26 mM festgestellt (Budelli et al. 2016). Eine schwache Hemmung der Slack-Kanäle durch das Assaysystem, die zu einer Potenzminderung geführt haben könnten, sollte nicht ausgeschlossen werden. Außerdem kann die Aktivitätsmessung *in vitro* an humanem und *in vivo* an murinem Slack zu abweichenden Ergebnissen führen. Eine Wiederholung des FluxOR™-Assays mit Zellen, die murine Slack-Kanäle exprimieren, wäre eine sinnvolle Ergänzung, um seine Vorhersagekraft im Hinblick auf Mausmodelle zu verbessern. Trotz der relativ niedrigen Potenz von VH425 sprechen die signifikanten antipruritischen Effekte nach Applikation von 10 mg/kg für eine ausreichend starke Slack-Aktivierung *in vivo*, sodass die wahre  $\text{EC}_{50}$  von VH425 wahrscheinlich unterhalb der 30,3  $\mu\text{M}$  liegt.

Die Annahme, dass die Slack-Aktivierung das primäre Wirkprinzip von VH425 ist, wurde durch den ausbleibenden antipruritischen Effekt in Slack-defizienten Mäusen bestätigt. Trotzdem zeigten die Slack<sup>-/-</sup>-Mäuse ein leicht reduziertes Kratzverhalten, was die Involvierung weiterer Targets vermuten lässt. Dafür spricht ebenfalls, dass die VH425- und EN12-induzierte Hemmung des Kratzverhaltens über die Versuchsdauer von 30 Minuten anhält, das Kratzverhalten in Slack<sup>-/-</sup>-Mäusen jedoch vor allem während der ersten fünf bis zehn Minuten signifikant erhöht ist (Martinez-Espinosa et al. 2015). Möglicherweise hat die Bindung von VH425 und EN12 an 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren einen zusätzlichen Einfluss auf das Juckreizverhalten, da Serotonin und insbesondere die Subtypen der 5-HT<sub>2</sub>-Rezeptoren ebenfalls an der Verarbeitung pruritogener Stimuli beteiligt sind (Morita et al. 2015; Lay und Dong 2020). Die Bindung an 5-HT<sub>2B</sub>-Rezeptoren spielt eine untergeordnete Rolle, da nur 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptoren auf sensorischen Neuronen exprimiert werden (Zeisel et al. 2018). Um das tatsächliche Ausmaß der 5-HT<sub>2A</sub>-Rezeptormodulation einschätzen zu können, sollte wie bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben, ein Aktivitätsassay zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt werden. Darüber hinaus kann nicht ausgeschlossen werden, dass weitere Targets, die nicht im SafetyScreen44™ Panel enthalten waren, an den juckreizhemmenden Effekten involviert sind.

In einem zweiten Kontrollexperiment zur Bestätigung des Wirkmechanismus sollte mittels des Slack-Inhibitors Compound 31 die Slack-vermittelte Juckreizhemmung von VH425 antagonisiert werden. Zwar deutet das in den ersten fünf Minuten erhöhte Kratzverhalten der Compound 31-behandelten Tiere im Vergleich zu den nur mit VH425-behandelten Tieren auf eine Interaktion beider Substanzen am gleichen Target hin, jedoch wurden die Kratzreaktionen weiterhin fast vollständig unterdrückt. Da Compound 31 eine Bindungsaffinität an GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren aufweist (Griffin et al. 2021), wurde der Effekt der Slack-Antagonisierung wahrscheinlich durch die zu starke Sedierung maskiert. Der Slack-Inhibitor eignet sich demnach nicht für die weitere *in vivo* Anwendung in Juckreiz-Modellen.

Warum VH425 keine Hemmung des Histamin-vermittelten Pruritus bewirkte (siehe **Abbildung 26 E**), obwohl Slack-Kanäle und H<sub>1</sub>- bzw. H<sub>4</sub>-Rezeptoren in den gleichen Prurizeptoren (NP2- und NP3) exprimiert werden (Usoskin et al. 2015), steht im Widerspruch mit der vermuteten Gate-Keeper-Rolle von Slack. Möglicherweise könnte es einen Zusammenhang zwischen der Transduktion des Juckreizes und der Wirksamkeit von Slack-Aktivatoren geben. Die neuronale Aktivierung durch Histamin wird primär über TRPV1 vermittelt (Imamachi et al. 2009; Shim et al. 2007), mit dem Slack-Kanäle wenig koexprimiert werden (Zhou et al. 2022). Dagegen erfolgt die Transduktion vieler nicht-histaminerg Pruritogene maßgeblich über TRPA1-Kanäle (Kim et al. 2016; Wilson et al. 2011), mit denen Slack funktionell eng gekoppelt ist (Zhou et al. 2022). Ru et al. diskutieren neben der TRPA1-abhängigen neuronalen Aktivierung durch die Stimulation von MrgprA3 oder anderen GPCR außerdem einen alternativen Signalweg über calciumaktivierte Chloridionenkanäle wie TMEM16C (Ru et al. 2017), die wiederum die Öffnungswahrscheinlichkeit von Slack erhöhen (Huang et al. 2013). Durch die zusätzliche Rekrutierung weiterer Immunzellen und der Ausschüttung verschiedener Pruritogene als Folge einer Histamin-Stimulation (Dong und Dong 2018; Lay und Dong 2020) entsteht eine diffuse Signalkaskade, die möglicherweise nicht durch die alleinige Slack-Aktivierung moduliert werden kann.

Überraschenderweise konnten für EN12, das *in vitro* eine niedrigere EC<sub>50</sub> und einen größeren Maximaleffekt gegenüber VH425 zeigte, nur eine geringere Wirksamkeit *in vivo* festgestellt werden. So war die juckreizhemmende Wirkung im Vergleich zu VH425 bei gleicher Dosis im Chloroquin-induzierten Pruritus weniger stark ausgeprägt und fehlte im SLIGRL-induzierten akuten sowie dem AKD-Modell des chronischen Pruritus vollständig. Wie in Kapitel 3.2.5.2 bereits beschrieben, konnte die analgetische Wirksamkeit im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung ebenfalls nicht bestätigt werden. EN12 weist im Vergleich zu VH425 nur eine sehr geringe ZNS-Penetrationsfähigkeit auf. Allerdings könnten Slack-Kanäle im Rückenmark ebenfalls an der Verarbeitung somatosensorischer Stimuli beteiligt sein (Evely et al. 2017). Außerdem erstrecken sich die zentralen Axone von peripheren Nerven über die Blut-Hirn-Schranke bis in das Dorsalhorn des Rückenmarks (Lu et al. 2015), wo Slack-Kanäle wahrscheinlich in die synaptische Transmission involviert sind (Evely et al. 2017). Eine peripher begrenzte Slack-Aktivierung führt daher möglicherweise nicht zu ausreichend antipruritogenen bzw. analgetischen Effekten, obwohl die niedrige ZNS-Penetration hinsichtlich der unerwünschten zentralnervösen Wirkungen von Vorteil wäre.

Viele allergische, entzündliche oder infektiöse Hauterkrankungen gehen einher mit chronischem nicht-histaminergem Pruritus und lassen sich erfolgreich in Tiermodellen untersuchen. In den peripheren Juckreizsignalwegen der atopischen Dermatitis sind vor allem IL-31, IL-4, TSLP und

Lysophosphatidsäuren (LPA) involviert (Misery und Ständer 2016; Yosipovitch et al. 2020) und es kommt zu einer Hochregulation von Protease-aktivierten Rezeptoren (Steinhoff et al. 2003). Die zugrunde liegenden Mechanismen, die zum Pruritus bei allergischer Kontaktdermatitis führen, sind weniger gut verstanden. Eine Störung der Hautbarriere und epidermale Veränderungen bewirken die Infiltration von Immunzellen und Freisetzung von Zytokinen. Außerdem konnten in Mausmodellen erhöhte Level an NGF und endogenen Pruritogenen wie Substanz P und Serotonin gemessen werden (Liu et al. 2013). Durch die ausgeprägte Wirksamkeit von VH425 nicht nur im akuten, sondern auch chronischen nicht-histaminerg vermittelten Pruritus wird auch spontanes Jucken in Mausmodellen effektiv gehemmt. Somit könnte VH425 die Erregbarkeit sensibilisierter Neurone dämpfen und einen neuen Ansatz in der symptomatischen Therapie bei dermatologischem Pruritus darstellen. Neben einer oralen Applikation wäre dafür insbesondere die Entwicklung einer dermalen Formulierung zur lokalen Anwendung von VH425 sinnvoll. Weitere Untersuchungen von VH425, oder alternativen Slack-Aktivatoren mit geeigneten physikochemischen Eigenschaften, zur Penetrationsfähigkeit durch die Haut wären nötig, um das Potential einer dermalen Anwendung abschätzen zu können. Außerdem konnte im Rahmen dieser Arbeit noch nicht geklärt werden, wie hoch die Slack-Expression an den freien Endigungen peripherer Nerven im Hautgewebe ist. Darüber hinaus wäre eine Wirksamkeit von VH425 auch in systemischen Juckreizzuständen wie beispielsweise dem Cholestase-bedingten oder CKD-assoziierten Pruritus denkbar, da sie ebenfalls nicht-histaminergen Signalwegen unterliegen (Misery und Ständer 2016; Meixiong et al. 2019). In geeigneten Mausmodellen könnte diese Hypothese überprüft werden.

Die ausgeprägten juckreizhemmenden Effekte *in vivo* und die reduzierte Erregbarkeit sensibilisierter IB4-positiver DRG-Neurone *ex vivo* in Kombination mit der hohen Expression von Slack-Kanälen in humanen Prurizeptoren (siehe **Abbildung 6**) lassen auch eine Wirksamkeit von Slack-Aktivatoren im Menschen vermuten. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass die Mechanismen der Juckreizverarbeitung im Menschen weitaus weniger aufgeklärt sind als in der Maus. Translationale Unterschiede zeigen sich bereits daran, dass in Mäusen bislang 27 Mrgprs identifiziert wurden und in Menschen nur acht (MrgprX1 – X4 und MrgprD – G) (Meixiong et al. 2019). Verschiedene Sequenzierungsstudien ergaben widersprüchliche Ergebnisse hinsichtlich des interspezifischen Ausmaßes der Slack-Expression. So wurde zunächst eine deutlich niedrigere relative mRNA-Expression von Slack in humanen DRGs festgestellt, wodurch die Wirksamkeit einer Slack-Aktivierung im Menschen in Frage gestellt wird (Ray et al. 2018). Eine aktuelle Einzelkern-mRNA-Sequenzanalyse konnte dagegen zum einen die Klassifizierung der murinen Subpopulationen auch in humanen DRG-Neuronen nachweisen und zum anderen eine vergleichbare Slack-Expression in den murinen und humanen NP1 – 3 Neuronen detektieren (Jung et al. 2023). Zusammengefasst bieten Slack-Aktivatoren ein großes Potential neuartige klinische Wirkstoffkandidaten zur Therapie

von nicht-histaminerg bedingtem Pruritus in klinischen Studien zu werden. Für eine erfolgreiche translationale Entwicklung sollte jedoch die Rolle von Slack-Kanälen in der Juckreizverarbeitung im Menschen sowie die generell zugrundeliegenden Mechanismen noch weiter aufgeklärt werden.

### 4.3.3 Beeinflussung des Schmerzverhaltens

Im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung konnte durch VH425 in einer Dosis von 10 mg/kg das neuropathische Schmerzverhalten signifikant reduziert werden, jedoch war der Effekt im Vergleich zu seinen antipruritischen Effekten deutlich schwächer ausgeprägt. EN12 scheint dagegen selbst in einer Dosis von 30 mg/kg keine signifikante Wirksamkeit im SNI-Modell auszuüben. Die verminderte Effektivität der Aktivatoren im neuropathischen Schmerzmodell könnte möglicherweise mit einer verminderten Slack-Expression im nozizeptiven System zusammenhängen. In wie weit die Slack-Expression nach einer peripheren Nervenverletzung tatsächlich downreguliert wird, ist nicht abschließend geklärt, da sich Ergebnisse verschiedener Studien widersprechen. Obwohl Lu et al. 2021 mithilfe immunhistologischer Verfahren zeigen konnten, dass sich die Slack-Expression auf mRNA- und Proteinebene in DRG-Neuronen und im Rückenmark 14 Tage nach peripherer Nervenverletzung nicht verändert, scheint einer Einzelzell-RNA-Sequenzanalyse zufolge die Genexpression in Abhängigkeit des neuropathischen Schmerzmodells durchaus reguliert zu werden (Renthal et al. 2020). Nach einer Quetschung des *Nervus ischiadicus* kommt es zur Abnahme der mRNA-Level in den nicht-peptidergen C-Fasern (NP-Population) sowie A $\delta$ -LTMRs (NF3-Population), welche sich nach 14 Tagen regenerieren. Nach der vollständigen Durchtrennung des *Nervus ischiadicus* ist die Slack-codierende mRNA dagegen nur in den NF3-Neuronen downreguliert und erreicht bereits nach sieben Tagen wieder ihr Normalniveau. Da Slack überwiegend in den nicht-peptidergen C-Fasern exprimiert ist, können transkriptionelle Veränderungen in anderen Populationen vernachlässigt werden. Zwar lassen diese Ergebnisse eine Abnahme der Proteinexpression in den betreffenden Neuronenpopulationen vermuten, jedoch können über verschiedene Feedbackmechanismen die Proteinspiegel auch einigermaßen robust gegenüber mRNA-Spiegeln gehalten werden, sodass die Proteinlevel nicht zwingend korrelieren müssen (Buccitelli und Selbach 2020). Die Diskrepanz der Ergebnisse könnte daran liegen, dass in den immunhistochemischen Färbungen keine Differenzierung der DRG-Neurone vorgenommen und eine reduzierte mRNA-Konzentration spezifisch begrenzt auf eine bestimmte Population nicht detektiert werden konnte. Um das Ausmaß der Slack-Regulation auf Proteinebene abschließend zu klären, wäre z.B. eine Massenspektrometrie-basierte Proteinanalyse in verschiedenen Modellen für neuropathische Schmerzen sinnvoll. Obwohl Slack eine wichtige Rolle in der Modulation neuronaler Erregbarkeit im Rahmen von neuropathischen Schmerzen zugesprochen wird (Lu et al. 2015; Lu et

al. 2021; Evely et al. 2017), scheinen die nicht-peptidergen C-Fasern neuesten wissenschaftlichen Erkenntnissen zufolge vor allem in der mechanischen Hypersensitivität bei Entzündungs- und postoperativen Schmerzen, nicht jedoch nach peripheren Nervenverletzungen, beteiligt zu sein (Tanioku et al. 2022). Weiterhin können an einer neuropathischen Allodynie auch umprogrammierte A $\beta$ -Fasern involviert werden (Costigan et al. 2009; Duan et al. 2018), sodass der Einfluss einer Slack-Aktivierung möglicherweise begrenzt ist. Der analgetische Effekt von Loxapin im SNI-Modell in einer niedrigen Dosis von 0,13 mg/kg könnte durch die zusätzliche Slack-Aktivierung an terminalen Endigungen im Rückenmark zu erklären sein, da Loxapin eine hohe ZNS-Penetration aufweist. Gestützt wird diese Vermutung dadurch, dass EN12, welches kaum die Blut-Hirn-Schranke überwindet, selbst in einer deutlich höheren Dosis keinen analgetischen Effekt erzielte. Um diese Hypothese zu untersuchen, könnte das mechanische Schmerzverhalten von SNI-operierten Mäusen nach einer intrathekalen Applikation von EN12 analysiert werden. Außerdem wäre eine Testung von VH425 und EN12 in Modellen für Entzündungsschmerzen, wie dem CFA-Modell (Stein et al. 1988), oder postoperative Schmerzen, z.B. ausgelöst durch einen Hauteinschnitt (Larson et al. 2019), interessant.

Obwohl Slack-Kanäle die Aktivität von TRPA1-positiven Neuronen modulieren und seine Deletion in Mäusen ein verstärktes Schmerzverhalten nach einer intraplantaren AITC-Injektion hervorruft (Zhou et al. 2022), konnte unerwarteterweise kein antinozizeptiver Effekt des Slack-Aktivators VH425 im AITC-Modell festgestellt werden. Das Leckverhalten von VH425-behandelten Tiere in einer Dosis von 10 mg/kg war leicht, aber statistisch nicht signifikant, reduziert gegenüber der Vehikelgruppe. Die mechanische Sensitivität blieb unverändert. TRPA1 wird primär in IB4-positiven DRG-Neuronen exprimiert (Barabas et al. 2012; Usoskin et al. 2015) aber nur  $77,4 \pm 3,7$  % der TRPA1-positiven Neurone sind ebenfalls positiv für Slack (Zhou et al. 2022). Demnach liegt keine vollständige Kolo-kalisation vor und der Effekt von 10 mg/kg VH425 ist möglicherweise nicht ausreichend. Eine Erhöhung der Dosis von VH425 auf 30 mg/kg könnte eventuell eine stärkere Hemmung des Schmerzverhaltens erzielen. Da Schmerz eine überaus komplexe und facettenreiche Erfahrung darstellt, die sich sowohl in Nagern als auch Menschen schwer objektiv quantifizieren lässt, spielt außerdem die Auswahl des Messverfahrens zur korrekten Beurteilung der Effektivität einer Therapie eine wichtige Rolle. Viele Modelle, wie auch die von Frey-Filamente, messen nur akute Reaktionen auf nozizeptive Stimuli. Die Schmerzbewertung wird dabei stark vereinfacht und durch die erforderliche Handhabung der Tiere kann eine stressbedingte Analgesie nicht ausgeschlossen werden (Turner et al. 2019). Neuere Methoden versuchen, schmerzinduzierte Veränderungen im spontanen Verhalten von Nagern zu quantifizieren, um neben der reinen Sensorik auch die affektiven, emotionalen und kognitiven Komponenten von Schmerzen abzubilden (Larson et al. 2019). Beispielsweise haben sich das Wühl-, Nestbau-, oder Kletterverhalten als geeignete

Surrogatparameter etabliert, da sie signifikant durch Schmerzen vermindert werden (Tappe-Theodor und Kuner 2014; Turner et al. 2019; Mogil 2019; Zhang et al. 2021). Alternativ können die durch spontane Schmerzen hervorgerufenen Gesichtsexpressionen mittels einer Drei-Punkte-Skala klassifiziert werden. Die 2010 entwickelte „Mouse Grimace Scale“ (MGS) konnte im Modell der Zymosan-induzierten inflammatorischen Schmerzen den analgetischen Effekt von Paracetamol nachweisen. Dagegen wurde die mechanische Hypersensitivität, gemessen mittels von Frey-Filamenten, bei gleicher Dosierung nicht signifikant reduziert (Langford et al. 2010). Demnach könnte auch der Effekt von VH425 im AITC-Modell auf das spontane Schmerzverhalten mittels eines zweiten Messverfahrens, wie der MGS, reevaluiert werden.



## 5 Zusammenfassung

Der Natrium-abhängige Kaliumkanal Slack ( $K_{Na}1.1$ , Slo2.2, KCNT1) nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation neuronaler Erregbarkeit ein, indem er die Ausbildung und Feuerungsfrequenz von Aktionspotentialen kontrolliert. Sowohl in Mäusen als auch in Menschen wird Slack besonders hoch in nicht-peptidergen C-Faser-Neuronen exprimiert. Wissenschaftliche Erkenntnisse der letzten Jahre konnten die Beteiligung von Slack-Kanälen in der Signalverarbeitung neuropathischer Schmerzen, aber auch in verschiedenen Arten von Pruritus, feststellen. Dabei zeigen Slack-defiziente Mäuse ein verstärktes mechanisches Schmerzverhalten nach einer peripheren Nervenverletzung und ein erhöhtes Kratzverhalten in akuten Juckreiz-Modellen. Das als Slack-Aktivator identifizierte trizyklische Neuroleptikum Loxapin zeigt sowohl analgetische als auch antipruritische Effekte in Mäusen, jedoch ist sein klinischer Einsatz auf Grund schwerwiegender antipsychotischer Nebenwirkungen limitiert. Basierend auf Loxapins Leitstruktur wurden daher in dieser Arbeit neue Slack-Aktivatoren mit einem verbesserten pharmakologischen Profil designed und ihr Potential für die Therapie von Schmerzen sowie akutem und chronischem Pruritus *in vivo* untersucht.

Von den 77 neu entwickelten Loxapin-Derivaten zeigten 39 Slack-aktivierende Eigenschaften im FluxOR<sup>TM</sup>-Kaliumkanal Assay. Unter Berücksichtigung der  $EC_{50}$  und des  $E_{Max}$  wurden die neun interessantesten Kandidaten ausgewählt, um ihre Effekte auf Slack-abhängige Kaliumströme in Patch-Clamp Experimenten zu untersuchen. Dabei konnte eine positive Korrelation zwischen dem  $E_{Max}$  und dem relativen Anstieg der Stromdichte nach Applikation des Slack-Aktivators festgestellt werden. Die reduzierte Feuerungsfrequenz von sensibilisierten DRG-Neuronen nach Applikation des Slack-Aktivators VH425 oder Loxapin bestätigte, dass eine Aktivierung von Slack die neuronale Erregbarkeit hemmt. Die weitere In-vitro-Charakterisierung zeigte, dass bei allen ausgewählten Kandidaten von einer niedrigen zellulären Zytotoxizität ausgegangen werden kann, die metabolische Stabilität der Kandidaten VH425, FZ201 und EN12 am höchsten ist und VH425 sowie EN12 die niedrigsten Bindungsaffinitäten an  $D_2$ - sowie  $D_3$ -Rezeptoren aufweisen. In einem Off-Target Screening konnte das verbesserte pharmakologische Selektivitätsprofil beider Kandidaten bestätigt werden. So bindet Loxapin an 17 Targets, VH425 dagegen nur noch an acht und EN12 an fünf der im Assay untersuchten 44 Targets.

Pharmakokinetische Studien in der Maus zeigten ausreichend lange Halbwertszeiten und akzeptable Bioverfügbarkeiten nach i.p. und p.o. Applikation von VH425 (i.p.:  $t_{1/2} = 0,58$  Stunden;  $c_{max} = 6280$  ng/ml) und EN12 (i.p.:  $t_{1/2} = 1,35$  Stunden;  $c_{max} = 7810$  ng/ml) für die Durchführung weiterer In-vivo-Versuche. Im Vergleich zu dem peripher limitierten EN12 passiert VH425 weiterhin die Blut-Hirn-Schranke. Motor koordinations tests konnten eine Hemmung der motorischen Funktionen durch VH425 oder EN12 bis zu einer Dosis von 30 mg/kg ausschließen. In einem Modell für neuropathische

Schmerzen konnten schwache analgetische, im AITC-induzierten nozizeptiven Schmerz dagegen keine Effekte für VH425 festgestellt werden. Dagegen wurde eine ausgeprägte antipruritische Wirksamkeit für VH425 in murinen Modellen von akutem Histamin-unabhängigem sowie chronischem Pruritus nachgewiesen. Dass der Wirkmechanismus tatsächlich auf einer gezielten Aktivierung von Slack-Kanälen beruht, konnte durch das Ausbleiben des Effekts in Slack-defizienten Mäusen bestätigt werden. Im Histamin-abhängigen Pruritus blieb VH425 dagegen wirkungslos.

Zusammengefasst lassen die Ergebnisse dieser Arbeit vermuten, dass Slack-Aktivatoren nicht-histaminergen Pruritus effektiv hemmen können. Eine ausgeprägte analgetische Wirksamkeit von Slack-Aktivatoren konnte jedoch in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden.

## 6 Abkürzungsverzeichnis

### A

---

AITC	Allylthiocyanat
AD	Atopische Dermatitis
AKD	Allergische Kontaktdermatitis
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol Propionsäure
ANOVA	Varianzanalyse
AP	Aktionspotential
AP2	Adapterkomplex 2
APD90	Aktionspotential bei 90 % Repolarisation
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AUC	<i>Area under the curve</i>

### B

---

BAM8-22	<i>bovine adrenal medulla 8-22 peptid</i>
Bhlhb5	<i>basic helix-loop-helix member B5</i>
BK	<i>big K<sup>+</sup> channels</i>
BNP	natriuretische Peptid Typ B
bzw.	beziehungsweise

### C

---

Ca <sup>+</sup>	Calciumion
Ca <sub>v</sub>	Spannungsgesteuerte Calciumkanäle
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
CKD	<i>Chronic Kidney Disease</i>
CFA	<i>complete Freund's adjuvant</i> , Komplettes Freund-Adjuvans
CGRP	<i>calcitonin-gene related peptide</i>
CL	<i>Clearance</i>
Cl <sup>-</sup>	Chloridion
C-LTMRs	<i>C-low-threshold mechanoreceptors</i>
cm	Zentimeter
C <sub>max</sub>	maximale Plasmakonzentration
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CREB	<i>cAMP-responsive element-binding protein</i>
CYP	Cytochrom P450

### D

---

Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNFB	1-Fluor-2,4-dinitrobenzol
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphate
DPA	Dynamic Plantar Aesthesiometer
DPBS	<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>
DRG	<i>dorsal root ganglia</i> , Spinalganglien

**E**


---

EC <sub>50</sub>	halbmaximale effektive Konzentration
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E <sub>Max</sub>	Maximaleffekt
EPMS	extrapyramidalmotorische Störungen
EPSP	exzitatorisches postsynaptisches Potential
ERK	<i>extracellular-signal regulated kinases</i>
et al.	<i>et alii</i>

**F**


---

FCS	<i>fetal calf serum</i> , Fetales Kälberserum
fwd	<i>forward</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>

**G**


---

g	Gramm
GΩ	Gigaohm
GABA	γ-Aminobuttersäure
GDNF	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GoF	<i>Gain-of-Function</i>
GPCRs	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GRP	<i>gastrin releasing peptide</i>
GRPR	<i>gastrin releasing peptide</i> – Rezeptor

**H**


---

h	Stunden
H <sub>2</sub> O	Wasser
HBSS	<i>Hank's Balanced Salt Solution</i> , Hank's Salzlösung
HCN	<i>hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channel</i>
HEK-	<i>Human Embryonic Kidney-</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

**I**


---

IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IB4	Isolektin B4
IC <sub>50</sub>	halbmaximale inhibitorische Konzentration
IK	<i>intermediate K<sup>+</sup> channels</i>
I <sub>k</sub>	Kaliumstrom
IL	Interleukin
inf	<i>infinity</i> , unendlich
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös

**J**


---

JNK	c-Jun-N-terminalen Kinasen
-----	----------------------------

**K**


---

K <sup>+</sup>	Kaliumion
K <sub>2P</sub>	2-Poren-Domänen Kaliumkanäle
K <sub>Ca</sub>	Calciumaktivierte Kaliumkanäle

## Abkürzungsverzeichnis

---

KCl	Kaliumchlorid
$K_{el}$	Eliminationskonstante
kg	Kilogramm
KI	Konfidenzintervall
$K_i$	Inhibitorkonstante
$K_{ir}$	Einwärtsgleichrichter-Kaliumkanäle
$K_{Na}$	Natriumaktivierte Kaliumkanäle
KO	Knockout
KOH	Kaliumhydroxid
$K_v$	Spannungsgesteuerte Kaliumkanäle

### L

---

l	Liter
$Li^+$	Lithiumion
LPA	Lysophosphatidsäuren
LTMRs	<i>low-threshold mechanoreceptors</i>

### M

---

M	Mol pro Liter
$M\Omega$	Megaohm
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MC903	Calcipotriol
$Mg^{2+}$	Magnesiumion
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mV	Millivolt
Mrgpr	<i>Mas-related</i> G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
mRNA	<i>messenger</i> RNA

### N

---

n	Stichprobengröße
$Na^+$	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
$NAD^+$	Nicotinamidadenindinukleotid
NaOH	Natriumhydroxid
$Na_v$	Spannungsgesteuerte Natriumkanäle
n.d.	nicht detektiert
ng	Nanogramm
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NK1	Neurokinin 1
nm	Nanometer
nM	Nanomol pro Liter
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPRA	Natriuretischer Peptidrezeptor Typ A
NPY	Neuropeptid Y
NSAID	Nichtsteroidale Antirheumatika

### O

---

$O_2$	Sauerstoff
-------	------------

**P**


---

P2X3	Purinerger Rezeptor der Unterklasse X3
pA	Picoampere
PAG	periaquäduktales Grau
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PDL	Poly-D-Lysin
pF	Picofarad
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
p.o.	peroral

**R**


---

r	Pearson-Korrelationskoeffizient
RCK	<i>regulator of K<sup>+</sup>-conductance</i>
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezien
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase

**S**


---

s	Sekunde
s.c.	subkutan
SCN9A	<i>Sodium Voltage-Gated Channel Alpha Subunit 9</i>
SD	<i>standard deviation</i> , Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler
SK	<i>small K<sup>+</sup> channels</i>
Slack	<i>Sequence like a calcium-activated K<sup>+</sup> channel</i>
Slick	<i>Sequence like an intermediate conductance K<sup>+</sup> channel</i>
SNI	<i>Spared nerve injury</i>
SST	Somatostatin
SST <sub>2A</sub> R	Somatostatin-Rezeptor 2A

**T**


---

t <sub>1/2</sub>	Halbwertszeit
TBE	Tris-Borat-EDTA
TH	Tyrosinhydroxylase
t <sub>max</sub>	Zeitpunkt der maximalen Plasmakonzentration
TrkA	Tropomyosinrezeptorkinase A
TRP	transiente Rezeptor-Potenzial-Kationenkanäle
TSLP	thymisches stromales Lymphopoietin

## Abkürzungsverzeichnis

---

### U

---

U	<i>units</i> , Einheit
U <sub>Soll</sub>	Sollspannung
UV	Ultraviolett

### V

---

V <sub>d</sub>	Verteilungsvolumen
Vol.-%	Volumenprozent

### W

---

WT	Wildtyp
----	---------

### Z

---

z.B.	zum Beispiel
Zn <sup>2+</sup>	Zinkion
ZNS	zentrales Nervensystem

### Symbole

---

5-HT	5-Hydroxytryptamin (Serotonin)
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Ω	Ohm

## 7 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b>	Vereinfachte schematische Darstellung des nozizeptiven Systems.....	5
<b>Abbildung 2:</b>	Vereinfachte schematische Darstellung der Juckreizverarbeitung in der Haut.....	13
<b>Abbildung 3:</b>	Expressionsprofil von murinen Prurizeptoren (Usoskin et al. 2015).....	14
<b>Abbildung 4:</b>	Schematische Darstellung der spinalen Juckreizsignalwege basierend auf dem derzeitigen Wissensstand.....	16
<b>Abbildung 5:</b>	Schematischer Aufbau der $\alpha$ -Untereinheit des Slack-Kanals.....	23
<b>Abbildung 6:</b>	Expressionsmuster von KCNT1 (Slack) in verschiedenen Einzelzell-RNA-Sequenzierungsstudien.....	25
<b>Abbildung 7:</b>	Prinzip des FluxOR™-Kaliumkanal Assays.....	40
<b>Abbildung 8:</b>	Schematische Übersicht der Dosis-Wirkungs-Beziehungen von drei Wirkstoffen.....	41
<b>Abbildung 9:</b>	Vereinfachtes Schaltbild eines Patch-Clamp Vorverstärkers in Whole-cell Konfiguration.....	44
<b>Abbildung 10:</b>	Strukturformeln ausgewählter Slack-Aktivatoren.....	62
<b>Abbildung 11:</b>	Bestimmung der $EC_{50}$ - und $E_{Max}$ -Werte ausgewählter Testsubstanzen im FluxOR™-Assay in HEK-Slack Zellen.....	63
<b>Abbildung 12:</b>	Struktur-Wirkungsbeziehung der neuen Slack-Aktivatoren.....	66
<b>Abbildung 13:</b>	Validierung des Slack-Inhibitors Compound 31 im FluxOR™-Assay.....	67
<b>Abbildung 14:</b>	<i>In vitro</i> Pharmakologie-Profil (Eurofins SafetyScreen44™ Panal) ausgewählter Slack-Aktivatoren.....	69
<b>Abbildung 15:</b>	Bestimmung der $EC_{50}$ von Loxapin in Whole-cell Voltage-Clamp Messungen an HEK-Slack Zellen.....	70
<b>Abbildung 16:</b>	IV-Relation von Whole-cell Patch-Clamp Messungen mit ausgewählten Slack-Aktivatoren.....	71
<b>Abbildung 17:</b>	Der relative Anstieg der Stromdichte ausgewählter Slack-Aktivatoren korreliert mit dem $E_{Max}$ aus FluxOR™-Assay.....	75
<b>Abbildung 18:</b>	Einfluss von Loxapin auf Kaliumströme muriner Spinalganglien.....	76
<b>Abbildung 19:</b>	Untersuchung der Erregbarkeit sensibilisierter Spinalganglien nach Inkubation mit Slack-Aktivatoren.....	78
<b>Abbildung 20:</b>	Veränderungen elektrophysiologischer Parameter von evozierten Aktionspotentialen sensibilisierter DRG-Neurone nach Inkubation mit Slack-Aktivatoren.....	79



<b>Abbildung 21:</b> Konzentration im Plasma und Gehirn nach intraperitonealer, peroraler und intravenöser Applikation von Slack-Aktivatoren in C57BL/6J-Mäusen .....	81
<b>Abbildung 22:</b> Verhältnisse der Gehirn-/Plasmakonzentrationen von Slack-Aktivatoren nach intraperitonealer, peroraler und intravenöser Applikation .....	83
<b>Abbildung 23:</b> Untersuchung der Motorkoordination von C57BL/6N nach Applikation von Loxapin, VH425 und EN12 .....	84
<b>Abbildung 24:</b> Untersuchung des lokomotorischen und explorativen Verhaltens von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425 im Open Field Test .....	85
<b>Abbildung 25:</b> Untersuchung kardiovaskulärer Funktionen in C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425, Loxapin und Morphin.....	87
<b>Abbildung 26:</b> Effekte von VH425 und EN12 in verschiedenen akuten Juckreiz-Modellen.....	89
<b>Abbildung 27:</b> Untersuchung des LY344864-induzierten Juckreizverhaltens von Slack <sup>-/-</sup> - und Wildtyp-Mäusen und von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425 .....	90
<b>Abbildung 28:</b> Mechanistische Untersuchung des Slack-aktivierenden Effekts von VH425.....	91
<b>Abbildung 29:</b> Effekte von VH425 und EN12 im Modell der allergischen Kontaktdermatitis .....	93
<b>Abbildung 30:</b> Effekte von VH425 im Modell der atopischen Dermatitis.....	94
<b>Abbildung 31:</b> Untersuchung der mechanischen und thermischen Sensitivität von C57BL/6N-Mäusen nach Applikation von VH425 .....	95
<b>Abbildung 32:</b> Effekte von VH425 im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung .....	97
<b>Abbildung 33:</b> Effekte von EN12 im SNI-Modell der peripheren Nervenverletzung .....	98
<b>Abbildung 34:</b> Effekte von VH425 im AITC-induziertem Schmerzmodell .....	99

## 8 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b>	Verwendete Chemikalien und Reagenzien.....	29
<b>Tabelle 2:</b>	Verwendete Lösungen und Puffer aus eigener Herstellung.....	32
<b>Tabelle 3:</b>	Lösungen und Puffer zur Verwendung im FluxOR™ Kaliumkanal-Assay .....	33
<b>Tabelle 4:</b>	Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	33
<b>Tabelle 5:</b>	Verwendete Geräte .....	34
<b>Tabelle 6:</b>	Komponenten des Patch-Clamp Setups .....	35
<b>Tabelle 7:</b>	Verwendete Primer mit erwarteten Bandengrößen .....	50
<b>Tabelle 8:</b>	PCR-Temperaturprogramm .....	50
<b>Tabelle 9:</b>	Behandlungsschema der C57BL/6J-Mäuse in den pharmakokinetischen Studien .....	51
<b>Tabelle 10:</b>	EC <sub>50</sub> - und E <sub>Max</sub> -Werte der im FluxOR™-Assay identifizierten Slack-Aktivatoren .....	64
<b>Tabelle 11:</b>	Maximaleffekt und relativer Anstieg der Stromdichte bei 25 µM und 50 µM von ausgewählten Slack-Aktivatoren .....	73
<b>Tabelle 12:</b>	Pharmakokinetische Parameter ermittelt aus den Plasmakonzentrationen .....	82
<b>Tabelle 13:</b>	Wesentliche Kooperationspartner dieser Doktorarbeit.....	126

## 9 Wesentliche Kooperationspartner

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

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

**Tabelle 13:** Wesentliche Kooperationspartner dieser Doktorarbeit

Kooperationspartner		Material
Prof. Dr. Eugen Proschak Wenxin Felix Zhu	Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt	In silico Bindungs-Untersuchungen und Synthese der Loxapin-Derivate
Dr. Victor Hernandez-Olmos Dr. Jan Heering	Fraunhofer-Institut für Translationale Medizin und Pharmakologie (ITMP)	Synthese der Loxapin-Derivate und Unterstützung bei der Etablierung des FluxOR™ Kaliumkanal-Assays
Prof. Dr. Dr. Holger Stark Mariam Dubiel Annika Frank	Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Heinrich Heine Universität Düsseldorf	Testung der Bindungsaffinitäten in Dopamin-Rezeptor- und Histamin-Rezeptor-Bindungsassays
Prof. Dr. Stefan Knapp Dr. Susanne Müller-Knapp Amelie Menge	Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt	Messung der Zytotoxizität im Multiplex-Assay
Prof. Dr. Schubert-Zsilavec Astrid Kaiser	Institut für Pharmazeutische Chemie, Goethe-Universität Frankfurt	Stabilitätstests in Lebermikrosomen von Sprague-Dawley-Ratten
Prof. Dr. Robert Lukowski Prof. Dr. Peter Ruth Dr. Anne E. Bausch	Pharmakologie, Toxikologie und Klinische Pharmazie, Institut für Pharmazie, Universität Tübingen	Bereitstellung von Slack <sup>-/-</sup> - und Wildtyp-Mäusen
Eurofins Discovery	Auftragsforschungsinstitut, Celle-Lévescault, Frankreich	SafetyScreen44™ Panel ausgewählter Slack-Aktivatoren
Enamine/Bienta	Auftragsforschungsinstitut, Kiew, Ukraine	Pharmakokinetische Eigenschaften ausgewählter Slack-Aktivatoren
Else-Kröner-Fresenius-Stiftung		Finanzielle Förderung

## 10 Literaturverzeichnis

- Abd-Elseyed, A; Jackson, M; Gu, S L; Fiala, K; Gu, J (2019): Neuropathic pain and Kv7 voltage-gated potassium channels: The potential role of Kv7 activators in the treatment of neuropathic pain. In: *Molecular pain* 15, 1744806919864256. DOI: 10.1177/1744806919864256.
- Abraira, V E; Ginty, D D (2013): The sensory neurons of touch. In: *Neuron* 79 (4), S. 618–639. DOI: 10.1016/j.neuron.2013.07.051.
- Agoston, D V (2017): How to Translate Time? The Temporal Aspect of Human and Rodent Biology. In: *Frontiers in neurology* 8, S. 92. DOI: 10.3389/fneur.2017.00092.
- Akiyama, T; Lerner, E A; Carstens, E (2015): Protease-activated receptors and itch. In: *Handbook of experimental pharmacology* 226, S. 219–235. DOI: 10.1007/978-3-662-44605-8\_13.
- Akiyama, T; Tominaga, M; Davoodi, A; Nagamine, M; Blansit, K; Horwitz, A et al. (2013): Roles for substance P and gastrin-releasing peptide as neurotransmitters released by primary afferent pruriceptors. In: *Journal of neurophysiology* 109 (3), S. 742–748. DOI: 10.1152/jn.00539.2012.
- Akiyama, T; Tominaga, M; Takamori, K; Carstens, M I; Carstens, E (2014): Roles of glutamate, substance P, and gastrin-releasing peptide as spinal neurotransmitters of histaminergic and nonhistaminergic itch. In: *Pain* 155 (1), S. 80–92. DOI: 10.1016/j.pain.2013.09.011.
- Alexander, S P H; Christopoulos, A; Davenport, A P; Kelly, E; Mathie, A; Peters, J A et al. (2019): THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2019/20: G protein-coupled receptors. In: *British journal of pharmacology* 176 Suppl 1 (Suppl 1), S21-S141. DOI: 10.1111/bph.14748.
- Andersen, H H; Melholt, C; Hilborg, S D; Jerwiarz, A; Randers, A; Simoni, A et al. (2017): Antipruritic Effect of Cold-induced and Transient Receptor Potential-agonist-induced Counter-irritation on Histaminergic Itch in Humans. In: *Acta dermato-venereologica* 97 (1), S. 63–67. DOI: 10.2340/00015555-2447.
- Andres-Bilbe, A; Castellanos, A; Pujol-Coma, A; Callejo, G; Comes, N; Gasull, X (2020): The Background K<sup>+</sup> Channel TRESK in Sensory Physiology and Pain. In: *International Journal of Molecular Sciences* 21 (15). DOI: 10.3390/ijms21155206.
- Bachmann, K; Chupka, J; Erhardt, P; White, D (2007): Application of simple mathematical expressions to relate half-lives of drugs in mice to those in humans. In: *Drug metabolism letters* 1 (2), S. 127–129. DOI: 10.2174/187231207780363606.
- Bandell, M; Story, G M; Hwang, S W; Viswanath, V; Eid, S R; Petrus, M J et al. (2004): Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. In: *Neuron* 41 (6), S. 849–857. DOI: 10.1016/s0896-6273(04)00150-3.
- Barabas, M E; Kossyeva, E A; Stucky, C L (2012): TRPA1 is functionally expressed primarily by IB4-binding, non-peptidergic mouse and rat sensory neurons. In: *PLOS ONE* 7 (10), e47988. DOI: 10.1371/journal.pone.0047988.
- Barcia, G; Fleming, M R; Deligniere, A; Gazula, V-R; Brown, M R; Langouet, M et al. (2012): De novo gain-of-function KCNT1 channel mutations cause malignant migrating partial seizures of infancy. In: *Nature genetics* 44 (11), S. 1255–1259. DOI: 10.1038/ng.2441.
- Baron, R; Binder, A; Wasner, G (2010): Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. In: *The Lancet Neurology* 9 (8), S. 807–819. DOI: 10.1016/S1474-4422(10)70143-5.
- Basbaum, A I; Bautista, D M; Scherrer, G; Julius, D (2009): Cellular and molecular mechanisms of pain. In: *Cell* 139 (2), S. 267–284. DOI: 10.1016/j.cell.2009.09.028.

- Bautista, D M; Siemens, J; Glazer, J M; Tsuruda, P R; Basbaum, A I; Stucky, C L et al. (2007): The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. In: *Nature* 448 (7150), S. 204–208. DOI: 10.1038/nature05910.
- Bautista, D M; Wilson, S R; Hoon, M A (2014): Why we scratch an itch: the molecules, cells and circuits of itch. In: *Nature neuroscience* 17 (2), S. 175–182. DOI: 10.1038/nn.3619.
- Bell, J K; McQueen, D S; Rees, J L (2004): Involvement of histamine H4 and H1 receptors in scratching induced by histamine receptor agonists in Balb C mice. In: *British journal of pharmacology* 142 (2), S. 374–380. DOI: 10.1038/sj.bjp.0705754.
- Bethan A. Cole; Rachel M. Johnson; Hattapark Dejakaisaya; Nadia Pilati; Colin W.G. Fishwick; Stephen P. Muench; Jonathan D. Lippiat (2020): Structure-Based Identification and Characterization of Inhibitors of the Epilepsy-Associated KNa1.1 (KCNT1) Potassium Channel. In: *iScience* 23, S. 101100. DOI: 10.1016/j.isci.2020.101100.
- Beuers, U; Kremer, A E; Bolier, R; Elferink, R P J O (2014): Pruritus in cholestasis: facts and fiction. In: *Hepatology* 60 (1), S. 399–407. DOI: 10.1002/hep.26909.
- Beuers, U; Wolters, F; Oude Elferink, Ronald P. J. (2023): Mechanisms of pruritus in cholestasis: understanding and treating the itch. In: *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 20 (1), S. 26–36. DOI: 10.1038/s41575-022-00687-7.
- Bhattacharjee, A; Gan, L; Kaczmarek, L K (2002): Localization of the Slack potassium channel in the rat central nervous system. In: *The Journal of comparative neurology* 454 (3), S. 241–254. DOI: 10.1002/cne.10439.
- Bhattacharjee, A; Joiner, W J; Wu, M; Yang, Y; Sigworth, F J; Kaczmarek, L K (2003): Slick (Slo2.1), a Rapidly-Gating Sodium-Activated Potassium Channel Inhibited by ATP. In: *J. Neurosci.* 23 (37), S. 11681–11691. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-37-11681.2003.
- Bhattacharjee, A; Kaczmarek, L K (2005): For K<sup>+</sup> channels, Na<sup>+</sup> is the new Ca<sup>2+</sup>. In: *Trends in neurosciences* 28 (8), S. 422–428. DOI: 10.1016/j.tins.2005.06.003.
- Biton, B; Sethuramanujam, S; Picchione, K E; Bhattacharjee, A; Khessibi, N; Chesney, F et al. (2012): The antipsychotic drug loxapine is an opener of the sodium-activated potassium channel slack (Slo2.2). In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 340 (3), S. 706–715. DOI: 10.1124/jpet.111.184622.
- Blackburn-Munro, G; Jensen, B S (2003): The anticonvulsant retigabine attenuates nociceptive behaviours in rat models of persistent and neuropathic pain. In: *European Journal of Pharmacology* 460 (2-3), S. 109–116. DOI: 10.1016/s0014-2999(02)02924-2.
- Bliss, T V P; Collingridge, G L; Kaang, B-K; Zhuo, M (2016): Synaptic plasticity in the anterior cingulate cortex in acute and chronic pain. In: *Nature reviews. Neuroscience* 17 (8), S. 485–496. DOI: 10.1038/nrn.2016.68.
- Bolivar, V J; Caldarone, B J; Reilly, A A; Flaherty, L (2000): Habituation of Activity in an Open Field: A Survey of Inbred Strains and F1 Hybrids. In: *Behavior Genetics* 30 (4), S. 285–293.
- Borsook, D; Hargreaves, R; Bountra, C; Porreca, F (2014): Lost but making progress--Where will new analgesic drugs come from? In: *Science translational medicine* 6 (249), 249sr3. DOI: 10.1126/scitranslmed.3008320.
- Bouhassira, D; Attal, N; Fermanian, J; Alchaar, H; Gautron, M; Masquelier, E et al. (2004): Development and validation of the Neuropathic Pain Symptom Inventory. In: *Pain* 108 (3), S. 248–257. DOI: 10.1016/j.pain.2003.12.024.
- Bowes, J; Brown, A J; Hamon, J; Jarolimek, W; Sridhar, A; Waldron, G; Whitebread, S (2012): Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. In: *Nature reviews. Drug discovery* 11 (12), S. 909–922. DOI: 10.1038/nrd3845.

- Braz, J M; Nassar, M A; Wood, J N; Basbaum, A I (2005): Parallel "pain" pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. In: *Neuron* 47 (6), S. 787–793. DOI: 10.1016/j.neuron.2005.08.015.
- Breivik, H; Collett, B; Ventafridda, V; Cohen, R; Gallacher, D (2006): Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. In: *European Journal of Pain* 10 (4), S. 287–333. DOI: 10.1016/j.ejpain.2005.06.009.
- Brown, M R; Kronengold, J; Gazula, V-R; Chen, Y; Strumbos, J G; Sigworth, F J et al. (2010): Fragile X mental retardation protein controls gating of the sodium-activated potassium channel Slack. In: *Nature neuroscience* 13 (7), S. 819–821. DOI: 10.1038/nn.2563.
- Brown, M R; Kronengold, J; Gazula, V-R; Spilianakis, C G; Flavell, R A; Hehn, C A A von et al. (2008): Amino-terminal isoforms of the Slack K<sup>+</sup> channel, regulated by alternative promoters, differentially modulate rhythmic firing and adaptation. In: *The Journal of physiology* 586 (21), S. 5161–5179. DOI: 10.1113/jphysiol.2008.160861.
- Buccitelli, C; Selbach, M (2020): mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. In: *Nature reviews. Genetics* 21 (10), S. 630–644. DOI: 10.1038/s41576-020-0258-4.
- Budelli, G; Sun, Q; Ferreira, J; Butler, A; Santi, C M; Salkoff, L (2016): SLO2 Channels Are Inhibited by All Divalent Cations That Activate SLO1 K<sup>+</sup> Channels. In: *Journal of Biological Chemistry* 291 (14), S. 7347–7356. DOI: 10.1074/jbc.M115.709436.
- Busserolles, J; Tsantoulas, C; Eschalier, A; López García, J A (2016): Potassium channels in neuropathic pain: advances, challenges, and emerging ideas. In: *Pain* 157 Suppl 1, S7-S14. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000368.
- Caterina, M J; Leffler, A; Malmberg, A B; Martin, W J; Trafton, J; Petersen-Zeitz, K R et al. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. In: *Science* 288 (5464), S. 306–313. DOI: 10.1126/science.288.5464.306.
- Cevikbas, F; Wang, X; Akiyama, T; Kempkes, C; Savinko, T; Antal, A et al. (2014): A sensory neuron-expressed IL-31 receptor mediates T helper cell-dependent itch: Involvement of TRPV1 and TRPA1. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 133 (2), S. 448–460. DOI: 10.1016/j.jaci.2013.10.048.
- Chakrabarti, A; Bagnall, A; Chue, P; Fenton, M; Palaniswamy, V; Wong, W; Xia, J (2007): Loxapine for schizophrenia. In: *The Cochrane database of systematic reviews* 2007 (4), CD001943. DOI: 10.1002/14651858.CD001943.pub2.
- Chemin, J; Patel, A J; Duprat, F; Lauritzen, I; Lazdunski, M; Honoré, E (2005): A phospholipid sensor controls mechanogating of the K<sup>+</sup> channel TREK-1. In: *The EMBO Journal* 24 (1), S. 44–53. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600494.
- Chen, X-J; Sun, Y-G (2020): Central circuit mechanisms of itch. In: *Nature Communications* 11 (1), S. 3052. DOI: 10.1038/s41467-020-16859-5.
- Clauw, D J; Essex, M N; Pitman, V; Jones, K D (2019): Reframing chronic pain as a disease, not a symptom: rationale and implications for pain management. In: *Postgraduate medicine* 131 (3), S. 185–198. DOI: 10.1080/00325481.2019.1574403.
- Cohen, S P; Vase, L; Hooten, W M (2021): Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. In: *The Lancet* 397 (10289), S. 2082–2097. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00393-7.
- Colloca, L; Ludman, T; Bouhassira, D; Baron, R; Dickenson, A H; Yarnitsky, D et al. (2017): Neuropathic pain. In: *Nature reviews. Disease primers* 3, S. 17002. DOI: 10.1038/nrdp.2017.2.

- Coste, B; Mathur, J; Schmidt, M; Earley, T J; Ranade, S; Petrus, M J et al. (2010): Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. In: *Science* 330 (6000), S. 55–60. DOI: 10.1126/science.1193270.
- Coste, B; Xiao, B; Santos, J S; Syeda, R; Grandl, J; Spencer, K S et al. (2012): Piezo proteins are pore-forming subunits of mechanically activated channels. In: *Nature* 483 (7388), S. 176–181. DOI: 10.1038/nature10812.
- Costigan, M; Scholz, J; Woolf, C J (2009): Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. In: *Annual review of neuroscience* 32, S. 1–32. DOI: 10.1146/annurev.neuro.051508.135531.
- Coull, J A M; Boudreau, D; Bachand, K; Prescott, S A; Nault, F; Sk, A et al. (2003): Trans-synaptic shift in anion gradient in spinal lamina I neurons as a mechanism of neuropathic pain. In: *Nature* 424 (6951), S. 938–942. DOI: 10.1038/nature01868.
- Crofford, L J (2015): Chronic Pain: Where the Body Meets the Brain. In: *Transactions of the American Clinical and Climatological Association* 126, S. 167–183. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4530716/>.
- Dalgard, F J; Svensson, ; Halvorsen, J A; Gieler, U; Schut, C; Tomas-Aragones, L et al. (2020): Itch and Mental Health in Dermatological Patients across Europe: A Cross-Sectional Study in 13 Countries. In: *The Journal of investigative dermatology* 140 (3), S. 568–573. DOI: 10.1016/j.jid.2019.05.034.
- David, M; Macas, ; Moreno, C; Prieto, ; Martínez-Mrmol, R; Vicente, R et al. (2012): Protein kinase C (PKC) activity regulates functional effects of Kv1.3 subunit on KV1.5 channels: identification of a cardiac Kv1.5 channelosome. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (25), S. 21416–21428. DOI: 10.1074/jbc.M111.328278.
- Dhaka, A; Murray, A N; Mathur, J; Earley, T J; Petrus, M J; Patapoutian, A (2007): TRPM8 is required for cold sensation in mice. In: *Neuron* 54 (3), S. 371–378. DOI: 10.1016/j.neuron.2007.02.024.
- Dong, X; Dong, X (2018): Peripheral and Central Mechanisms of Itch. In: *Neuron* 98 (3), S. 482–494. DOI: 10.1016/j.neuron.2018.03.023.
- Dong, X; Han, S; Zylka, M J; Simon, M I; Anderson, D J (2001): A Diverse Family of GPCRs Expressed in Specific Subsets of Nociceptive Sensory Neurons. In: *Cell* 106 (5), S. 619–632. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00483-4.
- Dost, R; Rostock, A; Rundfeldt, C (2004): The anti-hyperalgesic activity of retigabine is mediated by KCNQ potassium channel activation. In: *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 369 (4), S. 382–390. DOI: 10.1007/s00210-004-0881-1.
- Drdla, R; Sandkhler, J (2008): Long-term potentiation at C-fibre synapses by low-level presynaptic activity in vivo. In: *Molecular pain* 4, S. 18. DOI: 10.1186/1744-8069-4-18.
- Drenth, J P H; Waxman, S G (2007): Mutations in sodium-channel gene SCN9A cause a spectrum of human genetic pain disorders. In: *The Journal of clinical investigation* 117 (12), S. 3603–3609. DOI: 10.1172/JCI33297.
- Duan, B; Cheng, L; Ma, Q (2018): Spinal Circuits Transmitting Mechanical Pain and Itch. In: *Neuroscience Bulletin* 34 (1), S. 186–193. DOI: 10.1007/s12264-017-0136-z.
- Dubin, A E; Patapoutian, A (2010): Nociceptors: the sensors of the pain pathway. In: *The Journal of clinical investigation* 120 (11), S. 3760–3772. DOI: 10.1172/JCI42843.
- Emery, E C; Ernfors, P (2020): Dorsal Root Ganglion Neuron Types and Their Functional Specialization. In: John N. Wood, John N. Wood, Edward C. Emery und Patrik Ernfors (Hg.): *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*: Oxford University Press, S. 127–155.

- Evely, K M; Pryce, K D; Bausch, A E; Lukowski, R; Ruth, P; Haj-Dahmane, S; Bhattacharjee, A (2017): Slack KNa Channels Influence Dorsal Horn Synapses and Nociceptive Behavior. In: *Molecular pain* 13, 1744806917714342. DOI: 10.1177/1744806917714342.
- Faber, E S L; Sah, P (2003): Calcium-Activated Potassium Channels: Multiple Contributions to Neuronal Function. In: *The Neuroscientist* 9 (3), S. 181–194. DOI: 10.1177/1073858403252673.
- Finnerup, N B (2019): Nonnarcotic Methods of Pain Management. In: *The New England journal of medicine* 380 (25), S. 2440–2448. DOI: 10.1056/NEJMra1807061.
- Finnerup, N B; Attal, N; Haroutounian, S; McNicol, E; Baron, R; Dworkin, R H et al. (2015): Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-analysis. In: *The Lancet Neurology* 14 (2), S. 162–173. DOI: 10.1016/S1474-4422(14)70251-0.
- Finnerup, N B; Sindrup, S H; Jensen, T S (2010): The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. In: *Pain* 150 (3), S. 573–581. DOI: 10.1016/j.pain.2010.06.019.
- Fishbane, S; Jamal, A; Munera, C; Wen, W; Menzaghi, F (2020): A Phase 3 Trial of Difelikefalin in Hemodialysis Patients with Pruritus. In: *The New England journal of medicine* 382 (3), S. 222–232. DOI: 10.1056/NEJMoa1912770.
- Fitzcharles, M-A; Cohen, S P; Clauw, D J; Littlejohn, G; Usui, C; Häuser, W (2021): Nociceptive pain: towards an understanding of prevalent pain conditions. In: *The Lancet* 397 (10289), S. 2098–2110. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00392-5.
- Foster, E; Wildner, H; Tudeau, L; Haueter, S; Ralvenius, W T; Jegen, M et al. (2015): Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. In: *Neuron* 85 (6), S. 1289–1304. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.02.028.
- Gao, K; Lin, Z; Wen, S; Jiang, Y (2022): Potassium channels and epilepsy. In: *Acta Neurologica Scandinavica* 146 (6), S. 699–707. DOI: 10.1111/ane.13695.
- Geldenhuys, W J; Mohammad, A S; Adkins, C E; Lockman, P R (2015): Molecular determinants of blood-brain barrier permeation. In: *Therapeutic Delivery* 6 (8), S. 961–971. DOI: 10.4155/tde.15.32.
- Genc, H; Nacir, B; Duyur Cakit, B; Saracoglu, M; Erdem, H R (2012): The effects of coexisting fibromyalgia syndrome on pain intensity, disability, and treatment outcome in patients with chronic lateral epicondylitis. In: *Pain medicine* 13 (2), S. 270–280. DOI: 10.1111/j.1526-4637.2011.01300.x.
- González, C; Baez-Nieto, D; Valencia, I; Oyarzún, I; Rojas, P; Naranjo, D; Latorre, R (2012): K(+) channels: function-structural overview. In: *Comprehensive Physiology* 2 (3), S. 2087–2149. DOI: 10.1002/cphy.c110047.
- Gotoh, Y; Andoh, T; Kuraishi, Y (2011): Noradrenergic regulation of itch transmission in the spinal cord mediated by  $\alpha$ -adrenoceptors. In: *Neuropharmacology* 61 (4), S. 825–831. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2011.05.030.
- Green, D; Dong, X (2016): The cell biology of acute itch. In: *Journal of cell biology* 213 (2), S. 155–161. DOI: 10.1083/jcb.201603042.
- Griffin, A M; Kahlig, K M; Hatch, R J; Hughes, Z A; Chapman, M L; Antonio, B et al. (2021): Discovery of the First Orally Available, Selective KNa1.1 Inhibitor: In Vitro and In Vivo Activity of an Oxadiazole Series. In: *ACS Medicinal Chemistry Letters* 12 (4), S. 593–602. DOI: 10.1021/acsmchemlett.0c00675.



- Grundy, L; Harrington, A M; Castro, J; Garcia-Caraballo, S; Deiteren, A; Maddern, J et al. (2018): Chronic linacotide treatment reduces colitis-induced neuroplasticity and reverses persistent bladder dysfunction. In: *JCI Insight* 3 (19). DOI: 10.1172/jci.insight.121841.
- Gunal, A I; Ozalp, G; Yoldas, T K; Gunal, S Y; Kirciman, E; Celiker, H (2004): Gabapentin therapy for pruritus in haemodialysis patients: a randomized, placebo-controlled, double-blind trial. In: *Nephrol Dial Transplant* 19 (12), S. 3137–3139. DOI: 10.1093/ndt/gfh496.
- Gunthorpe, M J; Large, C H; Sankar, R (2012): The mechanism of action of retigabine (ezogabine), a first-in-class K<sup>+</sup> channel opener for the treatment of epilepsy. In: *Epilepsia* 53 (3), S. 412–424. DOI: 10.1111/j.1528-1167.2011.03365.x.
- Gururaj, S; Evely, K M; Pryce, K D; Li, J; Qu, J; Bhattacharjee, A (2017): Protein kinase A-induced internalization of Slack channels from the neuronal membrane occurs by adaptor protein-2/clathrin-mediated endocytosis. In: *Journal of Biological Chemistry* 292 (47), S. 19304–19314. DOI: 10.1074/jbc.M117.804716.
- Gururaj, S; Fleites, J; Bhattacharjee, A (2016): Slack sodium-activated potassium channel membrane expression requires p38 mitogen-activated protein kinase phosphorylation. In: *Neuropharmacology* 103, S. 279–289. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.12.016.
- Han, L; Dong, X (2014): Itch mechanisms and circuits. In: *Annual review of biophysics* 43, S. 331–355. DOI: 10.1146/annurev-biophys-051013-022826.
- Hargreaves, K; Dubner, R; Brown, F; Flores, C; Joris, J (1988): A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. In: *Pain* 32 (1), S. 77–88. DOI: 10.1016/0304-3959(88)90026-7.
- Häring, M; Zeisel, A; Hochgerner, H; Rinwa, P; Jakobsson, J E T; Lönnerberg, P et al. (2018): Neuronal atlas of the dorsal horn defines its architecture and links sensory input to transcriptional cell types. In: *Nature neuroscience* 21 (6), S. 869–880. DOI: 10.1038/s41593-018-0141-1.
- Harvey, R J; Depner, U B; Wässle, H; Ahmadi, S; Heindl, C; Reinold, H et al. (2004): GlyR alpha3: an essential target for spinal PGE<sub>2</sub>-mediated inflammatory pain sensitization. In: *Science* 304 (5672), S. 884–887. DOI: 10.1126/science.1094925.
- Heel, R C; Brogden, R N; Speight, T M; Avery, G S (1978): Loxapine: a review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy as an antipsychotic agent. In: *Drugs* 15 (3), S. 198–217. DOI: 10.2165/00003495-197815030-00002.
- Hermey, Guido (2011): *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (SpringerLink Bücher).
- Heron, S E; Smith, K R; Bahlo, M; Nobili, L; Kahana, E; Licchetta, L et al. (2012): Missense mutations in the sodium-gated potassium channel gene KCNT1 cause severe autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy. In: *Nature genetics* 44 (11), S. 1188–1190. DOI: 10.1038/ng.2440.
- Hibino, H; Inanobe, A; Furutani, K; Murakami, S; Findlay, I; Kurachi, Y (2010): Inwardly rectifying potassium channels: their structure, function, and physiological roles. In: *Physiological reviews* 90 (1), S. 291–366. DOI: 10.1152/physrev.00021.2009.
- Hinman, A; Chuang, H-H; Bautista, D M; Julius, D (2006): TRP channel activation by reversible covalent modification. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (51), S. 19564–19568. DOI: 10.1073/pnas.0609598103.
- Hite, R K; MacKinnon, R (2017): Structural Titration of Slo2.2, a Na<sup>+</sup>-Dependent K<sup>+</sup> Channel. In: *Cell* 168 (3), 390-399.e11. DOI: 10.1016/j.cell.2016.12.030.

- Hite, R K; Yuan, P; Li, Z; Hsuing, Y; Walz, T; MacKinnon, R (2015): Cryo-electron microscopy structure of the Slo2.2 Na(+)-activated K(+) channel. In: *Nature* 527 (7577), S. 198–203. DOI: 10.1038/nature14958.
- Holford, N (2017): Pharmacodynamic principles and the time course of immediate drug effects. In: *Translational and clinical pharmacology* 25 (4), S. 157–161. DOI: 10.12793/tcp.2017.25.4.157.
- Hopkins, A L; Groom, C R (2002): The druggable genome. In: *Nat Rev Drug Discov* 1 (9), S. 727–730. DOI: 10.1038/nrd892.
- Hu, Y; Fu, Q-Y; Fu, D-N; Wang, X-L; Wang, Z-H; Zhang, J-T et al. (2021): The Role of Transient Receptor Potential A1 and G Protein-Coupled Receptor 39 in Zinc-Mediated Acute and Chronic Itch in Mice. In: *Front. Mol. Neurosci.* 14, S. 768731. DOI: 10.3389/fnmol.2021.768731.
- Huang, F; Wang, X; Ostertag, E M; Nuwal, T; Huang, B; Jan, Y-N et al. (2013): TMEM16C facilitates Na(+)-activated K+ currents in rat sensory neurons and regulates pain processing. In: *Nature neuroscience* 16 (9), S. 1284–1290. DOI: 10.1038/nn.3468.
- Huang, J; Polgár, E; Solinski, H J; Mishra, S K; Tseng, P-Y; Iwagaki, N et al. (2018): Circuit dissection of the role of somatostatin in itch and pain. In: *Nature neuroscience* 21 (5), S. 707–716. DOI: 10.1038/s41593-018-0119-z.
- Hughes, J P; Rees, S; Kalindjian, S B; Philpott, K L (2011): Principles of early drug discovery. In: *British journal of pharmacology* 162 (6), S. 1239–1249. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.01127.x.
- Imamachi, N; Park, G H; Lee, H; Anderson, D J; Simon, M I; Basbaum, A I; Han, S (2009): TRPV1-expressing primary afferents generate behavioral responses to pruritogens via multiple mechanisms. In: *PNAS* 106 (27), S. 11330–11335. DOI: 10.1073/pnas.0905605106.
- Izumi, R; Negi, O; Suzuki, T; Tominaga, M; Kamo, A; Suga, Y et al. (2017): Efficacy of an emollient containing diethylene glycol/dilinoleic acid copolymer for the treatment of dry skin and pruritus in patients with senile xerosis. In: *Journal of Cosmetic Dermatology* 16 (4), e37-e41. DOI: 10.1111/jocd.12332.
- Jia, Y; Lin, Y; Li, J; Li, M; Zhang, Y; Hou, Y et al. (2019): Quinidine Therapy for Lennox-Gastaut Syndrome With KCNT1 Mutation. A Case Report and Literature Review. In: *Frontiers in neurology* 10, S. 64. DOI: 10.3389/fneur.2019.00064.
- Joiner, W J; Tang, M D; Wang, L Y; Dworetzky, S I; Boissard, C G; Gan, L et al. (1998): Formation of intermediate-conductance calcium-activated potassium channels by interaction of Slack and Slo subunits. In: *Nature neuroscience* 1 (6), S. 462–469. DOI: 10.1038/2176.
- Jung, M; Dourado, M; Maksymetz, J; Jacobson, A; Laufer, B I; Baca, M et al. (2023): Cross-species transcriptomic atlas of dorsal root ganglia reveals species-specific programs for sensory function. In: *Nature Communications* 14 (1), S. 366. DOI: 10.1038/s41467-023-36014-0.
- Kaczmarek, L K (2013): Slack, Slick and Sodium-Activated Potassium Channels. In: *ISRN neuroscience* 2013 (2013). DOI: 10.1155/2013/354262.
- Kaczmarek, L K; Aldrich, R W; Chandy, K G; Grissmer, S; Wei, A D; Wulff, H (2017): International Union of Basic and Clinical Pharmacology. C. Nomenclature and Properties of Calcium-Activated and Sodium-Activated Potassium Channels. In: *Pharmacol Rev* 69 (1), S. 1–11. DOI: 10.1124/pr.116.012864.
- Kallenborn-Gerhardt, W; Schröder, K; Del Turco, D; Lu, R; Kynast, K; Kosowski, J et al. (2012): NADPH oxidase-4 maintains neuropathic pain after peripheral nerve injury. In: *J. Neurosci.* 32 (30), S. 10136–10145. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6227-11.2012.

- Kameyama, M; Kakei, M; Sato, R; Shibasaki, T; Matsuda, H; Irisawa, H (1984): Intracellular Na<sup>+</sup> activates a K<sup>+</sup> channel in mammalian cardiac cells. In: *Nature* 309 (5966), S. 354–356. DOI: 10.1038/309354a0.
- Kardon, A P; Polgár, E; Hachisuka, J; Snyder, L M; Cameron, D; Savage, S et al. (2014): Dynorphin acts as a neuromodulator to inhibit itch in the dorsal horn of the spinal cord. In: *Neuron* 82 (3), S. 573–586. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.02.046.
- Kim, G E; Kaczmarek, L K (2014): Emerging role of the KCNT1 Slack channel in intellectual disability. In: *Frontiers in cellular neuroscience* 8, S. 209. DOI: 10.3389/fncel.2014.00209.
- Kim, S; Barry, D M; Liu, X-Y; Yin, S; Munanairi, A; Meng, Q-T et al. (2016): Facilitation of TRPV4 by TRPV1 is required for itch transmission in some sensory neuron populations. In: *Science signaling* 9 (437), ra71. DOI: 10.1126/scisignal.aaf1047.
- Kopcyiok, M E R; Ständer, H F; Osada, N; Steinke, S; Ständer, S (2016): Prevalence and Characteristics of Pruritus: A One-Week Cross-sectional Study in a German Dermatology Practice. In: *Acta dermato-venereologica* 96 (1), S. 50–55. DOI: 10.2340/00015555-2166.
- Kuang, Q; Purhonen, P; Hebert, H (2015): Structure of potassium channels. In: *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72 (19), S. 3677–3693. DOI: 10.1007/s00018-015-1948-5.
- Kühn, H; Kappes, L; Wolf, K; Gebhardt, L; Neurath, M F; Reeh, P et al. (2020): Complementary roles of murine NaV1.7, NaV1.8 and NaV1.9 in acute itch signalling. In: *Scientific reports* 10 (1), S. 2326. DOI: 10.1038/s41598-020-59092-2.
- Kupari, J; Usoskin, D; Parisien, M; Lou, D; Hu, Y; Fatt, M et al. (2021): Single cell transcriptomics of primate sensory neurons identifies cell types associated with chronic pain. In: *Nature Communications* 12 (1), S. 1510. DOI: 10.1038/s41467-021-21725-z.
- LaMotte, R H; Dong, X; Ringkamp, M (2014): Sensory neurons and circuits mediating itch. In: *Nature reviews. Neuroscience* 15 (1), S. 19–31. DOI: 10.1038/nrn3641.
- Langford, D J; Bailey, A L; Chanda, M L; Clarke, S E; Drummond, T E; Echols, S et al. (2010): Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. In: *Nat Methods* 7 (6), S. 447–449. DOI: 10.1038/nmeth.1455.
- Langford, R M (2006): Pain management today - what have we learned? In: *Clin Rheumatol* 25 Suppl 1 (1), S2-8. DOI: 10.1007/s10067-006-0311-5.
- Larson, C M; Wilcox, G L; Fairbanks, C A (2019): The Study of Pain in Rats and Mice. In: *Comparative medicine* 69 (6), S. 555–570. DOI: 10.30802/AALAS-CM-19-000062.
- Latremoliere, A; Woolf, C J (2009): Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. In: *The journal of pain : official journal of the American Pain Society* 10 (9), S. 895–926. DOI: 10.1016/j.jpain.2009.06.012.
- Lay, M; Dong, X (2020): Neural Mechanisms of Itch. In: *Annual review of neuroscience* 43, S. 187–205. DOI: 10.1146/annurev-neuro-083019-024537.
- Legat, F J (2019): Is there still a role for UV therapy in itch treatment? In: *Experimental dermatology* 28 (12), S. 1432–1438. DOI: 10.1111/exd.14011.
- Leslie, T A; Greaves, M W; Yosipovitch, G (2015): Current topical and systemic therapies for itch. In: *Handbook of experimental pharmacology* 226, S. 337–356. DOI: 10.1007/978-3-662-44605-8\_18.
- Lim, C X; Ricos, M G; Dibbens, L M; Heron, S E (2016): KCNT1 mutations in seizure disorders: the phenotypic spectrum and functional effects. In: *Journal of medical genetics* 53 (4), S. 217–225. DOI: 10.1136/jmedgenet-2015-103508.

- Liu, B; Escalera, J; Balakrishna, S; Fan, L; Caceres, A I; Robinson, E et al. (2013): TRPA1 controls inflammation and pruritogen responses in allergic contact dermatitis. In: *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27 (9), S. 3549–3563. DOI: 10.1096/fj.13-229948.
- Liu, Q; Sikand, P; Ma, C; Tang, Z; Han, L; Li, Z et al. (2012): Mechanisms of itch evoked by  $\beta$ -alanine. In: *J. Neurosci.* 32 (42), S. 14532–14537. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3509-12.2012.
- Liu, Q; Tang, Z; Surdenikova, L; Kim, S; Patel, K N; Kim, A et al. (2009): Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. In: *Cell* 139 (7), S. 1353–1365. DOI: 10.1016/j.cell.2009.11.034.
- Lu, R; Bausch, A E; Kallenborn-Gerhardt, W; Stoetzer, C; Debruin, N; Ruth, P et al. (2015): Slack channels expressed in sensory neurons control neuropathic pain in mice. In: *J. Neurosci.* 35 (3), S. 1125–1135. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2423-14.2015.
- Lu, R; Metzner, K; Zhou, F; Flauaus, C; Balzulat, A; Engel, P et al. (2021): Functional Coupling of Slack Channels and P2X3 Receptors Contributes to Neuropathic Pain Processing. In: *International Journal of Molecular Sciences* 22 (1). DOI: 10.3390/ijms22010405.
- Macpherson, L J; Dubin, A E; Evans, M J; Marr, F; Schultz, P G; Cravatt, B F; Patapoutian, A (2007): Noxious compounds activate TRPA1 ion channels through covalent modification of cysteines. In: *Nature* 445 (7127), S. 541–545. DOI: 10.1038/nature05544.
- Marron, S E; Tomas-Aragones, L; Boira, S; Campos-Rodenas, R (2016): Quality of Life, Emotional Wellbeing and Family Repercussions in Dermatological Patients Experiencing Chronic Itching: A Pilot Study. In: *Acta dermato-venereologica* 96 (3), S. 331–335. DOI: 10.2340/00015555-2263.
- Martin, H C; Kim, G E; Pagnamenta, A T; Murakami, Y; Carvill, G L; Meyer, E et al. (2014): Clinical whole-genome sequencing in severe early-onset epilepsy reveals new genes and improves molecular diagnosis. In: *Human molecular genetics* 23 (12), S. 3200–3211. DOI: 10.1093/hmg/ddu030.
- Martinez-Espinosa, P L; Wu, J; Yang, C; Gonzalez-perez, V; Zhou, H; Liang, H et al. (2015): Knockout of Slo2.2 enhances itch, abolishes KNa current, and increases action potential firing frequency in DRG neurons. In: *eLife Sciences Publications, Ltd*, 11.11.2015. Online verfügbar unter <https://elifesciences.org/articles/10013>, zuletzt geprüft am 12.03.2020.
- Matsuda, K M; Sharma, D; Schonfeld, A R; Kwatra, S G (2016): Gabapentin and pregabalin for the treatment of chronic pruritus. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 75 (3), 619–625.e6. DOI: 10.1016/j.jaad.2016.02.1237.
- Matta, J A; Cornett, P M; Miyares, R L; Abe, K; Sahibzada, N; Ahern, G P (2008): General anesthetics activate a nociceptive ion channel to enhance pain and inflammation. In: *PNAS* 105 (25), S. 8784–8789. DOI: 10.1073/pnas.0711038105.
- Matterne, U; Apfelbacher, C J; Loerbroks, A; Schwarzer, T; Büttner, M; Ofenloch, R et al. (2011): Prevalence, correlates and characteristics of chronic pruritus: a population-based cross-sectional study. In: *Acta dermato-venereologica* 91 (6), S. 674–679. DOI: 10.2340/00015555-1159.
- Matterne, U; Strassner, T; Apfelbacher, C J; Diepgen, T L; Weisshaar, E (2009): Measuring the prevalence of chronic itch in the general population: development and validation of a questionnaire for use in large-scale studies. In: *Acta dermato-venereologica* 89 (3), S. 250–256. DOI: 10.2340/00015555-0641.
- McNeil, B; Dong, X (2014): Mrgprs as Itch Receptors. In: *Itch: Mechanisms and Treatment*. Chapter 12. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24830013/>.

- Meixiong, J; Vasavda, C; Snyder, S H; Dong, X (2019): MRGPRX4 is a G protein-coupled receptor activated by bile acids that may contribute to cholestatic pruritus. In: *PNAS* 116 (21), S. 10525–10530. DOI: 10.1073/pnas.1903316116.
- Metz, M; Ständer, S (2010): Chronic pruritus--pathogenesis, clinical aspects and treatment. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV* 24 (11), S. 1249–1260. DOI: 10.1111/j.1468-3083.2010.03850.x.
- Miller, A N; Long, S B (2012): Crystal structure of the human two-pore domain potassium channel K2P1. In: *Science* 335 (6067), S. 432–436. DOI: 10.1126/science.1213274.
- Mills, S E E; Nicolson, K P; Smith, B H (2019): Chronic pain: a review of its epidemiology and associated factors in population-based studies. In: *BJA: British Journal of Anaesthesia* 123 (2), e273-e283. DOI: 10.1016/j.bja.2019.03.023.
- Misery, L; Brenaut, E; Pierre, O; Le Garrec, R; Gouin, O; Lebonvallet, N et al. (2021): Chronic itch: emerging treatments following new research concepts. In: *British journal of pharmacology* 178 (24), S. 4775–4791. DOI: 10.1111/bph.15672.
- Misery, L; Erfan, N; Castela, E; Brenaut, E; Lantéri-Minet, M; Lacour, J-P; Passeron, T (2015): Successful treatment of refractory neuropathic pruritus with capsaicin 8% patch: a bicentric retrospective study with long-term follow-up. In: *Acta dermato-venereologica* 95 (7), S. 864–865. DOI: 10.2340/00015555-2085.
- Misery, Laurent; Ständer, Sonja (2016): Pruritus. 2. Auflage. London: Springer-Verlag.
- Mishra, S K; Hoon, M A (2015): Transmission of pruriceptive signals. In: *Handbook of experimental pharmacology* 226, S. 151–162. DOI: 10.1007/978-3-662-44605-8\_8.
- Mochizuki, H; Kakigi, R (2015): Itch and brain. In: *The Journal of Dermatology* 42 (8), S. 761–767. DOI: 10.1111/1346-8138.12956.
- Mogil, J S (2019): The Measurement of Pain in the Laboratory Rodent. In: John N. Wood und Jeffrey S. Mogil (Hg.): *The Oxford Handbook of the Neurobiology of Pain*: Oxford University Press.
- Moore, A; Derry, S; Eccleston, C; Kalso, E (2013): Expect analgesic failure; pursue analgesic success. In: *BMJ* 346, f2690. DOI: 10.1136/bmj.f2690.
- Moore, K A; Kohno, T; Karchewski, L A; Scholz, J; Baba, H; Woolf, C J (2002): Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. In: *J. Neurosci.* 22 (15), S. 6724–6731. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.22-15-06724.2002.
- Morita, T; McClain, S P; Batia, L M; Pellegrino, M; Wilson, S R; Kienzler, M A et al. (2015): HTR7 Mediates Serotonergic Acute and Chronic Itch. In: *Neuron* 87 (1), S. 124–138. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.05.044.
- Narbutt, J; Olejniczak, I; Sobolewska-Sztychny, D; Sysa-Jedrzejowska, A; Słowik-Kwiatkowska, I; Hawro, T; Lesiak, A (2013): Narrow band ultraviolet B irradiations cause alteration in interleukin-31 serum level in psoriatic patients. In: *Archives of Dermatological Research* 305 (3), S. 191–195. DOI: 10.1007/s00403-012-1293-6.
- Nattkemper, L A; Martinez-Escala, M-E; Gelman, A B; Singer, E M; Rook, A H; Guitart, J; Yosipovitch, G (2016): Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. In: *Acta dermato-venereologica* 96 (7), S. 894–898. DOI: 10.2340/00015555-2417.
- Nguyen, M Q; Lars J von Buchholtz; Reker, A N; Ryba, N J; Davidson, S (2021): Single-nucleus transcriptomic analysis of human dorsal root ganglion neurons. In: *eLife Sciences*

- Publications, Ltd*, 26.11.2021. Online verfügbar unter <https://elifesciences.org/articles/71752>, zuletzt geprüft am 24.10.2022.
- Nuwer, M O; Picchione, K E; Bhattacharjee, A (2009): cAMP-dependent kinase does not modulate the Slack sodium-activated potassium channel. In: *Neuropharmacology* 57 (3), S. 219–226. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2009.06.006.
- Nuwer, M O; Picchione, K E; Bhattacharjee, A (2010): PKA-induced internalization of slack KNa channels produces dorsal root ganglion neuron hyperexcitability. In: *J. Neurosci.* 30 (42), S. 14165–14172. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3150-10.2010.
- Ocaña, M; Cendán, C M; Cobos, E J; Entrena, J M; Baeyens, J M (2004): Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. In: *European Journal of Pharmacology* 500 (1-3), S. 203–219. DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.07.026.
- Ohba, C; Kato, M; Takahashi, N; Osaka, H; Shihara, T; Tohyama, J et al. (2015): De novo KCNT1 mutations in early-onset epileptic encephalopathy. In: *Epilepsia* 56 (9), e121-8. DOI: 10.1111/epi.13072.
- O'Neill, J; Brock, C; Olesen, A E; Andresen, T; Nilsson, M; Dickenson, A H (2012): Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. In: *Pharmacol Rev* 64 (4), S. 939–971. DOI: 10.1124/pr.112.006163.
- Ostadhadi, S; Foroutan, A; Haddadi, N-S; Norouzi-Javidan, A; Momeny, M; Zarrinrad, G et al. (2017): Pharmacological evidence for the involvement of adenosine triphosphate sensitive potassium channels in chloroquine-induced itch in mice. In: *Pharmacological reports : PR* 69 (6), S. 1295–1299. DOI: 10.1016/j.pharep.2017.05.021.
- Pádua-Reis, M; Nôga, D A; Tort, A B L; Blunder, M (2021): Diazepam causes sedative rather than anxiolytic effects in C57BL/6J mice. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 9335. DOI: 10.1038/s41598-021-88599-5.
- Pagliara, A; Testa, B; Carrupt, P A; Jolliet, P; Morin, C; Morin, D et al. (1998): Molecular properties and pharmacokinetic behavior of cetirizine, a zwitterionic H1-receptor antagonist. In: *Journal of Medicinal Chemistry* 41 (6), S. 853–863. DOI: 10.1021/jm9704311.
- Palkar, R; Ongun, S; Catich, E; Li, N; Borad, N; Sarkisian, A; McKemy, D D (2018): Cooling Relief of Acute and Chronic Itch Requires TRPM8 Channels and Neurons. In: *The Journal of investigative dermatology* 138 (6), S. 1391–1399. DOI: 10.1016/j.jid.2017.12.025.
- Pan, H; Fatima, M; Li, A; Lee, H; Cai, W; Horwitz, L et al. (2019): Identification of a Spinal Circuit for Mechanical and Persistent Spontaneous Itch. In: *Neuron* 103 (6), 1135-1149.e6. DOI: 10.1016/j.neuron.2019.06.016.
- Peirs, C; Seal, R P (2016): Neural circuits for pain: Recent advances and current views. In: *Science* 354 (6312), S. 578–584. DOI: 10.1126/science.aaf8933.
- Phan, N Q; Bernhard, J D; Luger, T A; Ständer, S (2010): Antipruritic treatment with systemic  $\mu$ -opioid receptor antagonists: a review. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 63 (4), S. 680–688. DOI: 10.1016/j.jaad.2009.08.052.
- Pisoni, R L; Wikström, B; Elder, S J; Akizawa, T; Asano, Y; Keen, M L et al. (2006): Pruritus in haemodialysis patients: International results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study (DOPPS). In: *Nephrol Dial Transplant* 21 (12), S. 3495–3505. DOI: 10.1093/ndt/gfl461.
- Ponce, A; Castillo, A; Hinojosa, L; Martinez-Rendon, J; Cereijido, M (2018): The expression of endogenous voltage-gated potassium channels in HEK293 cells is affected by culture conditions. In: *Physiological Reports* 6 (8), e13663. DOI: 10.14814/phy2.13663.

- Popovic, D; Nuss, P; Vieta, E (2015): Revisiting loxapine: a systematic review. In: *Annals of general psychiatry* 14, S. 15. DOI: 10.1186/s12991-015-0053-3.
- Pryce, K D; Powell, R; Agwa, D; Evely, K M; Sheehan, G D; Nip, A et al. (2019): Magi-1 scaffolds NaV1.8 and Slack KNa channels in dorsal root ganglion neurons regulating excitability and pain. In: *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33 (6), S. 7315–7330. DOI: 10.1096/fj.201802454RR.
- Quick, K; Zhao, J; Eijkelkamp, N; Linley, J E; Rugiero, F; Cox, J J et al. (2012): TRPC3 and TRPC6 are essential for normal mechanotransduction in subsets of sensory neurons and cochlear hair cells. In: *Open biology* 2 (5), S. 120068. DOI: 10.1098/rsob.120068.
- Kuraishi, I H; Stern, S; Mangan, K P; Zhang, Y; Ali, S R; Mercier, M R et al. (2019): An Epilepsy-Associated KCNT1 Mutation Enhances Excitability of Human iPSC-Derived Neurons by Increasing Slack KNa Currents. In: *J. Neurosci.* 39 (37), S. 7438–7449. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1628-18.2019.
- Raja, S N; Carr, D B; Cohen, M; Finnerup, N B; Flor, H; Gibson, S et al. (2020): The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. In: *Pain* 161 (9), S. 1976–1982. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001939.
- Ranade, S S; Syeda, R; Patapoutian, A (2015): Mechanically Activated Ion Channels. In: *Neuron* 87 (6), S. 1162–1179. DOI: 10.1016/j.neuron.2015.08.032.
- Ray, P; Torck, A; Quigley, L; Wangzhou, A; Neiman, M; Rao, C et al. (2018): Comparative transcriptome profiling of the human and mouse dorsal root ganglia: an RNA-seq-based resource for pain and sensory neuroscience research. In: *Pain* 159 (7), S. 1325–1345. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001217.
- Reddy, V B; Iuga, A O; Shimada, S G; LaMotte, R H; Lerner, E A (2008): Cowhage-evoked itch is mediated by a novel cysteine protease: a ligand of protease-activated receptors. In: *J. Neurosci.* 28 (17), S. 4331–4335. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0716-08.2008.
- Redfern, W S; Carlsson, L; Davis, A S; Lynch, W G; MacKenzie, I; Palethorpe, S et al. (2003): Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. In: *Cardiovasc Res* 58 (1), S. 32–45. DOI: 10.1016/S0008-6363(02)00846-5.
- Reichling, D B; Green, P G; Levine, J D (2013): The fundamental unit of pain is the cell. In: *Pain* 154 Suppl 1, S2-9. DOI: 10.1016/j.pain.2013.05.037.
- Renthal, W; Tochitsky, I; Yang, L; Cheng, Y-C; Li, E; Kawaguchi, R et al. (2020): Transcriptional Reprogramming of Distinct Peripheral Sensory Neuron Subtypes after Axonal Injury. In: *Neuron* 108 (1), 128-144.e9. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.07.026.
- Rogoz, K; Andersen, H H; Lagerström, M C; Kullander, K (2014): Multimodal use of calcitonin gene-related peptide and substance P in itch and acute pain uncovered by the elimination of vesicular glutamate transporter 2 from transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 neurons. In: *J. Neurosci.* 34 (42), S. 14055–14068. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1722-14.2014.
- Rose, C R (2002): Na<sup>+</sup> signals at central synapses. In: *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 8 (6), S. 532–539. DOI: 10.1177/1073858402238512.
- Ross, S E; Mardinly, A R; McCord, A E; Zurawski, J; Cohen, S; Jung, C et al. (2010): Loss of inhibitory interneurons in the dorsal spinal cord and elevated itch in Bhlhb5 mutant mice. In: *Neuron* 65 (6), S. 886–898. DOI: 10.1016/j.neuron.2010.02.025.

- Ru, F; Sun, H; Jurcakova, D; Herbstsomer, R A; Meixong, J; Dong, X; Udem, B J (2017): Mechanisms of pruritogen-induced activation of itch nerves in isolated mouse skin. In: *The Journal of physiology* 595 (11), S. 3651–3666. DOI: 10.1113/JP273795.
- Salkoff, L; Butler, A; Ferreira, G; Santi, C; Wei, A (2006): High-conductance potassium channels of the SLO family. In: *Nature reviews. Neuroscience* 7 (12), S. 921–931. DOI: 10.1038/nrn1992.
- Santi, C M; Ferreira, G; Yang, B; Gazula, V-R; Butler, A; Wei, A et al. (2006): Opposite regulation of Slick and Slack K<sup>+</sup> channels by neuromodulators. In: *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26 (19), S. 5059–5068. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3372-05.2006.
- Schlereth, T e a (2019): S2k-Leitlinie Diagnose und nicht interventionelle Therapie neuropathischer Schmerzen. In: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie (Hrsg.)*. Online verfügbar unter <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/030-114.html>.
- Schmidt, Robert F.; Lang, Florian; Heckmann, Manfred (Hg.) (2010): Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie : mit herausnehmbaren Repetitorium. 31., überarbeitete und aktualisierte Auflage. Heidelberg: Springer Medizin-Verlag (Springer-Lehrbuch).
- Schmidtko, A; Gao, W; König, P; Heine, S; Motterlini, R; Ruth, P et al. (2008): cGMP produced by NO-sensitive guanylyl cyclase essentially contributes to inflammatory and neuropathic pain by using targets different from cGMP-dependent protein kinase I. In: *J. Neurosci.* 28 (34), S. 8568–8576. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2128-08.2008.
- Schmiedl, S; Peters, D; Schmalz, O; Mielke, A; Rossmann, T; Diop, S et al. (2019): Loxapine for Treatment of Patients With Refractory, Chemotherapy-Induced Neuropathic Pain: A Prematurely Terminated Pilot Study Showing Efficacy But Limited Tolerability. In: *Frontiers in Pharmacology* 10, S. 838. DOI: 10.3389/fphar.2019.00838.
- Sharif, B; Ase, A R; Ribeiro-da-Silva, A; Séguéla, P (2020): Differential Coding of Itch and Pain by a Subpopulation of Primary Afferent Neurons. In: *Neuron* 106 (6), 940-951.e4. DOI: 10.1016/j.neuron.2020.03.021.
- Sharma, N; Flaherty, K; Lezgiyeva, K; Wagner, D E; Klein, A M; Ginty, D D (2020): The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. In: *Nature* 577 (7790), S. 392–398. DOI: 10.1038/s41586-019-1900-1.
- Shim, W-S; Tak, M-H; Lee, M-H; Kim, M; Kim, M; Koo, J-Y et al. (2007): TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. In: *J. Neurosci.* 27 (9), S. 2331–2337. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4643-06.2007.
- Shimada, S G; Shimada, K A; Collins, J G (2006): Scratching behavior in mice induced by the proteinase-activated receptor-2 agonist, SLIGRL-NH<sub>2</sub>. In: *European Journal of Pharmacology* 530 (3), S. 281–283. DOI: 10.1016/j.ejphar.2005.11.012.
- Shiotsuki, H; Yoshimi, K; Shimo, Y; Funayama, M; Takamatsu, Y; Ikeda, K et al. (2010): A rotarod test for evaluation of motor skill learning. In: *Journal of neuroscience methods* 189 (2), S. 180–185. DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.03.026.
- Shore, A N; Colombo, S; Tobin, W F; Petri, S; Cullen, E R; Dominguez, S et al. (2020): Reduced GABAergic Neuron Excitability, Altered Synaptic Connectivity, and Seizures in a KCNT1 Gain-of-Function Mouse Model of Childhood Epilepsy. In: *Cell Reports* 33 (4), S. 108303. DOI: 10.1016/j.celrep.2020.108303.
- Shram, M J; Spencer, R H; Qian, J; Munera, C L; Lewis, M E; Henningfield, J E et al. (2022): Evaluation of the abuse potential of difelikefalin, a selective kappa-opioid receptor agonist, in recreational polydrug users. In: *Clinical and translational science* 15 (2), S. 535–547. DOI: 10.1111/cts.13173.



- Sikand, P; Dong, X; LaMotte, R H (2011): BAM8-22 peptide produces itch and nociceptive sensations in humans independent of histamine release. In: *Journal of Neuroscience* 31 (20), S. 7563–7567. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1192-11.2011.
- Solak, Y; Biyik, Z; Atalay, H; Gaipov, A; Guney, F; Turk, S et al. (2012): Pregabalin versus gabapentin in the treatment of neuropathic pruritus in maintenance haemodialysis patients: a prospective, crossover study. In: *Nephrology* 17 (8), S. 710–717. DOI: 10.1111/j.1440-1797.2012.01655.x.
- Solinski, H J; Kriegbaum, M C; Tseng, P-Y; Earnest, T W; Gu, X; Barik, A et al. (2019): Nppb Neurons Are Sensors of Mast Cell-Induced Itch. In: *Cell Reports* 26 (13), 3561-3573.e4. DOI: 10.1016/j.celrep.2019.02.089.
- Spitznagel, B D; Mishra, N M; Qunies, A M; Prael, F J; Du, Y; Kozek, K A et al. (2020): VU0606170, a Selective Slack Channels Inhibitor, Decreases Calcium Oscillations in Cultured Cortical Neurons. In: *ACS Chemical Neuroscience* 11 (21), S. 3658–3671. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00583.
- Ständer, S; Schmelz, M (2006): Chronic itch and pain--similarities and differences. In: *European Journal of Pain* 10 (5), S. 473–478. DOI: 10.1016/j.ejpain.2006.03.005.
- Ständer, S; Weisshaar, E; Mettang, T; Szepietowski, J C; Carstens, E; Ikoma, A et al. (2007): Clinical classification of itch: a position paper of the International Forum for the Study of Itch. In: *Acta dermato-venereologica* 87 (4), S. 291–294. DOI: 10.2340/00015555-0305.
- Ständer, S; Yosipovitch, G; Legat, F J; Lacour, J-P; Paul, C; Narbutt, J et al. (2020): Trial of Nemolizumab in Moderate-to-Severe Prurigo Nodularis. In: *The New England journal of medicine* 382 (8), S. 706–716. DOI: 10.1056/NEJMoa1908316.
- Ständer, S; Zeidler, C; Augustin, M; Darsow, U; Kremer, A E; Legat, F J et al. (2022): S2k-Leitlinie zur Diagnostik und Therapie des chronischen Pruritus. In: *Deutsche Dermatologische Gesellschaft e.V. (DDG)*. Online verfügbar unter <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/013-048.html>.
- Staubach, P; Metz, M (2013): Magistral formulations and pruritus therapy - What is established, what is confirmed, what is new? In: *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft = Journal of the German Society of Dermatology : JDDG* 11 (11), S. 1049–1055. DOI: 10.1111/ddg.12230.
- Steglitz, J; Buscemi, J; Ferguson, M J (2012): The future of pain research, education, and treatment: a summary of the IOM report "Relieving pain in America: a blueprint for transforming prevention, care, education, and research". In: *Translational behavioral medicine* 2 (1), S. 6–8. DOI: 10.1007/s13142-012-0110-2.
- Stein, C; Millan, M J; Herz, A (1988): Unilateral inflammation of the hindpaw in rats as a model of prolonged noxious stimulation: alterations in behavior and nociceptive thresholds. In: *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 31 (2), S. 445–451. DOI: 10.1016/0091-3057(88)90372-3.
- Steinhoff, M; Neisius, U; Ikoma, A; Fartasch, M; Heyer, G; Skov, P S et al. (2003): Proteinase-activated receptor-2 mediates itch: a novel pathway for pruritus in human skin. In: *J. Neurosci.* 23 (15), S. 6176–6180. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.23-15-06176.2003.
- Steinke, S; Zeidler, C; Riepe, C; Bruland, P; Soto-Rey, I; Storck, M et al. (2018): Humanistic burden of chronic pruritus in patients with inflammatory dermatoses: Results of the European Academy of Dermatology and Venereology Network on Assessment of Severity and Burden of Pruritus (PruNet) cross-sectional trial. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 79 (3), 457-463.e5. DOI: 10.1016/j.jaad.2018.04.044.

- Stucky, C L; Lewin, G R (1999): Isolectin B(4)-positive and -negative nociceptors are functionally distinct. In: *J. Neurosci.* 19 (15), S. 6497–6505. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.19-15-06497.1999.
- Sukhtankar, D D; Ko, M-C (2013): Physiological function of gastrin-releasing peptide and neuromedin B receptors in regulating itch scratching behavior in the spinal cord of mice. In: *PLOS ONE* 8 (6), e67422. DOI: 10.1371/journal.pone.0067422.
- Sun, S; Dong, X (2016): Trp channels and itch. In: *Seminars in immunopathology* 38 (3), S. 293–307. DOI: 10.1007/s00281-015-0530-4.
- Sun, Y-G; Chen, Z-F (2007): A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord. In: *Nature* 448 (7154), S. 700–703. DOI: 10.1038/nature06029.
- Takano, N; Arai, I; Kurachi, M (2004): Possible antipruritic effects of K<sup>+</sup> channel openers in mice. In: *Journal of Dermatological Science* 35 (1), S. 71–73. DOI: 10.1016/j.jdermsci.2004.02.010.
- Tamsett, T J; Picchione, K E; Bhattacharjee, A (2009): NAD<sup>+</sup> activates KNa channels in dorsal root ganglion neurons. In: *J. Neurosci.* 29 (16), S. 5127–5134. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0859-09.2009.
- Tang, Q-Y; Zhang, F-F; Xu, J; Wang, R; Chen, J; Logothetis, D E; Zhang, Z (2016): Epilepsy-Related Slack Channel Mutants Lead to Channel Over-Activity by Two Different Mechanisms. In: *Cell Reports* 14 (1), S. 129–139. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.12.019.
- Tanioku, T; Nishibata, M; Tokinaga, Y; Konno, K; Watanabe, M; Hemmi, H et al. (2022): Tmem45b is essential for inflammation- and tissue injury-induced mechanical pain hypersensitivity. In: *PNAS* 119 (45), e2121989119. DOI: 10.1073/pnas.2121989119.
- Tappe-Theodor, A; Kuner, R (2014): Studying ongoing and spontaneous pain in rodents--challenges and opportunities. In: *European Journal of Neuroscience* 39 (11), S. 1881–1890. DOI: 10.1111/ejn.12643.
- Tavares-Ferreira, D; Shiers, S; Ray, P R; Wangzhou, A; Jeevakumar, V; Sankaranarayanan, I et al. (2022): Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors. In: *Science translational medicine* 14 (632), eabj8186. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj8186.
- Thomas, P; Smart, T G (2005): HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. In: *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 51 (3), S. 187–200. DOI: 10.1016/j.vascn.2004.08.014.
- Tibbs, G R; Posson, D J; Goldstein, P A (2016): Voltage-Gated Ion Channels in the PNS: Novel Therapies for Neuropathic Pain? In: *Trends in Pharmacological Sciences* 37 (7), S. 522–542. DOI: 10.1016/j.tips.2016.05.002.
- Tjaden, A; Chaikuad, A; Kowarz, E; Marschalek, R; Knapp, S; Schröder, M; Müller, S (2022): Image-Based Annotation of Chemogenomic Libraries for Phenotypic Screening. In: *Molecules* 27 (4), S. 1439. DOI: 10.3390/molecules27041439.
- Tourlaki, A; Genovese, G; Consonni, D; Brambilla, L (2020): Efficacy of a detergent combined with a moisturizer for the treatment of pruritus associated with xerosis in an elderly population affected by Kaposi's sarcoma. In: *Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia* 155 (4), S. 487–491. DOI: 10.23736/S0392-0488.18.05765-6.
- Treede, R-D; Rief, W; Barke, A; Aziz, Q; Bennett, M I; Benoliel, R et al. (2019): Chronic pain as a symptom or a disease: the IASP Classification of Chronic Pain for the International Classification of Diseases (ICD-11). In: *Pain* 160 (1), S. 19–27. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001384.

- Tsantoulas, C; McMahon, S B (2014): Opening paths to novel analgesics: the role of potassium channels in chronic pain. In: *Trends in neurosciences* 37 (3), S. 146–158. DOI: 10.1016/j.tins.2013.12.002.
- Tucker, S J; Baukrowitz, T (2008): How highly charged anionic lipids bind and regulate ion channels. In: *J Gen Physiol* 131 (5), S. 431–438. DOI: 10.1085/jgp.200709936.
- Turner, P V; Pang, D S; Lofgren, J L (2019): A Review of Pain Assessment Methods in Laboratory Rodents. In: *Comparative medicine* 69 (6), S. 451–467. DOI: 10.30802/AALAS-CM-19-000042.
- Uhlén, M; Fagerberg, L; Hallström, B M; Lindskog, C; Oksvold, P; Mardinoglu, A et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. In: *Science* 347 (6220), S. 1260419. DOI: 10.1126/science.1260419.
- Usoskin, D; Furlan, A; Islam, S; Abdo, H; Lönnnerberg, P; Lou, D et al. (2015): Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. In: *Nature neuroscience* 18 (1), S. 145–153. DOI: 10.1038/nn.3881.
- van Hecke, O; Torrance, N; Smith, B H (2013): Chronic pain epidemiology and its clinical relevance. In: *British journal of anaesthesia* 111 (1), S. 13–18. DOI: 10.1093/bja/aet123.
- van Laarhoven, A I M; Marker, J B; Elberling, J; Yosipovitch, G; Arendt-Nielsen, L; Andersen, H H (2019): Itch sensitization? A systematic review of studies using quantitative sensory testing in patients with chronic itch. In: *Pain* 160 (12), S. 2661–2678. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001678.
- Vandewauw, I; Clercq, K de; Mulier, M; Held, K; Pinto, S; van Ranst, N et al. (2018): A TRP channel trio mediates acute noxious heat sensing. In: *Nature* 555 (7698), S. 662–666. DOI: 10.1038/nature26137.
- Vardeh, D; Naranjo, J F (2017): Peripheral and Central Sensitization. In: *Pain Medicine*: Springer, Cham, S. 15–17. Online verfügbar unter [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-43133-8\\_4](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-43133-8_4).
- Verduzco, H A; Shirazian, S (2020): CKD-Associated Pruritus: New Insights Into Diagnosis, Pathogenesis, and Management. In: *Kidney International Reports* 5 (9), S. 1387–1402. DOI: 10.1016/j.ekir.2020.04.027.
- Wang, K; McIlvain, B; Tseng, E; Kowal, D; Jow, F; Shen, R et al. (2004): Validation of an atomic absorption rubidium ion efflux assay for KCNQ/M-channels using the ion Channel Reader 8000. In: *Assay and drug development technologies* 2 (5), S. 525–534. DOI: 10.1089/adt.2004.2.525.
- Ward, K W; Hardy, L B; Kehler, J R; Azzarano, L M; Smith, B R (2004): Apparent absolute oral bioavailability in excess of 100% for a vitronectin receptor antagonist (SB-265123) in rat. II. Studies implicating transporter-mediated intestinal secretion. In: *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems* 34 (4), S. 367–377. DOI: 10.1080/0049825042000205540a.
- Waterhouse, R N (2003): Determination of lipophilicity and its use as a predictor of blood-brain barrier penetration of molecular imaging agents. In: *Molecular imaging and biology* 5 (6), S. 376–389. DOI: 10.1016/j.mibio.2003.09.014.
- Waxman, S G; Zamponi, G W (2014): Regulating excitability of peripheral afferents: emerging ion channel targets. In: *Nature neuroscience* 17 (2), S. 153–163. DOI: 10.1038/nn.3602.
- Weisshaar, E; Szepietowski, J C; Dalgard, F J; Garcovich, S; Gieler, U; Giménez-Arnau, A M et al. (2019): European S2k Guideline on Chronic Pruritus. In: *Acta dermato-venereologica* 99 (5), S. 469–506. DOI: 10.2340/00015555-3164.

- Wilson, S R; Gerhold, K A; Bifolck-Fisher, A; Liu, Q; Patel, K N; Dong, X; Bautista, D M (2011): TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. In: *Nature neuroscience* 14 (5), S. 595–602. DOI: 10.1038/nn.2789.
- Wilson, S R; Thé, L; Batia, L M; Beattie, K; Katibah, G E; McClain, S P et al. (2013): The epithelial cell-derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. In: *Cell* 155 (2), S. 285–295. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.057.
- Wollenberg, A; Barbarot, S; Bieber, T; Christen-Zaech, S; Deleuran, M; Fink-Wagner, A et al. (2018): Consensus-based European guidelines for treatment of atopic eczema (atopic dermatitis) in adults and children: part I. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 32 (5), S. 657–682. DOI: 10.1111/jdv.14891.
- Wong, Y C; Wo, S K; Zuo, Z (2012): Investigation of the disposition of loxapine, amoxapine and their hydroxylated metabolites in different brain regions, CSF and plasma of rat by LC-MS/MS. In: *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 58, S. 83–93. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.09.020.
- Woolf, C J (1983): Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. In: *Nature* 306 (5944), S. 686–688. DOI: 10.1038/306686a0.
- Wu, J; Quraishi, I H; Zhang, Y; Bromwich, M; Kaczmarek, L K (2023): Disease-causing Slack potassium channel mutations produce opposite effects on excitability of excitatory and inhibitory neurons. In: *bioRxiv : the preprint server for biology*. DOI: 10.1101/2023.02.14.528229.
- Wuttke, T V; Seeböhm, G; Bail, S; Maljevic, S; Lerche, H (2005): The new anticonvulsant retigabine favors voltage-dependent opening of the Kv7.2 (KCNQ2) channel by binding to its activation gate. In: *Molecular pharmacology* 67 (4), S. 1009–1017. DOI: 10.1124/mol.104.010793.
- Xu, J; Lv, Y-T; Zhao, X-Y; Wang, J-J; Shen, Z-S; Li, J et al. (2023): Identification of Sodium- and Chloride-Sensitive Sites in the Slack Channel. In: *J. Neurosci.* 43 (15), S. 2665–2681. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1365-22.2023.
- Yang, B; Gribkoff, V K; Pan, J; Damagnez, V; Dworetzky, S I; Boissard, C G et al. (2006): Pharmacological activation and inhibition of Slack (Slo2.2) channels. In: *Neuropharmacology* 51 (4), S. 896–906. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2006.06.003.
- Yang, S-Y; Kao Yang, Y-H; Chong, M-Y; Yang, Y-H; Chang, W-H; Lai, C-S (2007): Risk of extrapyramidal syndrome in schizophrenic patients treated with antipsychotics: a population-based study. In: *Clinical pharmacology and therapeutics* 81 (4), S. 586–594. DOI: 10.1038/sj.clpt.6100069.
- Yin, H H; Mulcare, S P; Hilário, M R F; Clouse, E; Holloway, T; Davis, M I et al. (2009): Dynamic reorganization of striatal circuits during the acquisition and consolidation of a skill. In: *Nat Neurosci* 12 (3), S. 333–341. DOI: 10.1038/nn.2261.
- Yosipovitch, G; Berger, T; Fassett, M S (2020): Neuroimmune interactions in chronic itch of atopic dermatitis. In: *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 34 (2), S. 239–250. DOI: 10.1111/jdv.15973.
- Yosipovitch, G; Mochizuki, H (2015): Neuroimaging of itch as a tool of assessment of chronic itch and its management. In: *Handbook of experimental pharmacology* 226, S. 57–70. DOI: 10.1007/978-3-662-44605-8\_4.
- Yuan, A; Santi, C M; Wei, A; Wang, Z-W; Pollak, K; Nonet, M et al. (2003): The Sodium-Activated Potassium Channel Is Encoded by a Member of the Slo Gene Family. In: *Neuron* 37 (5), S. 765–773. DOI: 10.1016/S0896-6273(03)00096-5.

- Yurtseven, E; Kuzikov, M (2018): Measuring KCNT1 Ion Channel Activities Using the FluxOR Potassium Ion Channel Assay Kit on the VICTOR Nivo Multimode Reader. In: *Application Note, Perkin Elmer*, S. 1–6. Online verfügbar unter [https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app\\_mmd\\_victor\\_nivo\\_measuring\\_kcnt1\\_ion\\_channel\\_activites\\_using\\_fluxor\\_014406\\_01.pdf](https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/app_mmd_victor_nivo_measuring_kcnt1_ion_channel_activites_using_fluxor_014406_01.pdf), zuletzt geprüft am 15.08.2023.
- Zeisel, A; Hochgerner, H; Lönnerberg, P; Johnsson, A; Memic, F; van der Zwan, J et al. (2018): Molecular Architecture of the Mouse Nervous System. In: *Cell* 174 (4), 999-1014.e22. DOI: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
- Zhang, H; Lecker, I; Collymore, C; Dokova, A; Pham, M C; Rosen, S F et al. (2021): Cage-lid hanging behavior as a translationally relevant measure of pain in mice. In: *Pain* 162 (5), S. 1416–1425. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000002127.
- Zhang, Z; Rosenhouse-Dantsker, A; Tang, Q-Y; Noskov, S; Logothetis, D E (2010): The RCK2 domain uses a coordination site present in Kir channels to confer sodium sensitivity to Slo2.2 channels. In: *J. Neurosci.* 30 (22), S. 7554–7562. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0525-10.2010.
- Zhou, F; Metzner, K; Engel, P; Balzulat, A; Sisignano, M; Ruth, P et al. (2022): Slack Potassium Channels Modulate TRPA1-Mediated Nociception in Sensory Neurons. In: *Cells* 11 (10). DOI: 10.3390/cells11101693.
- Zou, B; Yu, H; Babcock, J J; Chanda, P; Bader, J S; McManus, O B; Li, M (2010): Profiling diverse compounds by flux- and electrophysiology-based primary screens for inhibition of human Ether-à-go-go related gene potassium channels. In: *Assay and drug development technologies* 8 (6), S. 743–754. DOI: 10.1089/adt.2010.0339.
- Zuberbier, T; Aberer, W; Asero, R; Abdul Latiff, A H; Baker, D; Ballmer-Weber, B et al. (2018): The EAACI/GA<sup>2</sup>LEN/EDF/WAO guideline for the definition, classification, diagnosis and management of urticaria. In: *Allergy* 73 (7), S. 1393–1414. DOI: 10.1111/all.13397.