Auswirkung der Nav1.9 p.(L799P)
***gain-of-function*-Mutation auf die Entwicklung der Schmerzbahn**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Sofia Francesca de Simone

aus

Jena

Berichter: Univ.-Prof. Dr. med. Ingo Kurth
Jun.-Prof. Dr. med. Dr. sc. nat. Juliane Bremer

Tag der mündlichen Prüfung: 27.04.2026

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS I

1 EINLEITUNG 1

1.1 DIE SCHMERZBAHN 2
1.2 TRANSKRIPTOM-BASIERTE KLASSIFIKATIONEN FÜR NOZIZEPTOREN 4
1.3 DIE ENTWICKLUNG DER NOZIZEPTOREN 6
1.4 PHYSIOLOGIE DER SCHMERZWAHRNEHMUNG 9
1.4.1 SPANNUNGSGESTEUERTE NATRIUMKANÄLE 9
1.5 SCHMERZVERLUST TROTZ FUNKTIONSGEWINN – DIE NAV 1.9 P.(L811P) MUTATION 14
1.6 ZIELSTELLUNG DER ARBEIT 16

2 MATERIAL UND METHODEN 17

2.1 MATERIAL 17
2.1.1 CHEMIKALIEN 17
2.1.2 LÖSUNGEN UND PUFFER 18
2.1.3 NUKLEINSÄURE UND NUKLEOTIDE 20
2.1.4 ENZYME UND ANDERE PROTEINE 20
2.1.5 VERSUCHSTIERE 21
2.2 METHODEN 21
2.2.1 ARBEIT MIT RNA 21
2.2.2 GEWEBEPRÄPARATION UND AUFREINIGUNG VON RNA 22
2.2.3 QUANTITATIVE UND QUALITATIVE ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN 25
2.2.4 PRIMER DESIGN FÜR DIE INSERTSYNTHESE 27
2.2.5 SYNTHESE VON NUKLEINSÄUREN 28
2.2.6 ENZYMATISCHE MANIPULATION VON DNA UND PLASMIDEN 31
2.2.7 DOT-BLOT ZUR ERMITTLUNG DER MARKIERUNGSEFFIZIENZ 34
2.2.8 DURCHFÜHRUNG DER *IN SITU* HYBRIDISIERUNG 34
2.2.9 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN 36

3 ERGEBNISSE 37

3.1 HERSTELLUNG DER SONDEN-TEMPLATES 38
3.2 HERSTELLUNG DES VEKTORS 39
3.3 ÜBERPRÜFUNG DER DIGOXIGENIN-MARKIERUNGSEFFIZIENZ DER RNA-SONDEN 40
3.4 *SCN11A*-LP TIERE ZEIGEN IN *IN SITU*-HYBRIDISIERUNG AB DEM POSTNATALEN TAG 0 EINE DEUTLICH VERRINGERTE EXPRESSION DES NAV1.9-GENS 42
3.4.1 DIE GENERIERTEN RNA-SONDEN ZEIGEN EINE HOHE SENSITIVITÄT UND ZIELGEN-SPEZIFITÄT 42
3.4.2 *IN SITU* HYBRIDISIERUNGEN DER VERSCHIEDENEN ALTERSSTADIEN 45
3.5 VERGLEICH VON IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN IN DEN SPINALGANGLIEN VON *SCN11A*$^{+/L799P}$- UND WILDTYPISCHEN MÄUSEN 51
3.5.1 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN MIT PLEXINC1 ZEIGEN DEUTLICH REDUZIERTE PLEXINC1-EXPRESSION IN *SCN11A*$^{+/L799P}$-MÄUSEN BEREITS ZUM ZEITPUNKT P0 51
3.5.2 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN VON TRKA, RUNX1 UND CLEAVED CASPASE3 53

4 DISKUSSION 57

4.1 *IN SITU* HYBRIDISIERUNGEN 57
4.1.1 DIE VALIDIERUNG DER GENERIERTEN RNA-SONDEN ZEIGT GENSPEZIFISCHE HYBRIDISIERUNGSMUSTER 57
4.1.2 VERRINGERTE NAV1.8 UND NAV1.9 EXPRESSION IN DER *SCN11A*$^{+/L799P}$-MAUS 58
4.2 METHODISCHE LIMITATIONEN 61
4.2.1 GENERIERUNG DER RNA-SONDEN FÜR *SCN9A, SCN10* UND *SCN11A* 61
4.2.2 AUSSAGEKRAFT VON *IN SITU*-HYBRIDISIERUNGEN 61
4.3 IMMUNFLUORESZENZFÄRBUNGEN 62
4.3.1 DER POSTNATALE NEURONENVERLUST IN DER *SCN11A*$^{+/L799P}$-MAUS WIRD NICHT DURCH CLEAVED CASPASE3-VERMITTELTE APOPTOSE VERURSACHT 63
4.3.2 NOZIZEPTOR-SUBTYP-SPEZIFISCHE FÄRBUNGEN ZEIGEN EINE ÄNDERUNG DES EXPRESSIONSPROFILS DER SENSORISCHEN NERVENZELLEN 64
4.4 ÜBERTRAGBARKEIT DER ERGEBNISSE AUS DEM *SCN11A*$^{+/L799P}$-MAUSMODELL AUF DAS ERKRANKUNGSBILD BEIM MENSCHEN UND DIE HUMANE PATHOLOGIE 67
4.4.1 UNTERSCHIEDE IN DEN ZELLPOPULATIONEN 69
4.5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK 70

5 ZUSAMMENFASSUNG 72

6 QUELLENANGABE 74

7 ANHANG 83

7.1 I: PRIMER 83
7.2 II: DIGOXIGENIN-*ANTISENSE*-RNA-SONDEN UND HYBRIDISIERUNGSTEMPERATUREN 83
7.3 III: ANTIKÖRPER 84
7.4 IV: KITS 84
7.5 V: GERÄTE 84
7.6 VI: SOFTWARE / WEBSEITEN 85

8 DANKSAGUNG 86
9 ERKLÄRUNG ZUR DATENAUFBEWAHRUNG 87
10 EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG 88

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µL	Mikroliter
ADB	Agarose Dilution Buffer
AmpR	Ampicillin Resistenz
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CALCA	Calcium-Related Calmodulin-Dependent Kinase Alpha
GFRA	GDNF Family Receptor Alpha
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CHRNA	Cholinergic Receptor, Nicotic, Alpha Subunit
CO_2	Kohlenstoffdioxid
cDNA	complementary DNA
C-LTMR	C-type Low-Threshold Mechanoreceptor
DIG	Digoxigenin
DNA	Deoxyribonucleic Acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DT	deionized
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid
EP3	Prostaglandin E Rezeptor 3
EtOH	Ethanol
g	Gramm
GC-(Gehalt)	Guanosin-Cytosin(-Gehalt)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
Het	heterozygot
H_2O	Wasser
IFM-Motiv	Isoleucin-Phenylalanin-Methionin-Motiv
IL31RA	Interleukin31 Rezeptor Alpha
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
ISH	In Situ-Hybridisierung
KCL	Kaliumchlorid
kDa	Kilo Dalton
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
L	Liter
LB(-Medium)	Luria-Bertani(-Medium)
logFC	*logarithmic Fold Change*
m	Meter
MaBs	*Maleic Acid Bis(Sodium Chloride)*
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid

Min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	*messenger* RNA
mV	Millivolt
myel	myelinisiert
unmyel	unmyelinisiert
Na-Citrat	Natriumcitrat
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
Nav	spannungsabhängiger Natriumkanal
NBT	*Nitroblue Tetrazolium*
NCBI	*National Centre for Biotechnology Information*
NF	Neurofilament
NGF	*Nerv Growth Factor*
Ngn	Neurogenin
nm	Nanometer
NP	nicht-peptiderg
NPPB	N-[4-(9-Phenanthrenyl)phenyl]benzenesulfonamide
NT	Neurotrophin
NTRK	Neurotrophe Rezeptrtyrosinkinase
PB	*Phosphate buffer*
PBS	*Phosphate-Buffered Saline*
PCR	*Polymerase Chain Reaction*
PENK	Proenkephalin
PEP	peptiderg
PFA	Paraformaldehyd
qPCR	quantitative *real-time* PCR
RNA	*Ribonucleic Acid*
RT-qPCR	*reverse Transcription* PCR
RNAseq	RNA-*Sequencing*
S	Segment
scRNA-seq	*single-cell* RNA *sequencing*
SOC	*Super Optimal broth with Catabolite Repression*
SSC	*Saline-Sodium Citrate Buffer*
TAC	Tachykinin
TBE	Tris/Borate/EDTA
TELT	Tris-EDTA-Lysin-Triton X-100
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TH	Tyrosin Hydroxylase
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
Tm	*melting temperature*

Trk	Tropomyosinrezeptorkinase
tRNA	Torula-RNA
TRPA	*Transient Receptor Potential Ankyrin*
TRPM	*Transient Receptor Potential Melastatin*
TTX	Tetrodotoxin
UCN	Urocortin
UV	Ultraviolett (Strahlung)
VGLUT	Vesikulärer Glutamat Transporter
WT	Wildtyp

1 Einleitung

Die Fähigkeit des menschlichen Körpers, eine Vielzahl verschiedener Reize wie z.B. das Ertasten einer rauen Oberfläche wahrzunehmen, ermöglicht es, mit unserer Umwelt zu interagieren. Neben vielen als positiv oder neutral erlebten Stimuli wie z.B. einer Berührung werden potenziell schädliche Reize wie das Treten in eine Glasscherbe als schmerzhaft wahrgenommen. Schmerz dient als Warnsystem, um Gefahren frühzeitig zu erkennen und lebensbedrohliche Verletzungen zu vermeiden. Seit Anbeginn der Menschheit spielen Schmerzen in Kultur und Medizin eine große Rolle. Dank der modernen Medizin gibt es zahlreiche Ansätze und Möglichkeiten diese zu lindern. Dennoch sind die pathophysiologischen Prozesse der Schmerzgenese in ihrer vollen Komplexität noch nicht gänzlich verstanden.

Vor allem die Behandlung chronischer Schmerzen stellt die Medizin vor eine andauernde Herausforderung. 6-7 % der Bevölkerung leiden täglich unter unaushaltbaren Schmerzen (Nahin, 2015). Weiter zeigt sich, dass die Hälfte aller Menschen über 65 Jahren unter chronischen Schmerzen leidet (Hauser et al., 2015). Aufgrund des demographischen Wandels wird die Zahl der betroffenen voraussichtlich steigen.

Nicht nur die Medikation von Schmerzpatienten stellt der Wissenschaft immer neue Fragen, auch indirekte Folgen, wie die Opioid-Krise in den Vereinigten Staaten, stellen ganze Gesellschaften vor ein Problem. Insuffiziente Schmerzmedikation führt zu verstärktem Konsum und Missbrauch starker synthetischer Opioide. 2020 starben allein in den Vereinigten Staaten täglich durchschnittlich 44 Menschen an Überdosierungen mit verschreibungspflichtigen Opioiden, die Tendenz ist steigend (Prevention, 2021).

In Anbetracht der aufgezeigten Probleme und Herausforderungen ist es von großem Interesse, beteiligte Strukturen und Signalwege in der Pathophysiologie der Schmerzwahrnehmung oder Nozizeption noch besser zu verstehen. So könnten in Zukunft neue, suffiziente Behandlungen gegen chronische Schmerzsyndrome entwickelt und somit möglicherweise auch die negativen Folgen insuffizienter Schmerzmedikation im Rahmen des Opiat-Abusus eingedämmt werden.

1.1 Die Schmerzbahn

Am Beginn der Wahrnehmung akuter Schmerzen steht ein schädlicher Reiz, dessen Ursprung chemisch, mechanisch oder thermischer Natur sein kann (Dubin und Patapoutian, 2010). Diese Stimuli werden von Nozizeptoren, den primären sensorischen Neuronen, detektiert und in elektrische Signale umgewandelt. Zu finden sind Nozizeptoren im gesamten Körper, vor allem in der Epidermis und Dermis der Haut sowie dem muskuloskelettalen System. Die peripheren/distalen afferenten Nervenfasern unterscheiden sich in ihrem axonalen Durchmesser, dem Myelinisierungsgrad und der Leitungsgeschwindigkeit. Anhand dieser Parameter können Nozizeptoren nach Erlanger und Gasser den Faserklassen A (β und δ) und C zugeordnet werden, wie in Abbildung 1.1 gemeinsam mit den Stationen der Schmerzbahn schematisch dargestellt. Aβ -Fasern (30–70 m/s, ~8 µm) sind dick myelinisiert, Aδ-Fasern (12–30 m/s, <3 µm) dünn myelinisiert, während C-Fasern (0,5–2 m/s, ~1 µm) unmyelinisiert sind (R. Schmidt, 2010).

Weiter unterscheiden sich die verschiedenen Fasertypen auch in den Stimuli, die sie wahrnehmen können. Aβ-Fasern registrieren niedrigschwellige, Aδ-Fasern höherschwellige mechanische Reize. C-Fasern können intensive mechanische, thermische und chemische Stimuli wahrnehmen, wobei eine kleine Gruppe auch niedrigschwellige mechanische Reize weiterleitet (Bennett et al., 2019). Diese Polymodalität der C-Fasern wurde erstmals 1969 (Bessou und Perl, 1969) beschrieben. Weiter können C-Fasern in peptiderge, Calcitonin-Gene Related Peptide (CGRP) exprimierende und nicht-peptiderge, Isolectin B4 (IB4) bindende Fasern unterteilt werden (Snider und McMahon, 1998). Während nicht-peptiderge Fasern außerdem den Transmembranrezeptor PlexinC1 stark exprimieren, ist die Expression dieses Proteins in Subtypen peptiderger Neuronen nur schwach ausgeprägt (Usoskin et al., 2015).

Die Perikaryen der Nozizeptoren sind, von Gliazellen umgeben, in den paarig angelegten Spinalganglien entlang der Wirbelsäule lokalisiert (Lin und Chen, 2018). Nozizeptoren sind pseudounipolare Neurone, deren Dendriten und Axone aus einem Fortsatz des Perikaryons entspringen (Krames, 2014). Diese primären sensorischen Neurone enden in der grauen Substanz des Rückenmarks, wo sie eine Synapse mit den sekundären Neuronen des zentralen Nervensystems bilden.

Die graue Substanz des Rückenmarks, in der die primären afferenten Fasern enden, ist in verschiedene *Laminae* unterteilt (Rexed, 1952). Jede *Lamina* wird von spezifischen afferenten Fasern innerviert (Todd, 2010). C-Fasern projizieren in *Lamina* I und II, peptiderge Fasern sind hauptsächlich in *Lamina* I und dem äußeren Teil von *Lamina* II zu finden, während nicht-peptiderge Fasern eher im zentralen Teil von *Lamina* II enden (Lorenzo et al., 2008).

Die Schmerzbahn besteht aus drei Projektionsneuronen, die den spinothalamischen Trakt bilden, der für die Weiterleitung von Schmerzreizen zum Gehirn verantwortlich ist. Nach der Umschaltung im Rückenmark kreuzt das zweite Neuron in die weiße Substanz und zieht zum Thalamus, wo es auf das dritte Neuron verschaltet wird, das in den somatosensorischen Cortex projiziert, welcher ebenso wie der spinothalamische Trakt eine somatotopische Gliederung aufweist. Auf diesem Weg gelangt der Schmerz ins Bewusstsein, sodass der Körper mit einer adäquaten Reaktion, wie zum Beispiel einem Beugereflex, darauf reagieren kann. Außerdem kann über absteigende Bahnen auch eine Hemmung der Signaltransduktion erfolgen. Diese wird durch Neurone vermittelt, die aus der *Formatio reticularis* Projektionen in das dorsale Horn des Rückenmarks haben. Es wird deutlich, dass sowohl die verschiedenen Nervenklassen in ihrer Funktion, als auch die beteiligten Signalwege in ihrer Komplexität modulierbar sind und viele Ziele für die Forschung sowie Ansätze für zukünftige Therapieoptionen bieten (Trepel, 2012).

Erlanger/Gasser

Fasertyp	Funktion	Durchmesser	Leitungsgeschwindigkeit (ms-1)
Aα	Primäre Muskelspindelafferenzen, motorisch	12µm	100
Aβ	Hautafferenzen Berührung/Druck	8µm	50
Aγ	Motorisch zu Muskelspindeln	5µm	20
A δ	Hautafferenzen Temperatur/Schmerz	<3µm	15
B	Sympathisch präganglionär	3µm	7
C	Sympathisch postganglionär	1µm	1

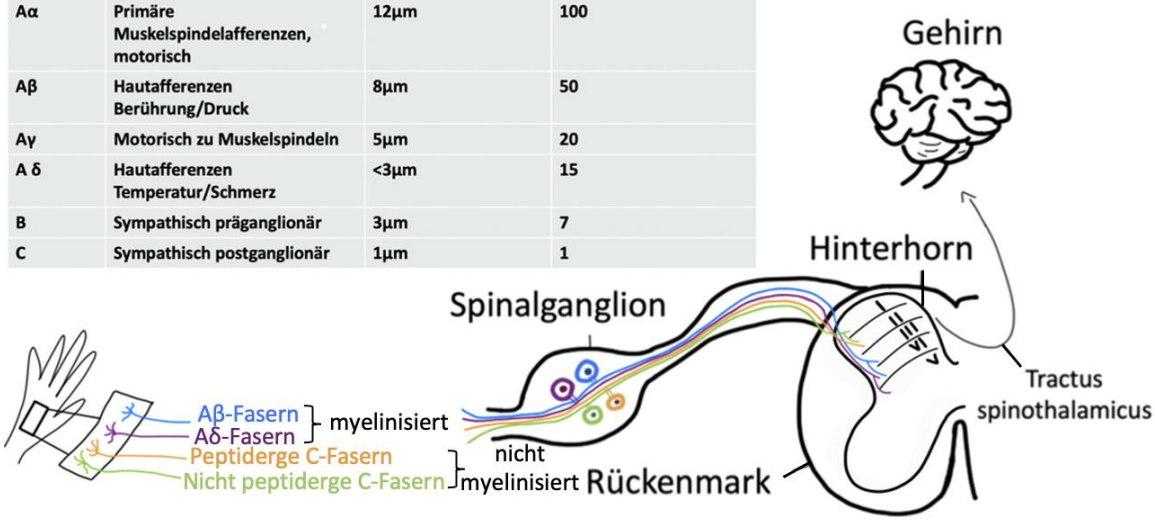


Abbildung 1.1: Schematische Anatomie der Schmerzbahn. Darstellung der sensorischen Faserklassen und ihres Verlaufs; Die Perikaryen der somatosenorischen Neurone liegen im Spinalganglion; die Umschaltung auf das zweite Neuron geschieht im Hinterhorn des Rückenmarks in den jeweiligen für die verschiedenen Faserklassen spezifischen *Laminae*; weiterer Verlauf der Schmerzbahn über den *Tractus spinothalamicus* und dessen Projektion in den somatosensorischen Cortex; eigene Abbildung. Tabelle verändert nach (R. Schmidt, 2010).

1.2 Transkriptom-basierte Klassifikationen für Nozizeptoren

Um zu verstehen, wie sich Nozizeptoren entwickeln, hilft es, die verschiedenen Gruppen der Neuronen der Spinalganglien genauer zu betrachten und von der oben genannten vereinfachten Klassifikation in C-und A-Fasern abzuweichen. Mithilfe von Einzelzell-RNA-Sequenzierung (Usoskin et al., 2015) wurde die Heterogenität sensorischer Nervenzellpopulationen im Spinalganglion beschrieben. Durch distinkte Genexpressionsmuster konnten vier Zellcluster identifiziert werden: ein Neurofilament (NF)-positives Cluster für myelinisierte Zellen, ein peptiderges (PEP)-Cluster, ein nicht peptiderges (NP)-Cluster und ein Thyroxinhydroxylase (TH)-Cluster (Abbildung 1.2). Innerhalb der Gruppen war eine weitere Unterteilung nach Modalität möglich.

Für die vorliegende Arbeit sind vor allem die Neuronen-Populationen relevant, die an der Entstehung und Wahrnehmung von Schmerz beteiligt sind. Nicht-peptiderge NP1-Neurone vermitteln neuropathische Schmerzen, während die NP3-Neurone u.a. für die Entstehung von inflammatorisch verursachtem Juckreiz zuständig sind. Im Cluster der peptidergen Neurone finden sich thermosensitive C-Faser-(PEP1) und Aδ-Faser-Nozizeptoren (PEP2). TH-positive Neuronen sind C-*low threshold mechanoreceptors* (C-LTMR), die sanfte Berührungen vermitteln. Solche Einzelzell-basierten Studien (Usoskin et al., 2015) können auch neue Markergene sensorischer Neuronen-Subpopulationen identifizieren wie *PlexinC1*, ein Marker für nicht-peptiderge Fasern, der alle Zellen im NP-Cluster markiert, jedoch auch die in der für Schmerz relevanten PEP1 Zellgruppe.

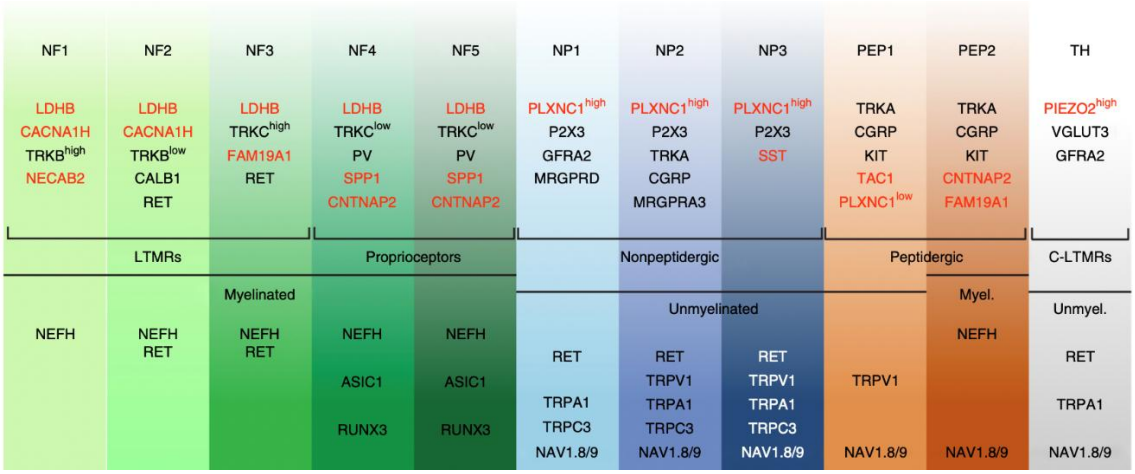


Abbildung 1.2: Klassifizierung sensorischer Neurone nach Usoskin et al. auf Grundlage von RNA-Transkriptomanalysen. Die oberen Genprodukte sind Marker, die für die Identifizierung von Subtypen vorgeschlagen werden (rot: in dieser Studie neu identifizierte Marker; schwarz: bereits vorher bekannte Marker). Die unteren Genprodukte sind Beispiele für Marker, die in der Praxis häufig für Untersuchungen genutzt werden. Vorgeschlagene modalitätsspezifische Funktionen oder frühere funktionelle Klassifizierungen der Subtypen sind in Klammern angegeben. Myel., myelinisiert; Unmyel., nicht myelinisiert (Abbildung und Text übernommen von (Usoskin et al., 2015))

Aktuelle Einzelzell-RNA-Sequenzierungen ermöglichten eine neue Klassifikation sensorischer Neuronen. So konnten Tavares-Ferreira et al. anhand verschiedenster Marker zwölf Cluster sensorischer Neurone innerhalb menschlicher Spinalganglien mittels räumlich aufgelöster Transkriptomanalyse *(spatial transcriptomics)* charakterisieren (Abbildung 1.3). Es zeigten sich fünf Cluster für C-Nozizeptoren, eines für C-LTMRs, ein Aβ -Nozizeptor-, zwei Aδ-, zwei Aβ - und ein Propriozeptor-Cluster. Die vermeintlichen Aβ-nozizeptiven Nervenfasern exprimieren die neurotrophe Rezeptor Tyrosin Kinase 3 (*NTRK3*), sowie die Alpha-Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.8 (*SCN10A*). Die Gruppe der Nozizeptoren, welche für das Empfinden von Kälte verantwortlich sind, charakterisieren sich durch die Expression des Transient Receptor Potential Melastatin Channel 8 (*TRPM8*). Ein weiteres C-Nozizeptoren-Cluster zeigte als einziges das Peptid-Neurotransmitter Gen Urocortin (*UCN*) sowie eine verstärkte Expression von Proenkephalin (*PENK*), dem Vorläufer endogener Opioide, und des Prostaglandin E Rezeptor 3-Gens (*EP3*). EP3 ist ein Rezeptor für entzündungsbedingt freigesetzte Prostaglandine und spielt eine Rolle bei der Wahrnehmung und Entstehung proinflammatorischen Schmerzes (Treutlein et al., 2018). Des Weiteren konnte eine zusätzliche C-Nozizeptoren-Klasse identifiziert werden, welche neben dem Kationenkanal TRPA1 besonders viel Tachykinin precursor (*TAC1*) und Calcitonin Related Polypeptid Alpha (*CALCA*) exprimiert.

Die sogenannten „stummen“ Nozizeptoren, zugehörig zu den mechano-insensitiven (CMi) C-Fasern, sind durch die Expression des Gens für die nikotinerge Alpha-3-Untereinheit des Acetylcholinrezeptors *(CHRNA3)* charakterisiert. Das Cluster, welches die Gene für das natriuretische Peptid B (*NPPB*), den Alpha 2-Rezeptor der GDNF-Familie (*GFRA2*), den Interleukin 31-Rezeptor Alpha (*IL31RA*) und verstärkt die Alpha Untereinheit des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.9 (*SCN11A*) exprimiert, umfasst Nozizeptoren, welche vornehmlich für das Empfinden von Juckreiz zuständig sind.

Eine ähnliche Genexpression wie das Cluster für diese pruritogenen Nozizeptoren zeigt das *GFRA2*-positive Cluster für C-LTMR Fasern, was sich jedoch in einer deutlich geringeren Expression von *NPPB* von der zuvor genannten Gruppe unterscheidet (Tavares-Ferreira et al., 2022).

Jung et al. unterteilten 2023 die C-LTMRs in zwei Untergruppen basierend auf der Expression von TH.

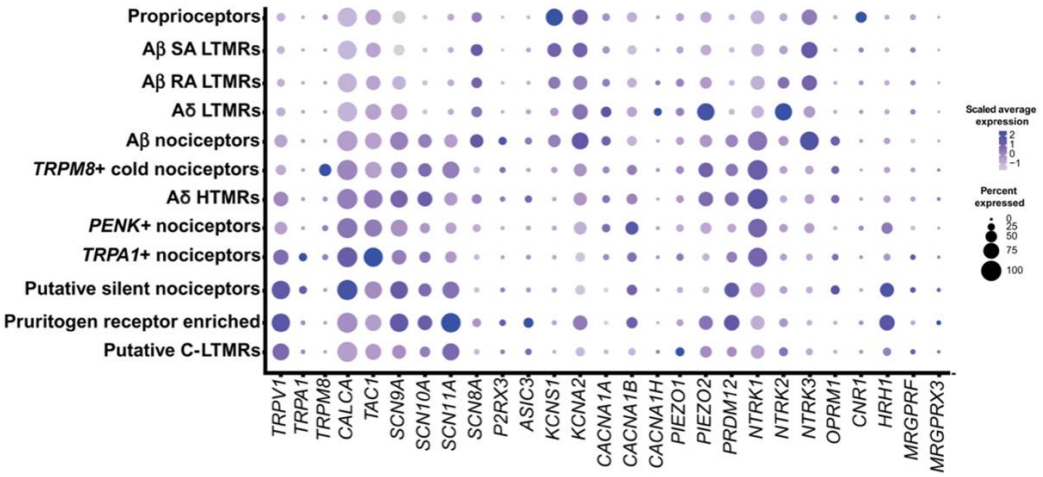


Abbildung 1.3: Dot-Plot. Zeigt die Expression bekannter Schmerzgene und -marker in verschiedenen Clustern; *SCN9A* wird in allen dargestellten Neuronenclustern exprimiert, besonders stark in pruritogenen und stillen nozizeptiven Neuronen; *SCN10A* zeigt vor allem in den LTMRs und propriozeptiven Neuronen wenig Expression; *SCN11A* zeigt besonders starke Expression in pruritogenen Neuronenclustern (Abbildung und Text übernommen und ergänzt von (Tavares-Ferreira et al., 2022))

1.3 Die Entwicklung der Nozizeptoren

Mit der Migration von Vorläuferzellen aus der Neuralleiste beginnt die Differenzierung der somatosensorischen Neurone (Faure et al., 2020). Die Vorläuferzellen lösen sich in Folge eines induktiven Signals aus dem Zellverband des dorsalen Neuralrohrs und bilden entlang diesem in jedem Somiten in regelmäßigen Abständen die Spinalganglien (Teillet et al., 1987). In der Maus erfolgt die Neurogenese der somatosensorischen Neuronen in zwei Wellen: Die erste Welle findet statt zwischen Embryonaltag E9.5 und E11 und führt zur Bildung der A-Fasern, beginnend mit der Expression des Transkriptionsfaktors Neurogenin 2 (Ngn2). Aus dieser Proliferationswelle gehen die Neurone großen und mittleren Durchmessers, bzw. die A-Fasern hervor. In der zweiten Welle, zwischen Embryonaltag E11 und E13, die durch die Expression von Neurogenin 1 (*Ngn1*) charakterisiert ist, entstehen die C-Fasern (Ma et al., 1999, Meltzer et al., 2021). Aktuelle Studien stellen dieses Modell jedoch infrage und zeigen, dass alle somatosensorischen Neuronen aus Vorläuferzellen hervorgehen, die sowohl *Ngn1* als auch *Ngn2* exprimieren, wobei die Neurogenese kontinuierlich während der Embryonalentwicklung von E9.5 bis E13.5 stattfindet (Faure et al., 2020, Sharma et al., 2020, Landy et al., 2021). Eine schematische Darstellung der beiden Modelle der Neurogenese der somatosensorischen Neurone ist in Abb. 1.4 dargestellt.

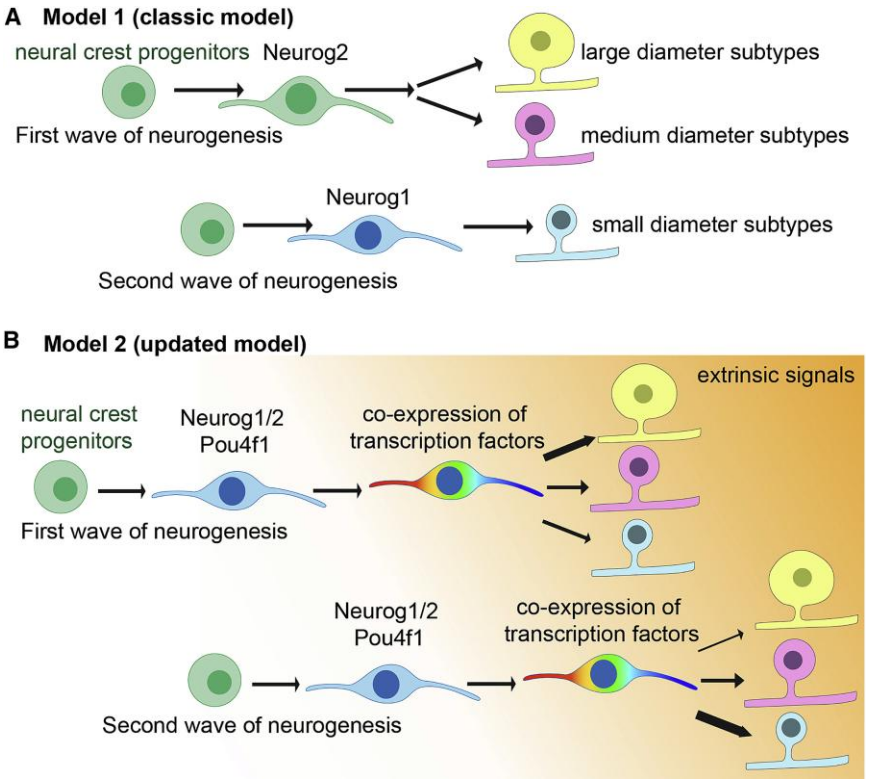


Abbildung 1.4: Modelle der Neurogenese. A: Ein seit langem bestehendes Modell der Neurogenese und Reifung der Spinalganglien geht davon aus, dass Neuronen, die während der ersten Neurogenese-Welle (E9.5-E11) geboren werden, ausschließlich *Ngn2* exprimieren und Neuronen mit großen (gelb) und mittelgroßen (rosa) Zellkörpern hervorbringen. Neuronen, die während der zweiten Welle der Neurogenese (E11-E13) geboren werden, exprimieren *Ngn1* und bringen unmyelinisierte C-Faser-Neuronen mit Zellkörpern von kleinem Durchmesser (cyan) hervor.; **B**: Ein aktualisiertes Modell, das Erkenntnisse aus scRNA-seq-Transkriptionsanalysen, genetischen Markierungsexperimenten, Gen-*knock-out*-Ergebnissen, Geburtsdatierungsexperimenten und iPSC-Experimenten berücksichtigt, besagt, dass während der Neurogenese neugeborene Spinalganglien-Neuronen *Ngn1/2* und *Brn3a/EP3* exprimieren und transkriptionell in der Lage sind, sich zu jedem Spinalganglien-Neuronen-Subtyp zu entwickeln. Diese neugeborenen Neurone beginnen, Axone auszubilden, und co-exprimieren eine breite Palette von Transkriptionsfaktoren (mehrfarbige Zelle), die zu einem späteren Zeitpunkt subtypspezifisch werden. Zeitlich und räumlich begrenzte Umwelteinflüsse können dazu führen, dass früh geborene Spinalganglien-Neurone auf einen Subtyp mit großem oder mittlerem Durchmesser ausgerichtet werden, während andere extrinsische Einflüsse die meist später geborenen Neuronen auf einen Subtyp mit kleinem Durchmesser ausrichten. Die relativen Prozentsätze der Subtypen sind durch die Dicke der Pfeile gekennzeichnet. (Abbildung und Text übernommen von (Meltzer et al., 2021))

Anhand der Expression verschiedener Tropomyosin Rezeptor Kinasen, welche als Rezeptoren für Wachstumsfaktoren dienen, können unreife Neurone schon früh in ihrer Differenzierung unterschiedlichen Untergruppen zugeordnet werden. Die Zelllinie der Neurone mit großem Durchmesser, welche später die C-LTMRs bilden, exprimiert die Tropomyosin Rezeptorkinase B (TrkB), welche als Rezeptor für den Brain derived neurotrophic factor (BDNF) dient. Nervenzellen, welche später die Propriozeptoren bilden, exprimieren hingegen charakteristisch die Tropomyosin Rezeptorkinase C (TrkC), ein Rezeptor für das Neurotrophin-3 (NT-3) (Lallemend und Ernfors, 2012). Vorläuferzellen der Nozizeptoren exprimieren in der Maus um den Embryonaltag E12 herum (Lallemend und Ernfors, 2012) die Tropomyosin Rezeptor Kinase A (TrkA), ein

Rezeptor für den Wachstumsfaktor Nerve Growth Factor (NGF). NGF spielt eine wichtige Rolle während der Differenzierung und Reifung der Nozizeptoren (Deinhardt und Chao, 2014). So wachsen die Axone TrkA-positiver Nervenfasern der NGF-Expression folgend aus und können so ihre Innervationsgebiete in der Haut finden (Gundersen, 1985). Dieser Mechanismus wird auch Chemotropismus genannt. Außerdem zeigt die Interaktion von NGF und TrkA, wie Wachstumsfaktoren extrinsisch die unterschiedliche transkriptionelle Ausstattung der einzelnen Neuronen-Subtypen im Spinalganglion kontrollieren. So zeigten Studien, dass Mäuse, welche entweder kein NGF oder TrkA exprimierten, einen Verlust aller kleinen und einiger mittlerer/großer Neuronen des Spinalganglions aufwiesen (Crowley et al., 1994, Smeyne et al., 1994). TrkA-positive Zellen differenzieren schlussendlich in nozizeptive Sinneszellen (Rostock et al., 2018). Im Verlauf der Neurogenese co-exprimieren einige Zellen der TrkA-positiven Linie den Transkriptionsfaktor Runx1 sowie die Rezeptortyrosinkinase Ret (Rostock et al., 2018). Diese Zellen entwickeln sich zu Vorläuferneuronen, die auf Schmerzempfindung, Juckreiz und Temperaturempfinden spezialisiert sind (Chen et al., 2006). Die Expression von Runx1 beginnt in TrkA-positiven Neuronen ab dem embryonalen Tag E14.5 und bleibt bis zum postnatalen Tag P0 auf diese Zellen beschränkt. Bis zum postnatalen Tag P30 exprimieren diese Runx1-positiven Neuronen im Zeitverlauf kein TrkA mehr, sondern wechseln zur Expression von Ret (Molliver et al., 1997). Der initiale Beginn der Ret-Expression ist durch den Wachstumsfaktor NGF vermittelt, während ihre Aufrechterhaltung von der Runx1-Expression abhängig ist (Huang et al., 2015). Die Ret-Expression beginnt zwischen E15.5 und P7.5 und führt zur sukzessiven Herunterregulation von TrkA (Molliver et al., 1997). Indem Runx1 die Expression des Calcitonin gene-related peptide (CGRP) unterdrückt (Kramer et al., 2006), bestimmt es die weitere Diversifizierung in nicht-peptiderge Neurone. So bestimmt die Expression von Runx1 die Entwicklung von zwei Subpopulationen innerhalb der sensorischen Neurone: Die TrkA-positiven Runx1-negativen Neurone, die postnatal zu den peptidergen Neuronen werden und die nicht-peptidergen TrkA-negativen Ret-positiven bzw. TrkA-negativen Runx1-positiven Neurone, welche sich postnatal zu den nicht-peptidergen Neuronen entwickeln (Abbildung 1.5)(Usoskin et al., 2015, Chen et al., 2006, Averill et al., 1995, Kashiba et al., 2001).

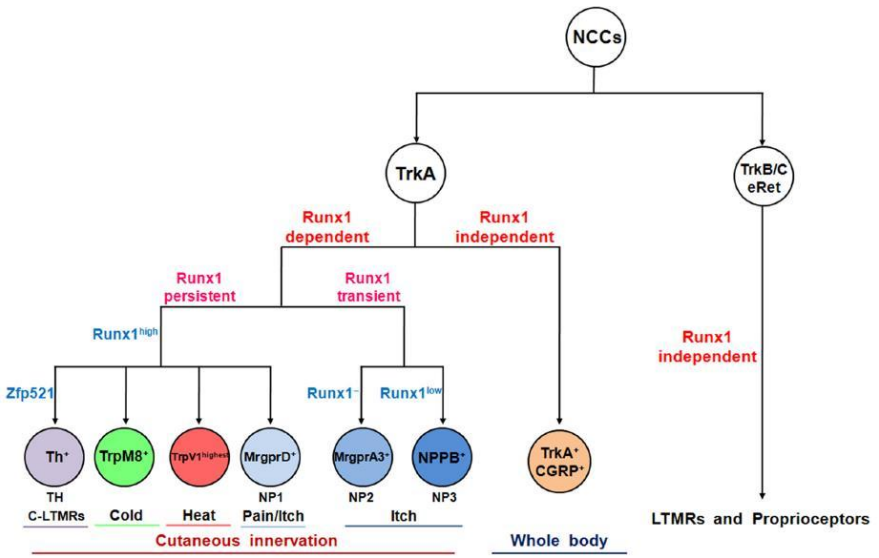


Abbildung 1.5: Weitergehende Klassifikation für Nozizeptoren. Hierarchische Kontrolle der Entwicklung somatosensorischer Neuronen in der Maus (*Mus musculus*). Der Transkriptionsfaktor Runx1 spielt bei der Entwicklung der sensorischen Neuronen der TrkA-Linie eine zentrale Rolle, was sich in der anatomischen und funktionellen Unterteilung dieser Neuronen widerspiegelt (Abbildung und Text übernommen von (Qi et al., 2017))

1.4 Physiologie der Schmerzwahrnehmung

Schmerzreize werden in Neuronen entlang der Axone als Aktionspotentiale weitergeleitet. Diese entstehen, wenn ein Reiz das Schwellenpotential überschreitet, gemäß dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (Adrian, 1914). Die Stärke des Reizes ist demnach nicht proportional zu der Antwort der Zelle, sondern wird ausgelöst, sobald der Reiz eine gewisse Schwelle überschreitet, oder bleibt aus, liegt dieser darunter. Die Potentialänderung ist bedingt durch einen Natriumeinstrom in die Nervenzelle, der erstmals 1952 beschrieben wurde (Hodgkin und Huxley, 1952).

1.4.1 Spannungsgesteuerte Natriumkanäle

Wichtig für die neuronale Signaltransduktion sind die spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Na_V) (Bennett et al., 2019). Anhand ihrer Empfindlichkeit für Tetrodotoxin (TTX), einem Nervengift, welches die Kanal-Pore blockiert (Lee und Ruben, 2008), werden sie in TTX-sensitive und TTX-resistente Kanäle kategorisiert (siehe Abb.: 1.6 A). TTX-resistente Kanäle besitzen statt des aromatischen Tyrosin- oder Phenylalanin-Restes einen Serin-Rest zwischen den Segmenten S5 und S6 in Protein-Domäne I, der zu einer TTX-Resistenz führt (Sivilotti et al., 1997). In sensorischen

Neuronen wurden verschiedenen Isoformen spannungsgesteuerter Natriumkanäle beschrieben, die sich in ihrer α-Untereinheit, kinetischen Eigenschaften und Lokalisation im Körper unterscheiden (Abbildung 1.6 A). Von den neun bekannten Subtypen (Nav1.1-1.9) werden hauptsächlich Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 in sensorischen Neuronen exprimiert (Bennett et al., 2019). Besonders Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 sind für die Schmerzforschung relevant, da pathogene Varianten dieser Kanäle die Schmerzwahrnehmung beeinflussen (Cox et al., 2006, Faber et al., 2012b, Leipold et al., 2013).

Strukturell bestehen sie aus einer α-Untereinheit, die von den kleineren β-Untereinheiten (30-40 kDa) reguliert wird (Goodwin und McMahon, 2021). Die α-Untereinheit setzt sich aus vier Domänen (I-IV) mit jeweils sechs Transmembransegmenten (S1-6) zusammen. Angetrieben durch eine positiv geladene Aminosäure in Segment (S) 4 wirken S1-4 als Spannungssensor, wobei S5-6 die Kanal-Pore bilden (Bennett et al., 2019) (siehe auch Abb.1.7 A).

Spannungsgesteuerte Natriumkanäle können verschiedene Zustände annehmen (Abb. 1.6 B). Depolarisiert ein Reiz die Zellmembran, wird dies über den Spannungssensor wahrgenommen und führt zu einer Konformationsänderung und somit Öffnung der Pore. Natriumionen strömen entlang ihres elektrochemischen Gradienten in die Zelle, was bei Überschreitung des Schwellenwerts zu einer weiteren Depolarisation und einem Aktionspotential führt (de Lera Ruiz und Kraus, 2015). Dieses wiederum depolarisiert und öffnet benachbarte spannungsgesteuerte Natriumkanäle und leitet das Aktionspotential entlang des Nervs weiter. An der ersten Synapse im Rückenmark führt ein darauf folgender Calciumeinstrom im präsynatpischen Neuron zur Freisetzung von Neurotransmittern, die ein Aktionspotential in der postsynaptischen Zelle auslösen (Katz und Miledi, 1967). Kurz darauf wechselt der Kanal in den inaktiven Zustand, in dem er nicht erneut geöffnet werden kann. Dieser Mechanismus reguliert die Erregbarkeit und Aktivitätsfrequenz der Zelle. Das *„ball and chain“*-Modell (Armstrong und Bezanilla, 1977) beschreibt die Blockierung der Pore durch eine Struktur, die den Ausgang der Pore auf der zytoplasmatischen Seite verschließt. Diese Inaktivierungsstruktur besteht aus einem Isoleucin-Phenylalanin-Methionin (IFM)-Motiv und ist zwischen Domäne III und IV lokalisiert (Bennett et al., 2019, Payandeh et al., 2012). Spannungsabhängige Kaliumkanäle öffnen sich bei Überschreiten ihres Schwellenpotenzials, was einen Kaliumausstrom und eine Hyperpolarisation der Zellmembran verursacht (Hausser,

2000). Dadurch gehen die Natriumkanäle in einen geschlossenen Zustand über, in dem eine erneute Aktivierung möglich ist (Bennett et al., 2019). Diese drei Zustände *offen*, *inaktiv* und *geschlossen* charakterisieren die Kinetik der spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Abbildung 1.6 B).

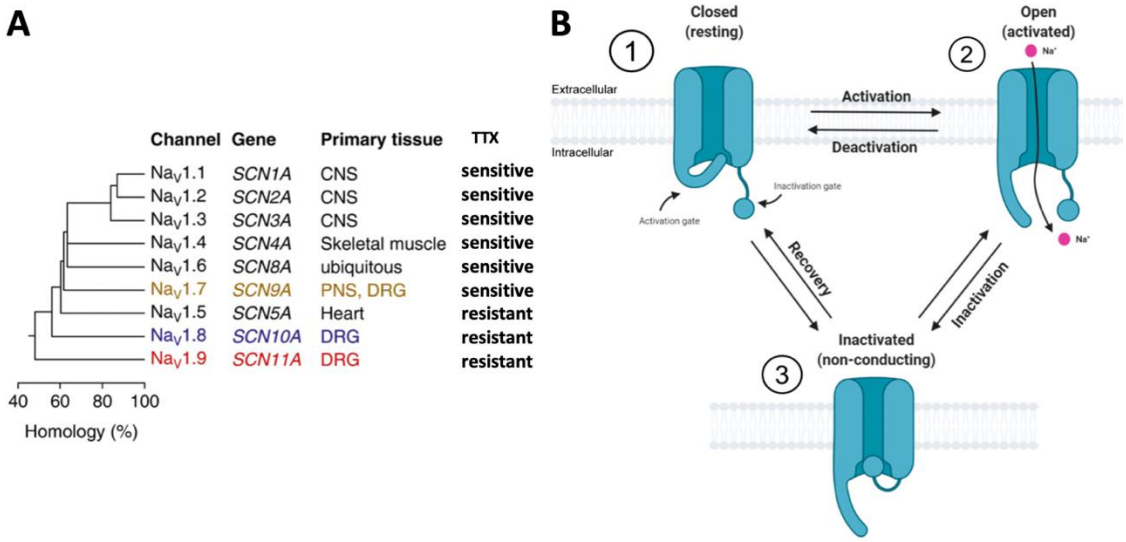


Abbildung 1.6: Diversität und Funktionsweise spannungsgesteuerter Natriumkanäle. A: Isoformen der spannungsgesteuerten Natriumkanäle, übernommen und modifiziert aus (Nau und Leipold, 2017); **B**: Die verschiedenen Aktivitätszustände eines spannungsgesteuerten Natriumkanals 1: geschlossen 2: offen 3: inaktiv; (übernommen aus (Zybura et al., 2021))

1.4.1.1 Die Bedeutung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 für die Entstehung von Schmerzreizen

Entscheidend für die Schmerzvermittlung ist der TTX-sensitive spannungsgesteuerte Natriumkanal Nav1.7, kodiert von *Scn9a* (Bennett et al., 2019). Nav1.7 *knock-out* Mäuse zeigen eine signifikant reduzierte Schmerzwahrnehmung, bzw. stark reduzierte Reaktionen auf schmerzhafte Reize (Gingras et al., 2014). Auch im Menschen konnten angeborene Schmerzunempfindlichkeiten und Anosmie auf eine Mutation im *SCN9A*-Gen zurückgeführt werden (Goldberg et al., 2007). Nav1.7 wird hauptsächlich im peripheren Nervensystem exprimiert, vor allem in den Spinal- (Black et al., 1996) , Trigeminal- und Zervikalganglien, sowie in den Mitralzellen des Riechkolbens (Bennett et al., 2019). Die *Scn9a*-mRNA findet sich dort vermehrt in den nozizeptiven C-Fasern sowohl peptiderger als auch nicht-peptiderger Neuronen (Black et al., 2012, Goodwin und McMahon, 2021, Fukuoka et al., 2008). Physiologisch reguliert der Nav1.7 den Schwellenwert zur Generierung eines Aktionspotenzials, indem er das durch Reize erzeugte Generatorpotenzial verstärkt und so die Schwelle zur Auslösung eines

Aktionspotenzials erreicht wird (Bennett et al., 2019). Der Nav1.7 ist durch seine schnelle Kinetik und seine Funktion als Verstärker subschwellig afferenter Reize ein integraler Bestandteil der nozizeptiven Signaltransduktion (Bennett et al., 2019). Auch in der medizinischen Forschung spielt der Nav1.7 eine wichtige Rolle. Gain *of function*-Mutationen im Menschen können angeborene Schmerzunempfindlichkeit verurusachen (Cox et al., 2006), während andere Varianten mit erblicher Erythromelalgie (Han et al., 2009), paroxysmaler extremer Schmerzstörung (Jarecki et al., 2008) und *small fiber* diabetischer Neuropathie (Faber et al., 2012a) assoziiert sind (Bennett et al., 2019).

Der spannungsgesteuerte TTX-resistente Natriumkanal Nav1.8, kodiert durch *Scn10a* (Information, 2023), wird in der Maus ab Embryonaltag E13-14 im peripheren Nervensystem exprimiert (Stirling et al., 2005, Akopian et al., 1996). Er ist vor allem in sensorischen Neuronen (Sangameswaran et al., 1996) der Spinalganglien zu finden, wo er in 75 % der Neurone nachweisbar ist (Shields et al., 2012). Eine Ausnahme bildet das *Ganglion cervicale superior*, in dem keine Nav1.8-mRNA nachgewiesen wurde (Sangameswaran et al., 1996). Über 85 % der Nav1.8-positiven Neurone sind Nozizeptoren (Djouhri et al., 2003). Exprimiert ist dieser Natriumkanal hauptsächlich in den kleinen Neuronen, während er in den großen sensorischen Neuronen (>30 µm Soma/Zelldurchmesser) eher selten zum Expressionsprofil gehört (Ho und O'Leary, 2011). In peptidergen Neuronen ist Nav1.8 stark exprimiert, mit Ausnahme von peptidergen TRPM8-positiven, kälteempfindlichen Neuronen. Nicht-peptiderge Neurone zeigen eine mittelstarke Expression, wobei die dieser Gruppe angehörigen niedrigschwelligen Tyrosinhydroxylase positiven nicht-nozizeptiven C-Fasern eine besonders starke Expression zeigen. Nicht nozizeptive A-Fasern zeigen nur eine geringe Nav1.8-Expression (Goodwin und McMahon, 2021). Auch im Gastrointestinaltrakt wurde der Nav1.8 nachgewiesen, wo er möglicherweise eine Rolle in neuroendokrinen Mechanismen spielt (Gautron et al., 2011). Studien an Nav1.8-Null-Mäusen belegen seine bedeutende Rolle in der Schmerzverarbeitung: Sie zeigen eine deutliche Analgesie gegenüber schmerzhaften mechanischen Reizen und eine verzögerte Ausbildung einer entzündlichen Hyperalgesie (Akopian et al., 1999). Funktionell ermöglicht der Nav1.8 durch schnelle Reaktivierung ein Dauerfeuern von Neuronen (Hameed, 2019). Im Gegensatz zu Nav1.7 liegt die Aktivierungs- und Inaktivierungsschwelle von Nav1.8 bei stärker depolarisierten Werten (Hameed, 2019). Der Nav1.8-Kanal hat mit 58-90 %

einen wesentlichen Anteil am einwärts gerichteten Natrium-Strom während der ansteigenden Phase des Aktionspotentials (Blair und Bean, 2002). Seine langsame Inaktivierungskinetik ermöglicht eine längere Öffnung und damit verbunden einen länger anhaltenden Natriumeinstrom (Elliott und Elliott, 1993).

Der spannungsgesteuerte TTX-resistente Natriumkanal Nav1.9, kodiert durch *Scn11a*, spielt ebenfalls eine wesentliche Rolle in der Schmerzreizleitung (Dib-Hajj et al., 1999b). Exprimiert wird Nav1.9 vorwiegend in den kleinen Neuronen (<30 µm Somadurchmesser) bzw. den Nozizeptoren (C-Fasern, Aδ-Fasern, Aβ-Fasern) (Fang et al., 2002) der Spinal- und Trigeminalganglien (Dib-Hajj et al., 2010, Dib-Hajj et al., 1998). Sein Expressionsprofil ähnelt dem des Nav1.8-Kanals, wobei er besonders stark in nicht-peptidergen Neuronen exprimiert wird, hingegen weniger stark in den nicht-peptidergen TH-positiven nicht-nozizeptiven C-Fasern (Goodwin und McMahon, 2021). Nav1.9 wurde auch in myenterischen Neuronen nachgewiesen, wo er möglicherweise die Regulierung intestinaler Reflexe beeinflusst (Padilla et al., 2007). Eine deutlich erhöhte Expression zeigt *SCN11A* in den pruritogenen *NPPB*-, *GFRA2*- und *IL31RA*-positiven C-Nozizeptoren in humanen Spinalganglien (Tavares-Ferreira et al., 2022). In seiner Kinetik unterscheidet sich Nav1.9 vor allem durch seine Aktivierung bei hyperpolarisierten Werten (-80 mV) (Dib-Hajj et al., 1999a) von den anderen Na_V-Isoformen. Durch seine sehr langsame Inaktivierung entsteht ein anhaltender Natriumstrom, der, nahe am Ruhemembranpotential, eine Depolarisation der Zelle bewirkt (Cummins et al., 1999). So trägt der Nav1.9 nicht direkt zur Entstehung des Aktionspotentials bei, sondern senkt die Schwelle für dessen Generierung, sodass auch schwache Reize Neurone erregen können. Verschiedene Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen dem Nav1.9 und Schmerzempfindungen bei Knochenkrebs (Qiu et al., 2012), viszeralen (Martinez und Melgar, 2008), entzündungsbedingten (Amaya et al., 2006) und kälteevozierten Schmerzen (Lolignier et al., 2015).

Ein vertieftes Verständnis der Funktionen und Wechselwirkungen der spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 ist für die Schmerzforschung von großer Bedeutung. Die Rolle des Nav1.9 wird durch pathogene Varianten bei peripherer Neuropathie (Han et al., 2015), familiären episodischen Schmerzen (Leng et al., 2017) und angeborener Schmerzinsensitivität (Huang et al., 2017, Leipold et al., 2013, Phatarakijnirund et al., 2016) unterstrichen. Zudem scheint Nav1.9 auch an der Entwicklung motorischer Axone beteiligt zu sein (Subramanian et

al., 2012). Auch Nav1.7 gilt als vielversprechendes Ziel für selektive Kanalblocker in der Schmerztherapie. Nav1.8 wiederum gewinnt durch *SCN10A*-Mutationen bei idiopathischer *Small Fiber-Neuropathie* (Faber et al., 2012b) an Bedeutung. So gibt es bereits ein von der *United States Food and Drug Administration* zugelassenes Nichtopioid-Analgetikum Namens Suzetrigine, welches selektiv den Nav1.8-Kanal blockiert und in der Behandlung mäßiger bis starker akuter Schmerzen eingesetzt wird (Wire, 2025).

1.5 Schmerzverlust trotz Funktionsgewinn – die Nav 1.9 p.(L811P) Mutation

2013 beschrieben Leipold et al. in zwei Individuen die heterozygote *de novo* missense-Variante p.(L811P) im Exon 15 des *SCN11A*-Gens, die in einem Austausch von Leucin durch Prolin in einer hoch konservierten Region am Ende des sechsten Transmembransegmentes in Domäne II des spannungsgesteuerten Nav1.9 Natriumkanals resultiert (Abbildung 1.7 A).

Betroffene zeigten Schmerzunempfindlichkeit mit schlecht heilenden Wunden, Knochenbrüchen, leichter Muskelschwäche, verzögerter motorischer Entwicklung, gastrointestinalen Problemen, Hyperhidrose und reduzierter Nervenleitgeschwindigkeit der motorischen und sensorischen Fasern.

Zur weiteren Untersuchung generierten Leipold et al. 2013 durch homologe Rekombination eine heterozygote *knock-in* Maus mit der orthologen murinen Variante *Scn11a*-p.Leu799Pro. Heterozygote (*Scn11a*$^{+/L799P}$-)Tiere zeigen durch verstärktes Kratzverhalten hervorgerufene Fell-/Hautläsionen, die bei bis zu 11 % der Mäuse beobachtet werden. In Verhaltensexperimenten zur Testung der akuten Schmerzwahrnehmung zeigte sich diese reduziert in *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen: Reizschwellen auf noxische Wärme waren signifikant erhöht, thermische und mechanische Hyperalgesie gering ausgeprägt. Morphologisch zeigten sich keine Hinweise auf Neurodegeneration. Elektrophysiologische Messungen an humanen Nav1.9-Leu811Pro-Zellen ergaben eine erhöhte basale Aktivität des mutierten Kanals auch während des Ruhemembranpotentials. Das Segment 6 in Domäne II interagiert, um den Natriumkanal zu schließen, mit dem IFM-Motiv. Da die Mutation genau in

diesem Segment liegt, ist die Kanalinaktivierung folglich beeinträchtigt. Die daraus resultierende Linksverschiebung des Aktionspotenzials ist in Abbildung 1.7 B zu sehen.

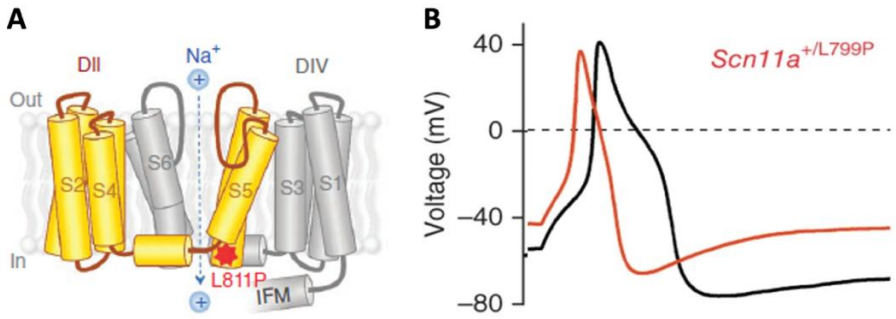


Abbildung 1.7: Schmerzverlust trotz Funktionsgewinn. A: Nav1.9 schematisch mit Mutation an Aminosäuren-Position L811P; **B**: Linksverschiebung des Aktionspotenzials/der Kanalaktivierung des Nav1.9 L811P; übernommen aus (Leipold et al., 2013)

Auf den ersten Blick scheint diese „*gain-of-function*"-Mutation nicht zum Phänotyp zu passen, da die bislang bekannten Mutationen, die zu Schmerzlosigkeit führen, auf „*loss-of-function*"-Mutationen eines spannungsgesteuerten Natriumkanals zurückzuführen sind (Cox et al., 2006). Ein durch die dauerhafte Öffnung des Kanals bedingter verstärkter Einstrom von Natriumionen führt zu einer dauerhaften Zelldepolarisation. Folglich könnte dies zu einer fortschreitenden Inaktivierung der für die Generierung des Aktionspotenzials zuständigen spannungsgesteuerten Natriumkanäle (Nav1.7, Nav1.8) führen. Durch eine darauffolgende fehlende Calciumionen-Freisetzung in den Präsynapsen des Rückenmarks, wäre die Signalweiterleitung von den primären Nozizeptoren zu den postsynaptischen Neuronen unterbrochen.

Immunfluoreszenzfärbungen (Schmidt, 2024) zeigten zudem, dass eine Zellpopulation in den Spinalganglien und dem dorsalen Horn des Rückenmarks in adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen fehlt, die beim Wildtyp vorhanden ist. Dabei handelt es sich um IB4 (Isolectin B4) und PlexinC1-exprimierende Zellen, beides Marker für die Nozizeptor-Cluster NP1-3 und PEP1 (siehe Abb. 1.2).

Neben der p.L811P-Mutation konnten auch die p.L396P-Mutation, lokalisiert in Segment S6 von Domäne I (King et al., 2017), sowie die p.L1302F-Mutation, lokalisiert in Segment S6 von Domäne III (Huang et al., 2017), als ursächlich für eine kongenitale Schmerzunempfindlichkeit identifiziert werden. Der Nachweis der p.L396P-Mutation ging mit einer ausgeprägten Obstipation einher, die zu einer erheblich beeinträchtigten oralen Nahrungsaufnahme führte und eine parenterale Ernährung erforderlich machte (Makar et al., 2023). Im Zusammenhang mit der p.L1302F-Mutation wurde hingegen über eine chronische Diarrhö berichtet (Huang et al., 2017).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, den Zeitpunkt des Fehlens der nicht-peptidergen Zellpopulation näher zu bestimmen. Die Arbeit untersucht, ob es sich dabei um einen postnatalen Verlust durch Apoptose handelt oder ob die PlexinC1-positiven Zellen von Geburt an fehlen, was auf eine embryonale Entwicklungsstörung mit einem potenziellen *„cell fate switch"* hinweisen könnte.

Zusätzlich sollte geprüft werden, ob es im Zusammenhang mit dem Verlust der nicht-peptidergen Zellen zu Veränderungen in der Expression der Kanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 kommt. Dafür sollten passende RNA-Sonden für diese Kanäle generiert werden. Anhand von Untersuchungen der nicht-peptidergen Neuronenpopulation in den postnatalen Stadien P0 und P6, sollte das Fehlen oder Vorhandensein von PlexinC1-positiven Zellen während verschiedener postnataler Altersstadien überprüft werden. Ziel war es festzustellen, ob die Unterschiede zwischen Wildtyp und der *Scn11a*$^{+/L799P}$ Linie bereits früh postnatal sichtbar sind oder sich erst im Verlauf der weiteren Entwicklung zeigen. Da das Fehlen der PlexinC1-Expression nicht zwangsläufig den Verlust einer Zellpopulation bedeuten muss, sondern auch auf einen *„cell fate switch"* mit veränderter Expression hinweisen kann, sollten peptiderge und nicht-peptiderge Neuronenklassen zusätzlich anhand der Marker TrkA und Runx1 quantifiziert werden. Diese Marker eignen sich besonders, da sie auch Rückschlüsse auf postnatale Entwicklungsprozesse zulassen. Als Marker für sensorische Neuronen wurde der Transkriptionsfaktor Islet1/2 verwendet, da beide Proteine in diesen Neuronen exprimiert werden. Besonders Islet1 ist ein zuverlässiger Marker, da er ab Embryonalstadium E9.5 bis E10.5 in nahezu allen sensorischen Neuronen der Maus exprimiert wird, was ihn zu einem frühen und spezifischen Marker für diese Zellpopulation macht (Sun et al., 2008).

Diese Arbeit soll dazu beitragen, den Einfluss und die Rolle von Nav1.9 bei der Schmerzverarbeitung besser zu verstehen. Außerdem soll der Frage weiter auf den Grund gegangen werden, ob die Veränderungen in den Spinalganglien rein funktioneller Natur sind, oder ob es auch strukturelle Veränderungen, wie beispielsweise neue Zelltypen gibt, die zum Phänotypen beitragen. Erfolgreiche Grundlagenforschung könnte in Zukunft die Entwicklung von Medikamenten fördern, die eine zielgerichtetere und erfolgreiche Schmerztherapie ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
10x Transkriptionspuffer	New England BioLabs, Ipswich, USA
2-Propanol	VWR BDH Chemicals, VWR International
Acetanhydrid	New England BioLabs, Ipswich, USA
ADB (Agarose Auflösungs-Puffer)	Zymo Research, Irvine, USA
Anti-digoxigenin AP-Konjugat	Sigma Aldrich, Mannheim
BCIP/NBT-Stock	Sigma Aldrich, Mannheim
Blocking Reagenz	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
EDTA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
EtOH 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Fast digest Puffer 10x	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Ficoll 400	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Fluoromount-G® (0100-01)	SouthernBiotech, USA
Formamid	New England BioLabs, Ipswich, USA
Formamid deionisiert	Thermo Fisher, Carlsbad, USA
Ladepuffer 10x	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Levamisol/Tetramisol	Sigma Aldrich, Darmstadt
Lithiumchlorid	New England BioLabs, Ipswich, USA
Mowiol 4-88	Sigma Aldrich, Taufkirchen
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nuclease-freies Wasser	Quiagen, Venlo, Niederlande
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer (10x)	Quiagen, Venlo, Niederlande
Pferdeserum	Thermo Fisher, Auckland, New Zealand
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
RepelSilan®	Fisher Sientific GmbH, Schwerte
SeaKem® LE Agarose	Lonza Group, Basel, Schweiz
T3 Puffer	New England BioLabs, Ipswich, USA
T4 DNA Ligase Puffer	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
TRI-Reagent®	Sigma Aldrich, Merck KGaA, USA
Trichlormethan/ Chloroform	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X® 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen wurden mit MilliQ Wasser aus einer Reinstwasseranlage (Millipore) angesetzt. RNAse-freies Wasser wurde durch Zugabe von 0,1 % DEPC, Rühren über Nacht und anschließendes Autoklavieren hergestellt. Nicht mit DEPC behandelbare Lösungen für ISH wurden mit DEPC-behandeltem Wasser angesetzt.

PBS

NaCl	137 mM
KCl	2,7 mM
$Na_2HPO_4 \cdot 2H2O$	6,4 mM
KH_2PO_4	1,5 mM

pH 7,4 mit HCl oder NaOH

20x SSC

NaCl	3 M
Na-Citrat	300 mM

pH 7,0

MaBS

Maleinsäure	0,1 M
NaCl	0,15 M

pH 7,5 mit NaOH

Reaktionspuffer

Tris	100 mM
NaCl	100 mM
$MgCl_2$	5 mM

pH 9,5 mit HCl

50x Denhardt´s Reagenz

Ficoll 400	1 %
BSA	1 %
Polyvinylpyrrolidon	1 %

pH 7,5

Mowiol

Mowiol 4-88	10 %
Glycerin	25 %
Tris-HCl	0,1 M

pH 8,5

Hybridisierungslösung

Formamid	50 %
20xSSC	ad 5x
Torula RNA	ad 0,4 mg/ml
tRNA	ad 0,1 mg/ml
RNA-Sonde	ad 3 ng/ml
50x Denhardt´s	ad 5x

ad H_2O_{DT}

150 µl pro Objektträger

PB Puffer 0,1 M

Na_2HPO_4	0,5 M
NaH_2PO_4	1 M

ad H_2O

PH 7,4

Blockierungspuffer (0,25 % Triton-X100)

Triton-X100 (25 %)	100 µl
Pferdeserum	500 µl

PB Puffer ad 10 µl

TELT-Puffer

Tris-HCl, pH 7,5	50 mM
EDTA	62,5 mM

HotShot Lyse-Puffer

NaOH	25 mM
EDTA	0.2 mM

pH 12,0

LB-Medium

Trypton / Pepton	10 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	5 g/l
NaOH 1M	1 ml/l

autoklaviert

Ampicillin	50 µg/ml

LB Agar

Bakterienagar	15 g/l

In LB-Medium

SOC-Medium

Pepton	20 g/l
Hefe-Extrakt	5 g/l
NaCl	0,5 g/l
KCl	2,5 mM
$MgCl_2$	10 mM
1 M NaOH	1 ml/l
Autoklaviert	
Glucose	3,6 g/l

Substratlösung

BCIP/NBT	20 µl
Reaktionspuffer	10 ml

2.1.3 Nukleinsäure und Nukleotide

Nukleinsäuren & Nukleotide	Hersteller
1 kb DNA-Leiter	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
M13 Forward Primer	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
tRNA	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
torula RNA	Thermo Fisher Scientific, Fair Lawn, USA
100 bp DNA-Leiter	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
dNTP-Set (100 mM)	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA
DIG RNA-Markierungsmix	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.4 Enzyme und andere Proteine

Enzyme & andere Proteine	Hersteller
Fast Alkalische Phosphatase	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
HotStarTaq Plus DNA-Polymerase	Qiagen, Venlo, Niederlande
RNAse Inhibitor	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
RNA Polymerase T3	New England BioLabs, Ipswich, USA
RNA Polymerase T7	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
T4 DNA-Ligase	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
T4 DNA-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, LItauen
BigDye-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Carlsbad, USA
KpnI fast digest	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
SacI fast digest	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Platinum SuperFi-Polymerase	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Proteinase K	Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Litauen
Lysozym	Pierce Biotechnology, Rockford, USA

2.1.5 Versuchstiere

Für alle Versuche wurden *knock-in* Mäuse der Linie *Scn11a*$^{+/L799P}$, welche die orthologe humane heterozygote *missense*-Variante p.(L799P) tragen, sowie Linien-interne wildtypische Tiere genutzt (Leipold et al., 2013). Alle Prozeduren wurden vom Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz, Nordrhein-Westfalen, Deutschland genehmigt (AZ 81-02.04.2019.A358; 81-02.04.2020.A005). Die Tiere wurden am Institut für Versuchstierkunde, Uniklinik RWTH Aachen, in geschlossenen Barrieren gehalten. Die Raumtemperatur betrug 20-24 °C bei einer Luftfeuchtigkeit von 45-65 %. Die Lichtintensität lag ≤ 200 Lux bei einer Höhe von 1 m und einem Hell-Dunkel-Rhythmus von je zwölf Stunden. Futter und Wasser wurde den Tieren *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden

Aufgrund der starken Sequenzhomologie von Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 fehlen geeignete Isoform-spezifische Antikörper. Daher wurden genspezifische RNA-Sonden für *Scn9a, Scn10a, Scn11a* und *Tubb3* als ubiquitären Neuronenmarker hergestellt. Auf diese Weise sollten mithilfe von *In Situ* Hybridisierungen (ISH) an Spinalganglien verschiedener Altersstadien (E13.5, P0, P6, adult) mögliche Unterschiede in der Genexpression zwischen dem Wildtyp und Mäusen mit der *Scn11a*$^{+/L799P}$ -Mutation analysiert werden. Die *In Situ* Hybridisierung ist aufgrund ihrer Sequenz-Spezifität und Sensitivität die Methode der Wahl. Abbildung 2.1 zeigt schematisch die Schritte für die Herstellung der RNA-Sonden.

2.2.1 Arbeit mit RNA

Da einzelsträngige RNA im Vergleich zu doppelsträngiger DNA deutlich instabiler ist, gilt beim Arbeiten mit RNA-Proben besondere Vorsicht. Ribonukleasen sind ubiquitär und vor allem ihre hohe Stabilität kann die Arbeit mit RNA erschweren. Aufgrund dessen wurden vor dem Arbeiten mit RNA einige Vorkehrungen getroffen. Die Versuche wurden unter Verwendung von Einmalhandschuhen durchgeführt. Die zu verwendenden Lösungen (wo möglich) wie auch das genutzte Wasser wurden mit 0,1 %

Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht gerührt und anschließend autoklaviert, um RNAsen möglichst zu entfernen. Die Labormaterialien (Metall, Glas) wurden vor der Verwendung drei Stunden lang bei 180 °C gebacken, um RNAsen zu inaktivieren.

Da Nukleotide leicht unspezifisch an Silikate auf Deckgläsern binden, wurden diese vor deren Verwendung silanisiert. RNAse-freie Deckgläser wurden für fünf Sekunden in der angegebenen Reihenfolge in Repel-Silan, Aceton und absolutes Ethanol getaucht und anschließend luftgetrocknet.

2.2.2 Gewebepräparation und Aufreinigung von RNA

Zur Gewinnung von Spinalganglien für die RNA-Extraktion wurde eine dreieinhalb Monate alte männliche Wildtyp-Maus aus der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Linie (Leipold et al., 2013) durch CO_2-Inhalation durch autorisierte Personen getötet. Zur Präparation der Spinalganglien wurde die Wirbelsäule dorsal vorsichtig mit einer Schere aufgeschnitten, so dass das Rückenmark entfernt werden konnte. Schließlich wurden die Spinalganglien entlang der Wirbelsäule entnommen und in eiskaltem PBS-Puffer auf Eis gesammelt. Um RNA-Abbau zu minimieren, wurden die Ganglien sofort nach Präparation auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Für alle embryonalen Organentnahmen wurden heterozygote mit wildtypischen Mäusen (Linie *Scn11a*$^{+/L799P}$) terminiert über Nacht verpaart und der nächste Tag als E0.5 definiert. Die in Verpaarung befindlichen Weibchen wurden auf das Vorhandensein eines Vaginalplugs kontrolliert. Dieser wurde als Indikator für eine erfolgreiche Befruchtung gewertet. Darüber hinaus erfolgte eine Gewichtskontrolle vor Verpaarung und ab E12. Eine kontinuierliche Gewichtszunahme wurde als weiterer Indikator für eine vorliegende Trächtigkeit gewertet. Das tragende Muttertier wurde am Embryonaltag E13.5 mittels intraperitonealer Injektionsnarkose (200 mg Ketamin/25 mg Xylazin pro kg Lebendgewicht) narkotisiert. Mithilfe des Corneal- und Zwischenzehenreflexes wurde auf chirurgische Toleranz getestet und bei Bedarf nachdosiert. Die Embryonen wurden mittels Kaiserschnitts aus dem Weibchen entnommen und dieses sofort dekapitiert. Die Präparation der Embryonen erfolgte auf Eis. Die Embryonen wurden mittels Scherenschlags dekapitiert und damit euthanasiert, eine Schwanzspitzenbiopsie wurde

für eine spätere Genotypisierung genommen. Embryonen wurden sofort auf Trockeneis eingefroren und bei -80 °C gelagert.

Um Spinalganglien der postnatalen Stadien zu gewinnen, wurde der komplette Wurf zum gegebenen Zeitpunkt (P0, P3, P6) durch Dekapitation getötet und eine Schwanzspitzenbiopsie zur Genotypisierung entnommen. An den null und drei Tage alten Tieren wurde aufgrund der geringeren Größe keine weitere Präparation vorgenommen. Sechs Tage alte Mäuse hingegen wurden dorsal entlang der Longitudinalachse eröffnet, die Wirbelsäule vorsichtig mit einer Schere von den Rippen gelöst und komplett inklusive Spinalganglien herausgenommen. Um die Gewebeintegrität zu erhalten und Artefakte zu minimieren, wurde das Gewebe sofort ca. 60 Sekunden in eiskaltes Isopentan getaucht und tiefgefroren. Das Gewebe wurde bei -80 °C gelagert.

Die Gewebe für die Immunfluoreszenzfärbungen wurden bei 4 °C über Nacht fixiert (4 % PFA in PBS), in 10 % und 30 % Sucrose in PBS kryokonserviert und auf Trockeneis tiefgefroren.

In der aus der Schwanzspitze des jeweiligen Tieres gewonnenen DNA wurden die jeweiligen *Scn11a* Allele nachgewiesen. DNA wurde aus den Schwanzbiopsien mittels der HotShot Methode isoliert. 25 µl HotShot Lysepuffer (25 mM NaOH/0,2 mM EDTA, pH 12,0) wurden zu dem Gewebe gegeben und dann 45 Minuten im Heizblock bei 95-98 °C erhitzt. Die Probe wurde bei - 20 °C für fünf Minuten abgekühlt. Anschließend wurden 25 µl HotShot Neutralisierungspuffer (40 mM Tris-HCl) hinzugegeben, die Probe kurz vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren gemischt und bei 4 °C gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion *(PCR)*

Zur Amplifikation der DNA-Zielsequenzen wurde folgender PCR-Mix angesetzt:

1,5 µl DNA

2 µl 10x PCR-Puffer

0,5 µl dNTPs

1,1 µl E16 Primer Mix

0,75 µl Δneo Primer Mix

0,1 µl HotStarTaq Plus DNA Polymerase

14 µl H_2O

20 µl

Der PCR-Ansatz wurde in den ThermoCycler gegeben und folgende Zyklen für die Denaturierung, die Primer-Hybridisierung und die Elongation durchlaufen:

***PCR*-Zyklus**

Temperatur [°C]	**Dauer**	
95	30min	
95	30s	} 35x
60	20s	
72	25s	
72	60s	

Dem gesamten Ansatz wurden 5 µl Ladepuffer hinzugegeben und die DNA-Fragmente auf einem 2 %igem Agarose-Gel mit 0,04 µl/ml Ethidiumbromid in 1xTBE Puffer 1 h bei 170 mV aufgetrennt. Als Referenz diente eine 100 bp Leiter.

Für die Aufreinigung und Isolierung von RNA aus den Spinalganglien der adulten Maus, wurden alle Schritte unter RNAse-freien Bedingungen durchgeführt. Um RNA aus dem Spinalganglion zu isolieren, wurde das Gewebe in 1 ml TRI-Reagenz pro 50-100 mg Gewebe homogenisiert. Die Probe wurde fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, woraufhin 0,2 ml Trichlormethan/Chloroform pro ml TRI-Reagenz hinzugegeben wurden. Nach Schütteln wurde der Ansatz 2-15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe bei 12.000xg für 15 Minuten bei 2-8 °C zentrifugiert. Aus

den drei Phasen wurde die farblose obere wässrige Phase abgenommen, um die RNA zu gewinnen. Die folgenden Schritte wurden alle auf Eis durchgeführt. Pro Milliliter TRI-Reagenz wurden 0,5 ml 2-Propanol hinzugefügt, die Probe kräftig geschüttelt und bei RT für 5-10 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die RNA durch Zentrifugation bei 12.000xg für 10 Minuten bei 2-8 °C pelletiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol pro 1 ml TRI-Reagenz gewaschen. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet getrocknet wurde, wurden 30 µl Nuklease-freies Wasser hinzugefügt, um die RNA zu lösen. Die RNA-Konzentration wurde mittels UV-Spektralphotometrie (NanoDrop 2000) bestimmt.

2.2.3 Quantitative und qualitative Analyse von Nukleinsäuren

2.2.3.1 UV-Spektrometrie

Die Qualität und Quantität der RNA kann anhand ihrer optischen Dichte mittels Spektralphotometrie bestimmt werden. Hierfür wurde der NanoDrop2000 (VWR International) verwendet. Doppelt destilliertes Wasser wurde als Leerwert genutzt, die Messungen wurden bei Wellenlängen von 260 nm, 280 nm und 230 nm durchgeführt. Dabei gibt das A260/280 Verhältnis die Reinheit der RNA an, wobei ein Verhältnis von 1,8-2,0 für pure RNA ohne Proteinverunreinigungen spricht. Um möglichst qualitative Ergebnisse zu erreichen, wurden nur Proben mit diesem Verhältnis verwendet.

2.2.3.2 Gelelektrophorese

Um die aus PCR-Reaktionen, Restriktionsverdauungen und *in-vitro Transkriptionen* entstandenen DNA- und RNA-Fragmente ihrer Größe nach aufzutrennen, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Für die Herstellung des Gels wurde Agarose in 1x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer geschmolzen und mit 0,04 µl/ml Ethidiumbromid (EtBr) versetzt. Dabei variierte die Gelstärke von 1-1,2 %. Die Proben wurden mit Ladepuffer (1xTBE-Puffer mit 20 µl EtBr/l) im Verhältnis 1:10 versetzt und bei 80-150 V 45 Minuten – 1 Stunde auf dem Gel aufgetrennt. Als Größenreferenz diente entweder eine 100 bp oder eine 1 kb Leiter. Die Agarosegele wurden unter UV-Licht mit dem Geldokumentationssystem UVP UVsolo touch (Analytik Jena) analysiert.

2.2.3.3 Sequenzierung

Um die jeweils relevante Gensequenz zu bestätigen, wurden Sanger Sequenzierungen durchgeführt. Dafür wurden die relevanten Sequenzen mittels PCR amplifiziert.

Polymerase-Kettenreaktion *(PCR)*

Zur Amplifikation der DNA-Zielsequenzen wurde folgender PCR-Mix angesetzt:

1 µl DNA

0,75 µl Primer (siehe Anhang Tabelle 1)

0,5 µl Sequenzierpuffer (2,5x)

0,5 µl Big Dye Polymerase

7,2 µl H_2O

10 µl

***PCR*-Zyklus**

Temperatur [°C]	**Dauer**	
96	60s	} 28x
96	10s	
50	8s	
60	4s	

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit 5 µl 3 M Natriumacetat, pH5,2 und 125 µl 100 % Ethanol durch Zentrifugieren der Probe für 20 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit ausgefällt. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 70 %igem Ethanol für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und so gewaschen, getrocknet und anschließend in deionisiertem Formamid resuspendiert. Nach der Sequenzierung mittels Kapillarelektrophorese wurde die Sequenz mit den entsprechenden Referenz-Gensequenzen der NCBI-Gendatenbank abgeglichen.

2.2.4 Primer Design für die Insertsynthese

Um die genspezifischen Inserts, die für die Herstellung der *In Situ*-Hybridisierungssonden benötigt werden, zu amplifizieren, mussten spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer für die PCR designt werden. Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen der Referenzsequenzen von *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* aus der NCBI-Datenbank mit dem Webprogramm ClustalX (Clustal) abgeglichen. Die Sequenzbereiche, die sich am meisten von denen der anderen Natriumkanäle unterschieden, wurden ausgewählt für die Klonierung der RNA-Sondentemplates. Somit sollten Kreuzhybridisierungen aufgrund von Sequenzähnlichkeit/-übereinstimmung reduziert bzw. vermieden werden.

Mit dem Programm Primer3 (Eric S. Lander) wurden passende Primer-Paare selektiert. Dabei wurden die Einstellungen für die Länge der Primer (20-30 bp), der Guanin-Cytosin (GC) –Gehalt (40-60 %) und die gewünschte Länge des Inserts (400-800 nt) festgelegt und alle weiteren Grundeinstellungen des Programms so belassen.

Um die Klonierung des Inserts in den Vektor zu ermöglichen, wurde eine Restriktions-Schnittstelle für KpnI an den Vorwärts- und für SacI an den Rückwärts-Primern jeweils am 5‘-Ende hinzugefügt. Die *multiple cloning site* des Vektors, in die die Zielsequenz eingefügt werden soll, enthält GC-reiche Sequenzen (NotI- und SalI-Schnittstellen), die zu hohen Hintergrund-Signalen führen können (Weth, 1993). Um einen Großteil davon entfernen zu können, mussten geeignete Restriktionsenzyme gewählt werden, damit dieses Herausschneiden erfolgen kann. Folglich wurden die oben genannten Enzyme gewählt, da sie sich in der Nähe der T7- und T3-Promotoren befinden, und somit jeweils am Beginn und Ende der zu entfernenden Sequenz. Mit dem Webprogramm NEB Cutter (Inc.) wurde überprüft, ob die in die Primer integrierten Sequenzen für die Restriktionsschnittstellen KpnI und SacI nicht im zu klonierenden Insert schneiden.

Letztlich wurden die gewählten Primer-Paare mit Hilfe des Programms Netprimer (Biosoft) anhand verschiedener Parameter auf Eignung überprüft. Das Hauptaugenmerk lag dabei auf vergleichbaren Schmelztemperaturen des Primer-Paares, der Abwesenheit von Sekundärstrukturen (sog. *hair pins*) und der Neigung zur Dimerisierung sowie dem Kriterium, dass die Stabilität des 5'-Endes- höher sein sollte als die des 3'-Endes.

Für eine effiziente Restriktion der amplifizierten und zu klonierenden Sonden-Inserts wurden vor den KpnI- und SacI-Schnittstellen noch einige Nukleotide eingefügt, so

genannte Linker-Sequenzen. Dies wurde für die Schmelztemperaturen und die anderen genannten Kriterien berücksichtigt.
Nach jedem Modifikationsschritt wurden die Primersequenzen mit den NCBI-Sequenzen für *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* abgeglichen, um zu prüfen, ob eine Homologie im Mausgenom besteht, die zu einer geringeren Spezifität der RNA-Sonde und einer möglichen Kreuzhybridisierung führen würde.
Die ausgewählten Primer-Paare wurden kommerziell über Biomers (biomers.net) bezogen.
Die für die PCR verwendeten Primer Sequenzen sind in Tabelle 1 im Anhang aufgeführt.

2.2.5 Synthese von Nukleinsäuren

2.2.5.1 cDNA-Synthese durch Reverse Transkription

Die für die Klonierung der Sonden-Templates benötigte komplementäre DNA (cDNA) wurde durch Reverse Transkription mit dem Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit von Thermo Fisher Scientific synthetisiert. Isolierte Gesamt-RNA aus Spinalganglien (siehe Kapitel 2.2.2) diente als Ausgangstemplate. Der PCR-Mastermix wurde gemäß der Gebrauchsanweisung pipettiert. Änderungen wurden bei den letzten Inkubationsschritten vorgenommen, die bei 55 °C für 45 Minuten durchgeführt wurden, anstatt 30 Minuten bei 50 °C. Die cDNA wurde aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Amplifikation des Inserts

Zur Amplifikation der spezifischen Sonden-Templates wurde cDNA (siehe Kapitel 2.2.5.1) als Vorlage verwendet. Die PCR wurde unter Verwendung Gen-spezifischer Primerpaare (Tabelle 1, Anhang) durchgeführt. Für die Amplifikation wurde die Platinum SuperFi-Polymerase gewählt, die aufgrund ihrer 3'-5'-Exonukleaseaktivität eine Korrekturfunktion hat. Darüber hinaus wurde dem PCR-Ansatz (siehe unten) der SuperFi-GC-Enhancer von ThermoFisher Scientific zugesetzt, der für schwierige und GC-reiche Vorlagen entwickelt wurde. Mit Hilfe des Polymerase Tm Calculators (Scientific) konnten die geeigneten PCR-Temperaturen für die Primerpaare bestimmt werden. Die Denaturierung wurde 1 Minute bei 98 °C durchgeführt, gefolgt vom Primer-Annealing

bei 66 °C für 15 sec und der Template-Elongation bei 72 °C. Dieser Zyklus wurde 36-mal wiederholt.
Die amplifizierten Sequenzen wurden mittels Gelelektrophorese (siehe 2.2.3.2) sichtbar gemacht.

PCR-Ansatz

5x Puffer 5 µl
dNTPs 0,5 µl
cDNA 1 µL (51,7 ng)
Super-Fi Polymerase 0,25 µl
SuperFi-GC-Enhancer 5 µl
Primer 2,5 µl (25 pmol)
Ad 25 µl H_2O

2.2.5.3 Synthese der RNA-Sonden

Im ersten Schritt der Herstellung von RNA-Sonden muss das rekombinante Plasmid linearisiert werden. Dazu wurde das rekombinante Plasmid mit KpnI verdaut, um die *antisense*-RNA-Sonden für *Scn9a*, *Scn10a*, *Scn11a* und *Tubb3* herzustellen. Durch Verdau mit SacI wurde das Plasmid auf der anderen Seite linearisiert, um die *sense*-Sonden für die genannten Gene zu erzeugen. Der Verdau wurde bei 37 °C für 2 h durchgeführt. Um die Überhänge zu glätten, wurde die T4-DNA-Polymerase genutzt. Diese Polymerase besitzt einerseits 5´→3‘-Polymeraseaktivität, durch die sie eine Template-abhängige Zweitstrangsynthese an 5´-Überhängen durchführen kann, als auch eine 3´→ 5‘-Exonukleaseaktivität durch die 3´-Überhänge beseitigt werden. Durch Zugabe von dNTPs wird die DNA vor weiterem Abbau geschützt.
Im Thermocycler wurden die Proben für 20 Minuten bei 11 °C inkubiert, danach für 10 Minuten auf 75 °C gebracht zur Enzymdenaturierung und dann auf 4 °C abgekühlt. Um zu kontrollieren, ob das Plasmid vollständig linearisiert wurde, wurden 5 µl des Ansatzes mittels Gelelektrophorese (2.2.3.2) analysiert. Linearisierte Plasmide zeigen eine einheitliche Bande bei der jeweils erwarteten Länge, wobei nicht linearisierte Plasmide häufig zwei oder mehrere Banden bei geringerem Molekulargewicht zeigen.

Die DNA-Extraktion aus dem Gel erfolgte mittels Phenol-Chloroform, die Konzentrationsbestimmung mittels UV-Spektrophotometrie (2.2.3.1). Die RNA-Sonden wurden von den jeweiligen linearisierten Plasmiden durch *in-vitro*-Transkription transkribiert, bei der Digoxigenin-UTPs (DIG RNA Labeling Mix, Roche) in die RNA-Sequenz eingebaut wurden, um die Sonde somit markierbar zu machen. Für die *in vitro*-Transkription der *sense*-Sonde wurde die HiScribe ®T7 Quick-Polymerase sowie 1-200 ng Plasmid, 10X Transkriptionspuffer (2 µl), RNAse Inhibitor (1 U/ µl) und NTP-Puffer (0,5 µl) in einem Ansatz ad 20 µl H_2O verwendet, während die *antisense*-Sonde mittels T3-RNA-Polymerase transkribiert wurde. Nach 2 h bei 37 °C im Thermocycler wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl RNAse-freiem 0,5 M EDTA, pH8 gestoppt. Die RNA-Fällung erfolgte mit 75 µl 100 % EtOH und 5 µl 4 M LiCl bei -80 °C für 30 Minuten. Nach dem Pelletieren der Probe durch Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit (25.000xg) bei 4 °C und Waschen mit 70 % EtOH wurde die RNA nach Lufttrocknung in TE-Puffer, pH7,4 gelöst. Die RNA-Sonden wurden bei -80 °C gelagert. Zur Überprüfung der Integrität der RNA-Sonden wurden je 0,5 µl RNA-Sonde mit 10 µl de-ionisiertem Formamid und 7,5 µl RNAse-freiem H_2O für drei Minuten bei 100 °C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 2 µl Ladepuffer wurden die Sonden mittels Gelelektrophorese (2.2.3.2) in 1 %igem Agarosegel aufgetrennt und überprüft.

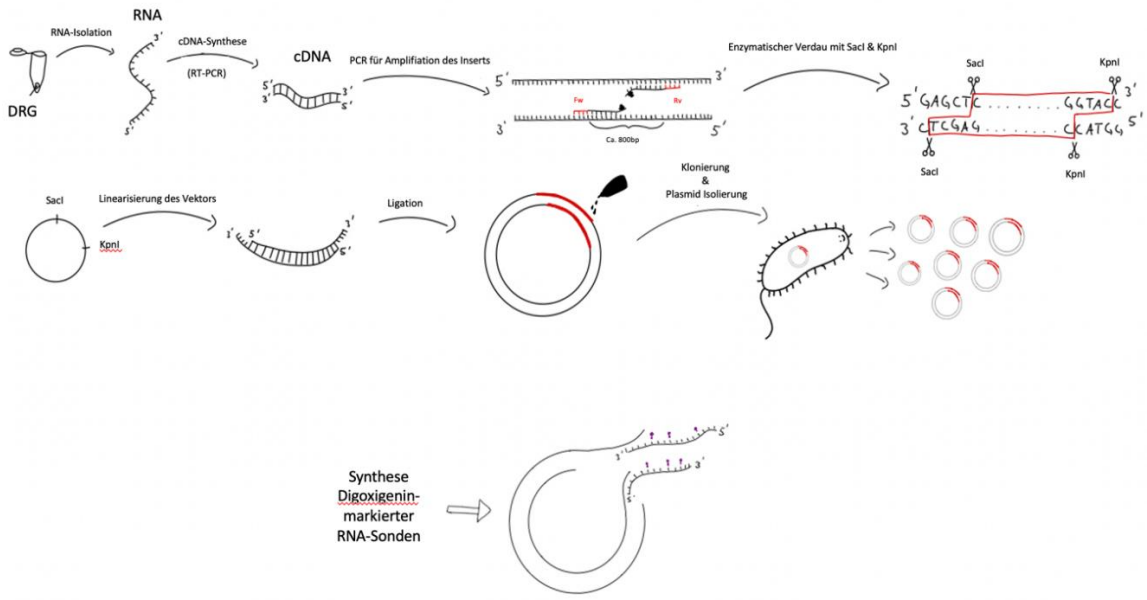


Abbildung 2.1*:* **Synthese der RNA-Sonden.** Schematische Darstellung der verschiedenen Schritte zur Herstellung der RNA-Sonde; eigene Abbildung

2.2.6 Enzymatische Manipulation von DNA und Plasmiden

2.2.6.1 Restriktionsverdau

Für die *In Situ*-Hybridisierung wurde das pBlueScript SK II (-) Plasmid als Vektor zum Klonieren der gewünschten Sonden-Insert-Sequenzen verwendet. Um sicher zu gehen, dass das richtige Plasmid verwendet wird, wurde dieses vor Verwendung sequenziert (2.2.3.3). Danach wurde ein doppelter Verdau mit den zu den Sonden-Templates kompatiblen Restriktionsenzymen KpnI und SacI entsprechend den Herstellerangaben für Fast Digest-Enzyme durchgeführt.

Es wurden 3 µl von jedem Restriktionsenzym, 5 µl Fast Digest Buffer, 1 µl Fast Alkaline Phosphatase sowie 5 µg pBlueScript SK II (-) Plasmid-DNA in einem Eppendorf Tube ad 50 µl H_2O gemischt und für 2 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz mittels Gelelektrophorese (2.2.3.2) analysiert. Das linearisierte Plasmid wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mittels DNA-Gelextraktion mit dem Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit extrahiert.

Um den Einbau der Basenabfolge und die anschließende Ligation zu ermöglichen, wurde das Insert mit denselben Restriktionsenzymen verdaut wie das Plasmid. Da die Enzyme die DNA innerhalb eines Palindroms schneiden, entstehen so genannte "*sticky ends*". Auf diese Weise passen die DNA-Basen von zwei gleich verdauten Sequenzen perfekt zusammen und können wieder einen durchgehenden DNA-Strang bilden. Diese Prozedur wurde mit 0,5 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme, 50 µl Insertprodukt aus der PCR, 6 µl 10x fast Digest Puffer, sowie H_2O in 60 µl durchgeführt. Der gesamte Versuch wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.

2.2.6.2 Ligation

Danach wurde die Ligation von Plasmid und Insert durchgeführt. Die Bildung der Phosphodiester-Bindung zwischen dem 3'- und dem 5'-Ende wurde durch die T4-DNA-Ligase katalysiert. Um den Einbau der Basenabfolge und die anschließende Ligation zu ermöglichen, wurde das Insert mit denselben Restriktionsenzymen verdaut wie das Plasmid. Da die Enzyme die DNA innerhalb eines Palindroms schneiden, entstehen so genannte "*sticky ends*". Auf diese Weise passen die DNA-Basen von zwei gleich

verdauten Sequenzen perfekt zusammen und können wieder einen durchgehenden DNA-Strang bilden. Diese Prozedur wurde mit 0,5 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme, 50 µl Insertprodukt aus der PCR, 6 µl 10x Fast Digest Puffer, sowie H_2O in 60 µl durchgeführt. Der gesamte Versuch wurde bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert.
Das Verhältnis Insert/Plasmid wurde auf 3:1 festgelegt. Der NEB Calculator (Biolabs) wurde verwendet, um die genauen benötigten DNA-Mengen zu berechnen. Gleichzeitig wurde die Ligation unter denselben Bedingungen ohne Insert durchgeführt, welche als Negativkontrolle diente.

2.2.6.3 Transformation von E.coli

Um die gewünschte genetische Sequenz ordnungsgemäß klonieren zu können, musste das rekombinante Plasmid von einem zur Replikation fähigen Wirt aufgenommen werden. In diesem Fall wurden Top10 *E. coli*-Bakterien als Wirtsorganismus verwendet, denen das Ligationsprodukt zugegeben und im Anschluss 20 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Anschließend wurde die Hitzeschockmethode angewandt, um zur Plasmidaufnahme Poren in der bakteriellen Zellmembran zu erzeugen. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für eine Minute durchgeführt. Danach wurden die Bakterien für 2-3 Minuten auf Eis gestellt und 250 µl SOC-Medium hinzugefügt. Nach Schütteln der Probe für 1 h bei 37 °C im Heizblock wurde die Bakterien-Suspension auf eine Ampicillin-haltige Agarplatte ausplattiert, um für transformierte Bakterien zu selektieren, die das rekombinante Plasmid aufgenommen haben. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert/kultiviert.

2.2.6.4 Kultur von E.coli zur Gewinnung rekombinanter DNA und Plasmidisolierung

Am nächsten Morgen wurden von der Agarplatte je zehn Klone pro Gen gepickt und in jeweils 2 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert.
Aus den Flüssigkulturen wurden die Plasmide mit der TELT-Methode isoliert. Dazu wurden 2-4 ml *E.coli*-Flüssigkultur wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und eine Minute bei 16000x g zentrifugiert, um die Bakterien zu pelletieren. Nach Verwerfen des Überstandes wurden zum Pellet 200-400 ml TELT-Puffer zugegeben und durch Vortexen resuspendiert. Dann wurden 20-40 µl Lysozym (10 mg/ml in H_2O) hinzugefügt,

um die Zellmembran der Bakterien zu lysieren. Die Suspension wurde sofort für 1 min auf 100 °C erhitzt und dann für zwei bis fünf Minuten auf Eis gestellt. Durch 15-minütiges Zentrifugieren der Probe bei 16000x g und Überführen des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurden die Zellrückstände entfernt. Durch Zugabe des doppelten Volumens 100 %igen Ethanols (EtOH) und zehn-minütiges Pelletieren bei 16000xg bei RT wurde die Plasmid-DNA ausgefällt. Schließlich wurde das Plasmid-DNA-Pellet fünf Minuten mit 70 %igem Ethanol bei 16000xg gewaschen, anschließend luftgetrocknet und dann in 30 µl H_2O gelöst.

2.2.6.5 Identifizierung positiver Klone

Durch einen analytischen Verdau wurden die rekombinanten Plasmide auf erfolgreiche Rekombination und korrekte Restriktionsstellen überprüft. Da die Enzyme KpnI und SacI für den Verdau verwendet wurden, wurde 1 µl des Plasmids mit 0,25 µl jedes Enzyms, 1 µl Fast Digest-Puffer und 10 µl H_2O für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die verdauten Fragmente wurden mittels Gelelektrophorese (2.2.3.2) aufgetrennt.
50 µl der aufbewahrten Flüssigkulturen der positiven Klone wurden mit 3 ml LB-Medium + Ampicillin (500 µl pro 500 ml LB-Medium) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Das ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit wurde für die anschließende Plasmidisolierung verwendet.

Um zu bestätigen, dass die Sequenzen der Inserts in den rekombinanten Plasmiden korrekt sind, wurden die Plasmide unter Verwendung des M13-Vorwärtsprimers sequenziert (2.2.3.3). Nach der Sequenzierung wurden die Sequenzen mit den entsprechenden Referenz-Gensequenzen der NCBI-Gendatenbank abgeglichen.

Da für die Herstellung der RNA-Sonden ausreichend Plasmid-DNA benötigt wird, wurde eine Re-Transformation mit den rekombinanten Plasmiden durchgeführt. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mit dem NucleoBond® Xtra Midi Kit.

2.2.7 Dot-Blot zur Ermittlung der Markierungseffizienz

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz, die je nach Sequenz von Sonde zu Sonde variieren kann, wurde eine Dot-Blot-Analyse durchgeführt. Dafür wurden auf eine Nylonmembran RNA-Sonden in verschiedenen Konzentrationen (1 ng/µl, 100 pg/µl, 10 pg/µl) geblottet. Nach einer zehnminütigen Inkubation mit Maleinsäure-gepufferter Saline (MaBS) wurde die Membran 1 h mit 2 % Blocking Reagenz in MaBS inkubiert. Anschließend wurde ein Anti-Digoxigenin-Antikörper (Roche, 1:1000) in 2 %igem Blocking-Reagenz für 30 Minuten zugegeben. Schließlich wurde die Nylonmembran dreimal mit MaBS gewaschen, der Dot-Blot in 10 ml Reaktionspuffer mit 200 µl BCIP/NBT-Stock Lösung bis zur Farbentwicklung inkubiert.

2.2.8 Durchführung der *In Situ* Hybridisierung

Um die Zielstrukturen, in diesem Fall die mRNA der Natriumkanäle, *in situ* in Spinalganglien lokalisieren zu können, wird eine *In Situ*-Hybridisierung durchgeführt. Dabei werden die *antisense*-RNA-Sonden auf die Gewebeschnitte gegeben, sodass die komplementären RNA-Sonden mit der mRNA im Gewebe hybridisieren können. Auf diese Weise werden individuelle, den jeweiligen Natriumkanal exprimierende/positive Zellen gefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar. Die *In Situ*-Hybridisierung wurde unter streng RNAse-freien Bedingungen (2.2.1) durchgeführt.

2.2.8.1 Herstellung von Gefrierschnitten und Hybridisierung

Gefrierschnitte (14 µm) von unfixierten Spinalganglien wildtypischer sowie von *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen wurden bei -20 °C hergestellt (Kryotom 3050, Leica) und direkt bei 55 °C auf einer Heizplatte für etwa 1 h getrocknet, um eine schnelle Inaktivierung von RNAsen zu bewirken und somit mRNA-Degradation vorzubeugen. Im ersten Schritt des *In Situ*-Hybridisierungsprotokolls wurden die Gewebeschnitte auf einer Heizplatte bei 55 °C aufgetaut und dann zehn Minuten in frisch hergestelltem 4 % PFA in PBS, pH 7,4 fixiert. Nach fünfminütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte zehn Minuten in 0,2 M HCl getaucht, um die Membranen zu destabilisieren. Nach einem weiteren fünfminütigen Waschschritt in MaBS wurden die Gewebeschnitte für zehn Minuten in

0,1 M Triethanolamin/HCl, pH8,0 mit 5 mM Essigsäureanhydrid überführt. Dieser Schritt dient der Verhinderung einer unspezifischen Bindung von negativ geladenen RNA-Sonden an protonierte Aminogruppen im Gewebeschnitt durch deren Acetylierung. Danach wurden die Objektträger für >5 Minuten in PBS gewaschen. Für die Hybridisierung wurden 3 ng/µl RNA-Sonde in 50 % Formamid/5x SSC denaturiert. Außerdem enthält die Hybridisierungslösung 0,4 mg/ml Torula-RNA und 0,1 mg/ml tRNA (Transfer-RNA aus Bäckerhefe) um den Hintergrund zu minimieren. Die RNA-Sonde wurde drei Minuten bei 100 °C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Diese Denaturierung gewährleistet eine optimale Hybridisierung durch von Minimierung RNA-typischer Sekundärstrukturen. Nach Zugabe von 5x Denhardt's Reagenz wurde die Lösung bei 70 °C gehalten. Whatman-Papier wurde in eine Metallbox gelegt und mit 5xSSC und 50 % Formamid befeuchtet. Die Objektträger wurden mit 145 µl Hybridisierungslösung bedeckt und über Nacht bei Hybridisierungstemperatur inkubiert. Die Hybridisierungstemperaturen für die verschiedenen RNA-Sonden wurden anhand folgender Formel berechnet:

$T_m^{Dig} = 79{,}8\ °C + 18{,}5 \log c_{cm} + 58{,}5\ x_{GC} + 11{,}8\ x_{GC}^2 - 820/L - 0{,}35\ c\%_{FA} - 25\ °C$ (Wahl et al., 1987)

Die letztlich verwendeten Hybridisierungstemperaturen für die verschiedenen RNA-Sonden können der Tabelle 2 im Anhang entnommen werden.

2.2.8.2 Detektion von RNA-Sonden

Die mit Digoxigenin (Dig) markierten RNA-Sonden wurden mit einem Anti-Dig-F_{ab}/alkalische Phosphatase-Antikörper nachgewiesen. Nach dem Waschen der Objektträger wurden die Gewebeschnitte eine Minute in 5x SSC gewaschen und die Stringenz der Waschschritte schrittweise erhöht, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Die Objektträger wurden 30 Minuten im Wasserbad bei HT zunächst in 50% FA/2xSSC und anschließend 1 h in 0,2x SSC gewaschen. Nach 15 Minuten in 0,2x SSC bei Raumtemperatur und fünf Minuten in MaBS wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Antikörper mit 2% igem Blockierungsreagenz in MaBS für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Dann wurden 145 µl Anti-Dig-Fab/alkalische Phosphatase-Antikörper (1:750) in 2% igem Blockierungsreagenz in MaBS auf die hybridisierten

Objektträger gegeben, mit Parafilm abgedeckt und in einer feuchten Kammer mit Reaktionspuffer für 30 Minuten inkubiert. Nach drei zehnminütigen Waschschritten in MaBS zum Entfernen überschüssiger Antikörper wurden endogene alkalische Phosphatasen durch fünfminütige Inkubation in Reaktionspuffer, pH 9.5 mit einer Spatelspitze Levamisol/Tetramisol inhibiert. Zur Visualisierung der RNA-RNA-Hybride wurden die Gewebeschnitte mit Substratlösung (NBT/BCIP in RP, pH9.5) bedeckt und in einer feuchten Kammer inkubiert, bis eine deutliche Farbentwicklung zu erkennen war. Die Detektionszeit war für jede Sonde variabel, je nach Expressions- und Markierungsgrad. Anschließend wurden die Objektträger >5 Minuten in PBS gewaschen, zehn Minuten in 4 %igem PFA nachfixiert und dann erneut >5 Minuten in PBS gewaschen. Schließlich wurden die Präparate mit Mowiol eingedeckelt. Lichtmikroskopische Aufnahmen der Gewebeschnitte wurden mit dem Slide Scanner Fritz (Precipoint) aufgenommen.

2.2.9 Immunfluoreszenzfärbungen

Die für Immunfärbungen genutzten Gewebe wurden wie unter 2.2.2 beschrieben präpariert. Es wurden transversale Kryostatschnitte (14 µm) entweder ganzer Mäuse (P0) oder der Wirbelsäule (P6) hergestellt. Pro Altersstadium wurden je drei Tiere präpariert und pro Tier drei Schnitte ausgezählt. Das Gewebe auf den Objektträgern wurde zehn Minuten mit 4 % PFA/PBS, pH 7,4 fixiert und dann vier mal fünf Minuten mit PB-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 1 h in PB/ 0,25 % Triton-X100/5 % Pferdeserum blockiert und über Nacht bei 4 °C mit in Blocking-Buffer verdünnten primären Antikörpern inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend dreimal zehn Minuten mit PB-Puffer gewaschen. Sekundäre Antikörper wurden in Blocking-Buffer verdünnt und die Objektträger damit 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kernfärbung wurde Hoechst-Färbelösung verwendet. Schließlich wurden die Objektträger drei mal zehn Minuten mit PBS gewaschen und dann mit Fluoromount-G eingedeckt. Die Immunmarkierungen wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Observer z.1 ApoTome.2 fluorescence, Carl Zeiss) aufgenommen. Für Antikörperinformationen und eingesetzte Verdünnungen siehe Tabelle 3 im Anhang.

3 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, spezifische *antisense*-RNA-Sonden für die Gene *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* der Spezies *Mus musculus* herzustellen und zu validieren. Aufgrund der sehr hohen Sequenzhomologie, die diese Gene aufweisen, war die Auswahl und Identifikation von Sequenzbereichen ohne Homologie von großer Bedeutung, um möglichst spezifische Sonden zu generieren und Doppelmarkierungen zu verhindern. Die cDNA der ausgewählten Sequenzen wurde mittels reverser Transkription und Polymerasekettenreaktion synthetisiert. Durch Ligation wurden die generierten Genfragmente in den Vektor pBluescript SK II (-) kloniert und das entstandene rekombinante Plasmid in *E.coli* Bakterien transformiert. RNA-Sonden wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt, wobei das rekombinante Plasmid jeweils als Matrize diente. Mithilfe dieser RNA-Sonden sollte die Expression von *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* mRNA in Gewebeschnitten von Spinalganglien sichtbar gemacht und so die Pathophysiologie der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mutation in *Scn11a*$^{+/L799P}$-*knock-in* Mäusen näher untersucht werden. Unveröffentlichte Daten (Schmidt, 2024) konnten zeigen, dass es in adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen zu einem fast vollständigen/kompletten Verlust von IB4-positiven, nicht-peptidergen C-Nozizeptoren in Spinalganglien sowie den entsprechenden Faserprojektionen in *Lamina* I und II im Hinterhorn des Rückenmarks kommt. Des Weiteren wurde eine verminderte Expression von Markergenen nicht-peptiderger sensorischer Neuronen (NP1-3), welche sich mittels PlexinC1 anfärben lassen, gefunden (Lürkens, 2022). Da Nav1.9 (*Scn11a*) in NP-Neuronen stark exprimiert wird (98), stellt sich die Frage, ob eine veränderte *Scn11a*-Expression *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen mit dem Verlust des IB4-Signals und somit von NP-Neuronen korreliert. Um diese Frage zu adressieren, sollten erste Übersichtsfärbungen mit den hergestellten Sonden erfolgen. Dabei sollten mögliche Unterschiede in der *Scn9a*-, *Scn10a*- und *Scn11a*-Expression in Wildtyp- und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen dargestellt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob eventuelle Unterschiede bereits pränatal oder erst postnatal auftreten und damit eher auf eine embryonale Entwicklungsstörung oder einen degenerativen Verlust dieser Zellpopulation hinweisen. Mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen sollte festgestellt werden, ob die in adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen fehlenden PlexinC1-positiven Neuronen bereits ab Geburt (P0) fehlen, oder sich dieser Phänotyp erst im postnatalen Verlauf manifestiert. Hierfür wurden zusätzlich

Färbungen mit spezifischen Markern für die TrkA-positiven/ Runx1-negativen C-Nozizeptoren (NP-, PEP-, TH-Cluster) durchgeführt für eine quantitative Analyse. Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Apoptosemarker Cleaved Caspase3 sollten Aufschluss darüber geben, ob der Verlust von PlexinC1-positiven Zellen durch eine vermehrte Apoptose bedingt sein könnte. *In Situ*-Hybridisierungen mit *antisense*-RNA-Sonden zum Nachweis der mRNA der drei Natriumkanäle *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* sollten einen Überblick über die embryonale und postnatale Expression dieser Kanäle geben.

3.1 Herstellung der Sonden-Templates

Gesamt-RNA wurde aus wildtypischen Spinalganglien isoliert, da diese eine besonders hohe Expression von *Scn9a, Scn10a und Scn11a* mRNA aufweisen (Bennett et al., 2019). Die RNA-Konzentration wurde auf dem NanoDrop mittels Spektralphotometrie bestimmt und betrug 1847,6 ng/µl. Ein gemessenes A260/A280-Verhältnis von 2,0 sowie ein A_{260}/A_{280}-Verhältnis von 2,1 zeigten eine ausreichend kontaminationsfreie RNA an. Während das A_{260}/A_{280}-Verhältnis einen Hinweis auf mögliche Proteinkontaminationen gibt, kann über das A_{260}/A_{230}-Verhältnis auf Kontaminationen durch andere Stoffe wie Salze oder Phenol aus dem Aufreinigungsprozess geschlossen werden (Cicinnati et al., 2008). Zur Herstellung einer cDNA wurden 1 – 5 µg dieser Gesamt-RNA revers transkribiert und als Vorlage für die Amplifikation der Sonden-Templates (Inserts) genutzt (Abb. 3.1). Um zu überprüfen, ob die amplifizierte Sequenz mit der erwarteten Sequenzlänge übereinstimmt, wurde das PCR-Produkt für jedes Gen auf ein Gel aufgetragen. Wie in Abbildung 3.1 zu sehen ist, entsprach die Länge der Inserts den erwarteten Größen von 646 bp (*Scn9a)*, 418 bp (*Scn10a*) und 582 bp (*Scn11a*).

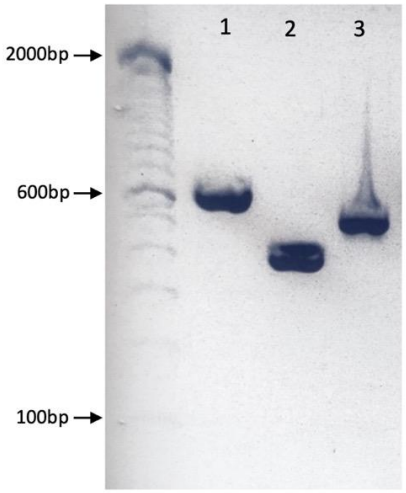


Abbildung 3.1: Gelelektrophorese der PCR-Inserts für *Scn9a* (1), *Scn10a* (2), *Scn11a* (3). Erwartete Längen für *Scn9a*: 646 bp, *Scn10a*: 418 bp, *Scn11a*: 582 bp; auf 2 % Agarosegel; DNA-Standard/Marker: 100 bp Leiter.

3.2 Herstellung des Vektors

Das Plasmid pBlueScript SK II (-), welches als Vektor für die Herstellung der RNA-Sonden diente, wurde mit den Restriktionsenzymen KpnI und SacI verdaut und somit linearisiert. Die Linearisierung des Plasmids wurde durch eine Gelelektrophorese bestätigt, welche in Abbildung 3.2 A dargestellt ist. Als Kontrolle wurde das unverdaute bzw. nicht linearisierte Plasmid aufgetragen. Durch den Restriktionsverdau wurden sogenannte *sticky end*-Überhänge kreiert, die zu den Überhängen des hergestellten Inserts komplementär sind und somit eine Vektor-Insert-Ligation ermöglichten. Nach Transformation und Vervielfältigung in kompetenten *E.coli*-Bakterien wurden einzelne Bakterienkolonien gepickt, Plasmid-DNA isoliert und die erfolgreiche Klonierung mittels analytischem Restriktionsverdau überprüft (Abbildung 3.2 C). Dabei wurden die zuvor isolierten Plasmide mit den Restriktionsenzymen SacI und KpnI verdaut, so dass die rekombinanten Plasmide an den eingebauten spezifischen Nukleotidsequenzen geschnitten wurden, falls der Einbau dieser wie gewünscht stattgefunden hatte. Folglich konnte man durch eine Gelelektrophorese sehen, welche Transformationsansätze erfolgreich waren, und die erwarteten Restriktionsfragmente zeigten. Wie in Abbildung 3.2 C zu sehen ist, war von je 6 gepickten Klonen für *Scn9a* und *Scn10a* jeweils ein Klon positiv (*Scn9a*: Klon #2; *Scn10a*: Klon #5), während es drei positive Klone (#3, 4, 6) für die rekombinanten Plasmide von *Scn11a* gab. Durch eine Sanger-Sequenzierung wurde die Sequenz der rekombinanten Plasmide final auf Restriktionsstellen und Mutationen geprüft. Abbildung 3.2 B zeigt schematisch den Aufbau des rekombinanten Plasmids, hier am Beispiel von *Scn9a* dargestellt.

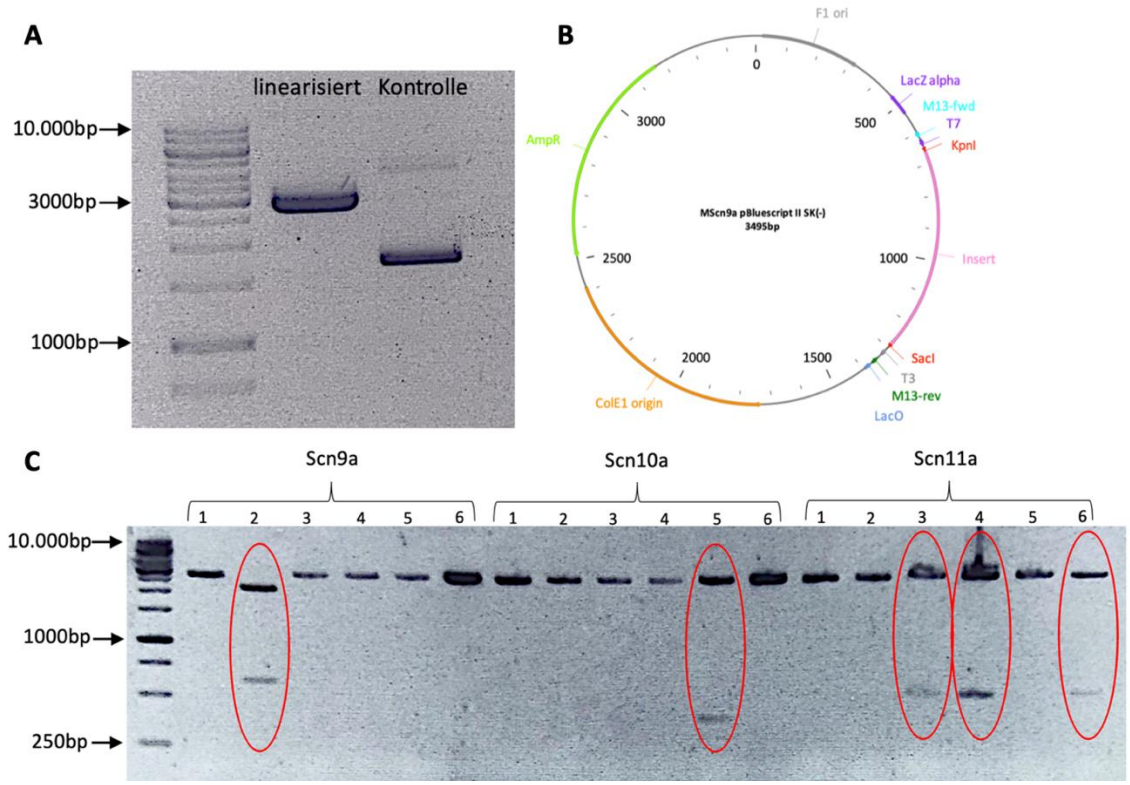


Abbildung 3.2: Herstellung des Vektors. *A*: Gelelektrophorese von linearisiertem pBlueScript SK II (-) Plasmid (2963 bp) mit ungeschnittenem Plasmid als Kontrolle (oben Strangbrüche, unten *supercoiled* Struktur) auf 0,8 % Agarosegel, 1 kb Leiter B: schematische Darstellung des rekombinanten Plasmides pBlueScript II SK(-) am Beispiel von *Scn9a*; AmpR (grün): Ampicillin Resistenz, F1 ori (grau): Replikationsursprung, LacZ alpha (lila): für Expression des Proteins Beta- Galactosidase notwendig, M13fwd: M13 forward Primer, T7 (lila): T7 Promotor für T7-Polymerase, KpnI (orange): Schnittstelle für KpnI, Insert (rosa): eingefügte Sequenz (hier für *Scn9a*), SacI (rot): Schnittstelle für SacI, T3 (grau): T3 Promotor für T3 Polymerase, M13-rev (grün): M13 reverse Primer, LacO (blau): Bindungsstelle für Lactose-Repressor, ColE1 origin (orange): Replikationsursprung für ColE-Plasmid C: Gelelektrophorese des analytischen Verdaus der rekombinanten Plasmide für *Scn9a*, *Scn10a*, *Scn11a*; erfolgreiche Transformationsansätze bei *Scn9a* (2), *Scn10a* (5), *Scn11a* (3,4,6); erwartete Länge der herausgeschnittenen Fragmente für *Scn9a*: 632 bp *Scn10a*: 403 bp *Scn11a*: 543 bp; 1 % Agarosegel; 1 kb Leiter

3.3 Überprüfung der Digoxigenin-Markierungseffizienz der RNA-Sonden

Die fertigen RNA-Sonden wurden mit Hilfe eines *Dot-Blots* auf ihre Markierungseffizienz überprüft zur Bestimmung der einzusetzenden Sonden-Konzentration. Verschiedene Konzentrationen der RNA-Sonden wurden aufgetragen und die Stärke der Färbung beurteilt. Diese kann je nach Sequenz und Sonde unterschiedlich sein und gibt Hinweise auf die Empfindlichkeit der Hybridisierung und mögliche unspezifische Hintergrundsignale, welche für die spätere Interpretation der Färbungen wichtig sind. Folglich gibt der *Dot-Blot* Auskunft über die Stärke der Färbung in den späteren *In Situ*-Hybridisierungen mit den jeweiligen Sonden. Sollte eine Sonde beispielsweise eine

besonders schwache Markierungseffizienz haben, kann man die Konzentration dieser erhöhen. Wie man in Abbildung 3.3 sehen kann, ist die Signalintensität für alle Sonden bei 1 ng aufgetropfter Sonde am stärksten und nimmt mit abnehmenden Konzentrationen erwartungsgemäß ab. Die drei hergestellten Sonden unterscheiden sich nur minimal in ihrer Markierungseffizienz, wobei die RNA-Sonde für *Scn10a* ein etwas stärkeres Signal aufweist. Bei je 10 pg der RNA-Sonden für *Scn9a* und *Scn11a* ist keine Markierung mehr sichtbar, bei *Scn10a* hingegen ist noch eine leichte Färbung sichtbar. Um eine ausreichend starke Färbung in den *In Situ*-Hybridisierungen zu erreichen, wurden diese mit einer etwas höheren Konzentration (3 ng/µl statt 1 ng/µl) durchgeführt, da die mRNA-Moleküle im Gewebe für die Sonden nicht so leicht zugänglich sind wie die auf die Nylonmembran gespottete RNA.

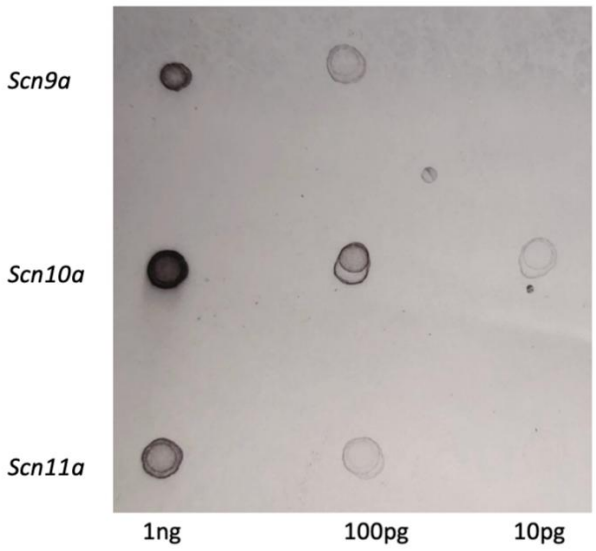


Abbildung 3.3: Dot Blot auf Nylonmembran zur Überprüfung der Markierungseffizienz der RNA-Sonden Scn9a, *Scn10a, Scn11a.* Auftrag der Sondenmengen von jeweils 1 ng, 100 pg, 10 pg.

3.4 *Scn11a*-LP Tiere zeigen in *In Situ*-Hybridisierung ab dem postnatalen Tag 0 eine deutlich verringerte Expression des Nav1.9-Gens

Um die Expression der für die Schmerzweiterleitung relevanten spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 in Spinalganglien und Rückenmark beurteilen zu können, wurden die generierten RNA-Sonden eingesetzt. In einer Zeitreihe wurden von Embryonaltag E13.5 bis ins adulte Stadium wildtypische mit heterozygoten Tieren verglichen.

3.4.1 Die generierten RNA-Sonden zeigen eine hohe Sensitivität und Zielgen-Spezifität

Um die hergestellten Sonden zu validieren, wurde jeweils eine *in Situ*-Hybridisierung mit der *antisense*-Sonde, welche komplementär zu der Zielsequenz ist, als auch mit der *sense*-Sonde, deren Sequenz identisch mit der Zielsequenz ist durchgeführt. Die Färbungen mit der *sense*-Sonde zeigten keine spezifischen Färbungen, während bei jenen mit den *antisense*-Sonden spezifische Signale zu sehen sind (Abbildung 3.4.1). Alle Sonden für die Kanalproteine färben spezifisch Nervenzellen an, während die morphologisch differenzierbaren Fasertrakte kein Signal zeigen.

Morphologisch kann man in den *In Situ*-Färbungen sehen, dass sich die Zellen in ihrer Größe unterscheiden. Während im Spinalganglion Zellen mit großem Soma vor allem für die Propriozeption verantwortlich sind, stellen die kleinen Zellen hauptsächlich unmyelinisierte sensorische C-Fasern beziehungsweise Nozizeptoren dar (Landy et al., 2021). Die Kanalproteine Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 werden im Spinalganglion mehrheitlich von nicht-peptidergen sensorischen Fasern exprimiert (Kiehn, 2006, Minett et al., 2012).

Nav1.7 Färbungen im Spinalganglion zeigten, dass diese mehrheitlich in kleinen Neuronen, aber auch in einigen großen Neuronen vorhanden sind (Dib-Hajj et al., 2010). Während die kleinen Zellen mehrheitlich ein starkes Signal zeigen, ist eine etwas schwächere Färbung nur bei manchen größeren Zellen zu sehen (Abbildung 3.4.2 A).

Auch das Kanalprotein Nav1.8 ist überwiegend in den kleinen Neuronen des Spinalganglions exprimiert, allerdings ist es auch in denen mittlerer Größe zu finden

(Dib-Hajj et al., 2010). Die durch die *In Situ*-Hybridisierung gefärbten Zellen sind klein bis mittelgroß, während die Zellen mit großem Zellsoma kein Signal zeigen (Abbildung 3.4.3 B).

Im Gegensatz zu den beiden zuvor genannten Kanalproteinen wird Nav1.9 ausschließlich von kleinen Zellen im Spinalganglion exprimiert (Dib-Hajj et al., 2010). Die Zellen, die eine starke Hybridisierung mit der *Scn11a* Sonde aufweisen, haben ausschließlich einen kleinen Durchmesser, während eine Färbung der größeren Zellen durch diese Sonde ausbleibt (Abbildung 3.4.4 C).

Beta-3-Tubulin (Tubb3) ist Bestandteil der Mikrotubuli im Nervengewebe, welche sowohl für Zellteilung, Zelltransport als auch die Stabilität des Zytoskelettes eine tragende Rolle spielen (Mariani et al., 2015). Die *in Situ*-Hybridisierung mit der RNA-Sonde für *Tubb3* färbt Nervengewebe an. So sind neben dem Rückenmark (RM) auch beidseitig die Spinalganglien (G) zu sehen. Auch hier zeigt die *sense*-Sonde wie erwartet keinerlei Hybridisierungssignal.

Betrachtet man die Unterschiede in der Signalintensität nach Hybridisierung, so spiegeln sich die Ergebnisse des *DotBlots* (siehe Abb. 3.3) wider. Die Färbungen mit der *Scn10a* Sonde sind etwas stärker und intensiver im Vergleich zu den anderen beiden Sonden.

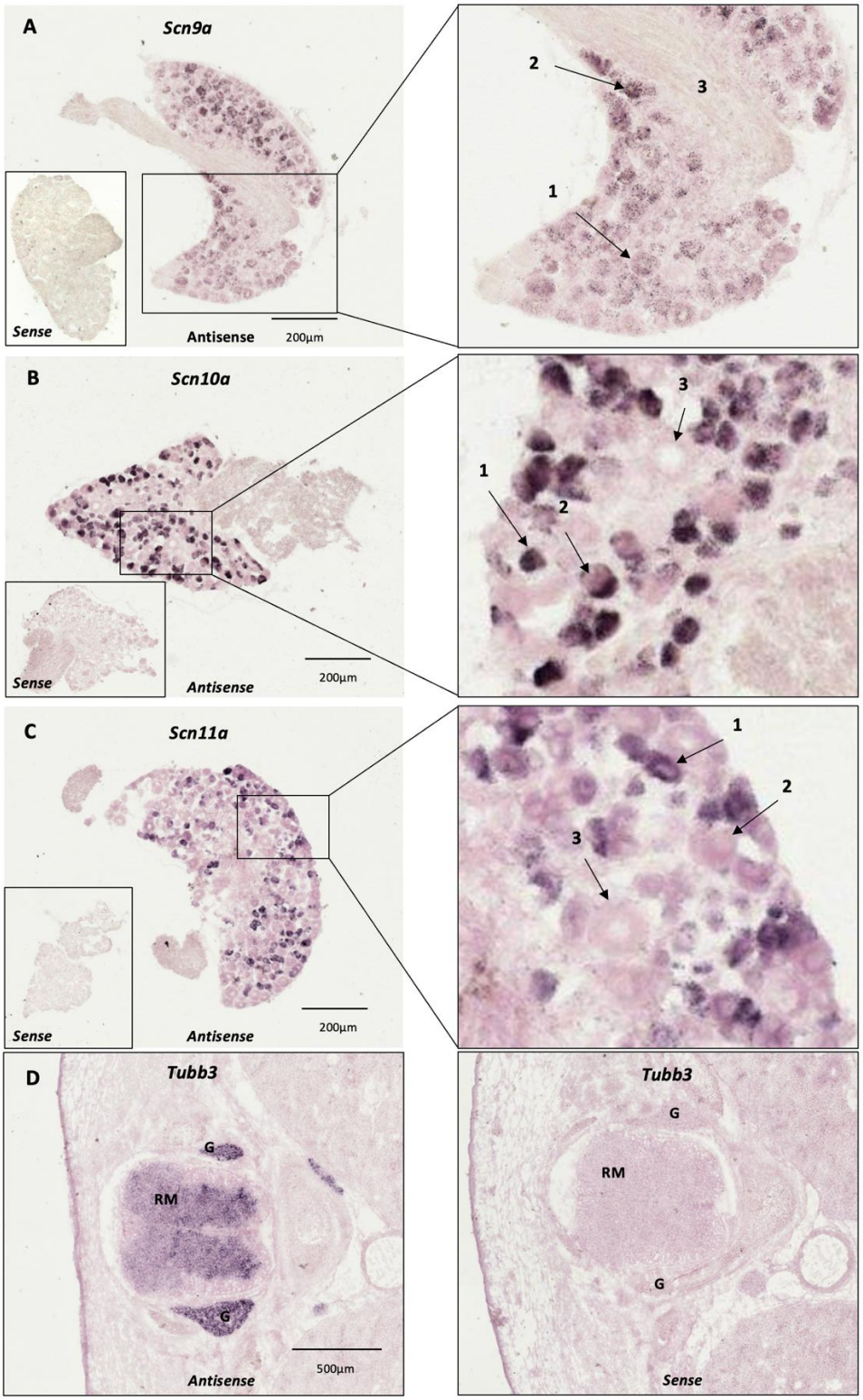


Abbildung 3.4.1*:* Validierung der hergestellten *sense* und *antisense* Sonden. Für *Scn9a, Scn10a, Scn11a* im Spinalganglion der adulten wildtypischen Maus; für *Tubb3* im transversalen Rückenmark eines wildtypischen E13.5 Embryos; RM=Rückenmark G=Spinalganglion; Maßstab 200 µm für adulte Schnitte, 500 µm für E13.5 **A**: ISH mit der *Scn9a*/Nav1.7 *antisense*-Sonde; 1: große Gefärbte Zelle Durchmesser: 20 µm, 2: kleine Zelle: 12 µm, 3: ungefärbte Gewebsfasern

B: ISH mit der *Scn10a*/Nav1.8 *antisense*-Sonde; 1: kleine gefärbte Zelle: 8 µm, 2: mittelgroße gefärbte Zelle ca.: 13,6 µm, 3: große ungefärbte Zelle ca.: 21,6 µm

C: ISH mit der *Scn11a*/Nav1.9 *antisense*-Sonde; 1: kleine gefärbte Zelle: 9,6 µm 2: mittelgroße ungefärbte Zelle: 13,8 µm 3: große ungefärbte Zelle: 19,4 µm

D*:* ISH mit der *Tubb3 antisense*- und *sense*-Sonde; *antisense*-Sonde färbt Spinalganglien und graue Substanz des RM an; Verstärkte Färbung der Neurone im Vorderhorn des RM; sense-Sonde zeigt keine spezifische Färbung von Gewebe

3.4.2 *In Situ* Hybridisierungen der verschiedenen Altersstadien

Wie die Ergebnisse von A. Schmidt und N. Haag (Schmidt, 2024) zeigen, gibt es in adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$ -Mäusen eine signifikante Reduktion IB4- und PlexinC1-positiver Zellen. Da keine spezifischen Antikörper für *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* existieren, wurde mit den generierten RNA-Sonden eine *In Situ*-Hybridisierung durchgeführt. Dabei sollte untersucht werden, ob im Spinalganglion der adulten Maus ebenfalls Expressions-Unterschiede des mutierten Kanals Nav1.9 zu sehen sind. Des Weiteren sollte die *In Situ*-Hybridisierung zeigen, ob eventuell vorhandene Unterschiede bereits embryonal zu sehen sind, oder sich erst postnatal phänotypisch etablieren. Dabei sollen die Färbungen nur grobe Hinweise geben, um den Fokus in der weiteren Forschung entweder auf embryonale oder postnatale Entwicklungsstörungen setzen zu können.

Das erste Stadium, in dem eine Hybridisierung mit den Sonden für *Scn9a, Scn10a* und *Scn11a* durchgeführt wurde, ist das Embryonalstadium E13.5. Dieses Stadium wurde gewählt, da die Nozizeptoren zwischen E9.5 und E13.5 geboren werden (Landy et al., 2021). Wie in den Abbildungen 3.4.2-3.4.4 zu sehen ist, zeigt die *In Situ*-Hybridisierung am Embryonaltag E13.5 keine deutlichen Unterschiede bezüglich der Farbintensität und Anzahl angefärbter Zellen.

Anders verhält es sich hingegen im postnatalen Stadium P0. Hier zeigt sich in der *In Situ*-Hybridisierung (Abbildung 3.4.4) ein deutlicher Unterschied bei der Hybridisierung mit *Scn11a*, wo sich das Signal in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus im Gegensatz zum Wildtyp deutlich verringert zeigt. Keine deutlichen Unterschiede scheint es bei der Färbung für *Scn9a* zu geben. Bei der Hybridisierung mit der *Scn10a*-Sonde scheint die Intensität und Anzahl der gefärbten Zellen in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus leicht verringert.

Die *In Situ*-Hybridisierung im Stadium P6 (Abbildung 3.4.4) unterstützt dieses Ergebnis, da auch hier ein deutlicher Unterschied in der *Scn11a*-Färbung zu sehen ist.

Auch die *In Situ*-Hybridisierung adulter Spinalganglien mit der *Scn11a*-Sonde (Abbildung 3.4.4) zeigt sowohl eine weniger starke Farbintensität als auch deutlich weniger angefärbte Zellen im heterozygoten Tier. Außerdem scheint auch die Farbintensität der *Scn10a*-Sonde im Vergleich zum Wildtyp etwas reduziert zu sein.

Die Hybridisierung mit der *Tubb3 antisense*-Sonde (Abbildung 3.4.5) wurde zur Markierung aller Neuronen genutzt, um zu klären, ob eine Reduktion von Nervenzellen

in den Spinalganglien oder dem Rückenmark nachweisbar ist. Erste Färbungen scheinen nicht auf eine deutliche Reduktion hinzuweisen. Dies müsste allerdings quantitativ bestätigt werden.

Die *In Situ*-Hybridisierungen weisen folglich auf einen ab P0 manifestierten Phänotyp hin, da im Embryonalstadium E13.5 noch kein offensichtlicher Unterschied zwischen wildtypischen und heterozygoten Spinalganglien zu erkennen ist.

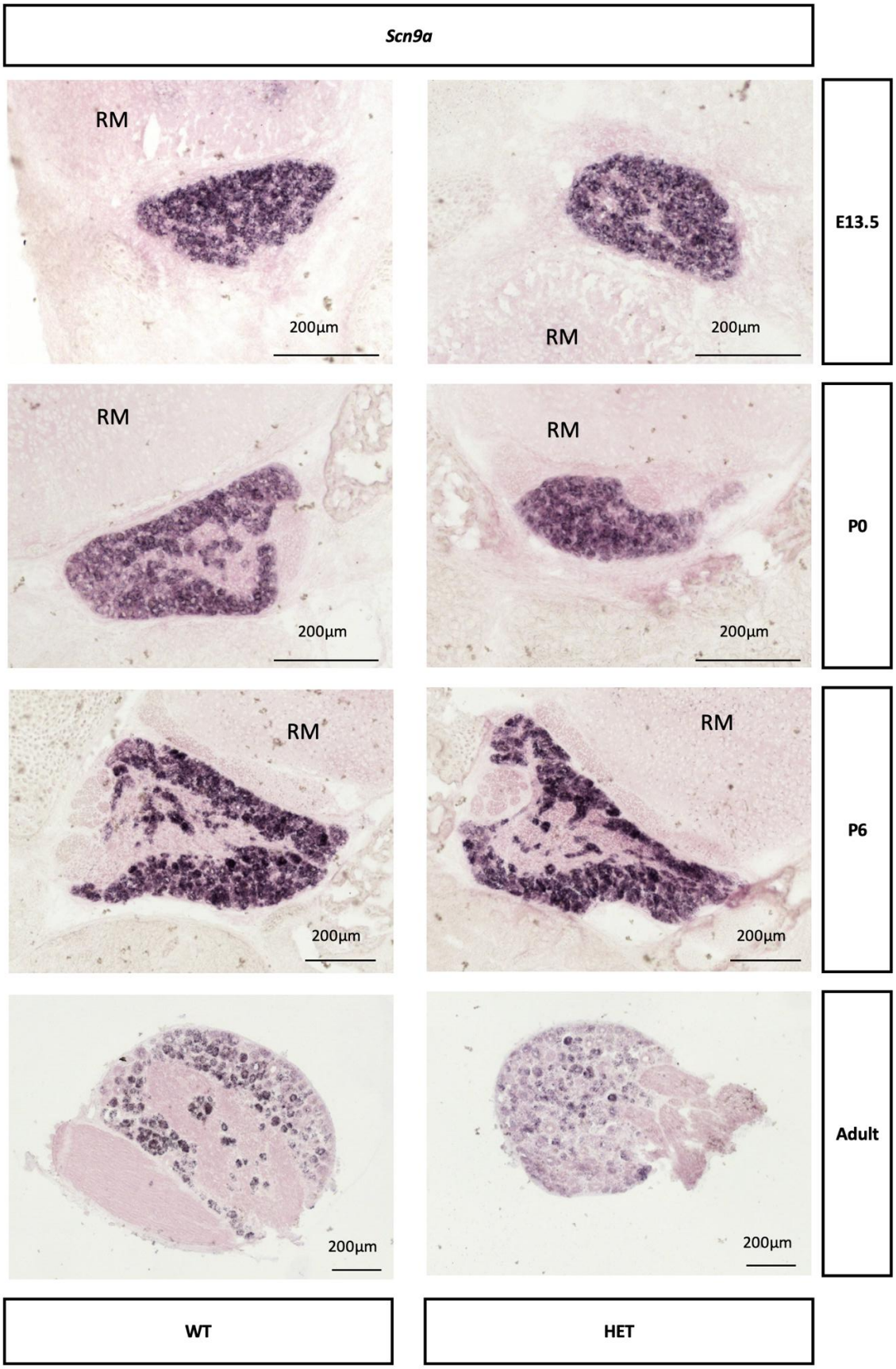


Abbildung 3.4.2*: In Situ*-Hybridisierung der *Scn9a*-Sonde im Stadium E13.5, P0, P6 und adult. Vergleich von Wildtyp und heterozygot; Gefrierschnitte (14µm), Wirbelsäule mit Rückenmark und Spinalganglien im Ganzen transversal angeschnitten; n=3 Schnitte; Maßstab 200 µm; keine offensichtlichen Expressionsunterschiede zu erkennen; RM=Rückenmark; anliegend die Spinalganglien; im adulten Tier Spinalganglien isoliert angefärbt

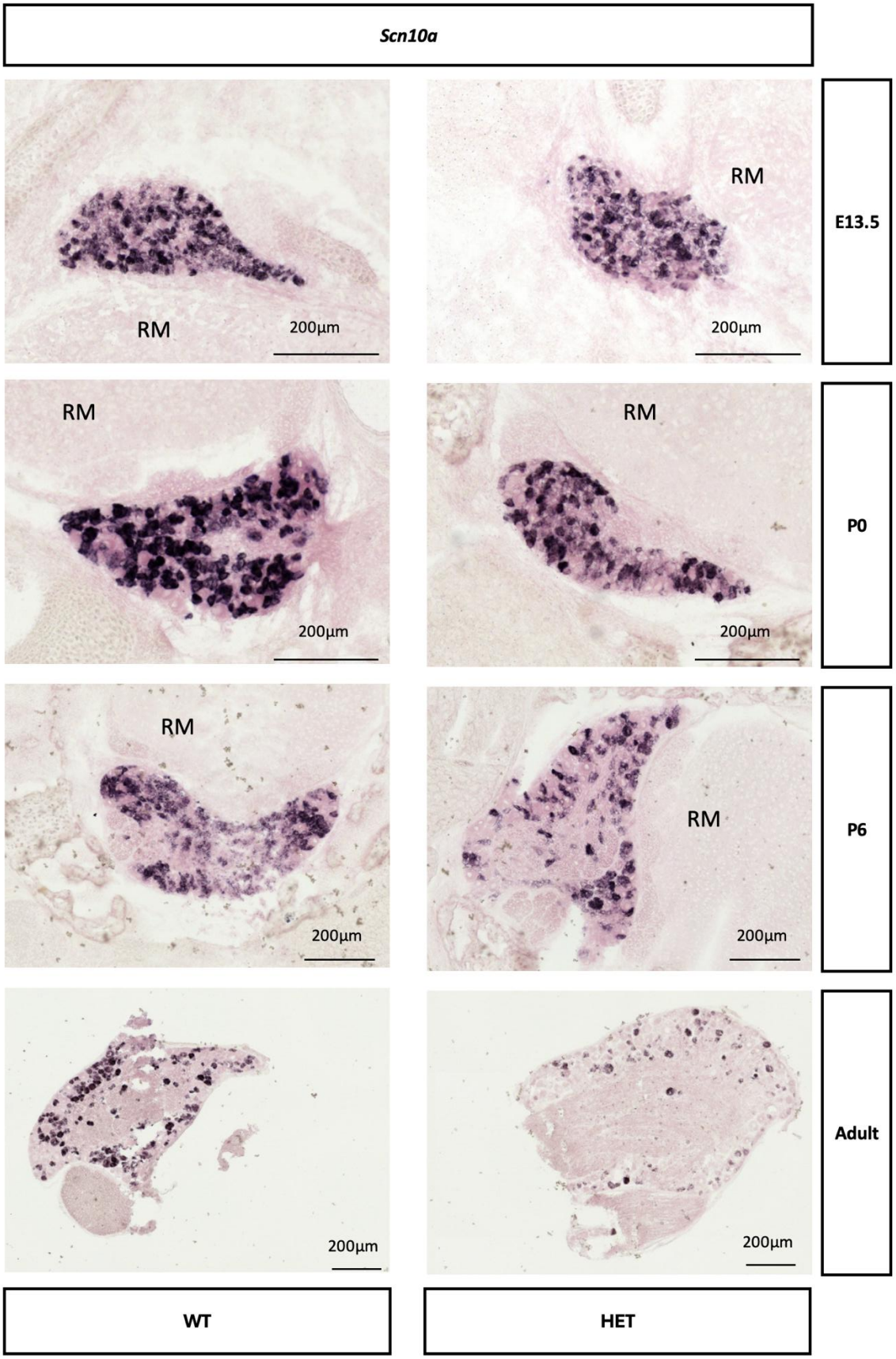


Abbildung 3.4.3 *In Situ*-Hybridisierung der *Scn10a*-Sonde im Stadium E13.5, P0, P6 und adult. Vergleich von Wildtyp und heterozygot; Gefrierschnitte (14 µm), Wirbelsäule mit Rückenmark und Spinalganglien im Ganzen transversal angeschnitten; n=3 Schnitte; Maßstab 20 µm; verringerte Expression im adulten heterozygoten Tier zu erkennen RM=Rückenmark; anliegend die Spinalganglien; im adulten Tier Spinalganglien isoliert angefärbt

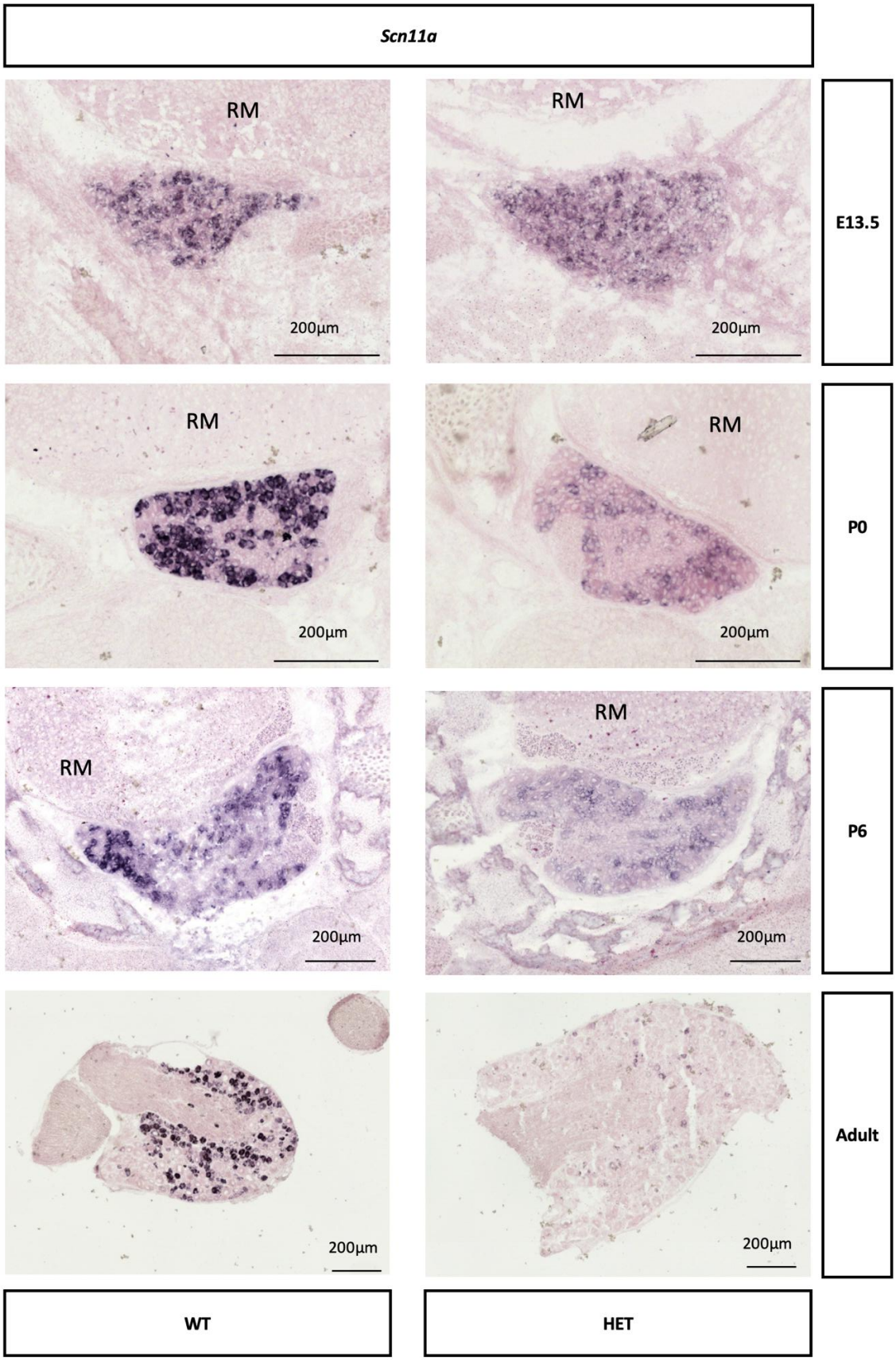


Abbildung 3.4.4 *In Situ*-Hybridisierung der *Scn11a*-Sonde im Stadium E13.5, P0, P6 und adult. Vergleich von Wildtyp und heterozygot; Gefrierschnitte (14 µm), Wirbelsäule mit Rückenmark und Spinalganglien im Ganzen transversal angeschnitten; n=3 Schnitte; Maßstab 200 µm; offensichtliche Expressionsunterschiede ab Stadium P0 zu erkennen RM=Rückenmark; anliegend die Spinalganglien; im adulten Tier Spinalganglien isoliert angefärbt

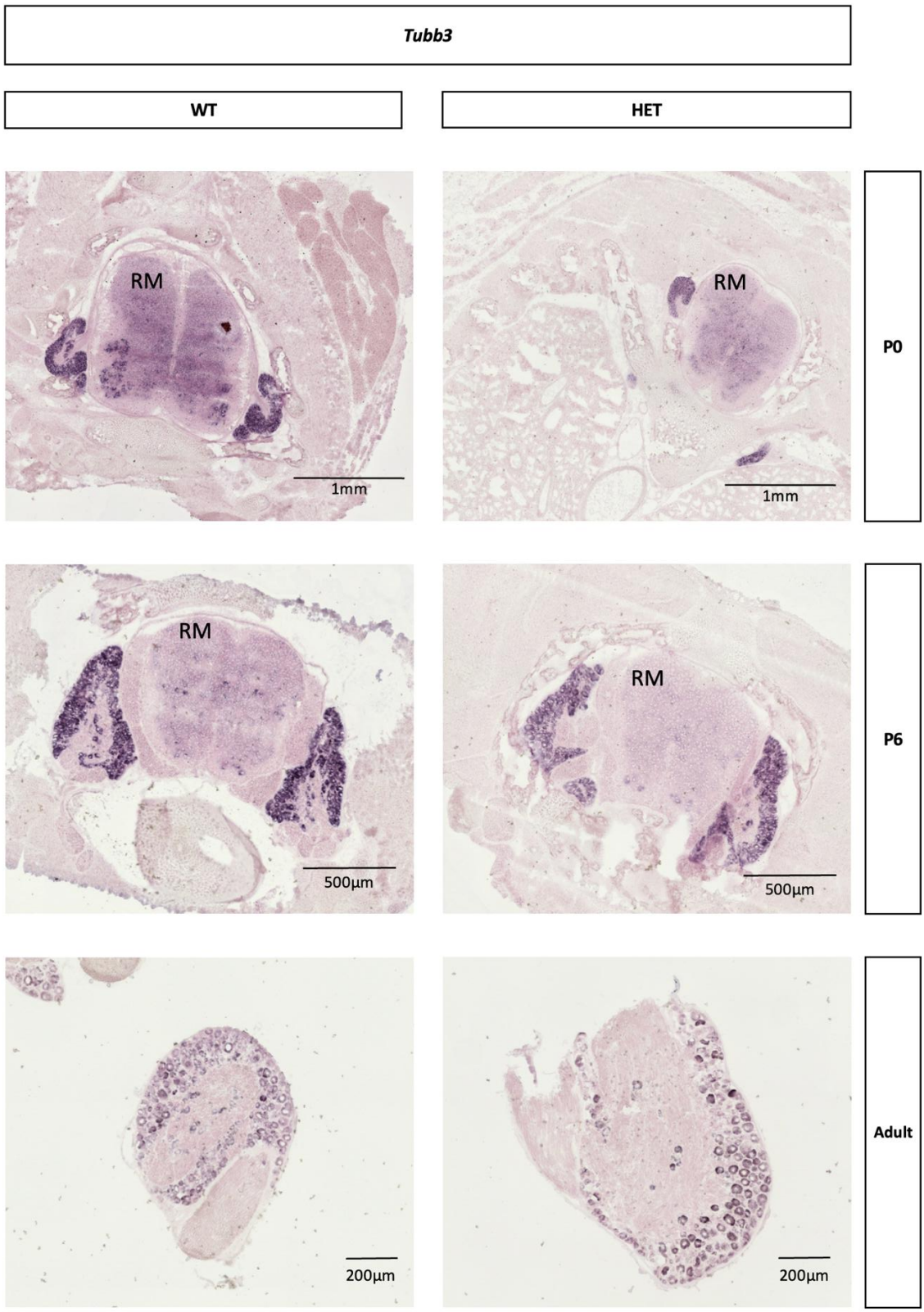


Abbildung 3.4.5: *In Situ*-Hybridisierung mit der *Tubb3 antisense*-Sonde in verschiedenen Entwicklungsstadien. (P0: ganzes Tier, Transversalschnitt; P6: Wirbelsäule mit Rückenmark Querschnitt; im adulten Tier Querschnitte isolierter Spinalganglion); Gefrierschnitte (14 µm); n=1 Tier; Maßstab: 1 mm bei P0, 500 µm bei P6, 200 µm beim adulten. Vergleich von Wildtyp und heterozygot, RM=Rückenmark; seitlich gelegen die gefärbten Spinalganglien; im adulten Tier Spinalganglien isoliert angefärbt.

3.5 Vergleich von Immunfluoreszenzfärbungen in den Spinalganglien von *Scn11a*$^{+/L799P}$- und wildtypischen Mäusen

Vorarbeiten (Schmidt, 2024) zeigen, dass in den Spinalganglien adulter *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäuse nicht-peptiderge IB4- und PlexinC1-positive Zellen fehlen. Um zu überprüfen, ob sich dieser Phänotyp erst postnatal ausbildet oder bereits perinatal nachweisbar ist, wurden Immunfluoreszenzfärbungen an neugeborenen Tieren im P0-Stadium durchgeführt.

Darüber hinaus wurde analysiert, ob Unterschiede in den für die Entwicklung und Differenzierung von C-Faser-Nozizeptoren relevanten Markern TrkA und Runx1 vorliegen. Die Tropomyosinrezeptorkinase A (TrkA) dient als Rezeptor für den Wachstumsfaktor Nerve Growth Factor (NGF) und wird initial von allen embryonalen nozizeptiven Vorläuferzellen exprimiert (Huang und Reichardt, 2001). Der Transkriptionsfaktor Runx1 (Runt-related transcription factor 1*)* wird an P0 nur in TrkA-positiven Neuronen exprimiert wobei ab P6.5 zunehmend auch Runx1/TrkA-negative Neurone zu finden sind (Chen et al., 2006). Durch die Inhibierung der CGRP (Calcitonin gene-related peptide)-Expression determiniert Runx1 die Bildung von nicht-peptidergen Neuronen im Spinalganglion (Kramer et al., 2006). In Anbetracht der Tatsache, dass nicht-peptiderge C-Nozizeptoren in *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen fehlen (Schmidt, 2024), sollte außerdem der Frage nachgegangen werden, ob eine vermehrt stattfindende postnatale Apoptose diesem Prozess zugrunde liegt. Folglich wurden in den Stadien P0 und P6 Kryostatschnitte der Spinalganglien mit Antikörpern gegen den Apoptosemarker Cleaved Caspase3, einem an der Apoptose beteiligten Enzym, gefärbt und die Zellen anschließend ausgezählt.

3.5.1 Immunfluoreszenzfärbungen mit PlexinC1 zeigen deutlich reduzierte PlexinC1-Expression in *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen bereits zum Zeitpunkt P0

Die in Abbildung 3.5.1 gezeigten Immunfluoreszenzfärbungen mit PlexinC1-Antikörpern zeigen nach Quantifizierung der PlexinC1-positiven Zellen in Relation zu Islet1/2-positiven sensorischen Neuronen bereits ab P0 signifikante Unterschiede zwischen den Wildtyp-und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen. Es sind deutlich weniger PlexinC1-positive Zellen im

Spinalganglion des heterozygoten Tieres angefärbt mit einigen schwach PlexinC1-positiven Zellen größeren Durchmessers, die peptidergen C-Fasern entsprechen. Vergleicht man die Färbungen der heterozygoten Tiere in den Stadien P0 und P6, so sind an Tag P0 mehr PlexinC1-positive Zellen vorhanden als an Tag P6 (Abbildung 3.5.1). Dieser Effekt ist allerdings statistisch nicht signifikant.

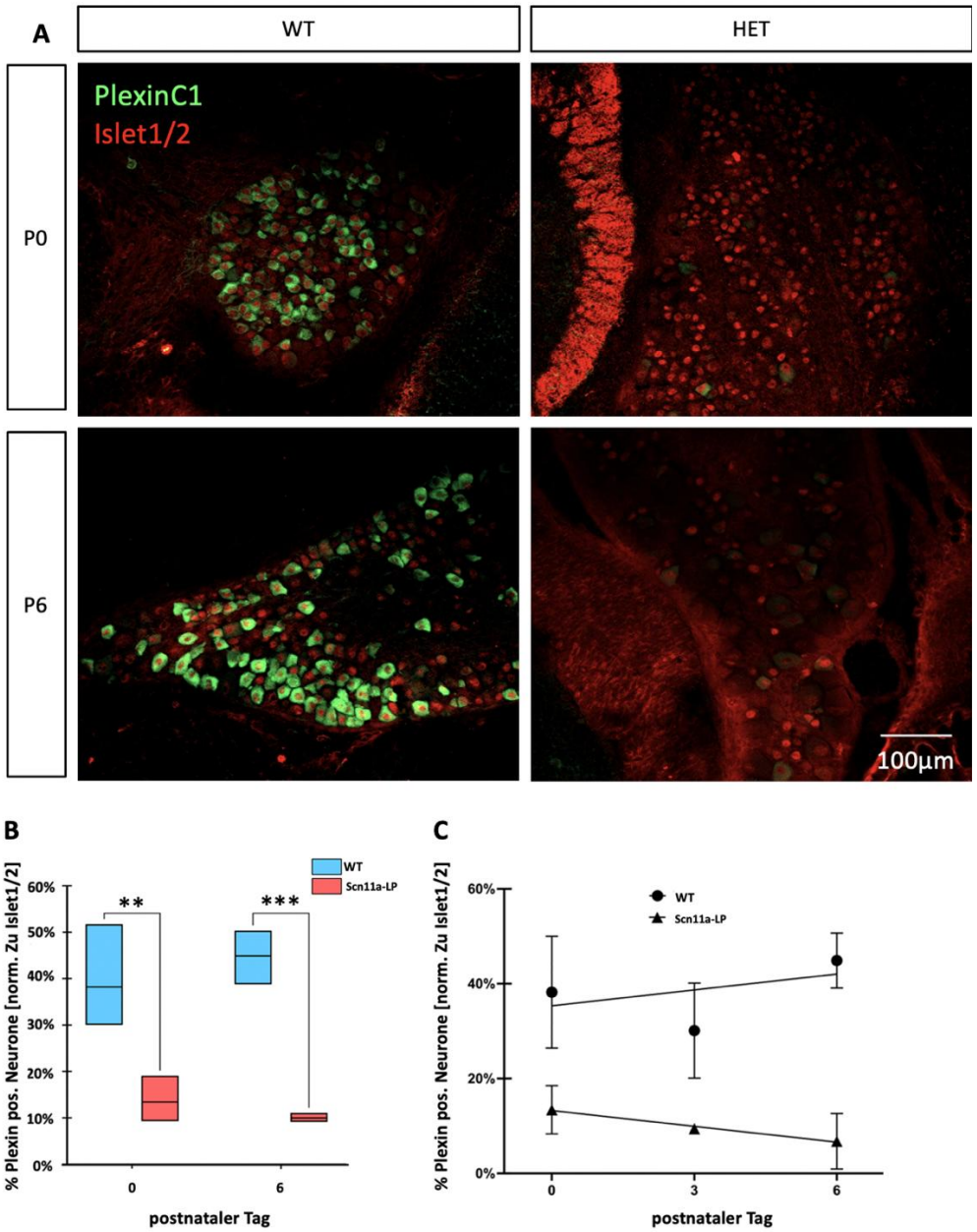


Abbildung 3.5.1: Immunfluoreszenzfärbungen. **A**: Expression von PlexinC1 in wildtypischen und heterozygoten Spinalganglien im Stadium P0 und P6. Die Anzahl PlexinC1-positiver Zellen ist an beiden Altersstadien in heterozygoten Mäusen deutlich reduziert; Wildtyp: n=3 Tiere und jeweils 3 Schnitte pro Tier; Heterozygot: n=3 Tiere und jeweils 3 Schnitte pro Tier. Maßstab: 100 µm
B und **C**: Quantitative Analyse der PlexinC1-positiven Zellen in verschiedenen Altersstadien; **B**: Durchschnittlicher prozentualer Anteil PlexinC1-positiver Zellen normiert auf Islet1/2-positive Zellen. Der Anteil an PlexinC1-positiven Zellen ist in heterozygoten Tieren für die Entwicklungsstadien P0 und P6 signifikant verringert (*two-way ANOVA repeated measures*, P0: ** $p < 0.01$; P6: *** $p < 0.001$). **C:** einfache lineare Regression des prozentualen Anteils an PlexinC1-positiven Zellen über den postnatalen Entwicklungsverlauf von P0, P3 bis zu P6. Keine signifikante Abweichung von 0 (Signifikanzniveau $p < 0.05$).

3.5.2 Immunfluoreszenzfärbungen von TrkA, Runx1 und Cleaved Caspase3

TrkA und Runx1 sind Markerproteine, die in der Entwicklung der Nozizeptoren eine wichtige Rolle spielen (Chen et al., 2006). Daher wurden in den Stadien P0 und P6 Immunfluoreszenzfärbungen der Spinalganglien angefertigt und der Wildtyp mit der Scn11a$^{+/L799P}$-Maus verglichen. Färbungen mit dem Apoptosemarker Cleaved Caspase3 sollten zudem Aufschluss darüber geben, ob in den Spinalganglien der Maus postnatal eine erhöhte Apoptoserate zu beobachten ist, welche den Verlust der PlexinC1-positiven Zellen erklären könnte.

Da der Transkriptionsfaktor Runx1 im Zellkern lokalisiert ist, zeigen die in Abbildung 3.5.2 dargestellten Runx1-Färbungen wie erwartet ein in den Zellkernen lokalisiertes Fluoreszenzsignal. Die Runx1-Expression unterscheidet sich allerdings weder im Stadium P0 noch im Stadium P6 in Spinalganglien von WT-und Scn11a$^{+/L799P}$-Tieren.

Die Expression von Runx1 ist bis zum Stadium P0 auf TrkA-positive Neurone beschränkt, was deutlich in den Immunfluoreszenzfärbungen von Spinalganglien im Stadium P0, in denen Runx1 mit TrkA co-lokalisiert, zu erkennen ist (Abb.3.5.2). Einige Ausnahmen lassen sich womöglich auf einen suboptimalen Anschnitt zurückführen, wobei zwar Zellkörper, aber nicht die Zellkerne angeschnitten wurden. Im Vergleich dazu sind im P6-Stadium Zellen zu sehen, die TrkA-negativ, aber Runx1-positiv sind.

Die Gruppe der peptidergen Neurone im Spinalganglion geht aus den TrkA-positiven/Runx1- negativen Neuronen hervor. Dies zeigt sich dadurch, dass sich TrkA-positive Neurone nur selten mit IB4, dem Marker für nicht-peptiderge Neurone, anfärben lassen (Averill et al., 1995, Kashiba et al., 2001). In dieser Neuronenpopulation gibt es ebenso keine signifikanten Unterschiede in der Anzahl markierter Neuronen zwischen Wildtyp und Scn11a$^{+/L799P}$-Maus in beiden untersuchten Altersstadien.

Falls Apoptose dem Verlust von C-Faser-Nozizeptoren zugrunde liegt, wäre eine erhöhte Apoptoserate in Spinalganglien von *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen zu erwarten mit zum Beispiel deutlich mehr Cleaved Caspase3-positiven Zellen in Spinalganglien heterozygoter Tiere. Die Färbungen zeigen jedoch, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Wildtyp und Scn11a$^{+/L799P}$-Maus gibt. Die abgebildete apoptotische Zelle zeigt den typisch fragmentierten Zellkern (Abbildung 3.5.4 B und C).

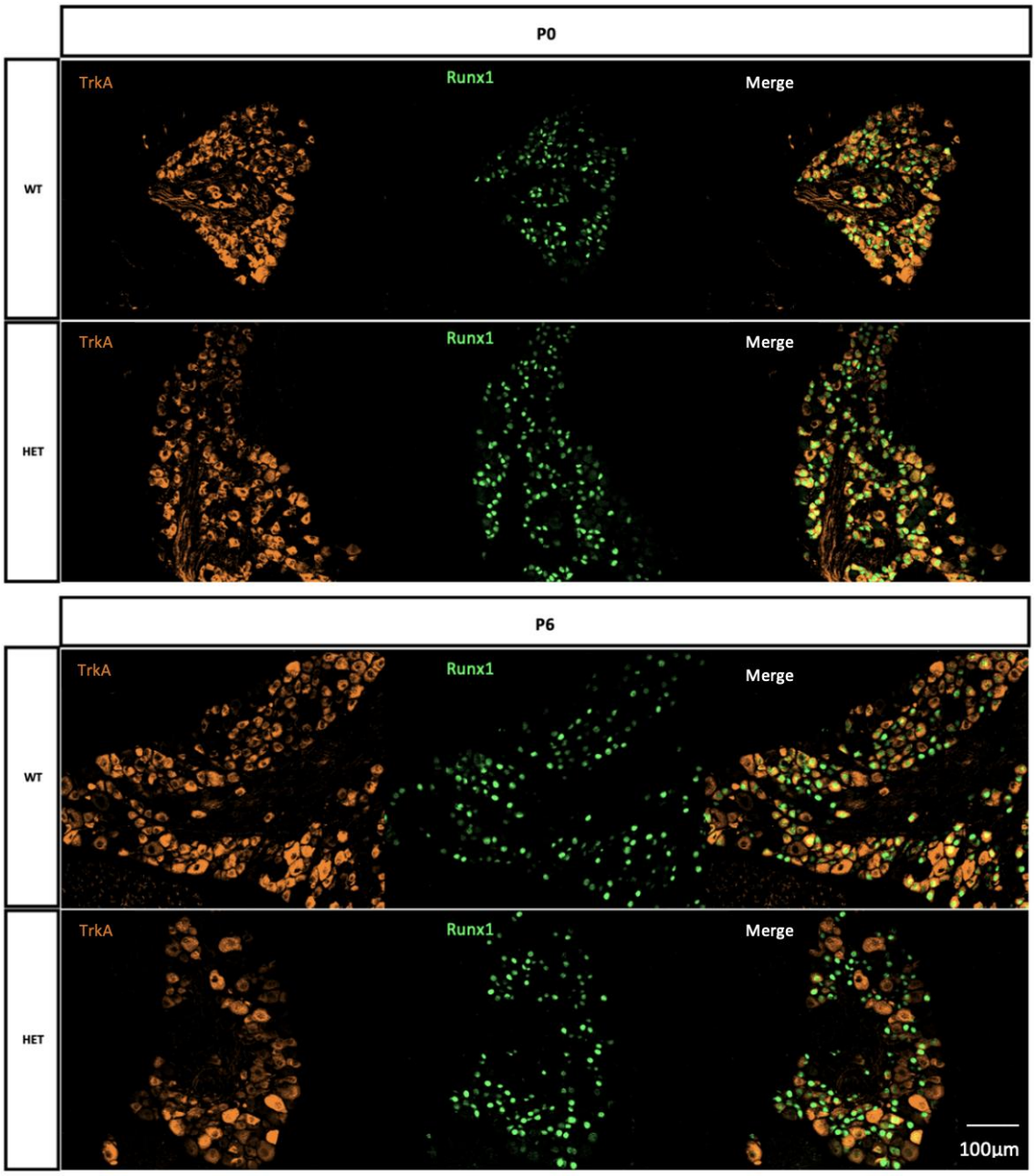


Abbildung 3.5.2: Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen TrkA und Runx1. Wildtypische und heterozygote Spinalganglien im Stadium P0 und P6. Wildtyp n=3 (3 Schnitte pro Tier)*;* Heterozygot n=3 (3 Schnitte pro Tier), Maßstab: 100 µm

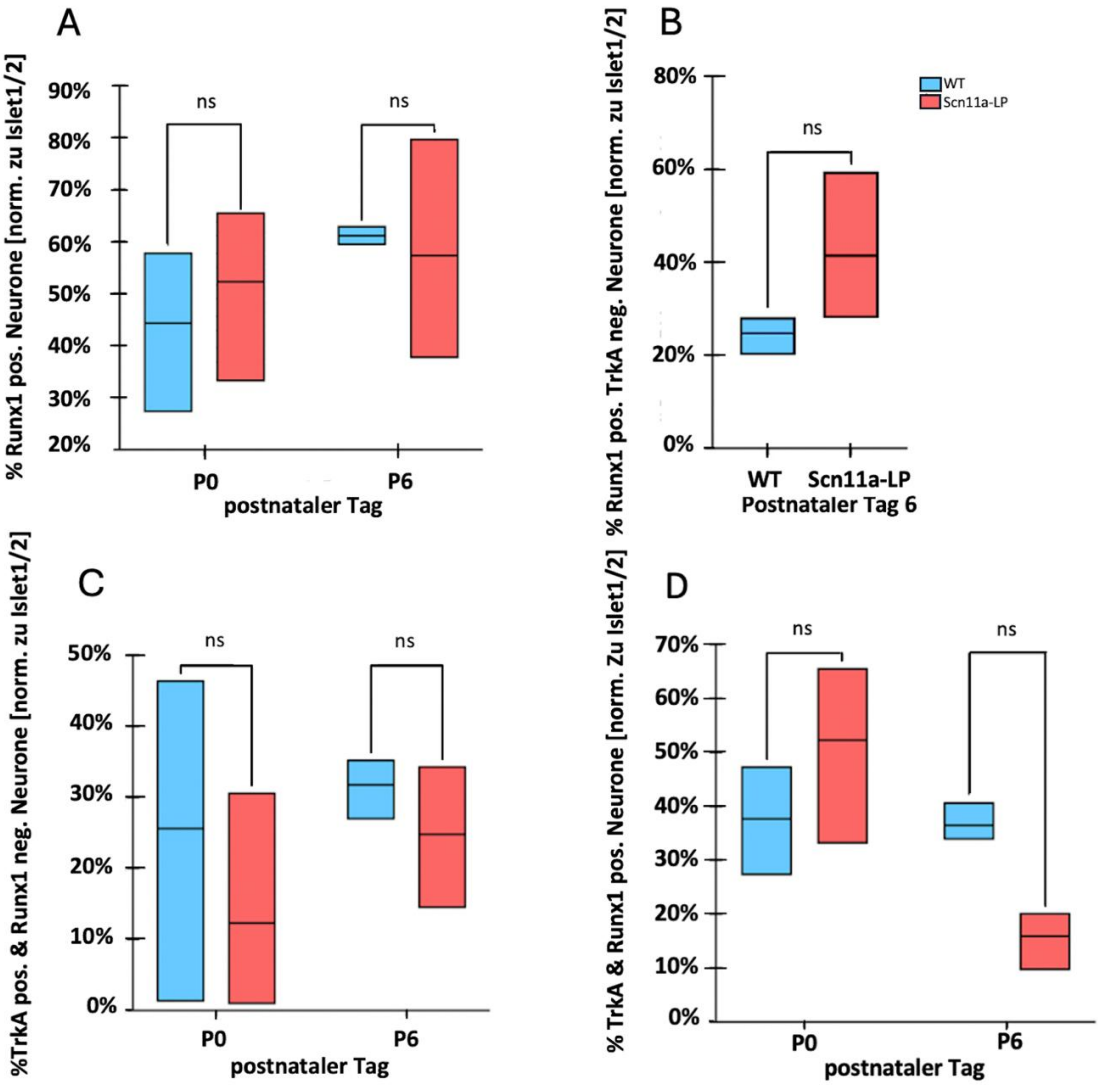


Abbildung 3.5.3: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen von TrkA und Runx1. A: durchschnittlicher prozentualer Anteil Runx1-positiver Zellen normiert zu Islet1/2 positiven Zellen; kein signifikanter Unterschied erkennbar; Statistik *two-way Anova repeated measure*s (Signifikanzniveau $p < 0.05$) n = 3 Tiere und jeweils 3 Schnitte pro Tier **B**: Durchschnittlicher prozentualer Anteil Runx1 positiver TrkA-negativer Neurone normiert zu Islet1/2; kein signifikanter Unterschied erkennbar; Statistik t-test (ns nicht signifikant $p < 0.05$) **C**: durchschnittlicher prozentualer Anteil TrkA-positiver Runx1-negativer Neurone normiert zu Islet1/2-positiven Zellen; kein signifikanter Unterschied erkennbar; Statistik *two-way Anova repeated measure*s (Signifikanzniveau $p < 0.05$) n = 3 Tiere und jeweils 3 Schnitte pro Tier **D**: durchschnittlicher prozentualer Anteil TrkA- Runx1 -positiver Neurone normiert zu Islet1/2-positiven Zellen; kein signifikanter Unterschied erkennbar; Statistik *Two-way anova repeated measures* (Signifikanzniveau $p < 0.05$) n = 3 Tiere und jeweils 3 Schnitte pro Tier

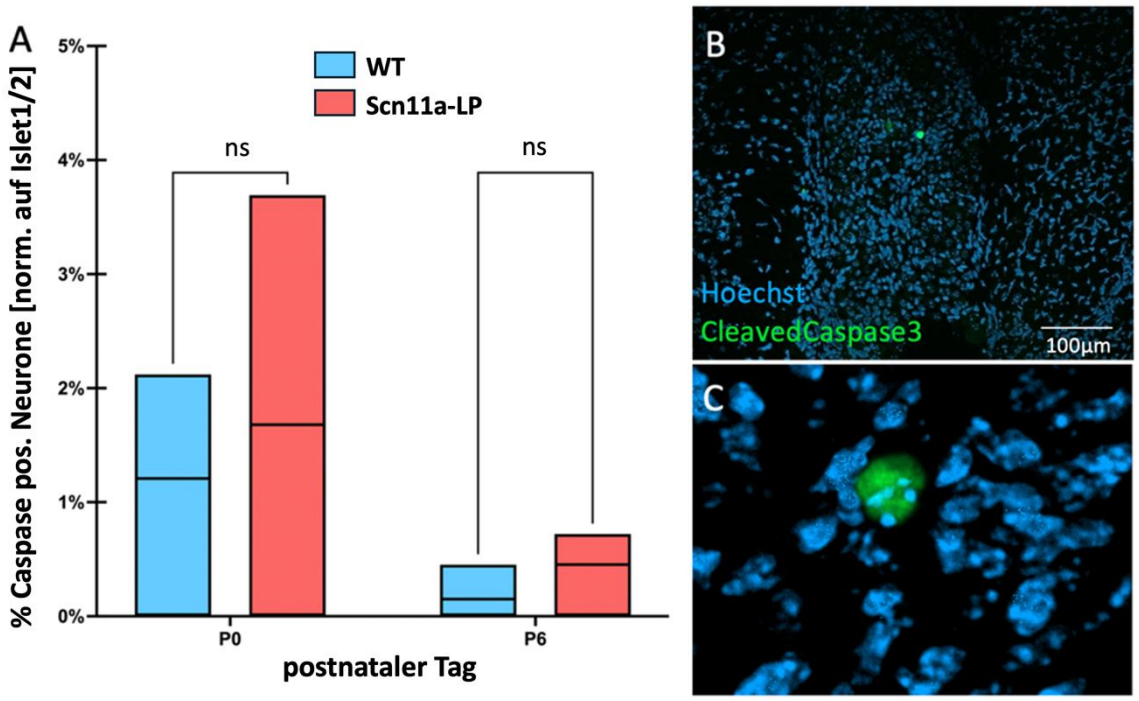


Abbildung 3.5.4: Auswertung der Immunfluoreszenzfärbungen mit Cleaved Caspase3. A: durchschnittlicher prozentualer Anteil Cleaved Caspase3 positiver Neurone normiert zu Islet1/2 positiven Zellen; kein signifikanter Unterschied erkennbar (*two-way Anova repeated measures*, Signifikanzniveau $p < 0.05$) **B**: Immunfluoreszenzfärbung mit Cleaved Caspase3 im Spinalganglion einer Wildtyp Maus im Stadium P0, Maßstab 100 µm **C**: vergrößerter Ausschnitt aus B; Cleaved Caspase3 positive apoptotische Zelle mit fragmentiertem Kern.

4 Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Auswirkungen der Nav1.9 p.(L799P) *gain-of-function*-Mutation auf die Entwicklung der Schmerzbahn mithilfe von *In Situ* Hybridisierung und Immunfluoreszenzfärbungen zu untersuchen. Es zeigte sich, dass *Scn11a* in den Spinalganglien von L799P-Mäusen bereits ab dem postnatalen Tag 0 (P0) reduziert exprimiert wird, während *Scn10a* in adulten Tieren eine verminderte Expression aufweist. Darüber hinaus wurde eine signifikant reduzierte Expression von PlexinC1 in der frühen postnatalen Phase beobachtet, ohne dass eine begleitende Zunahme des Apoptosemarkers Cleaved Caspase 3 festgestellt werden konnte. Markierungen nicht peptiderger Vorläuferzellen mittels TrkA und Runx1 ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Mutanten und Kontrolltieren. Die nachfolgende Diskussion ordnet diese Befunde im Kontext der aktuellen wissenschaftlichen Literatur ein, weist auf Limitationen der Methodik hin und gibt einen Ausblick auf potenzielle weiterführende Forschungsansätze.

4.1 *In Situ* Hybridisierungen

4.1.1 Die Validierung der generierten RNA-Sonden zeigt genspezifische Hybridisierungsmuster

Mithilfe von eigens hergestellten RNA-Sonden zum Nachweis der spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 wurde deren Expressionsprofil innerhalb der Spinalganglien untersucht, wo sie primär von nicht-peptidergen sensorischen C-Faser-Nozizeptoren exprimiert werden (Kiehn, 2006, Minett et al., 2012). Zur Validierung dieser, wurde eine *In Situ*-Hybridisierung mit den jeweiligen *sense*- und *antisense*-Sonden in den Spinalganglien adulter Wildtyp-Mäuse durchgeführt. Wie erwartet, war eine spezifische Färbung sensorischer Neuronen mit *antisense*-Sonden zu sehen, welche jedoch bei den *sense*-Sonden ausblieb (Abbildung 9.1). Unterschiede in der Signal-Intensität und Größe der gefärbten Zellen nach Hybridisierung mit den *antisense*-Sonden im Vergleich zu einer ubiquitären gleichförmigen Hintergrundfärbung nach Hybridisierung mit den *sense*-Sonden verdeutlichen die Spezifität der RNA-Sonden.

In der Literatur bereits beschriebene Färbungen im Spinalganglion zeigten, dass der spannungsgesteuerte Natriumkanal Nav1.7 vorwiegend in kleinen, aber auch einigen großen Neuronen exprimiert ist (Dib-Hajj et al., 2010). Die *In Situ*-Hybridisierung mit der *Scn9a*-Sonde (Abbildung 3.4.2) bestätigt diese Ergebnisse.

Auch der Natriumkanal Nav1.8 ist überwiegend in den kleinen Neuronen, also den nozizeptiven C-Fasern des Spinalganglions exprimiert, mit Ausnahme weniger mittelgroßer Zellen, welche die Aδ-Fasern darstellen (Dib-Hajj et al., 2010, R. Schmidt, 2010). Auch das bestätigen die hier durchgeführten Analysen.

Im Gegensatz zu Nav1.7 und Nav1.8 wird Nav1.9 ausschließlich von den kleinen C-Faser Neuronen im Spinalganglion exprimiert (Dib-Hajj et al., 2010). Wie in Abbildung 3.4.4 ersichtlich, bestätigt die Hybridisierung mit der hergestellten *Scn11a*-RNA-Sonde ein starkes und differentielles Signal in sensorischen Neuronen mit kleinem Durchmesser, während eine Färbung der größeren Zellen durch diese Sonde ausbleibt. Somit zeigen alle generierten *antisense*-Sonden das erwartete Zelltyp-spezifische Expressionsmuster.

4.1.2 Verringerte Nav1.8 und Nav1.9 Expression in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus

Anhand der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *In Situ*-Hybridisierungen an den Entwicklungsstadien E13.5, P0, P6 und in adulten Tieren wurde der zeitliche Verlauf der Expression der drei oben genannten Natriumkanäle untersucht.

Für den Nav1.7-Kanal, kodiert durch das *Scn9a*-Gen, war in keinem der untersuchten Altersstadien ein offensichtlicher Unterschied der Expression zwischen Wildtyp und heterozygotem Tier zu beobachten. Zu bedenken ist jedoch, dass auch wenn dieser Natriumkanal strukturell nicht von der Mutation betroffen ist, eine kompensatorisch veränderte Genexpression als Reaktion auf die veränderte Funktion des Nav1.9 Kanals denkbar wäre, da die Natriumkanäle Nav1.7, 1.8 und 1.9 sich in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen. So zeigten real-time PCR-Daten aus den Spinalganglien von Nav1.9 *null mutant* (-/-) Mäusen marginal erhöhte Expression der mRNA von Natrium-Kanälen, unter anderem des Nav1.7 (Priest et al., 2005). Weiter zeigten Untersuchungen von Akopian et al. in der Nav1.8-/- Maus eine erhöhte Expression des Nav1.7 (Akopian et al., 1999). Allerdings wäre aufgrund der fehlenden Quantifizierung der hier durchgeführten *In Situ*-Hybridisierungen ein marginaler Unterschied der Expression, wie er von Priest et. al. beschrieben wird, nur schwer zu sehen. Die *In Situ*-Hybridisierungen

mit der *Scn9a*-Sonde suggerieren jedoch, dass die Mutation des Nav1.9 Kanals die Expression von Nav1.7 nicht oder nur wenig beeinflusst. Dieses Ergebnis wird durch die Ergebnisse von M. Lürkens unterstützt. Eine Gesamt-RNA-Sequenzierung (bulk RNAseq) zeigte keine signifikanten Unterschiede in der Expression des *Scn9a*-Gens in der adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus (Lürkens, 2022).

Obwohl der Nav1.8, kodiert durch das *Scn10a*-Gen, strukturell nicht von der Mutation betroffen ist, zeigten die *In Situ*-Hybridisierungen mit der *Scn10a*- Sonde überraschende Ergebnisse. So zeigte sich eine deutliche Reduktion der Nav1.8-Expression in Gewebeschnitten von Spinalganglien adulter *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäuse, die in ihrer Offensichtlichkeit so in vorherigen Stadien nicht zu sehen war. Auch hier werden die Ergebnisse der *In situ*-Hybridisierung durch die RNA-Seq-Daten von M. Lürkens unterstützt. Diese zeigen eine signifikante Herunterregulierung der *Scn10a*-mRNA-Expression in der adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus (Lürkens, 2022). Da die in dieser Maus fehlenden NP-Neuronen sowohl *Scn11a* als auch *Scn10a* exprimieren, lässt sich dieser Rückgang durch den Verlust dieser Zellpopulation erklären. Wie in Leipold et al. 2013 bereits postuliert, führt die Überaktivität des Nav1.9 Kanals in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zu einer dauerhaften Depolarisation und damit zu einer fortschreitenden Deaktivierung der für das Aktionspotenzial zuständigen Natriumkanäle Nav1.7 und Nav1.8. Die verringerte Expression von Nav1.8 könnte also auch eine adaptive Anpassung an die veränderte Nav1.9-Funktion darstellen, die auf die fortschreitende Deaktivierung infolge der Überaktivität von Nav1.9 zurückzuführen ist. Da sich deutliche Expressionsunterschiede für *Scn10a* in den *In Situ*-Hybridisierungen erst im adulten Stadium zeigen und nicht bereits an E13.5 oder P0 könnte es sich hierbei um eine späte embryonale oder postnatale Anpassung der *Scn10a*-Expression an veränderte Aktivitätsmuster handeln. Um festzustellen, ab welchem Zeitpunkt genau sich dieser Expressionsunterschied manifestiert, sind jedoch weitere Untersuchungen wie z.B. RNAseq an embryonalen und postnatalen Altersstadien nötig.

Es bleibt jedoch unklar, warum die Expression von Nav1.7 keine deutlichen Unterschiede zeigt, obwohl auch dieser Kanal infolge der anhaltenden Depolarisation inaktiviert wird. Eine mögliche Erklärung könnte darin liegen, dass der Nav1.8-Kanal den Großteil der Natriumströme vermittelt, die zur Auslösung des Aktionspotentials beitragen (Blair und Bean, 2002). Auch ist von Nav1.7 bekannt, dass er auf posttranslationaler Ebene z.B.

durch Phosphorylierung funktionell reguliert wird und somit eine Regulation auf Genexpression eine eher untergeordnete Rolle spielt (Tyagi et al., 2024).

Die *Scn11a*-Sonde wurde für die Markierung des Natriumkanals Nav1.9 benutzt. Hier zeigten sich sehr deutliche Expressionsunterschiede bereits ab dem Stadium P0, nicht jedoch vorher im Embryonalstadium E13.5. Eine offensichtlich verringerte Anzahl Nav1.9-exprimierender Neurone im *Scn11a*$^{+/L799P}$-Tier ab Stadium P0 kann auch bei adulten Tieren beobachtet werden, was in Übereinstimmung mit Vorarbeiten ist, die den Verlust von C-Faser-Nozizeptoren in Spinalganglien adulter *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäuse zeigen (Schmidt, 2024). Auch diese Ergebnisse werden durch die Übereinstimmung mit den Ergebnissen von M. Lürkens validiert, welche in einer RNAseq eine signifikante Herunterregulierung des *Scn11a*-Gens in der adulten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zeigen.

Als möglicher Pathomechanismus der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mutation scheint hier vermutlich eine pränatale Entwicklungsstörung zugrunde zu liegen, die sich phänotypisch und wahrscheinlich auch funktionell bereits zwischen E13.5 und P0 manifestiert. Dies wird auch gestützt durch Literatur, die Nav1.9 als wichtigen Einflussfaktor für das Wachstum und die Entstehung der Axone von Motoneuronen beschreibt (Subramanian et al., 2012) und auch eine kausale Erklärung für die beschriebene verzögerte motorische Entwicklung bei Patienten mit der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mutation (Leipold et al., 2013) liefert. Auch hier wären weitere Untersuchungen von Interesse, um mehr über eine mögliche Rolle und den Einfluss des Nav1.9-Kanals in der pränatalen Entwicklung von sensorischen Neuronen herauszufinden.

Da bei allen *In Situ*-Hybridisierungen im Stadium E13.5 bereits positive Neurone zu sehen sind, kann man davon ausgehen, dass die Kanäle Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 zu diesem Entwicklungszeitpunkt bereits exprimiert werden. Die Informationen zum Expressionsbeginn dieser drei Kanäle sind in der Literatur entweder spärlich, ungenau oder gar nicht vorhanden. So zeigen vorhandene Daten, dass das *Scn9a*-Gen bereits am embryonalen Tag E11.5 im Darm von Mausembryonen nachgewiesen wurde (Hao et al., 2012). Allerdings gibt es keine Publikationen, die den genauen Beginn der Expression dieses Kanals im Spinalganglion beschreiben. In einer Nav1.8-Cre-rekombinanten Maus setzte die Cre-Expression, die den Expressionszeitpunkt des Nav1.8 widerspiegelte, ab dem embryonalen Tag 14 im Spinalganglion ein (Stirling et al., 2005). In der Ratte hingegen wird der Nav1.8 in den Spinalganglien zum Zeitpunkt E15 exprimiert, wohingegen der Nav1.9 erst an E17 exprimiert wird (Benn et al., 2001). RNA-*In-Situ*-

Hybridisierungen in einem E14.5-Mausembryo zeigen bereits eine Expression von *Scn11a* im Spinalganglion (Diez-Roux et al., 2011, Laboratory). Die durchgeführten *In Situ*-Hybridisierungen zeigen, dass alle drei Kanäle zum Zeitpunkt E13.5 bereits in den Spinalganglien der Maus exprimiert werden (Abbildung 3.4.2-3.4.4).
Die *In Situ*-Hybridisierungen mit der Sonde für *Tubb3* zeigen keine Unterschiede in der Expression zwischen Wildtyp und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Tier. Diese Sonde wurde als Positivkontrolle zum Nachweis sensorischer Neurone eingesetzt.

4.2 Methodische Limitationen

4.2.1 Generierung der RNA-Sonden für *Scn9a, Scn10* und *Scn11a*

Eine besondere Herausforderung bei der Generierung der RNA-Sonden für die in dieser Arbeit untersuchten Kanäle Nav1.7, Nav1.8, Nav1.9 war die Homologie ihrer Gensequenzen, welche auf eine gemeinsame phylogenetische Herkunft zurückzuführen ist (Catterall et al., 2005). Diese Tatsache birgt die Gefahr für Kreuzhybridisierungen der Sonden und damit eine Verringerung ihrer Spezifität, vor allem da die oben genannten Kanäle teilweise von denselben Neuronensubtypen exprimiert werden (Dib-Hajj et al., 2010). Die differentiellen Hybridisierungsmuster der verschiedenen Sonden sprechen allerdings gegen eine starke Kreuzhybridisierung. Zudem sind die generierten Ergebnisse aussagekräftig genug im Rahmen eines Screenings zur Eingrenzung der Altersstadien mit phänotypischer Manifestation.

4.2.2 Aussagekraft von *In Situ*-Hybridisierungen

Insgesamt ist auch die Aussagekraft von *In Situ*-Hybridisierungen als Methode bezüglich ihrer Interpretation eingeschränkt, da es sich immer nur um die RNA-Expression eines Gens handelt. Posttranslationale Modifikationen und Veränderungen des Proteins bleiben in dieser Betrachtung unberücksichtigt und können daher nicht in die pathomechanistische Analyse einfließen. Weiter wurde keine Quantifizierung der Ergebnisse durchgeführt, deshalb können offensichtliche Unterschiede zwischen Wildtyp und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus nur deskriptiv beschrieben werden. Auch wenn die *In Situ*-Hybridisierungen an jeweils drei Schnitten wiederholt wurden, beträgt die Anzahl

der verwendeten Versuchstiere pro Stadium nur n=1, was für valide quantitative Aussagen nicht ausreichend ist. Für das geplante „Screening“ auf Veränderungen genügen die Versuche jedoch, da die Ergebnisse mit RNAseq-Analysen an adulten Tieren (Lürkens, 2022) übereinstimmen und auch mit der Literatur zur embryonalen/pränatalen Expression der Kanäle in Einklang stehen.

4.3 Immunfluoreszenzfärbungen

PlexinC1 ist ein Marker für nicht-peptiderge C-Nozizeptoren (Usoskin et al., 2015). Basierend auf den bereits mehrfach erwähnten Vorarbeiten (Schmidt, 2024), die den Verlust dieses Neuronensubtyps in den Spinalganglien adulter *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäuse zeigen, wurde in dieser Arbeit durch eine postnatale Zeitreihe geschaut, ob der Phänotyp bereits postnatal vorhanden ist oder sich mit zunehmendem Alter erst entwickelt.

Die PlexinC1-Immunfluoreszenzfärbungen an Spinalganglien zeigten sowohl im Stadium P0 als auch im Stadium P6 einen signifikanten Verlust der PlexinC1-exprimierenden Zellen. In der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus waren jeweils noch wenige große schwach positive Zellen zu erkennen, wobei es sich übereinstimmend mit den Ergebnissen von A. Schmidt als auch mit denen von Usoskin et al. 2015 höchstwahrscheinlich um peptiderge CGRP-positive Zellen (PEP1) handelt, die dieses Markerprotein ebenfalls schwach exprimieren. Vergleicht man die Färbungen in der heterozygoten Maus, scheint es auf den ersten Blick, dass die Zahl der noch vorhandenen PlexinC1-positiven Zellen im Verlauf von P0 zu P6 in heterozygoten *Scn11a*$^{+/L799P}$-Tieren weiter abnimmt. Eine einfache lineare Regression mit den generierten Daten konnte jedoch zeigen, dass es hier keine signifikante Abweichung von 0, also keine signifikante postnatale Veränderung der nicht-peptidergen Neurone in beiden Genotypen gibt.

Auch diese Ergebnisse weisen auf eine embryonale Entwicklungsstörung hin, da der adulte Phänotyp, also die fehlenden nicht-peptidergen Neurone im Spinalganglion, bereits am postnatalen Tag P0 manifest ist. So könnte der spannungsgesteuerte Natriumkanal Nav1.9 eine maßgebliche Rolle in der Neurogenese bzw. Subtyp-Spezifizierung/Differenzierung sensorischer Neuronen in den Spinalganglien spielen.

4.3.1 Der postnatale Neuronenverlust in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus wird nicht durch Cleaved Caspase3-vermittelte Apoptose verursacht

Die Hypothese, dass das Fehlen einer gesamten Zellpopulation in den Spinalganglien der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus durch neurodegenerative Prozesse verursacht wird, wurde durch Vorarbeiten bereits widerlegt. So zeigten elektronenmikroskopische Analysen von Schnitten des Suralnervs der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus keine typisch neurodegenerativen Zeichen. Die Dichte der C-Fasern war weder im Remak-Bündel noch pro µm^2 signifikant reduziert, was darauf hinweist, dass der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus-Phänotyp nicht auf einer Verringerung der C-Fasern beruht. Außerdem waren weitere charakteristische Merkmale, wie etwa autophagische Ablagerungen oder Einschlusskörperchen, im heterozygoten Tier nicht signifikant erhöht (Schmidt, 2024). Die gleichbleibende Anzahl an C-Fasern könnte trotz des Verlustes an PlexinC1-positiven C-Nozizeptoren durch den nachgewiesenen Zugewinn an C-LTMR-Fasern zurückzuführen sein (Lürkens, 2022).
Durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Apoptose-Marker Cleaved Caspase3 sollte daher untersucht werden, ob eine erhöhte postnatale Apoptose als mögliche Ursache für den postnatalen Zellverlust der nicht-peptidergen Neurone in Frage kommt. Da keine signifikant erhöhte Apoptose-Rate in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus gefunden wurde, unterstützt dieses Ergebnis die Hypothese, dass weder ein zahlenmäßiger noch degenerativer oder apoptotischer postnataler Verlust der nicht-peptidergen Neuronen Population in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus vorliegt. Somit legen die gefundenen Muster in ihrer Gesamtheit eine Störung der neuronalen Spezifizierung und Differenzierung während der Embryonalentwicklung nahe. Allerdings wurde hier selektiv nur Cleaved Caspase3 als Apoptosemarker untersucht und nicht globale Apoptose-Ereignisse. Hier wären weiterführende Studien zum Beispiel mittels TUNEL-Assay sinnvoll, um alle apoptotischen Prozesse zu erfassen und deren Rolle für die Entstehung der Alterationen im Spinalganglion der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus beurteilen zu können. Die Tatsache, dass sich bei P0 deutlich mehr Apoptose-Ereignisse zeigen als zum Zeitpunkt P6, könnte auf einen Apoptose-Peak hinweisen, der um den Zeitpunkt P0 herum stattfindet.

4.3.2 Nozizeptor-Subtyp-spezifische Färbungen zeigen eine Änderung des Expressionsprofils der sensorischen Nervenzellen

Um die peptidergen und nicht-peptidergen Neurone besser voneinander abgrenzen zu können und ihre Entwicklung postnatal zu untersuchen, wurden zusätzlich zu PlexinC1 weitere Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen TrkA und Runx1 durchgeführt.

Wie von Chen et al. 2006 beschrieben, ist die Expression von Runx1 bis zum Stadium P0 auf TrkA-positive Neurone beschränkt. Dies sieht man deutlich in den vorliegenden Immunfluoreszenzfärbungen im Stadium P0 (Abbildung 3.5.2), wo Runx1 bis auf wenige Ausnahmen mit TrkA co-lokalisiert. Weiter kann man im Stadium P6 beobachten, dass es einige Runx1-positive und TrkA-negative Neurone gibt. Dies könnte die von Chen et al. beschriebene Entwicklungslinie widerspiegeln, wobei Runx1-positive Neurone im Verlauf TrkA negativ werden und damit die nicht-peptidergen Neurone bilden. Nimmt man all diese Beobachtungen zusammen, kann man daraus schließen, dass die Färbungen die korrekten Strukturen markieren.

Die Gruppe der peptidergen Neurone im Spinalganglion geht aus den TrkA-positiven und Runx1-negativen Neuronen hervor, da die IB4-Expression (Marker für nicht-peptiderge Zellen) nur selten mit einer TrkA Expression co-lokalisiert (Averill et al., 1995, Kashiba et al., 2001). Das Ergebnis, dass hier keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zu erkennen sind, überrascht daher nicht, da die peptiderge Neuronenpopulation von der Mutation nicht betroffen scheint (Schmidt, 2024).

Die im Stadium P6 TrkA-negativen und Runx1-positiven Neurone werden durch die Inhibierung der CGRP-Expression durch Runx1 zu nicht-peptidergen Neuronen (Kramer et al., 2006), also genau der Neuronengruppe, die zu fehlen scheint. Da 90 % der IB4 positiven Neurone auch Runx1 exprimieren (Chen et al., 2006), wäre in dem Fall, dass eine ganze Neuronenpopulation fehlt, primär zu erwarten, dass eine deutlich verminderte Runx1 Expression zu sehen ist. Die Ergebnisse zeigen jedoch in keinem Stadium signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus in der Runx1-Expression. Eine Studie über die modalitätsselektive Entwicklung sensorischer Subtypen (Lou et al., 2015) liefert jedoch einen interessanten Erklärungsansatz für die unveränderte Runx1-Expression in *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen. So konnte gezeigt werden,

dass die Interaktion zwischen Runx1 und Zfp521 maßgeblich die Entstehung von polymodalen Nozizeptoren, C-LTMRs und Prurirezeptoren bestimmt. Zfp521 ist ein Zinkfinger-Protein, das als Transkriptionsfaktor eine bedeutende Funktion bei der Entwicklung von Knochen-, Fett- und Nervengewebe übernimmt (Hesse et al., 2010, Lou et al., 2015, Kang et al., 2012). Die Expression des Zfp521-Proteins hängt stark von Runx1 ab. So zeigten *In Situ*-Hybridisierungen, dass nahezu alle Neuronen (96,6 %) mit hoher Zfp521-Expression ebenfalls Runx1 exprimierten. Um die Entwicklung der sensorischen Neurone zu steuern, bilden Runx1 und Zfp521 einen so genannten „*Incoherent Feed-Forward Regulatory Loop*". Dabei handelt es sich um einen Signalweg, der sowohl einen aktivierenden als auch einen hemmenden regulatorischen Pfad bildet, welcher die Expression des Zielgens jeweils positiv oder negativ beeinflussen kann. Die verschiedenen Subgruppen der sensorischen Neurone lassen sich anhand der charakteristischen Expression von Markergenen einteilen (Lou et al., 2015) (siehe Abb. 1.2 von Usoskin et al.). Polymodale Nozizeptoren zeichnen sich durch die Expression des *Mas-related*-G-Protein gekoppelten Rezeptoren (MrgprD) aus (NP1-Cluster(Usoskin et al., 2015)). Die C-LTMRs hingegen sind durch die Expression des Vesikulären Glutamat-Transporters 3 (Vglut3) und der Thyroxin-Hydroxylase (Th) (TH-Cluster(Usoskin et al., 2015)) charakterisiert. Prurizeptoren wiederum exprimieren den Mass-related-G-Protein gekoppelten Rezeptor 3 (MrgprA3) (NP2-Cluster (Usoskin et al., 2015)). In Vorläuferneuronen wird durch Runx1 je nach Expression von Zfp521 gesteuert, welcher Neuronensubytp gebildet wird.

Im positiven Pfad des *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loops",* in dem Runx1 die Expression von Zfp521 unterdrückt, wird die Expression verschiedener Markergene initiiert, welche die Bildung MrgprD-positiver Neuronen fördern und deren Identität als polymodale Nozizeptoren etablieren.

Im negativen Pfad hingegen fungiert der Transkriptionsfaktor Zfp521 als genetischer Repressor, der Runx1 in seiner Aktivierung des positiven Pfades hemmt und stattdessen die Expression von Vglut3 und Th etabliert. Durch die Aktivierung dieses negativen Pfades entstehen C-LTMRs, während die Entstehung polymodaler MrgprD-positiver Neuronen unterdrückt wird (Abb .4.2).

Daraus ergibt sich die Hypothese, dass bei den *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen eine Veränderung in dem oben genannten Signalweg vorliegt. Es erscheint denkbar, dass die Aktivität von Zfp521 erhöht und damit der negative Pfad des *„Incoherent Feed-forward Regulatory*

Loops" verstärkt aktiviert ist. Somit wäre eine verstärkte Bildung von C-LTMRs und eine verminderte Bildung der MrgprD-positiven polymodalen Nozizeptoren zu erwarten, was als ein Erklärungsansatz für den phänotypischen Schmerzverlust dienen könnte. Da der Transkriptionsfaktor Zfp521 im Signalweg nachgelagert zu Runx1 fungiert, könnte eine veränderte Expression oder Aktivität von Zfp521 die unbeeinflusste Runx1-Expression erklären, die hier beobachtet wurde. RNAseq-Ergebnisse von *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen zeigen interessanterweise Expressionsunterschiede der hier zentralen Markergene, die diesen Erklärungsansatz weiter unterstützen. So zeigte sich in den *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen eine signifikant geringere Expression von *MrgprD*, während sich die Expression von *Vglut3* und *Th* signifikant hochreguliert zeigte (Lürkens, 2022). Die starke Expression von *Zfp521* wurde erstmals zwischen E13.5 und E16 nachgewiesen, während die Expression von *MrgprD* erst ab E16 einsetzt (Chen et al., 2006, Liu et al., 2008). Eine veränderte Wirkung der Transkriptionsfaktoren in diesem Signalweg könnte im Einklang mit der zuvor aufgestellten Hypothese stehen, dass die Veränderungen im Spinalganglion auf eine Störung zurückzuführen sind, die bereits während der Embryonalentwicklung auftritt (siehe Abschnitt 4.2). Ein *„cell fate switch"* von MrgprD-positiven Neuronen zu C-LTMRs könnte den phänotypischen Verlust des Schmerzempfindens erklären. Dies würde bedeuten, dass die Neuronen, die ursprünglich für die Schmerzwahrnehmung zuständig sind, durch eine Umprogrammierung oder Veränderung in ihrer genetischen Identität in einen anderen Neuronentyp übergehen, der keine Schmerzsignale mehr sondern vielleicht Juckreiz vermittelt. Da die genaue Funktionsweise des *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loops"* noch nicht vollständig geklärt ist, könnte man außerdem annehmen, dass eine weitere Veränderung im Signalweg auch eine verstärkte Expression der MrgprA3-positiven Neurone bedingt, was wiederum das verstärkte Kratzverhalten erklären könnte.

Die vorliegenden Ergebnisse legen nahe, dass die im Wildtyp PlexinC1-exprimierenden Zellen in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zwar noch vorhanden sind, jedoch Veränderungen in ihrem Expressionsprofil als auch ihrer Funktion ausweisen. So könnte der Nav1.9 während der embryonalen neuronalen Entwicklung eine Rolle in der Zelltypverteilung spielen, unter anderem durch Einfluss auf die Etablierung und die Funktion von Signalwegen, die die Bildung der verschiedenen Neuronensubtypen steuern. Möglicherweise werden die nicht-peptidergen PlexinC1-positiven Neurone stattdessen

zu einer anderen, neuen Zellpopulation mit veränderter Markerexpression. Dies muss durch zukünftige Analysen auf Einzelzellebene wie zum Beispiel durch Einzelzell-RNA-Sequenzierung aufgeklärt werden. Auch der Transkriptionsfaktor Zfp521 könnte hier eine bedeutende Rolle spielen und eine weitere Untersuchung dieses Signalweges sowohl in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus als auch im Wildtyp wäre von Interesse.

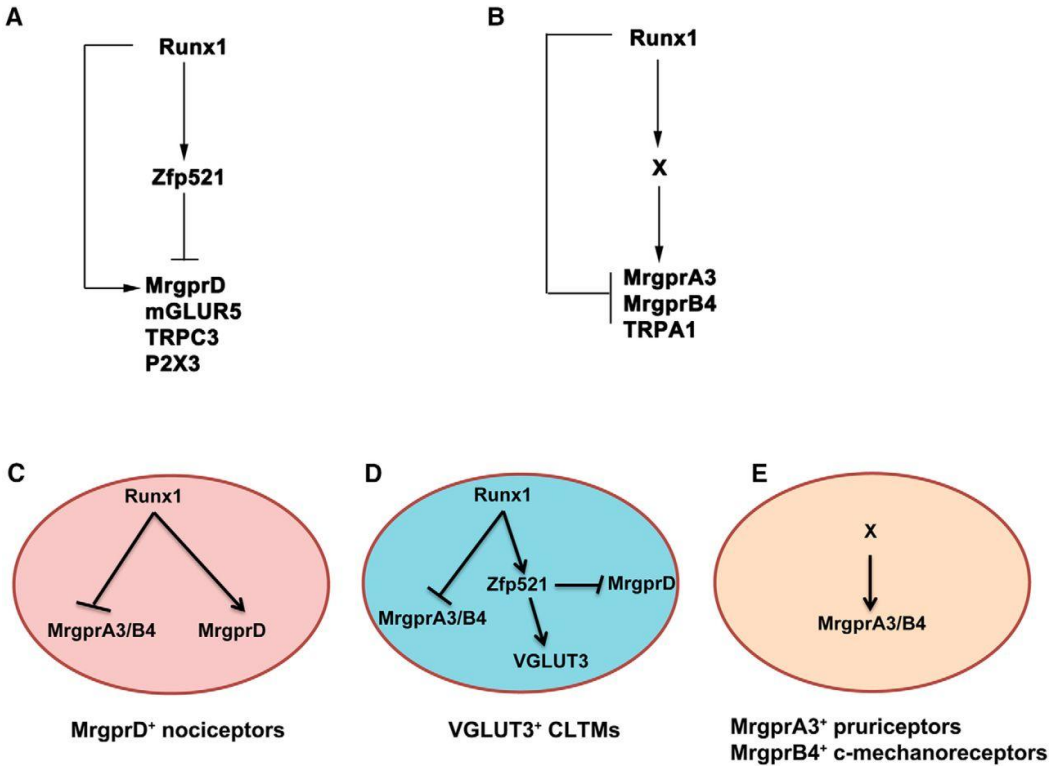


Abbildung 4.2 *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loop“* kontrolliert neuronale Subtypbildung; A und B: Runx1 bildet mit nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren Signalwege, die für die Bildung verschiedener sensorisch relevanter Kanäle und Rezeptoren wichtig sind. Das Runx1-abhängige Ereignis X und seine genaue Funktion ist noch unbekannt. C-E: Molekulare Mechanismen, die zur Bildung neuronaler Subtypen führen. Die Pfeile („→“) oder „—I“ zeigen die Notwendigkeit von vorgeschalteten Faktoren für die Aktivierung oder Repression nachgelagerter Ereignisse an. Übernommen aus (Lou et al., 2015)

4.4 Übertragbarkeit der Ergebnisse aus dem *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mausmodell auf das Erkrankungsbild beim Menschen und die humane Pathologie

Seit Jahrzehnten ist die Maus aufgrund ihrer Eigenschaften als *in vivo* Model aus der Forschung nicht mehr wegzudenken. Nichtsdestotrotz weist der Organismus der Maus verglichen mit dem des Menschen Unterschiede auf, die bei der Übertragbarkeit von Ergebnissen von der Maus auf den Menschen berücksichtigt werden müssen, um Fehlschlüsse zu verhindern.

So zeigen sich auch zwischen den Phänotypen des von Leipold et al. generierten *Scn11a*$^{+/L799P}$ *-knock-in* Mausmodells und dem der Patienten offensichtliche Unterschiede. Während alle bekannten humanen Individuen unter Juckreiz und selbst zugefügten Wunden leiden, wurde dies nur bei ca. 11 % der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäuse beobachtet (Leipold et al., 2013). Da es weltweit nur sehr wenige bekannte Patienten mit der *SCN11A* p.(L811P) -Mutation gibt, sind die genannten Zahlen mit Vorsicht zu betrachten. In einer größeren Patientenkohorte könnte sich zeigen, dass Juckreiz und selbst zugefügte Wunden möglicherweise nur bei einem Teil der Betroffenen auftreten. Auch die nur verringerte Schmerzempfindlichkeit der Mäuse im Gegensatz zu einem vollständigen Verlust des Schmerzempfindens bei Menschen mit der *SCN11A* p.(L811P)-Mutation weist auf einen ausgeprägteren Phänotyp bei Menschen mit dieser genetischen Veränderung hin. Weiter interessant ist, dass sich bei den *Scn11a*$^{+/L799P}$-Mäusen eine geschlechtsspezifische Ausprägung des Phänotyps zeigte, welcher seine Ausprägung in vermehrtem Kratzverhalten findet. So sind 72 % der Mäuse, die ein vermehrtes Kratzverhalten zeigen männlich (persönliche Kommunikation, N. Haag 2025). Ob sich die in der Maus offensichtlichen geschlechtsspezifischen Unterschiede auch im Menschen zeigen, ist zu diesem Zeitpunkt unbekannt. Vor diesem Hintergrund wäre es umso interessanter zu untersuchen, ob und wie die *SCN11A* p.(L811P)-Mutation geschlechtsspezifische Ausprägungen im Menschen zeigt. Ein Erklärungsansatz für die Unterschiede der phänotypischen Ausprägung zwischen Mensch und Maus könnte im oben genannten *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loop“* (Lou et al., 2015) liegen. Unterschiedliche Intensitäten der Aktivierung im positiven oder negativen Pfad des *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loops“* könnten zu variierenden Ausprägungen und Aktivierungen der Signalwege führen. Ein Beispiel hierfür zeigt sich im Vergleich zwischen Maus und Ratte: Während in der Maus MrgprD-positive Nozizeptoren kein MrgprA exprimieren, ist dies in der Ratte der Fall. Diese Diskrepanz könnte auf eine unterschiedliche Regulierung des *„Incoherent Feed-forward Regulatory Loops“* zurückzuführen sein (Dong et al., 2001, Zylka et al., 2003, Lou et al., 2015).

Auch bei Betrachtung der Expression des Nav1.9 in Maus und Mensch offenbaren sich Unterschiede. Der hier im Fokus stehende spannungsgesteuerte Natriumkanal Nav1.9 des Nagers zeigt in seiner Aminosäuresequenz nur eine 75 %ige Übereinstimmung mit der des humanen Natriumkanals (Dib-Hajj et al., 1999a). Exprimiert werden die

Natriumkanäle Nav1.8 und Nav1.9 im Menschen außerdem in allen sensorischen Neuronen des Spinalganglions (Coward et al., 2000, Jung et al., 2023) während sie im Spinalganglion der Maus nur in bestimmten Subpopulationen der Neurone der Spinalganglien zu finden sind (NP1-3, PEP1 & 2, TH) (Usoskin et al., 2015). Zudem zeigen *In Situ*-Hybridisierungen eine signifikant erhöhte Expression des Nav1.9 als auch des Nav1.8 in TrkA-positiven Neuronen der humanen Spinalganglien (Rostock et al., 2018). Unterschiede in der Aminosäuresequenz können sich in verschieden ausgeprägten Funktionsweisen des Natriumkanals widerspiegeln. Daher ist eine Übertragbarkeit der Ergebnisse von der Maus auf den Menschen nicht 1:1 möglich.

4.4.1 Unterschiede in den Zellpopulationen

Die Ergebnisse von Rostock et al. (2018) unterstreichen die Notwendigkeit zur Vorsicht, wenn Erkenntnisse aus dem Mausmodell direkt auf den Menschen übertragen werden. So waren in den Spinalganglien des Menschen vermehrt Neurone zu finden, die TrkA und Ret gemeinsam exprimieren. Da die TrkA-Expression in Spinalganglien von Mäusen bei Expression von Ret herunterreguliert wird, ist dies abweichend zur Situation im humanen Spinalganglion. Neuere Studien jedoch postulieren eine Rolle dieser Neurone in der Vermittlung von Juckreiz im Menschen (Stantcheva et al., 2016, Usoskin et al., 2015).

Einzelzell-Transkriptomstudien (Jung et al., 2023) zeigen erhebliche Unterschiede in der Verteilung der Neuronensubtypen zwischen den Spinalganglien von Mäusen und Menschen auf. So liegt der Anteil der C-LTMRs in den Spinalganglien von Mäusen bei etwa 8 %, während er beim Menschen mit rund 0,8 % deutlich geringer ausfällt. Die Transkriptomanalysen bestimmter Neuronensubtypen zeigten eine hohe Übereinstimmung zwischen Maus und Mensch, wobei insbesondere Propriozeptoren und Aβ SA-LTMRs die stärkste Korrelation aufwiesen. Im Gegensatz dazu wiesen die NP1- und PEP2-FAM19A1-Subtypen die geringste Korrelation zwischen beiden Spezies auf. Vor diesem Hintergrund sind die hier gezeigten Ergebnisse nicht einwandfrei auf den Menschen übertragbar, da die NP1-Neuronen zu der Gruppe der PlxnC1-exprimierenden Neurone gehört (Usoskin et al., 2015), welche in den Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp- und *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zeigen.

Eine RNAscope-*In-Situ*-Hybridisierung zeigte, dass menschliche Spinalganglien eine signifikant höhere Anzahl an CGRP-exprimierenden Neuronen aufweisen (59,3 % im Vergleich zu 32,9 % in der Maus). Zudem offenbarte diese Studie, dass beim Menschen vermehrt Neuronen auftreten, die Marker für sowohl peptiderge (CGRP) als auch nicht-peptiderge Neuronen (P2X3R beim Menschen, IB4 bei der Maus) co-exprimieren (Shiers et al., 2020). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, inwieweit die Unterteilung der C-Faser-Nozizeptoren in peptiderge und nicht-peptiderge Subtypen auf den Menschen übertragbar und sinnvoll ist.

Vor dem Hintergrund, dass das *Scn11a*$^{+/L799P}$ Mausmodell einen weniger starken Phänotypen zeigt, als der, der bei betroffenen Menschen beobachtet wurde, könnten die oben genannten Ergebnisse jedoch von Relevanz sein. Die erhöhte Nav1.9-Expression in TrkA-positiven Neuronen, die Unterschiede in den Neuronentypen zwischen Mensch und Maus, sowie die verstärkte Expression von C-LTMRs im Menschen könnten dem im Menschen stärker ausgeprägten Phänotypen zugrunde liegen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen in den Spinalganglien der *Scn11a*$^{+/L799P}$ -Maus liefern wertvolle Einblicke in die unmittelbaren postnatalen Auswirkungen dieser *„gain of function“*-Mutation des Nav1.9-Kanals auf die Entwicklung der sensorischen Neurone.

Der bereits ab postnatalem Tag P0 nachweisbare Verlust der PlexinC1-Expression in nicht-peptidergen Neuronen deutet auf frühzeitige Entwicklungsveränderungen hin. Da weder eine Neurodegeneration (Schmidt, 2024) noch Caspase-vermittelte Apoptose vorliegt und die Expression von Runx1 und TrkA keinen signifikanten Unterschied zum Wildtyp zeigt, ist ein vollständiges Fehlen dieser Neuronen unwahrscheinlich. Vielmehr legen die Daten ein verändertes molekulares Expressionsprofil nahe. Auf Grundlage der von Lürkens beschriebenen differentiellen Expression von *Th*, *Vglut3* und *MrgprD* lässt sich die Hypothese eines sogenannten „*Cell Fate Switches*“ formulieren. Dieser könnte durch eine Runx1-abhängige regulatorische Schleife (Lou et al., 2015) vermittelt sein, in der die verstärkte Aktivierung von Zfp521 zu einer bevorzugten Ausbildung von Th-/Vglut3-positiven C-LTMRs und einer verminderten Entwicklung MrgprD-positiver NP1-Fasern führt.

Weiterhin unklar bleibt jedoch, welche spezifische Rolle der Nav1.9-Kanal in der Entwicklung der neuronalen Subtypen spielt und auf welche Weise die Pathophysiologie der *„gain of function"*-Mutation des Nav1.9 mit den zugrunde liegenden Signalwegen interagiert. Um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen und potenzielle Zusammenhänge zu identifizieren, sind weiterführende Studien erforderlich. Von besonderem Interesse wäre es, die Expression von Zfp521 detailliert zu evaluieren. Beispielsweise könnten *In Situ*-Hybridisierung oder immunhistochemische Verfahren ab dem Zeitpunkt seiner erstmaligen Expression, die im embryonalen Entwicklungsstadium E13.5 (Lou et al., 2015) in der Maus beobachtet wurde, dazu beitragen, die Expression des Transkriptionsfaktors zeitlich und räumlich in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus zu analysieren. Darüber hinaus könnte der Einsatz eines Reportergens dazu beitragen, die Aktivität des Transkriptionsfaktors Zfp521 *in vivo* genau zu untersuchen.

RNAseq an embryonalen Stadien wäre außerdem wichtig durchzuführen, um weitere Expressionsprofile, besonders der an der neuronalen Entwicklung beteiligten Markergene zu identifizieren und weitere regulatorische Netzwerke aufzudecken.

Unmissverständlich ist jedoch, dass der Nav1.9 eine tragende Rolle bei der Vermittlung von Schmerzreizen spielt. Sein Potential als Zielmolekül in der Schmerztherapie scheint noch nicht ausgeschöpft. Obwohl die aktuelle Forschung im Bereich der Schmerzmedikation hauptsächlich auf die Hemmung der spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7 und Nav1.8 abzielt (Kaye et al., 2024), könnte ein besseres Verständnis des Nav1.9 dazu beitragen, neue Ansatzpunkte für die Entwicklung alternativer Schmerzmedikationen zu identifizieren.

5 Zusammenfassung

Das nozizeptive System ist essenziell, um uns vor potenziellen Gefahren zu schützen. So leiten Nervenfasern, die unser Gewebe innervieren, einen schmerzhaften Reiz über C-nozizeptive Fasern in das Spinalganglion, von wo aus er über das Rückenmark bis in den somatosensorischen Cortex weitergeleitet wird und als Schmerz in unser Bewusstsein gelangt. Elektrophysiologisch spielen die spannungsgesteuerten Natriumkanäle Nav1.7, Nav1.8 und Nav1.9 eine tragende Rolle, indem sie als Antwort auf einen schwellenüberschreitenden Reiz Aktionspotenziale generieren. Pathologien in diesem komplexen Signalsystem können einerseits zu chronischen Schmerzerkrankungen führen, andererseits jedoch auch zum kompletten Verlust des Schmerzempfindens. Die sehr seltene *de-novo* p.(L811P) Variante im *SCN11A*-Gen, welches für den Nav1.9-Natriumkanal codiert, führt durch einen *„gain of function"*- Effekt zu einem kompletten Verlust des Schmerzempfindens, starkem Juckreiz und dadurch ausgelöste selbst beigebrachte Verletzungen im Menschen.

In dieser Arbeit wurde die Pathophysiologie dieser Mutation anhand des von Leipold et al. generierten *Scn11a*$^{+/L799P}$ -Mausmodells weiter untersucht.

In Situ-Hybridisierungen an Spinalganglien ermöglichten einen Einblick in die Expression der Gene *Scn9a*, *Scn10a* und *Scn11a* während der Entwicklungsstadien E13.5, P0, P6 und im erwachsenen Tier. Hierbei zeigte sich bereits ab P0 eine deutlich verringerte Expression von *Scn11a* in der *Scn11a*$^{+/L799P}$-Maus. Kongruent zu RNAseq-Ergebnissen (Lürkens, 2022) zeigte sich in adulten Spinalganglien eine reduzierte Expression sowohl von *Scn11a* als auch von *Scn10a*.

Mithilfe von Immunfluoreszenzfärbungen wurde außerdem die Entwicklung der peptidergen und nicht-peptidergen Neuronenpopulationen während der frühen Postnatalzeit analysiert. Bereits ab P0 zeigte sich die PlexinC1-Expression signifikant verringert. Färbungen mit dem Apoptosemarker Caspase3 zeigten jedoch keine erhöhte Aktivität, sodass eine Caspase-assoziierte Apoptose der nicht-peptidergen PlexinC1-Nervenfasern ausgeschlossen werden konnte. Zudem zeigten Färbungen mit TrkA und Runx1, einer alternativen Kombination für nicht-peptiderge Vorläuferzellen, keine signifikanten Unterschiede zwischen heterozygoten Tieren und dem Wildtyp.

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die pathophysiologischen Veränderungen bereits während der embryonalen Entwicklung stattfinden. Die

Scn11a$^{+/L799P}$-Mutation scheint nicht zu einem Verlust der nicht-peptidergen Zellen zu führen, sondern induziert einen so genannten *„cell fate switch“*, bei dem eine andere oder neue Subpopulation von Nervenzellen innerhalb des Spinalganglions entsteht.
Um diese Prozesse und die zugrunde liegenden Signalwege umfassend zu verstehen, benötigt es noch weitere Untersuchungen. Der Schwerpunkt sollte dabei insbesondere auf die embryonale Entwicklung gelegt werden. Diese Forschung könnte zu einem vertieften Verständnis der Rolle des spannungsgesteuerten Natriumkanals Nav1.9 in der Entwicklung von Nozizeptoren beitragen.

6 Quellenangabe

ADRIAN, E. D.: The all-or-none principle in nerve. *J Physiol (1914)* 47:460-74.

AKOPIAN, A. N., SIVILOTTI, L. & WOOD, J. N.: A tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel expressed by sensory neurons. *Nature (1996)* 379:257-62.

AKOPIAN, A. N., SOUSLOVA, V., ENGLAND, S., OKUSE, K., OGATA, N., URE, J., SMITH, A., KERR, B. J., MCMAHON, S. B., BOYCE, S., HILL, R., STANFA, L. C., DICKENSON, A. H. & WOOD, J. N.: The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat Neurosci (1999)* 2:541-8.

AMAYA, F., WANG, H., COSTIGAN, M., ALLCHORNE, A. J., HATCHER, J. P., EGERTON, J., STEAN, T., MORISSET, V., GROSE, D., GUNTHORPE, M. J., CHESSELL, I. P., TATE, S., GREEN, P. J. & WOOLF, C. J.: The voltage-gated sodium channel Na(v)1.9 is an effector of peripheral inflammatory pain hypersensitivity. *J Neurosci (2006)* 26:12852-60.

ARMSTRONG, C. M. & BEZANILLA, F.: Inactivation of the sodium channel. II. Gating current experiments. *J Gen Physiol (1977)* 70:567-90.

AVERILL, S., MCMAHON, S. B., CLARY, D. O., REICHARDT, L. F. & PRIESTLEY, J. V.: Immunocytochemical localization of trkA receptors in chemically identified subgroups of adult rat sensory neurons. *Eur J Neurosci (1995)* 7:1484-94.

BENN, S. C., COSTIGAN, M., TATE, S., FITZGERALD, M. & WOOLF, C. J.: Developmental expression of the TTX-resistant voltage-gated sodium channels Nav1.8 (SNS) and Nav1.9 (SNS2) in primary sensory neurons. *J Neurosci (2001)* 21:6077-85.

BENNETT, D. L., CLARK, A. J., HUANG, J., WAXMAN, S. G. & DIB-HAJJ, S. D.: The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev (2019)* 99:1079-1151.

BESSOU, P. & PERL, E. R.: Response of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *J Neurophysiol (1969)* 32:1025-43.

BIOLABS, N. E. *NEBioCalculator™* [Online]. Available: https://nebiocalculator.neb.com/#!/ligation [Accessed 6. September 2023].

BIOMERS.NET. *the biopolymer factory* [Online]. Available: https://www.biomers.net.

BIOSOFT, P. *NetPrimer* [Online]. Available: https://www.premierbiosoft.com/crm/jsp/com/pbi/crm/clientside/EligibleForDiscountLoginForm.jsp?LoginForFreeTool=true&PID=3 [Accessed 10. April 2022].

BLACK, J. A., DIB-HAJJ, S., MCNABOLA, K., JESTE, S., RIZZO, M. A., KOCSIS, J. D. & WAXMAN, S. G.: Spinal sensory neurons express multiple sodium channel alpha-subunit mRNAs. *Brain Res Mol Brain Res (1996)* 43:117-31.

BLACK, J. A., FREZEL, N., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G.: Expression of Nav1.7 in DRG neurons extends from peripheral terminals in the skin to central preterminal branches and terminals in the dorsal horn. *Mol Pain (2012)* 8:82.

BLAIR, N. T. & BEAN, B. P.: Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na+ current, TTX-resistant Na+ current, and Ca2+ current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci (2002)* 22:10277-90.

CATTERALL, W. A., GOLDIN, A. L. & WAXMAN, S. G.: International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. *Pharmacol Rev (2005)* 57:397-409.

CHEN, C. L., BROOM, D. C., LIU, Y., DE NOOIJ, J. C., LI, Z., CEN, C., SAMAD, O. A., JESSELL, T. M., WOOLF, C. J. & MA, Q.: Runx1 determines nociceptive sensory neuron phenotype and is required for thermal and neuropathic pain. *Neuron (2006)* 49:365-77.

CICINNATI, V. R., SHEN, Q., SOTIROPOULOS, G. C., RADTKE, A., GERKEN, G. & BECKEBAUM, S.: Validation of putative reference genes for gene expression studies in human hepatocellular carcinoma using real-time quantitative RT-PCR. *BMC Cancer (2008)* 8:350.

CLUSTAL. *Clustal 2 - Multiple Sequence Alignment* [Online]. EMBL-EBI. Available: http://www.clustal.org/clustal2/ [Accessed 25. Juni 2023].

COWARD, K., PLUMPTON, C., FACER, P., BIRCH, R., CARLSTEDT, T., TATE, S., BOUNTRA, C. & ANAND, P.: Immunolocalization of SNS/PN3 and NaN/SNS2 sodium channels in human pain states. *Pain (2000)* 85:41-50.

COX, J. J., REIMANN, F., NICHOLAS, A. K., THORNTON, G., ROBERTS, E., SPRINGELL, K., KARBANI, G., JAFRI, H., MANNAN, J., RAASHID, Y., AL-GAZALI, L., HAMAMY, H., VALENTE, E. M., GORMAN, S., WILLIAMS, R., MCHALE, D. P., WOOD, J. N., GRIBBLE, F. M. & WOODS, C. G.: An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain. *Nature (2006)* 444:894-8.

CROWLEY, C., SPENCER, S. D., NISHIMURA, M. C., CHEN, K. S., PITTS-MEEK, S., ARMANINI, M. P., LING, L. H., MCMAHON, S. B., SHELTON, D. L., LEVINSON, A. D. & ET AL.: Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop basal forebrain cholinergic neurons. *Cell (1994)* 76:1001-11.

CUMMINS, T. R., DIB-HAJJ, S. D., BLACK, J. A., AKOPIAN, A. N., WOOD, J. N. & WAXMAN, S. G.: A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J Neurosci (1999)* 19:RC43.

DE LERA RUIZ, M. & KRAUS, R. L.: Voltage-Gated Sodium Channels: Structure, Function, Pharmacology, and Clinical Indications. *J Med Chem (2015)* 58:7093-118.

DEINHARDT, K. & CHAO, M. V. 2014. Trk Receptors. *In:* LEWIN, G. & CARTER, B. (eds.) *Neurotrophic Factors. Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin, Heidelberg: Springer.

DIB-HAJJ, S. D., CUMMINS, T. R., BLACK, J. A. & WAXMAN, S. G.: Sodium channels in normal and pathological pain. *Annu Rev Neurosci (2010)* 33:325-47.

DIB-HAJJ, S. D., TYRRELL, L., BLACK, J. A. & WAXMAN, S. G.: NaN, a novel voltage-gated Na channel, is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down-regulated after axotomy. *Proc Natl Acad Sci U S A (1998)* 95:8963-8.

DIB-HAJJ, S. D., TYRRELL, L., CUMMINS, T. R., BLACK, J. A., WOOD, P. M. & WAXMAN, S. G.: Two tetrodotoxin-resistant sodium channels in human dorsal root ganglion neurons. *FEBS Lett (1999a)* 462:117-20.

DIB-HAJJ, S. D., TYRRELL, L., ESCAYG, A., WOOD, P. M., MEISLER, M. H. & WAXMAN, S. G.: Coding sequence, genomic organization, and conserved chromosomal localization of the mouse gene Scn11a encoding the sodium channel NaN. *Genomics (1999b)* 59:309-18.

DIEZ-ROUX, G., BANFI, S., SULTAN, M., GEFFERS, L., ANAND, S., ROZADO, D., MAGEN, A., CANIDIO, E., PAGANI, M., PELUSO, I., LIN-MARQ, N., KOCH, M., BILIO, M., CANTIELLO, I., VERDE, R., DE MASI, C., BIANCHI, S. A., CICCHINI, J., PERROUD, E., MEHMETI, S., DAGAND, E., SCHRINNER, S., NURNBERGER, A., SCHMIDT, K., METZ, K., ZWINGMANN, C., BRIESKE, N., SPRINGER, C., HERNANDEZ, A. M.,

HERZOG, S., GRABBE, F., SIEVERDING, C., FISCHER, B., SCHRADER, K., BROCKMEYER, M., DETTMER, S., HELBIG, C., ALUNNI, V., BATTAINI, M. A., MURA, C., HENRICHSEN, C. N., GARCIA-LOPEZ, R., ECHEVARRIA, D., PUELLES, E., GARCIA-CALERO, E., KRUSE, S., UHR, M., KAUCK, C., FENG, G., MILYAEV, N., ONG, C. K., KUMAR, L., LAM, M., SEMPLE, C. A., GYENESEI, A., MUNDLOS, S., RADELOF, U., LEHRACH, H., SARMIENTOS, P., REYMOND, A., DAVIDSON, D. R., DOLLE, P., ANTONARAKIS, S. E., YASPO, M. L., MARTINEZ, S., BALDOCK, R. A., EICHELE, G. & BALLABIO, A.: A high-resolution anatomical atlas of the transcriptome in the mouse embryo. *PLoS Biol (2011)* 9:e1000582.

DJOUHRI, L., FANG, X., OKUSE, K., WOOD, J. N., BERRY, C. M. & LAWSON, S. N.: The TTX-resistant sodium channel Nav1.8 (SNS/PN3): expression and correlation with membrane properties in rat nociceptive primary afferent neurons. *J Physiol (2003)* 550:739-52.

DONG, X., HAN, S., ZYLKA, M. J., SIMON, M. I. & ANDERSON, D. J.: A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell (2001)* 106:619-32.

DUBIN, A. E. & PATAPOUTIAN, A.: Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest (2010)* 120:3760-72.

ELLIOTT, A. A. & ELLIOTT, J. R.: Characterization of TTX-sensitive and TTX-resistant sodium currents in small cells from adult rat dorsal root ganglia. *J Physiol (1993)* 463:39-56.

ERIC S. LANDER, S. L., MARK DALY. *Primer3 Version 4.1.0* [Online]. Available: https://primer3.ut.ee [Accessed 25. Juni 2023].

FABER, C. G., HOEIJMAKERS, J. G., AHN, H. S., CHENG, X., HAN, C., CHOI, J. S., ESTACION, M., LAURIA, G., VANHOUTTE, E. K., GERRITS, M. M., DIB-HAJJ, S., DRENTH, J. P., WAXMAN, S. G. & MERKIES, I. S.: Gain of function Nanu1.7 mutations in idiopathic small fiber neuropathy. *Ann Neurol (2012a)* 71:26-39.

FABER, C. G., LAURIA, G., MERKIES, I. S., CHENG, X., HAN, C., AHN, H. S., PERSSON, A. K., HOEIJMAKERS, J. G., GERRITS, M. M., PIERRO, T., LOMBARDI, R., KAPETIS, D., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G.: Gain-of-function Nav1.8 mutations in painful neuropathy. *Proc Natl Acad Sci U S A (2012b)* 109:19444-9.

FANG, X., DJOUHRI, L., BLACK, J. A., DIB-HAJJ, S. D., WAXMAN, S. G. & LAWSON, S. N.: The presence and role of the tetrodotoxin-resistant sodium channel Na(v)1.9 (NaN) in nociceptive primary afferent neurons. *J Neurosci (2002)* 22:7425-33.

FAURE, L., WANG, Y., KASTRITI, M. E., FONTANET, P., CHEUNG, K. K. Y., PETITPRE, C., WU, H., SUN, L. L., RUNGE, K., CROCI, L., LANDY, M. A., LAI, H. C., CONSALEZ, G. G., DE CHEVIGNY, A., LALLEMEND, F., ADAMEYKO, I. & HADJAB, S.: Single cell RNA sequencing identifies early diversity of sensory neurons forming via bi-potential intermediates. *Nat Commun (2020)* 11:4175.

FUKUOKA, T., KOBAYASHI, K., YAMANAKA, H., OBATA, K., DAI, Y. & NOGUCHI, K.: Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J Comp Neurol (2008)* 510:188-206.

GAUTRON, L., SAKATA, I., UDIT, S., ZIGMAN, J. M., WOOD, J. N. & ELMQUIST, J. K.: Genetic tracing of Nav1.8-expressing vagal afferents in the mouse. *J Comp Neurol (2011)* 519:3085-101.

GINGRAS, J., SMITH, S., MATSON, D. J., JOHNSON, D., NYE, K., COUTURE, L., FERIC, E., YIN, R., MOYER, B. D., PETERSON, M. L., ROTTMAN, J. B., BEILER, R. J.,

MALMBERG, A. B. & MCDONOUGH, S. I.: Global Nav1.7 knockout mice recapitulate the phenotype of human congenital indifference to pain. *PLoS One (2014)* 9:e105895.

GOLDBERG, Y. P., MACFARLANE, J., MACDONALD, M. L., THOMPSON, J., DUBE, M. P., MATTICE, M., FRASER, R., YOUNG, C., HOSSAIN, S., PAPE, T., PAYNE, B., RADOMSKI, C., DONALDSON, G., IVES, E., COX, J., YOUNGHUSBAND, H. B., GREEN, R., DUFF, A., BOLTSHAUSER, E., GRINSPAN, G. A., DIMON, J. H., SIBLEY, B. G., ANDRIA, G., TOSCANO, E., KERDRAON, J., BOWSHER, D., PIMSTONE, S. N., SAMUELS, M. E., SHERRINGTON, R. & HAYDEN, M. R.: Loss-of-function mutations in the Nav1.7 gene underlie congenital indifference to pain in multiple human populations. *Clin Genet (2007)* 71:311-9.

GOODWIN, G. & MCMAHON, S. B.: The physiological function of different voltage-gated sodium channels in pain. *Nat Rev Neurosci (2021)* 22:263-274.

GUNDERSEN, R. W.: Sensory neurite growth cone guidance by substrate adsorbed nerve growth factor. *J Neurosci Res (1985)* 13:199-212.

HAAG, N.: Differenzielle Einzelzell-Transkriptomanalyse zur Identifizierung geruchsrezeptorassoziierter Differenzierungsmoleküle während der Entwicklung des olfaktorischen Systems der Maus. *(2009)*

HAMEED, S.: Na(v)1.7 and Na(v)1.8: Role in the pathophysiology of pain. *Mol Pain (2019)* 15:1744806919858801.

HAN, C., DIB-HAJJ, S. D., LIN, Z., LI, Y., EASTMAN, E. M., TYRRELL, L., CAO, X., YANG, Y. & WAXMAN, S. G.: Early- and late-onset inherited erythromelalgia: genotype-phenotype correlation. *Brain (2009)* 132:1711-22.

HAN, C., YANG, Y., DE GREEF, B. T., HOEIJMAKERS, J. G., GERRITS, M. M., VERHAMME, C., QU, J., LAURIA, G., MERKIES, I. S., FABER, C. G., DIB-HAJJ, S. D. & WAXMAN, S. G.: The Domain II S4-S5 Linker in Nav1.9: A Missense Mutation Enhances Activation, Impairs Fast Inactivation, and Produces Human Painful Neuropathy. *Neuromolecular Med (2015)* 17:158-69.

HAO, M. M., LOMAX, A. E., MCKEOWN, S. J., REID, C. A., YOUNG, H. M. & BORNSTEIN, J. C.: Early development of electrical excitability in the mouse enteric nervous system. *J Neurosci (2012)* 32:10949-60.

HAUSER, W., SCHMUTZER, G., HILBERT, A., BRAHLER, E. & HENNINGSEN, P.: Prevalence of Chronic Disabling Noncancer Pain and Associated Demographic and Medical Variables: A Cross-Sectional Survey in the General German Population. *Clin J Pain (2015)* 31:886-92.

HAUSSER, M.: The Hodgkin-Huxley theory of the action potential. *Nat Neurosci (2000)* 3 Suppl:1165.

HESSE, E., SAITO, H., KIVIRANTA, R., CORREA, D., YAMANA, K., NEFF, L., TOBEN, D., DUDA, G., ATFI, A., GEOFFROY, V., HORNE, W. C. & BARON, R.: Zfp521 controls bone mass by HDAC3-dependent attenuation of Runx2 activity. *J Cell Biol (2010)* 191:1271-83.

HO, C. & O'LEARY, M. E.: Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci (2011)* 46:159-66.

HODGKIN, A. L. & HUXLEY, A. F.: A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol (1952)* 117:500-44.

HUANG, E. J. & REICHARDT, L. F.: Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu Rev Neurosci (2001)* 24:677-736.

HUANG, J., VANOYE, C. G., CUTTS, A., GOLDBERG, Y. P., DIB-HAJJ, S. D., COHEN, C. J., WAXMAN, S. G. & GEORGE, A. L., JR.: Sodium channel NaV1.9 mutations associated with insensitivity to pain dampen neuronal excitability. *J Clin Invest (2017)* 127:2805-2814.

HUANG, S., O'DONOVAN, K. J., TURNER, E. E., ZHONG, J. & GINTY, D. D.: Extrinsic and intrinsic signals converge on the Runx1/CBFbeta transcription factor for nonpeptidergic nociceptor maturation. *Elife (2015)* 4:e10874.

INC., N. E. B. *NEBcutter* [Online]. Available: https://nc3.neb.com/NEBcutter/ [Accessed 10. April 2022].

INFORMATION, N. C. F. B. 2023. *SCN10A sodium voltage-gated channel alpha subunit 10 [Homo sapiens (human)]* [Online]. Available: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?Db=gene&Cmd=ShowDetailView&TermToSearch=6336 [Accessed 6.September 2023].

JARECKI, B. W., SHEETS, P. L., JACKSON, J. O., 2ND & CUMMINS, T. R.: Paroxysmal extreme pain disorder mutations within the D3/S4-S5 linker of Nav1.7 cause moderate destabilization of fast inactivation. *J Physiol (2008)* 586:4137-53.

JUNG, M., DOURADO, M., MAKSYMETZ, J., JACOBSON, A., LAUFER, B. I., BACA, M., FOREMAN, O., HACKOS, D. H., RIOL-BLANCO, L. & KAMINKER, J. S.: Cross-species transcriptomic atlas of dorsal root ganglia reveals species-specific programs for sensory function. *Nat Commun (2023)* 14:366.

KANG, S., AKERBLAD, P., KIVIRANTA, R., GUPTA, R. K., KAJIMURA, S., GRIFFIN, M. J., MIN, J., BARON, R. & ROSEN, E. D.: Regulation of early adipose commitment by Zfp521. *PLoS Biol (2012)* 10:e1001433.

KASHIBA, H., UCHIDA, Y. & SENBA, E.: Difference in binding by isolectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat sensory ganglia. *Brain Res Mol Brain Res (2001)* 95:18-26.

KATZ, B. & MILEDI, R.: Ionic requirements of synaptic transmitter release. *Nature (1967)* 215:651.

KAYE, A. D., EVERETT, E. S., LEHUQUET, A. M., MASON, J. W., MAITSKI, R., PLESSALA, M. J., BARRIE, S., BAPTISTE, C. J., MYCHASKIW, G., 2ND, AHMADZADEH, S., SHEKOOHI, S. & VARRASSI, G.: Frontiers in Acute Pain Management: Emerging Concepts in Pain Pathways and the Role of VX-548 as a Novel NaV1.8 Inhibitor: A Narrative Review. *Curr Pain Headache Rep (2024)* 28:1135-1143.

KIEHN, O.: Locomotor circuits in the mammalian spinal cord. *Annu Rev Neurosci (2006)* 29:279-306.

KING, M. K., LEIPOLD, E., GOEHRINGER, J. M., KURTH, I. & CHALLMAN, T. D.: Pain insensitivity: distal S6-segment mutations in Na(V)1.9 emerge as critical hotspot. *Neurogenetics (2017)* 18:179-181.

KRAMER, I., SIGRIST, M., DE NOOIJ, J. C., TANIUCHI, I., JESSELL, T. M. & ARBER, S.: A role for Runx transcription factor signaling in dorsal root ganglion sensory neuron diversification. *Neuron (2006)* 49:379-93.

KRAMES, E. S.: The role of the dorsal root ganglion in the development of neuropathic pain. *Pain Med (2014)* 15:1669-85.

LABORATORY, T. J. *Mouse Genome Informatics* [Online]. Bar Harbor, Maine, USA. Available: http://www.informatics.jax.org [Accessed 7. Januar 2025].

LALLEMEND, F. & ERNFORS, P.: Molecular interactions underlying the specification of sensory neurons. *Trends Neurosci (2012)* 35:373-81.

LANDY, M. A., GOYAL, M. & LAI, H. C.: Nociceptor subtypes are born continuously over DRG development. *Dev Biol (2021)* 479:91-98.
LEE, C. H. & RUBEN, P. C.: Interaction between voltage-gated sodium channels and the neurotoxin, tetrodotoxin. *Channels (Austin) (2008)* 2:407-12.
LEIPOLD, E., LIEBMANN, L., KORENKE, G. C., HEINRICH, T., GIESSELMANN, S., BAETS, J., EBBINGHAUS, M., GORAL, R. O., STODBERG, T., HENNINGS, J. C., BERGMANN, M., ALTMULLER, J., THIELE, H., WETZEL, A., NURNBERG, P., TIMMERMAN, V., DE JONGHE, P., BLUM, R., SCHAIBLE, H. G., WEIS, J., HEINEMANN, S. H., HUBNER, C. A. & KURTH, I.: A de novo gain-of-function mutation in SCN11A causes loss of pain perception. *Nat Genet (2013)* 45:1399-404.
LENG, X. R., QI, X. H., ZHOU, Y. T. & WANG, Y. P.: Gain-of-function mutation p.Arg225Cys in SCN11A causes familial episodic pain and contributes to essential tremor. *J Hum Genet (2017)* 62:641-646.
LIN, Y. T. & CHEN, J. C.: Dorsal Root Ganglia Isolation and Primary Culture to Study Neurotransmitter Release. *J Vis Exp (2018)*
LIU, Y., YANG, F. C., OKUDA, T., DONG, X., ZYLKA, M. J., CHEN, C. L., ANDERSON, D. J., KUNER, R. & MA, Q.: Mechanisms of compartmentalized expression of Mrg class G-protein-coupled sensory receptors. *J Neurosci (2008)* 28:125-32.
LOLIGNIER, S., BONNET, C., GAUDIOSO, C., NOEL, J., RUEL, J., AMSALEM, M., FERRIER, J., RODAT-DESPOIX, L., BOUVIER, V., AISSOUNI, Y., PRIVAL, L., CHAPUY, E., PADILLA, F., ESCHALIER, A., DELMAS, P. & BUSSEROLLES, J.: The Nav1.9 channel is a key determinant of cold pain sensation and cold allodynia. *Cell Rep (2015)* 11:1067-78.
LORENZO, L. E., RAMIEN, M., ST LOUIS, M., DE KONINCK, Y. & RIBEIRO-DA-SILVA, A.: Postnatal changes in the Rexed lamination and markers of nociceptive afferents in the superficial dorsal horn of the rat. *J Comp Neurol (2008)* 508:592-604.
LOU, S., PAN, X., HUANG, T., DUAN, B., YANG, F. C., YANG, J., XIONG, M., LIU, Y. & MA, Q.: Incoherent feed-forward regulatory loops control segregation of C-mechanoreceptors, nociceptors, and pruriceptors. *J Neurosci (2015)* 35:5317-29.
LÜRKENS, M. 2022. *Understanding the Pathophysiology of Sensory Neuron Dysfunction: Whole Transcriptome Analysis in the Mouse Model Scn11a p.(L799P) by RNA Sequencing.* Master of science, RWTH Aachen.
MA, Q., FODE, C., GUILLEMOT, F. & ANDERSON, D. J.: Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev (1999)* 13:1717-28.
MAKAR, G., KAHLON, S. & SEELEY, M.: Congenital Insensitivity to Pain due to a de novo L369P mutation in the SCN11A gene with Heterotrophic Ossification - A Case Report. *J Orthop Case Rep (2023)* 13:19-23.
MARIANI, M., KARKI, R., SPENNATO, M., PANDYA, D., HE, S., ANDREOLI, M., FIEDLER, P. & FERLINI, C.: Class III beta-tubulin in normal and cancer tissues. *Gene (2015)* 563:109-14.
MARTINEZ, V. & MELGAR, S.: Lack of colonic-inflammation-induced acute visceral hypersensitivity to colorectal distension in Na(v)1.9 knockout mice. *Eur J Pain (2008)* 12:934-44.
MELTZER, S., SANTIAGO, C., SHARMA, N. & GINTY, D. D.: The cellular and molecular basis of somatosensory neuron development. *Neuron (2021)* 109:3736-3757.
MINETT, M. S., NASSAR, M. A., CLARK, A. K., PASSMORE, G., DICKENSON, A. H., WANG, F., MALCANGIO, M. & WOOD, J. N.: Distinct Nav1.7-dependent pain sensations

require different sets of sensory and sympathetic neurons. *Nat Commun (2012)* 3:791.
MOLLIVER, D. C., WRIGHT, D. E., LEITNER, M. L., PARSADANIAN, A. S., DOSTER, K., WEN, D., YAN, Q. & SNIDER, W. D.: IB4-binding DRG neurons switch from NGF to GDNF dependence in early postnatal life. *Neuron (1997)* 19:849-61.
NAHIN, R. L.: Estimates of pain prevalence and severity in adults: United States, 2012. *J Pain (2015)* 16:769-80.
NAU, C. & LEIPOLD, E.: Voltage-gated sodium channels and pain. *e-Neuroforum (2017)* 23:123-130.
PADILLA, F., COUBLE, M. L., COSTE, B., MAINGRET, F., CLERC, N., CREST, M., RITTER, A. M., MAGLOIRE, H. & DELMAS, P.: Expression and localization of the Nav1.9 sodium channel in enteric neurons and in trigeminal sensory endings: implication for intestinal reflex function and orofacial pain. *Mol Cell Neurosci (2007)* 35:138-52.
PAYANDEH, J., GAMAL EL-DIN, T. M., SCHEUER, T., ZHENG, N. & CATTERALL, W. A.: Crystal structure of a voltage-gated sodium channel in two potentially inactivated states. *Nature (2012)* 486:135-9.
PHATARAKIJNIRUND, V., MUMM, S., MCALISTER, W. H., NOVACK, D. V., WENKERT, D., CLEMENTS, K. L. & WHYTE, M. P.: Congenital insensitivity to pain: Fracturing without apparent skeletal pathobiology caused by an autosomal dominant, second mutation in SCN11A encoding voltage-gated sodium channel 1.9. *Bone (2016)* 84:289-298.
PREVENTION, C. F. D. C. A. 2021. *CDC WONDER* [Online]. Atlanta: National Center for Health Statistics. Available: http://wonder.cdc.gov [Accessed 10. Mai 2024].
PRIEST, B. T., MURPHY, B. A., LINDIA, J. A., DIAZ, C., ABBADIE, C., RITTER, A. M., LIBERATOR, P., IYER, L. M., KASH, S. F., KOHLER, M. G., KACZOROWSKI, G. J., MACINTYRE, D. E. & MARTIN, W. J.: Contribution of the tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium channel NaV1.9 to sensory transmission and nociceptive behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A (2005)* 102:9382-7.
QI, L., HUANG, C., WU, X., TAO, Y., YAN, J., SHI, T., CAO, C., HAN, L., QIU, M., MA, Q., LIU, Z. & LIU, Y.: Hierarchical Specification of Pruriceptors by Runt-Domain Transcription Factor Runx1. *J Neurosci (2017)* 37:5549-5561.
QIU, F., JIANG, Y., ZHANG, H., LIU, Y. & MI, W.: Increased expression of tetrodotoxin-resistant sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 within dorsal root ganglia in a rat model of bone cancer pain. *Neurosci Lett (2012)* 512:61-6.
R. SCHMIDT, F. L., M. HECKMANN: *Physiologie des Menschen (2010) Springer Medizin Verlag*
REXED, B.: The cytoarchitectonic organization of the spinal cord in the cat. *J Comp Neurol (1952)* 96:414-95.
ROSTOCK, C., SCHRENK-SIEMENS, K., POHLE, J. & SIEMENS, J.: Human vs. Mouse Nociceptors - Similarities and Differences. *Neuroscience (2018)* 387:13-27.
SANGAMESWARAN, L., DELGADO, S. G., FISH, L. M., KOCH, B. D., JAKEMAN, L. B., STEWART, G. R., SZE, P., HUNTER, J. C., EGLEN, R. M. & HERMAN, R. C.: Structure and function of a novel voltage-gated, tetrodotoxin-resistant sodium channel specific to sensory neurons. *J Biol Chem (1996)* 271:5953-6.
SCHMIDT, A. 2024. *Structural Alterations Reduce Nociception in Mice Carrying the L799P-Gain-of-Function Variant*
in the NaV1.9 Voltage-Gated Sodium Channel. RWTH Aachen University.

SCIENTIFIC, T. *Tm Calculator* [Online]. Available: https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/tm-calculator.html?CID=fl-we120377 [Accessed 6. September 2023].

SHARMA, N., FLAHERTY, K., LEZGIYEVA, K., WAGNER, D. E., KLEIN, A. M. & GINTY, D. D.: The emergence of transcriptional identity in somatosensory neurons. *Nature (2020)* 577:392-398.

SHIELDS, S. D., AHN, H. S., YANG, Y., HAN, C., SEAL, R. P., WOOD, J. N., WAXMAN, S. G. & DIB-HAJJ, S. D.: Nav1.8 expression is not restricted to nociceptors in mouse peripheral nervous system. *Pain (2012)* 153:2017-2030.

SHIERS, S., KLEIN, R. M. & PRICE, T. J.: Quantitative differences in neuronal subpopulations between mouse and human dorsal root ganglia demonstrated with RNAscope in situ hybridization. *Pain (2020)* 161:2410-2424.

SIVILOTTI, L., OKUSE, K., AKOPIAN, A. N., MOSS, S. & WOOD, J. N.: A single serine residue confers tetrodotoxin insensitivity on the rat sensory-neuron-specific sodium channel SNS. *FEBS Lett (1997)* 409:49-52.

SMEYNE, R. J., KLEIN, R., SCHNAPP, A., LONG, L. K., BRYANT, S., LEWIN, A., LIRA, S. A. & BARBACID, M.: Severe sensory and sympathetic neuropathies in mice carrying a disrupted Trk/NGF receptor gene. *Nature (1994)* 368:246-9.

SNIDER, W. D. & MCMAHON, S. B.: Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron (1998)* 20:629-32.

STANTCHEVA, K. K., IOVINO, L., DHANDAPANI, R., MARTINEZ, C., CASTALDI, L., NOCCHI, L., PERLAS, E., PORTULANO, C., PESARESI, M., SHIRLEKAR, K. S., DE CASTRO REIS, F., PAPAROUNTAS, T., BILBAO, D. & HEPPENSTALL, P. A.: A subpopulation of itch-sensing neurons marked by Ret and somatostatin expression. *EMBO Rep (2016)* 17:585-600.

STIRLING, L. C., FORLANI, G., BAKER, M. D., WOOD, J. N., MATTHEWS, E. A., DICKENSON, A. H. & NASSAR, M. A.: Nociceptor-specific gene deletion using heterozygous NaV1.8-Cre recombinase mice. *Pain (2005)* 113:27-36.

SUBRAMANIAN, N., WETZEL, A., DOMBERT, B., YADAV, P., HAVLICEK, S., JABLONKA, S., NASSAR, M. A., BLUM, R. & SENDTNER, M.: Role of Na(v)1.9 in activity-dependent axon growth in motoneurons. *Hum Mol Genet (2012)* 21:3655-67.

SUN, Y., DYKES, I. M., LIANG, X., ENG, S. R., EVANS, S. M. & TURNER, E. E.: A central role for Islet1 in sensory neuron development linking sensory and spinal gene regulatory programs. *Nat Neurosci (2008)* 11:1283-93.

TAVARES-FERREIRA, D., SHIERS, S., RAY, P. R., WANGZHOU, A., JEEVAKUMAR, V., SANKARANARAYANAN, I., CERVANTES, A. M., REESE, J. C., CHAMESSIAN, A., COPITS, B. A., DOUGHERTY, P. M., GEREAU, R. W. T., BURTON, M. D., DUSSOR, G. & PRICE, T. J.: Spatial transcriptomics of dorsal root ganglia identifies molecular signatures of human nociceptors. *Sci Transl Med (2022)* 14:eabj8186.

TEILLET, M. A., KALCHEIM, C. & LE DOUARIN, N. M.: Formation of the dorsal root ganglia in the avian embryo: segmental origin and migratory behavior of neural crest progenitor cells. *Dev Biol (1987)* 120:329-47.

TODD, A. J.: Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. *Nat Rev Neurosci (2010)* 11:823-36.

TREPEL, M.: *Neuroanatomie, Struktur und Funktion (2012) Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag*

TREUTLEIN, E. M., KERN, K., WEIGERT, A., TARIGHI, N., SCHUH, C. D., NUSING, R. M., SCHREIBER, Y., FERREIROS, N., BRUNE, B., GEISSLINGER, G., PIERRE, S. & SCHOLICH, K.: The prostaglandin E2 receptor EP3 controls CC-chemokine ligand 2-mediated neuropathic pain induced by mechanical nerve damage. *J Biol Chem (2018)* 293:9685-9695.

TYAGI, S., HIGERD-RUSLI, G. P., GHOVANLOO, M. R., DIB-HAJJ, F., ZHAO, P., LIU, S., KIM, D. H., SHIM, J. S., PARK, K. S., WAXMAN, S. G., CHOI, J. S. & DIB-HAJJ, S. D.: Compartment-specific regulation of Na(V)1.7 in sensory neurons after acute exposure to TNF-alpha. *Cell Rep (2024)* 43:113685.

USOSKIN, D., FURLAN, A., ISLAM, S., ABDO, H., LONNERBERG, P., LOU, D., HJERLING-LEFFLER, J., HAEGGSTROM, J., KHARCHENKO, O., KHARCHENKO, P. V., LINNARSSON, S. & ERNFORS, P.: Unbiased classification of sensory neuron types by large-scale single-cell RNA sequencing. *Nat Neurosci (2015)* 18:145-53.

WAHL, G. M., BERGER, S. L. & KIMMEL, A. R.: Molecular hybridization of immobilized nucleic acids: theoretical concepts and practical considerations. *Methods Enzymol (1987)* 152:399-407.

WETH, F. 1993. Geruchsrezeptoren des Zebrabärblings - Untersuchungen zur genomischen Repräsentation und Expression.

WIRE, B. 2025. *Vertex Announces FDA Approval of JOURNAVX™ (suzetrigine), a First-in-Class Treatment for Adults With Moderate-to-Severe Acute Pain* [Online]. Available: https://investors.vrtx.com/news-releases/news-release-details/vertex-announces-fda-approval-journavxtm-suzetrigine-first-class [Accessed 25.02.2025].

ZYBURA, A., HUDMON, A. & CUMMINS, T. R.: Distinctive Properties and Powerful Neuromodulation of Na(v)1.6 Sodium Channels Regulates Neuronal Excitability. *Cells (2021)* 10:

ZYLKA, M. J., DONG, X., SOUTHWELL, A. L. & ANDERSON, D. J.: Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A (2003)* 100:10043-8.

7 Anhang

7.1 I: Primer

Tabelle 1: Primer und Temperaturen Auflistung der verwendeten Primer; [(1)] Accession number/Kennnummer der Referenzsequenz in der NCBI-Datenbank; Linker-Sequenzen als kleingeschriebene Basen; [(2)] Schmelztemperatur des zur Referenzsequenz komplementären Primer Bereiches; [(3)] Schmelztemperatur des Primers inklusive Linker Sequenz (in Kleinbuchstaben); Primer für *Tubb3* von N. Haag *(Haag, 2009)* entnommen.

In Situ Hybridisierung					
Gen	Acc# [(1)]	Ausrichtung	Primersequenz (5' → 3')	Tm1[(2)]	Tm2[(3)]
Scn9a	NM_001290674.1	Forward	tc GGTAC CCCTGTTTCTGGCTTTATTACTGAGT	58.83	72.93
		Reverse	gg GAGCT CGAGTCTATGTTAACTTGGCAGCAT	57.82	74.25
Scn10a	NM_001205321.1	Forward	cgg GGTAC CAGATGACAACAGATCACTACAATCC	57.08	75.49
		Reverse	tc GAGCT CAAAGGTTCATTCAAGTAGTCTGCAG	59.38	73.69
Scn11a	NM_011887.3	Forward	gctagc GGTAC CTCATCGTCTTTGTGCTGATCATG	61.0	78.44
		Reverse	ggc GAGCT CATGGTTAAATTCGGATCTTCTTCGG	64.32	79.44
Tubb3	NM_023279.2	Forward	ga GGTAC CGATGTATGAAGATGATGACGAGGA	58.5	72.4
		Reverse	ga GAGCT CCCATAAAAACAGACGAATAAGCAA	58.9	71.3
Genotypisierung					
Primer	Ausrichtung	Primersequenz (5' → 3')		Annealingtemperatur	Amplikongröße (bp)
E16 Primer Mix: SCN-BAC-E16	Forward	TACCTCAGGCTCCATCTTGC		59°C	748
	Reverse	CTGACACCTCCCATCATGC			
KI-Δneo Primer Mix	Forward	GCAGTCCCCATCAAAATTCC		57°C	272
	Reverse	GAATCGATCCTAGAGAATTCCG			

7.2 II: Digoxigenin-*antisense*-RNA-Sonden und Hybridisierungstemperaturen

Tabelle 2: Tabelle mit Angaben zu verwendeter Hybridisierungstemperatur, Sondenlänge sowie GC-Gehalt des zu mRNA komplementären Bereichs

Gen	Hybridisierungstemperatur °C	Sondenlänge (nt)	GC-Gehalt der Sonde
Scn9a	Berechnet 64°C Ausgeführt bei 70°C	636bp	44%
Scn10a	Berechnet 72°C Ausgeführt bei 70°C	408bp	57%
Scn11a	Berechnet 69°C Ausgeführt bei 70°C	547bp	52%
Tubb3	Berechnet 70°C Ausgeführt bei 70°C	299bp	54%

7.3 III: Antikörper

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Antikörper mit für die Immunfluoreszenzfärbungen verwendeten Verdünnungen

Primärantikörper					
Zielmolekül	Wirtsorganismus	Verdünnung	Produkt-ID	Firma	
Islet1/2	Maus	1:50	39.4D5	DSHB	
PlexinC1	Schaf	1:300	AF5375	R&D Systems	
TrkA	Ziege	1:40	AF1056	R&D Systems	
Runx1	Hase	1:400	ab229482	Abcam	
CleavedCaspase3	Hase	1:200	9661S	Cell Signaling	
Sekundärantikörper					
Zielspezies	Wirtsorganismus	Verdünnung	Konjugat	Produkt-ID	Firma
Maus	Esel	1:1000	AF647	A31571	Invitrogen
Schaf	Esel	1:1000	AF488	A11015	Invitrogen
Hase	Esel	1:1000	AF594	A21207	Invitrogen
Ziege	Esel	1:1000	AF555	A21432	Invitrogen
Hase	Esel	1:1000	AF488	A21206	Invitrogen

7.4 IV: Kits

Kits	Hersteller
ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit	Zymo Research Corp., Irvine, USA
NucleoBond Xtra Midi Kit	MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific, USA

7.5 V: Geräte

Geräte	Hersteller
Thermocycler Biometra TADVANCED	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Zentrifuge 5424, 5427 R	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, Deutschland
Gefrierkühlschrank (-70°C)	Kendro Laboratory Products GmbH Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer	Biozym Scientific GmbH Hessisch Oldendorf, Deutschland
IKA®Vortex4 digital	Sigma Aldrich
Kaltlichtquelle Zeiss CL 4500 LED (CRI 90)	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschland

Motorisierter Stößel (431-0094)	VWR International, USA
NanoDrop2000	VWR International, USA
NextSeq®500 Sequencer	Illumina, USA
Pipetten (1000µl, 200µl, 20µl, 10µl, 0,1-2,5µl)	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, Deutschland
Stemi 305	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena Deutschland
Thermocycler peOstar	PEQLAB Biotechnologie GmbH VWR International, USA
ThermoMixer C	Eppendorf Vertrieb GmbH, Hamburg, Deutschland
UVP UVsolo touch	Analytik Jena AG, Jena, Deutschland
Zeiss Axio Observer z.1 ApoTome.2 Fluoreszenz-Mikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Deutschland
Kryostat-Mikrotom	Leica Biosystems
Hybridisierungsofen	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Slide Scanner Fritz	Precipoint, Deutschland

7.6 VI: Software / Webseiten

Software / Webseiten

ChatGPT (OpenAI, Versionen GPT-3.5, GPT-4, GPT-4o)
GraphPad Prism (10.2.2)
ImageJ (JIJI) 1.53c
Microsoft Office (Excel, Word, Powerpoint)
http://nc3.n3b.com/NEBcutter/
https://www.clustal.org/clustal2
https://www.ncbi.nlm.nih.gov
https://primer3.ut.ee
https://www.premierbiosoft.com/netprime

Zur sprachlichen Überarbeitung einzelner Abschnitte wurde das KI-gestützte Sprachmodell Chat GPT (OpenAI) genutzt – darunter GPT-3.5, GPT-4 und GPT-4o (Stand: Juni 2025). Es kamen ausschließlich bereits eigenständig verfasste Textpassagen zum Einsatz, die durch das Tool stilistisch verbessert oder sprachlich geglättet wurden. Eine inhaltliche Texterstellung, Argumentationsentwicklung oder fachliche Bewertung durch das Tool erfolgte nicht.

8 Danksagung

Ohne die Unterstützung einiger Menschen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Deshalb gilt mein besonderer Dank zuallererst Univ.-Prof. Dr. med. Ingo Kurth für die Möglichkeit in seinem Institut mitzuarbeiten und damit diese Arbeit realisieren zu dürfen.

Frau Dr. rer. nat. Natja Haag war für mich auf Grund ihrer fachlichen Expertise und ihrer wertvollen Ratschläge und Anregung während des gesamten Prozesses eine sehr wichtige Unterstützung. Außerdem danke ich ihr für ihre unermüdliche Geduld beim Korrekturlesen.

Ebenso möchte ich Sebastian Gießelmann danken, der immer weiß, wo sich jegliches Material befindet. Ohne ihn hätte sich sicher der ein oder andere Rechenfehler bei den Konzentrationsberechnungen eingeschlichen.

Ebenso hat Martha Lürkens, mit unzähligen Lachern, dem obligatorischen Kaffee in der Mittagspause und inspirierenden Gesprächen meine Zeit im Labor zu einer besonderen Erinnerung gemacht. Ihr kritisches Denken beeindruckt mich sehr und ich bin dankbar, dass sich unsere Wege im Labor gekreuzt haben.

Meine tiefste Dankbarkeit möchte ich meinen Eltern ausdrücken. Mit ihrer Einstellung zum Leben sind sie sind mir jeden Tag aufs Neue eine Inspiration. Ihr Vertrauen in mich ermutigt mich, Herausforderungen anzunehmen und an ihnen zu wachsen.

9 Erklärung zur Datenaufbewahrung

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten im **Institut für Humangenetik und Genommedizin** des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

10 Eidesstattliche Erklärung

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, **Sofia Francesca de Simone** an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Auswirkung der Nav1.9 p.(L799P) *gain-of-function*-Mutation auf die Entwicklung der Schmerzbahn**“** dargestellten Ergebnisse erhoben habe:
Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	Sofia Francesca de Simone	Natja Haag	Ingo Kurth	Martha Lürkens	Künstliche Intelligenz (ChatGPT)	Summe (%)
Studienüberwachung		70	30			100
Studiendesign/Konzeption	50	40	10			100
Datenerhebung	100					100
Datenauswertung	100					100
Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen und der *In Situ*-Hybridisierungen	100					100
Statistische Auswertung	100					100
Bereitstellung von Materialien		30	70			100
Interpretation der Datenauswertung	70	30				100
Verfassung Manuskripts	100					100
Korrektur des Manuskripts		70		25	5	100