

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Angefertigt am Institut für Physiologie und Pathophysiologie der Friedrich-Alexander-
Universität Erlangen-Nürnberg
(PD Dr. med. Angelika Lampert)

"Zur Wirkung des Seeanemonen Toxins II (ATX-II) auf
spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle neuronaler Zellen und zu den
dadurch erreichten Änderungen im Schmerzempfinden"

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Alexandra Birgit Klinger

aus München

München 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Prof. Dr. Joachim Braun

Referent: Prof. Dr. Manfred Stangassinger

Korreferent: Prof. Dr. Andrea Fischer

Tag der Promotion: 09.02.2013

Die vorliegende Arbeit ist nach § 6 Abs. 2 der Promotionsordnung der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München in der geänderten Fassung vom 15.01.2007 als kumulative Dissertation gestaltet. Die im Abschnitt V.-Veröffentlichung dargestellten Ergebnisse sind in der englischsprachigen, wissenschaftlichen, mit Gutachtersystem ausgestatteten Zeitschrift "*Molecular Pain*" publiziert (Klinger et al. *Molecular Pain* 2012, 8:69; <http://www.molecularpain.com/content/8/1/69>).

meiner Familie

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	ZIEL DIESER ARBEIT	3
III.	DARSTELLUNG WICHTIGER GRUNDLAGEN	5
1	Natriumionenkanäle	5
1.1	Aufbau	5
1.2	Einteilung	6
1.3	Funktion.....	7
2	Resurgent current	9
2.1	Entstehung	9
2.2	Bedeutung.....	10
3	Schmerzfasern	11
3.1	Einteilung	11
3.2	Eigenschaften.....	11
4	ATX-II	12
IV.	MATERIAL UND METHODEN	13
1	Patch-Clamp Technik	13
1.1	Historie	13
1.2	Patch-Clamp Aufbau	16
1.3	Durchführung und Untersuchungsmaterial.....	21
2	Psychophysik	25
3	Zellvorbereitung für RT-qPCR-Experimente	28
V.	VERÖFFENTLICHUNG	29
VI.	DISKUSSION	62
VII.	ZUSAMMENFASSUNG	65
VIII.	SUMMARY	67
IX.	LITERATURVERZEICHNIS	69
X.	ANHANG	72
XI.	DANKSAGUNG	73

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

∅	Durchmesser
α	Alpha
β	Beta
τ	Tau, Zeitkonstante
Abb.	Abbildung
AD-Wandler	Analog-Digital Wandler
AP	Aktionspotenzial
AS	Aminosäure
ATX-II	Seeanemonen Toxin II (rekombinant)
DI - IV	Domäne eins bis vier (eines Natriumionenkanals)
DA-Wandler	Digital-Analog Wandler
DNA	desoxyribonucleic acid / Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DRG(s)	dorsal root ganglia neuron(s) / Hinterwurzelganglionneuron(e)
HEK 293	human Embryonic Kidney cells / menschliche, embryonale Nierenzelllinie
kDa	kilo-Dalton
M.W.	molecular weight / Molekulargewicht
N1E-115	Neuroblastomzellen (Zelllinie)
Na _v (s)	spannungsgesteuerter Natriumionenkanal (Pl.) / voltage-gated sodium channel(s)
NRS	numeric rating scale / numerische Bewertungsskala
PBS	phosphate buffered saline / Phosphat gepufferte Lösung
RNA	ribonucleic acid / Ribonukleinsäure
RT-qPCR	Reverse Transkription- quantitative PCR
S1-S6	Segment eins bis sechs (eines Natriumionenkanals)
SCN8a ^{med}	Gen des Na _v 1.6 mit einer Mutation für die motorische-Endplatten-Krankheit
TTXs/r	Tetrodotoxin sensitiv/resistent

I. EINLEITUNG

Schmerz ist für Mensch und Tier gleichermaßen belastend und mindert mitunter erheblich die Lebensqualität. Dies ist insbesondere für Tierärzte relevant, da nicht der Lebenserhalt um jeden Preis, sondern in erster Linie eine akzeptable Lebensqualität Ziel unserer Bemühungen sein sollte.

Umso wichtiger ist es die Grundlagen, die zu Schmerz führen, zu erforschen, um mit Hilfe dieser Erkenntnisse möglichst spezifische Therapiemethoden entwickeln zu können. Um die Information über ein schmerzhaftes Ereignis weiterleiten zu können, sind Natriumionenkanäle (Na_v s) und die von ihnen generierten Aktionspotentiale (APs) essentiell. Über APs kann dem Gehirn via Nervenfasern die Information über noxische Ereignisse aus der Peripherie übermittelt werden. Dies ist ein überlebensnotwendiger Mechanismus, um den Körper vor schädigenden Einflüssen zu bewahren. Was aber, wenn dieser Mechanismus fehlerhaft ist? So gibt es Erkrankungen, denen eine Mutation eines Na_v zu Grunde liegt und die mit kontinuierlichen, unphysiologischen Schmerzen einhergehen. Eine andere Mutation führt zu völliger Schmerzlosigkeit, ein Zustand, der nur auf den ersten Blick paradiesisch erscheint, denn den Betroffenen fehlt ein natürlicher Schutzreflex, der Schäden des Körpers verhindern kann. Doch manchmal ist Schmerz auch hinderlich. Leben Tiere wie Nacktmulle oder Mausohrfledermäuse in großen, unterirdischen Kolonien mit hohem CO_2 -Druck, so führt ein durch Na_v -Mutation hervorgerufener, fehlender "Säureschmerz" durchaus zu Überlebensvorteilen. Auch führt eine schmerzhaft Erfahrung eines Lebewesens zu künftigem Meideverhalten, so dass Schmerz auch eine mittelbar protektive Wirkung besitzt. Wer je beim Tauchen Bekanntschaft mit den Nesselfäden einer Seeanemone gemacht hat, wird künftig sicherlich Abstand halten. So schützt sich die Anemone auch vor potentiellen Fressfeinden oder erlegt auf diese Weise ihrerseits Beute. Der

Anemonenfisch hingegen scheint sich nicht an den Giften der Blumentiere zu stören und lebt in Symbiose inmitten der Tentakel mit den pfeilschnellen Nesselprojektilen, die anderen Fischen das Leben kosten (s. Abb.1). Nicht nur für Meeresbiologen sind Seeanemonen also ein interessantes Forschungsobjekt, auch im Bereich der Schmerzforschung sind ihr Gift und dessen Wirkung auf die Schmerzsignal-generierenden Na_vs durchaus von Bedeutung. Über welche Mechanismen führt das Gift zu Schmerz und können wir daraus Schlüsse auf die Funktionsweise der Na_vs ziehen? Kann es darüber hinaus vielleicht sogar zur Diagnostik oder Therapie bei Schmerzereignissen, wie wir dies bereits von anderen Tiergiften (z. B. dem ω -Conotoxin der Kegelschnecke) kennen, eingesetzt werden?

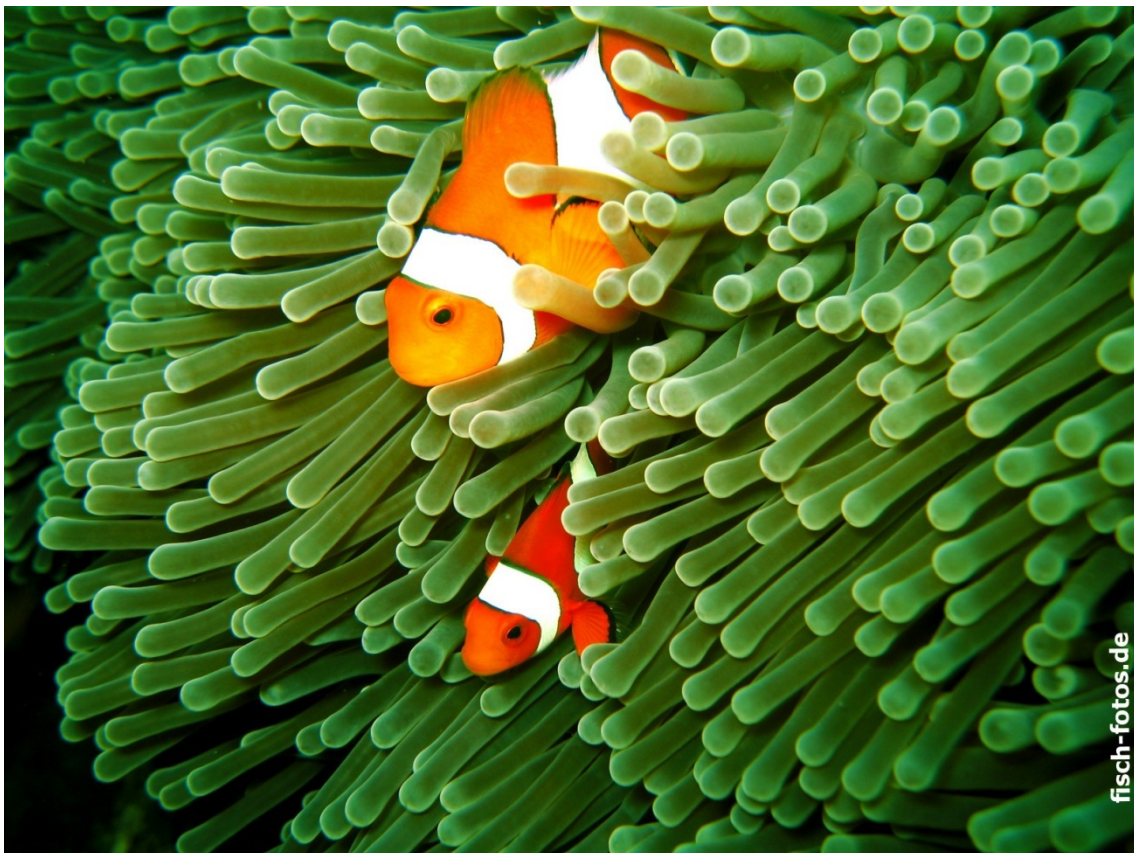


Abb.1: Seeanemone mit Anemonenfischen

(Quelle: <http://www.fisch-fotos.de/wallpapers>)

II. ZIEL DIESER ARBEIT

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, mit Hilfe von elektrophysiologischen Patch-Clamp Messungen zu untersuchen, ob und in welcher Weise das Seeanemonen-Toxin ATX-II Ströme durch Na_vs in sensorischen Hinterwurzelganglionneuronen (kurz: DRGs; engl. dorsal root ganglia neurons) modifiziert. Von besonderem Interesse für diese Arbeit ist ein Na^+ -Strom, der aus der durch das Toxin modifizierten, schnellen Inaktivierung der Na_vs entstehen kann; der sog. "resurgent current" (sinngemäß "wieder auflebender Strom"; Erläuterung hierzu s. Abschnitt III.2). Bisher konnte noch nicht gezeigt werden, dass ATX-II in sensorischen Neuronen resurgent currents induzieren kann. Auch die pathophysiologische Bedeutung dieser Ströme ist nicht geklärt. Die vorliegende Arbeit untersucht, in wie weit die durch das Toxin induzierten resurgent currents zu Änderungen im Schmerzempfinden beitragen können.

Säugetiere haben für die Schmerzwahrnehmung zwei Nervenfasertypen: langsam leitende C-Schmerzfasern, die mit kleinen DRGs verbunden sind und schnell leitende A-Schmerzfasern, die in den großen DRGs ihre Entsprechung finden. Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob beide Fasertypen unterschiedlich auf ATX-II reagieren und gesetzt den Fall, ob dies auf die zugrundeliegende Na_v -Subtypzusammensetzung zurück zu führen ist. Um dies zu beleuchten, werden geringe Mengen ATX-II auf kultivierte, vereinzelte DRGs der Maus appliziert und die Auswirkungen des Toxins auf die Na^+ -Ströme mit der Patch-Clamp Methode untersucht.

Um die Befunde auf molekularer Ebene eingehender zu untersuchen, sollen im Rahmen dieser Arbeit die wesentlichen Na_v -Untereinheiten ($\text{Na}_v1.6$ und $\text{Na}_v1.7$) jeweils in Zelllinien zur Expression gebracht und dort mit der Patch-Clamp Methode auf ihre ATX-II Empfindlichkeit untersucht werden.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit ist es, festzustellen, ob die bei der Maus auf molekularer Ebene untersuchten Effekte von ATX-II tatsächlich Auswirkungen auf das Schmerzempfinden haben können. Da Menschen zu der Qualität der Wahrnehmung befragt werden können und so ein größtmöglicher Erkenntnisgewinn möglich ist, wird dieser Teil der Arbeit an humanen Probanden durchgeführt. Hierfür wird gesunden, adulten Probanden eine geringe Menge des Toxins intrakutan injiziert und nachfolgend werden die je nach vermittelndem Schmerzfasertyp unterschiedlichen Empfindungsqualitäten (z. B. stechende, brennende, dumpfe Schmerzen) ebenso wie die Intensität der Empfindungen (mittels einer numerischen Bewertungsskala von 0-10) im Rahmen psychophysikalischer Tests untersucht.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen einen Beitrag leisten zur Aufklärung resurgent current-induzierter Schmerzen bei Tier und Mensch und langfristig die Möglichkeit eröffnen, u. a. auf der Basis dieser Ergebnisse, spezifische, schmerzhemmende Medikamente zu entwickeln.

Wichtige Ergebnisse aus diesen Untersuchungen sind publiziert (Abschnitt V dieser Dissertation) sowie im Rahmen einer Posterpräsentation vorgestellt worden (Abschnitt X der vorliegenden Arbeit).

III. DARSTELLUNG WICHTIGER GRUNDLAGEN

1 Natriumionenkanäle

Für die Entstehung von AP's auf erregbaren Zellmembranen sind Na_v s von zentraler Bedeutung.

1.1 Aufbau

Na_v s sind Proteine und werden eingeteilt in α - ($\text{Na}_v1.1 - 1.9$) und beigeordnete β - ($\beta1 - \beta4$) Untereinheiten. Die α -Untereinheiten bestehen aus vier Domänen (DI - DIV, Abb.2), die aus je sechs Transmembransegmenten (S1-S6) aufgebaut sind (CATTERALL, 2000) und bilden bereits ein funktionierendes Kanalprotein. Die vier Domänen lagern sich derart aneinander, dass in der Mitte eine Pore entsteht, die von S5 und S6 aller vier Domänen gebildet wird. Durch diese Pore gelangen bei entsprechender Kanalkonfiguration Natriumionen (Na^+) ins Zellinnere, andere Ionen werden auf Grund ihrer Ladung, Größe und ihrem Hydratisierungsgrad durch den Selektivitätsfilter (s. Abb.2, rote Schleifen) an der Kanalpassage gehindert. Die S4 (s. Abb.2, rosa hinterlegte Segmente) bilden die Spannungssensoren und zwischen DIII und DIV befindet sich das aus den Aminosäuren Isoleucin, Phenylalanin und Methionin gebildete IFM-Motif (s. Abb.2, gelber Kreis), das als Inaktivierungspartikel fungiert. Die β -Untereinheiten nehmen Einfluss auf die Kanaleigenschaften und -expression der α -Untereinheiten und treten in den unterschiedlichsten Kombinationen mit diesen auf. Von besonderem Interesse ist die $\beta4$ -Untereinheit, da sie oder Teile von ihr nach heutigem Wissensstand das "blocking particle" (den Na_v blockierender Partikel) darstellen, das für den resurgent current eine wichtige Rolle spielt.

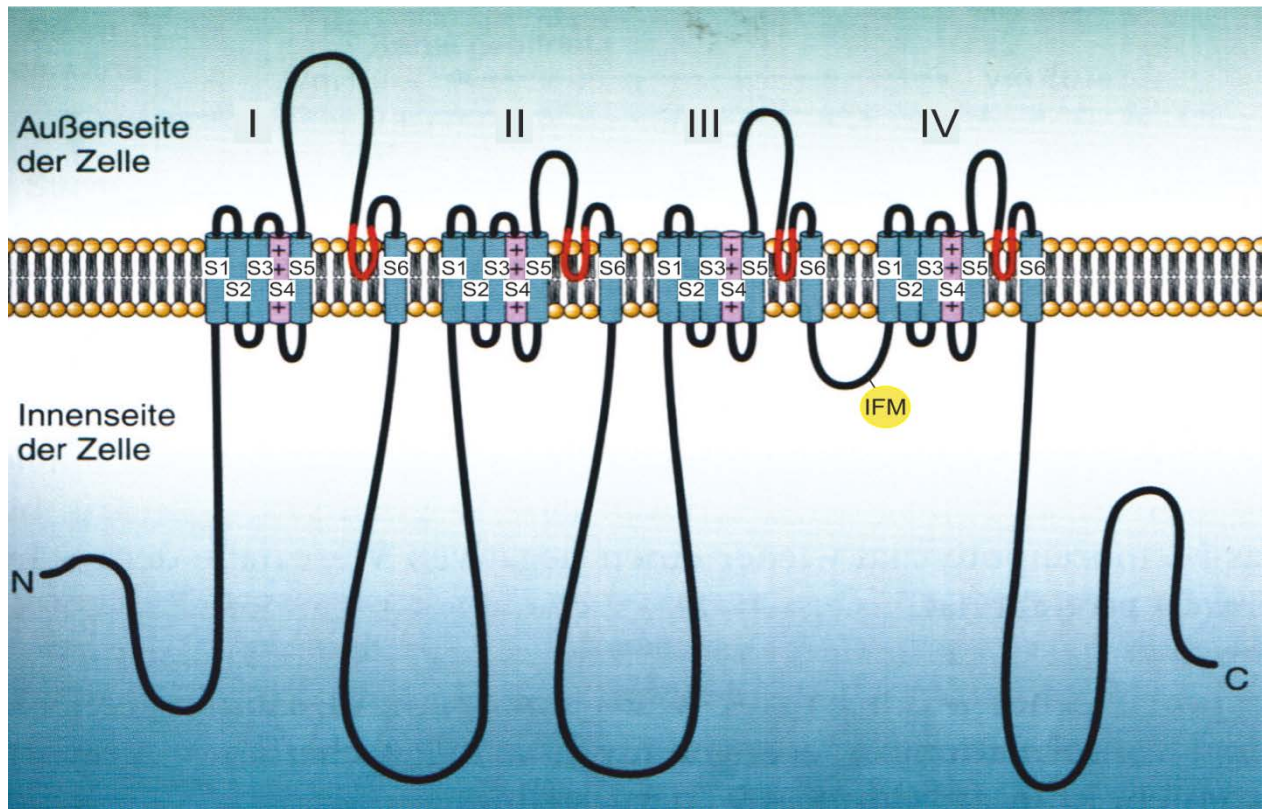


Abb.2: Schematisierte Darstellung eines Na_v ; modifiziert aus (BEAR et al., 2007)

1.2 Einteilung

Nach ihrer Empfindlichkeit dem Gift Tetrodotoxin (TTX) des Kugelfisches (*Tetraodon lineatus*) gegenüber werden die Na_v s in TTX-resistente (TTXr) und TTX-sensitive (TTXs) Kanäle unterteilt. Die Kanalsubtypen zeigen bei verschiedenen Membranspannungen unterschiedliche Kinetiken, was auch zu differierenden Erregungseigenschaften der jeweiligen Zellen führt (CATTERALL et al., 2005). In sensorischen Neuronen findet man die TTXs Kanäle $\text{Na}_v1.1$, 1.2, 1.3, 1.6 und 1.7 sowie die TTX-r Kanäle $\text{Na}_v1.8$ und 1.9. Dabei enthält ein Neuron stets mehrere Kanalsubtypen. Bei den mit großen sensorischen Neuronen assoziierten A-Fasern ist hauptsächlich $\text{Na}_v1.6$, bei C-Fasern, die mit kleinen Neuronen in Verbindung stehen, $\text{Na}_v1.7$ für die AP-Weiterleitung notwendig (WILSON et al., 2011). Diese beiden TTXs Kanäle scheinen also eine besondere Rolle in der Schmerzleitung zu spielen.

1.3 Funktion

Die Hauptfunktion der Na_vs besteht in der Erkennung und Weiterleitung von Reizen mit Hilfe von APs. Hierbei sind sie für die Phase des schnellen Aufstriches (s. Abb.3, orangefarbener Abschnitt des APs) verantwortlich. Kommt es zur Depolarisation einer erregbaren Membran, so öffnen sich die Na_vs (s. Abb.4a) und Na^+ beginnen in die Zelle zu fließen. Hierdurch wird die Membran fortschreitend depolarisiert, d. h. immer mehr Na_vs gehen in den offenen, aktivierten Zustand über und die Ladung der Zellmembran wird zunehmend weniger negativ. Schließlich wird das Schwellenpotential zur Entstehung eines APs erreicht (s. Abb.3, gelber Abschnitt). Von diesem Moment an folgt die AP-Generierung dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (s. Abb.3, oranger Abschnitt) (HODGKIN & HUXLEY, 1952). Nach kurzer Zeit schwingt das IFM-Motif in die Kanalpore und verhindert so den weiteren Einstrom von Na^+ . Der Kanal ist inaktiviert (s. Abb.4b) und nachdem sich auch das Aktivierungstor wieder schließt, deaktiviert (s. Abb.4c). Da der Na^+ -Einstrom nun zum Erliegen gekommen ist, also keine weitere Depolarisation der Membran stattfinden kann und sich zudem die verzögert aktivierten Kaliumionenkanäle öffnen, kommt es zur Repolarisation der Membran, da vermehrt positive Ladungen in Form von Kaliumionen (K^+) auf die Membranaußenseite fließen (s. Abb.3, roter Abschnitt). An die Repolarisation schließt sich eine kurze Phase der Hyperpolarisation an, die dann in die Wiederherstellung des Ruhemembranpotentials mündet (s. Abb.3, blauer und grüner Abschnitt).

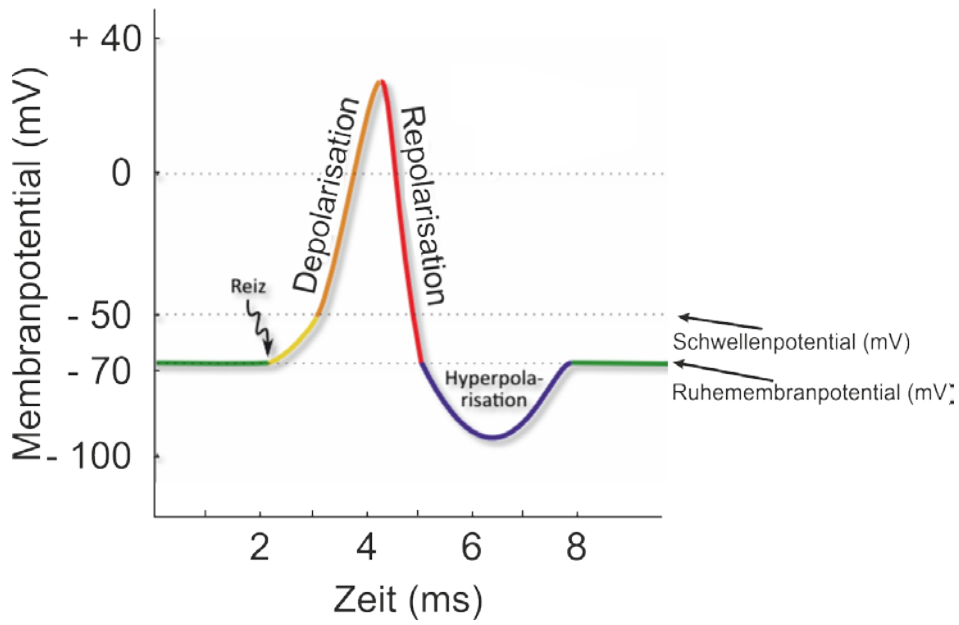


Abb.3: Schema eines APs im zeitlichen Verlauf; nach Dr. Kay-Uwe Jagemann; www.jagemann-net.de

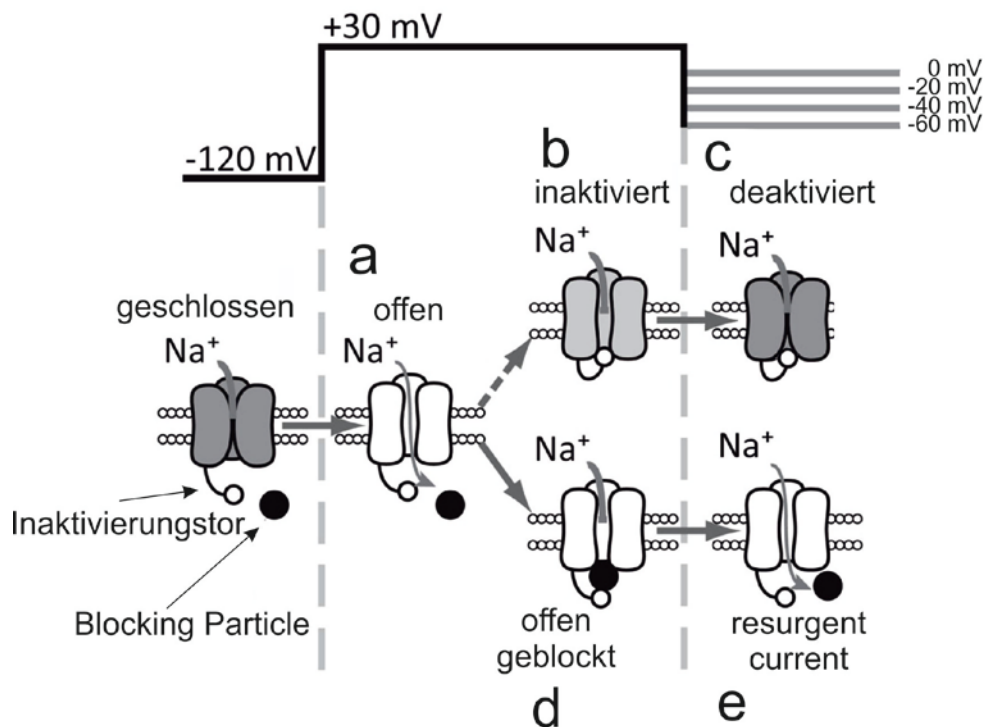


Abb.4: Schema der verschiedenen Na_v konfigurationen; modifiziert nach (SITTL et al., 2012)

2 Resurgent current

2.1 Entstehung

Eine Sonderform der Na_v -Inaktivierung stellt der 1997 erstmals von Raman und Bean (RAMAN & BEAN, 1997) beschriebene resurgent current dar. Dieser alternative Inaktivierungsmechanismus tritt in Neuronen wie Purkinjezellen (inhibitorische und einzige efferente Nervenzellen aus dem Cortex des Cerebellums) oder DRGs natürlicherweise auf. In Zelllinien, in die Na_v -Untereinheiten heterolog transfiziert und die in Isolation untersucht wurden, konnte dieser "wieder auflebende Strom" (engl. resurgent current) lange nicht nachgewiesen werden, was die Suche nach den genauen Ursprüngen dieses Stromes erheblich erschwerte. Der resurgent current entsteht wenn statt des eigentlichen Inaktivierungspartikels das blocking particle, das vermutlich von der $\beta 4$ -Untereinheit oder durch Teile dieser gebildet wird (GRIECO et al., 2005), in den für Na^+ noch offenen Kanal wandert (s. Abb.4d) und diesen zunächst für Na^+ unpassierbar macht (offener Kanalblock). Im Verlauf der Repolarisation der Membran löst sich das blocking particle vom Kanal und dieser ist kurzfristig wieder für Na^+ passierbar. Der nun wieder auflebende Strom ist der resurgent current (s. Abb.4e). Unter bestimmten Voraussetzungen lässt sich der resurgent current auch in heterolog transfizierten Na_v s nachweisen (WANG et al., 2006). Um diesen Strom in heterologen Expressionssystemen untersuchen zu können, muss der C-Terminus der $\beta 4$ -Untereinheit, das sogenannte $\beta 4$ -Peptid, künstlich über die Intrazellulärlösung zugeführt werden. Je nach Na_v -Subtyp kann dann auch hier resurgent current induziert werden.

2.2 Bedeutung

Die Stromamplitude des resurgent current ist weit weniger ausgeprägt als die des transienten schnellen Na^+ -Stromes. Allerdings depolarisiert er die Zelle am Ende eines abgelaufenen APs und kann so dazu führen, dass die Schwelle für das Auslösen eines erneuten APs frühzeitiger wieder erreicht wird. Somit wird die Erregbarkeit erhöht, was durchaus Folgen für den gesamten Organismus haben kann. So kommt es beispielsweise in der Krebstherapie beim Menschen durch Anwendung des Chemotherapeutikums Oxaliplatin zu schwerwiegenden, dosislimitierenden Nebenwirkungen (z. B. Neuropathien, die sich insbesondere in Verbindung mit Kälte verschlimmern). Diese werden durch vermehrten resurgent current hervorgerufen (SITTTL et al., 2012). Auf der anderen Seite können pathologische Na_v -Mutationen, wie sie beispielsweise beim Krankheitsbild der paroxysmal extreme pain disorder (PEPD) im $\text{Na}_v1.7$ vorkommen, zu verstärktem Auftreten von resurgent current führen (JARECKI et al., 2010). Diese Beispiele zeigen, dass der resurgent current von großer Relevanz in der Schmerzforschung ist und deshalb wird u. a. in unserer Arbeitsgruppe (AG Dr. Lampert) daran gearbeitet, den Mechanismus seines Entstehens vollständig aufzuklären.

3 Schmerzfasern

3.1 Einteilung

Die Einteilung der somatosensiblen Schmerzfasern wird vorwiegend nach ihrer Leitungsgeschwindigkeit und nach ihrer Myelinisierung vorgenommen. So werden myelinisierte, schnell leitende, hellen Schmerz vermittelnde A δ - von unmyelinisierten, langsam leitenden, dumpfen Schmerz vermittelnden C-Fasern unterschieden. Die mit einer Leitungsgeschwindigkeit von $< 2\text{m/s}$ deutlich langsameren C-Fasern sind im DRG mit kleinen Neuronen verbunden, wohingegen die über saltatorische Erregungsleitung verfügenden A δ -Fasern mit den großen sensorischen Neuronen in Verbindung stehen (LAWSON, 2002).

3.2 Eigenschaften

Bei einer Aktivierung von C-Fasern (z. B. durch einen Schmerzreiz) kann ein sogenanntes "Axon Reflex Erythem" auftreten (s. Abb.8c). Dieses ist makroskopisch durch eine sich konzentrisch um den Reiz ausbreitende Rötung definiert (sog. Erythem). Verantwortlich hierfür ist die antidrome Reizausbreitung mit großflächiger Vasodilatation und Permeabilitätssteigerung durch die Ausschüttung zahlreicher Neuropeptide, u. a. CGRP und Substanz P (DISCLAFANI & WILKIN, 1983).

Bei mechanischem Druck auf einen Nerv reagieren die hierfür empfindlicheren A-Fasern frühzeitiger mit einem Ausfall der Reizleitung als C-Fasern. So kann man mit Hilfe eines Nervenkompressionsblockes relativ selektiv die A-Faser-Antwort unterdrücken, während die C-Fasern zunächst weitgehend unbeeinflusst bleiben (TOREBJORK & HALLIN, 1973). Dies ist überaus nützlich um Effekte auf Faserebene zu differenzieren.

4 ATX-II

Das basische, neurotoxische, 47 Aminosäuren (AS) lange Polypeptid ATX-II wurde ursprünglich in einem aufwendigen Verfahren aus der Seeanemone *Anemonia sulcata* gewonnen. Hierzu wurden ganze Anemonentiere in Alkohol homogenisiert, die Toxine an Kationenaustauscher adsorbiert, gel-filtrierte und durch Chromatographie getrennt (BERESS et al., 1975). Seit einiger Zeit wird dieses Toxin rekombinant durch *Escherichia coli* hergestellt, womit ein gleichbleibend hoher Reinheitsgrad gewährleistet ist.

ATX-II ist ein potenter Na_v -Modulator, der die Inaktivierung der Kanäle verzögert (BERGMAN et al., 1976). So könnte es ein Ziel für die Entwicklung neuer pharmakologischer Substanzen sein, denn der damit verbundene verlängerte Na^+ -Einstrom führt beispielsweise am Herzen zu verlängerten Aktionspotentialen und hat somit vermutlich eine positiv inotrope Wirkung auf den Herzmuskel (ISENBERG & RAVENS, 1984). Eine Hemmung des resurgent current im Bereich reizleitender Fasern vermindert deren Erregbarkeit und könnte sich so beispielsweise bei der Behandlung von Tieren mit pathologischen Spontanaktivitäten, die u. a. bei Diabetes mellitus auftreten, als nützlich erweisen.

IV. MATERIAL UND METHODEN

1 Patch-Clamp Technik

1.1 Historie

Zu den häufig verwendeten Messmethoden in der Elektrophysiologie zählt die Patch-Clamp Technik. Sie wurde in den 1970er Jahren von den Nobelpreisträgern Erwin Neher und Bernd Sakmann entwickelt. Von den ursprünglichen "loose Patch-Clamp" Experimenten, bei denen mehrmals verwendete Glaspipetten lose (engl. "loose") auf die Zellmembran aufgesetzt und so Einzelkanäle untersucht wurden (NEHER & SAKMANN, 1976), entwickelte die Wissenschaftlergruppe um Neher und Sakmann die Technik in den Folgejahren stetig weiter. 1980 erkannte Neher, dass die gelegentlich vermeintlich verstopften Pipetten, die einen erhöhten Abdichtwiderstand verursachten (heute wegen dem über einem $G\Omega$ großen Widerstand als "Gigaseal" bezeichnet), verringertes Rauschen und deutlich verbesserte Ableitbedingungen zur Folge hatten. Dies führte zur Einmalverwendung der Pipetten und zum Einsatz von Über- und Unterdruck beim Patchvorgang und machte die Entwicklung der "tight seal patch-clamp" Methode möglich (HAMILL et al., 1981).

Der verbesserten Ableitmethode folgte die Entwicklung des ersten kommerziellen Patch-Clamp Verstärkers EPC-5 durch Fred Sigworth um den gestiegenen Ansprüchen an die elektrische Rauschunterdrückung gerecht zu werden, wodurch sich immer mehr Anwendungsgebiete dieser Methode ergaben (SIGWORTH, 1986).

Es gibt verschiedene Patch-Clamp Messkonfigurationen, die in Abb.5a-d dargestellt sind (HAMILL et al., 1981). Bei der "cell-attached" Konfiguration (s. Abb.5a) wird, nachdem durch Unterdruck eine Verbindung zur Zelloberfläche (engl. cell-attached)

hergestellt wurde, der durch den Zellmembranabschnitt unterhalb der Pipettenöffnung fließende Strom gemessen. Eine direkte Verbindung zum Zellinneren besteht nicht.

Bei der Ganzzellkonfiguration (engl. whole-cell configuration, s. Abb.5b) wird zunächst eine dichte Verbindung mit der Zellmembran hergestellt (engl. "Seal"). Dann wird durch einen zweiten kurzen, kräftigen Saugstoß das Zellmembranstück unter der Pipettenöffnung aus der übrigen Zellmembran gerissen und so der Zugang zum gesamten Zellinneren gewährt. Es werden somit alle in der Zellmembran befindlichen Kanäle gemessen.

Bei der "inside-out" Konfiguration (s. Abb.5c) wird die Pipette, nachdem eine Verbindung zur Zellmembran besteht, ein Stück zurückgezogen, so dass ein Zellmembran-Teilstück ("patch") aus der verbleibenden Zellmembran gerissen wird. Die ursprüngliche Zellmembran-Innenseite zeigt nun "nach außen", d. h. zur Extrazellulärlösung (auch Badlösung genannt; Zusammensetzung s. S. 50, Abschnitt V. Veröffentlichung), daher stammt der Name inside-out Konfiguration. Gemessen werden die Kanäle, die sich im Zellmembran-Teilstück befinden.

Eine weitere Messkonfiguration ist die "outside-out" Einstellung (s. Abb.5d). Hier wird nach Erreichen eines Seals und Durchbrechen der Zellmembran die Pipette langsam zurück gezogen, wodurch an der Pipette haftende Zellmembran-Teilstücke aus ihrer Verbindung zur restlichen Zellmembran gerissen werden. Diese Zellmembranstücke schwingen mit ihren freien Enden zur Pipettenspitzenmitte und verbinden sich dort wieder miteinander. Somit ist die ursprüngliche Zellmembranaußenseite auch wieder "nach außen" zur Badlösung gerichtet.

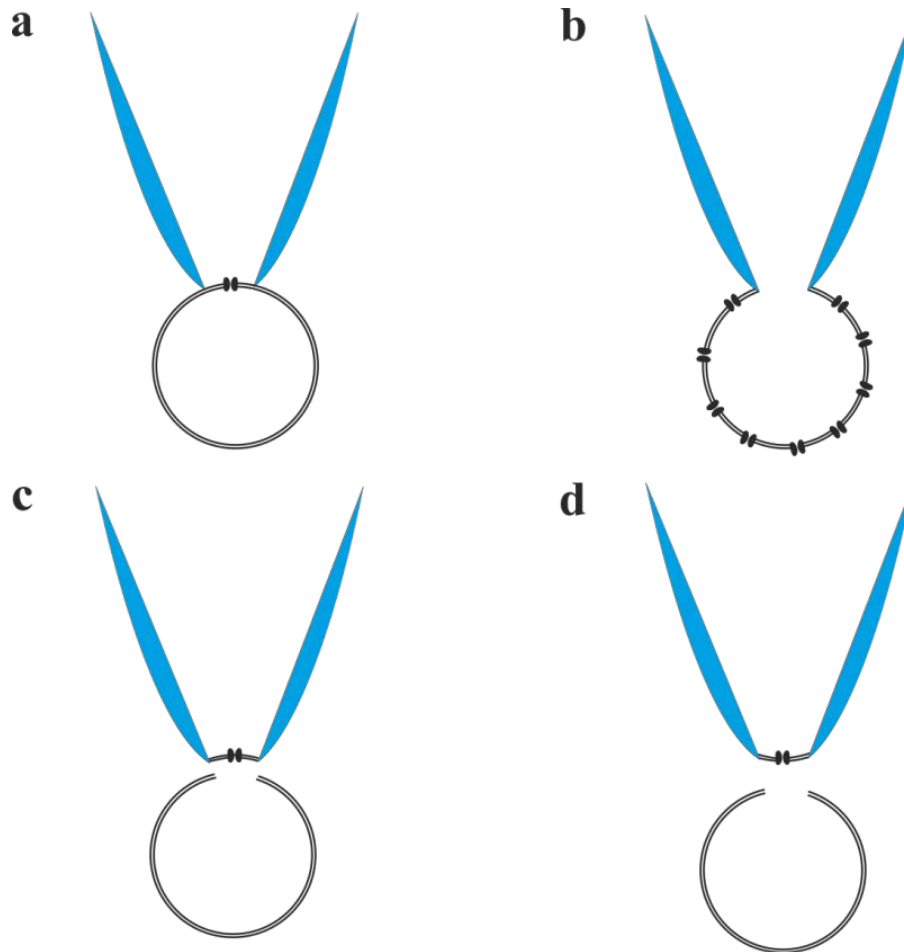


Abb.5: Schema der unterschiedlichen Patch-Clamp Konfigurationen.

Man unterscheidet die Modi cell-attached (s. Abb.5a), whole-cell (s. Abb.5b), inside-out (s. Abb.5c) und outside-out (s. Abb.5d).

Patch-Clamp Experimente werden oftmals durchgeführt, um Schalteigenschaften, Leitfähigkeiten und deren Veränderung durch Toxine, Pharmaka und Mutationen eines Kanals zu untersuchen. Bei "whole-cell voltage-clamp" Messungen (Ganzzell-Strommessungen bei geklemmter Spannung; s. Abb. 5b) an Na_vs , wird der Gesamt- Na^+ -Strom einer Zelle, also die Summe aller Einzelströme der in der Zellmembran befindlichen Na_vs , gemessen. Das Verhalten dieses Stromes bei verschiedenen Spannungen und unter Einfluss von ATX-II wurde mit whole-cell Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht.

1.2 Patch-Clamp Aufbau

Neben den allgemeinen Bestandteilen besitzt jeder Patch-Clamp Aufbau spezielle, auf die Bedürfnisse des Experimentes abgestimmte Komponenten. Im Folgenden wird der Aufbau beschrieben, welcher im Rahmen der vorliegenden Dissertation verwendet wurde.

Mechanische Schwingungen werden durch einen schwingungsgedämpften Tisch abgeschwächt (s. Abb.6, Nr.1). Dies ermöglicht erst die hochsensiblen, stör anfälligen Messungen an den wenige μm kleinen Zellen. Der in Abb.6 dargestellte Tisch ist mit einer Druckluftfederung ausgestattet. Neben den mechanischen stellen in erster Linie die elektromagnetischen Schwingungen (v. a. das sogenannte Netzbrummen) ein großes Problem für die Messungen dar. Um diese Rauschquellen zu minimieren, ist um den Messstand ein Faraday-Käfig installiert (s. Abb.6, Nr.2).

Das Mikroskop ist unabdingbar für jeden Patch-Clamp Aufbau. Hier unterscheidet man aufrechte von inversen Mikroskopen. Beim aufrechten Mikroskop befindet sich der Objektivrevolver oberhalb des Objektisches, was insbesondere für die Untersuchung dicker Präparate notwendig sein kann. Das inverse Mikroskop (hier verwendet; s. Abb.6, Nr.4) zeichnet sich dadurch aus, dass der Bereich oberhalb des Objektisches nicht vom Objektivrevolver eingenommen wird und somit reichlich Arbeitsabstand für Messkammer mit Präparat, Patchpipette, Perfusion etc. vorhanden ist. Das in Abb.6 gezeigte Mikroskop besitzt vier Objektive mit den Vergrößerungen 5fach, 20fach, 40fach und 63fach. So wird sowohl eine übersichtliche Grobpositionierung von Pipette und Perfusionsfilament (s. Abb.6, Nr.5) als auch eine μm genaue Zellannäherung unter Sichtkontrolle möglich. Am Mikroskop befindet sich überdies eine Kamera (s. Abb.6, Nr.6), die das Bild des Binokulars auf einen Monitor überträgt. Hierdurch ist eine Sichtkontrolle ohne die Gefahr ungewollter Berührungen des Mikroskops ebenso

möglich, wie mit entsprechender Software Zellbilder zu erstellen, die nachfolgend zur Größenabmessung genutzt werden können.

Die Pipetten werden von einem Pipettenziehgerät (s. Abb.6, Nr.7) aus Borosilikatglaskapillaren durch Erhitzen mittels Heizelement und nachfolgendem Auseinanderziehen hergestellt. Um sie für die Messung nutzen zu können, sind diese über einen Pipettenhalter (s. Abb.6, Nr.8) mit dem Vorverstärker (s. Abb.6, Nr.9) verbunden. Die chlorierte Silberdrahtelektrode des Pipettenhalters (s. Abb.7, Nr.2) steht über einen elektrischen Anschluss (s. Abb.7, Nr.1) ebenfalls mit dem Vorverstärker in Verbindung. Die Glaspipette wird durch Dichtringe (s. Abb. 7, Nr.3), die beim Zuschrauben des unteren Teiles des Pipettenhalters an die Pipettenwand gedrückt werden, luftdicht mit dem Pipettenhalter verbunden. Während des Patchvorgangs wird zunächst ein Über- und im weiteren Verlauf ein Unterdruck im Pipetteninneren erzeugt. Um diesen Druck zu erzeugen, wird ein Mundstück (s. Abb.7, Nr.6) über Schläuche mit der seitlichen Öffnung (s. Abb.7, Nr.4) des Pipettenhalters verbunden. Über einen Dreiwegehahn (s. Abb.7, Nr.5) wird das Pipetteninnere mit einem Druckmesser (s. Abb.7, Nr.7) verbunden und letztlich der Druck in der Pipette gehalten.

Zur Bewegung von Pipettenhalter samt Pipette werden ein Grob- und ein Mikromanipulator benötigt. Die Annäherung an die wenige μm kleinen Zellen muss in feinsten Schritten möglich sein. Der Mikromanipulator aus Abb.6, Nr.10 ist eine fernsteuerbare, motorgetriebene Variante (Bedienpanel s. Abb. 6, Nr. 10b, Kontrollbox s. Abb. 6, Nr.10c), die sich in drei Achsen und verschiedenen Geschwindigkeitsstufen zur Grob- und Feinannäherung an die Zelle bewegen lässt.

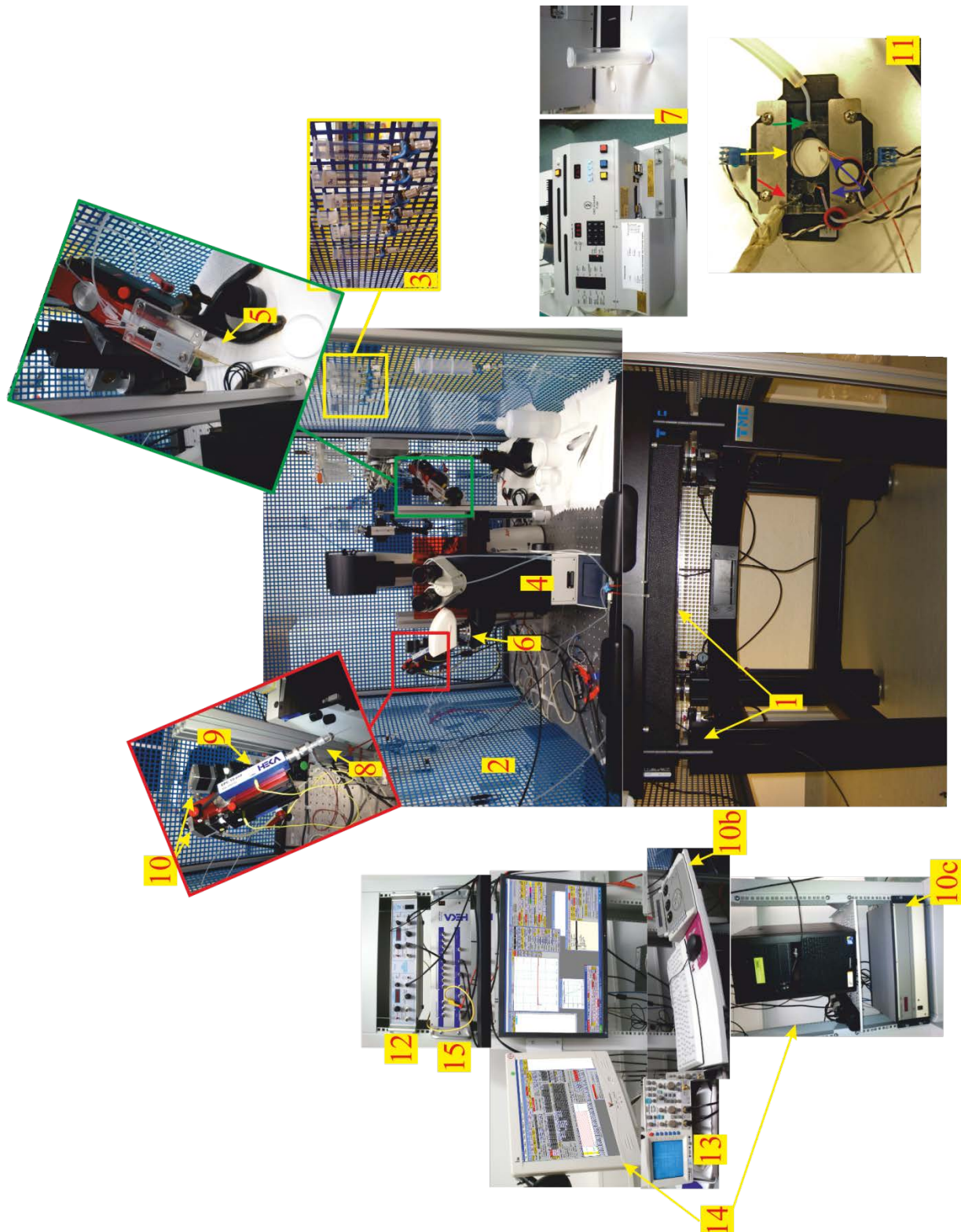


Abb.6: Darstellung des verwendeten Patch-Clamp Aufbaus.

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1: Schwingungsgedämpfter Tisch; | 9: Vorverstärker; |
| 2: Faraday-Käfig; | 10: Mikromanipulator mit Bedienpanel (b) und |
| 3: Perfusion; | Kontrollbox (c); |
| 4: inverses Mikroskop; | 11: Messkammer; |
| 5: Perfusionsfilament; | 12: Temperaturkontrollgerät; |
| 6: Kamera; | 13: Oszilloskop; |
| 7: Pipettenziehgerät; | 14: Datenverarbeitungscomputer, Bildschirm; |
| 8: Pipettenhalter; | 15: Hauptverstärker |

Je nach Experiment werden unterschiedliche Messkammern verwendet. Zelllinien, die in Petrischalen mit einem Durchmesser (\varnothing) von 35mm kultiviert werden, können direkt mit diesen in der entsprechenden Halterung auf dem Objektisch platziert werden. Für Zellen die auf "coverslips" (runde Deckgläschen, \varnothing 10mm) kultiviert werden und die während der Messung zum einen unterschiedlichen Substanzen, zum anderen bestimmten Temperaturen ausgesetzt werden, sind spezielle Messkammern von Nöten. In Abb.6 Nr.11 ist die zentrale Vertiefung zur Aufnahme des coverslips (gelber Pfeil) zu sehen. Außerdem ist der Zufluss (grüner Pfeil) zu erkennen, über den bei Bedarf durch ein Peltierelement vortemperierte Lösungen eingeleitet werden können, die dann auf der gegenüberliegenden Seite der Messkammer mit Hilfe einer Vakuumsaugpumpe abgesaugt werden (roter Pfeil). Temperaturfühler (blaue Pfeile) melden die aktuelle Temperatur an das automatische Temperaturkontrollgerät (s. Abb.6, Nr.12), welches diese über einen Rückkopplungsmechanismus anpasst.

Um verschiedene Substanzen applizieren zu können, ist eine schwerkraftbetriebene Perfusion am Faraday-Käfig befestigt (s. Abb.6, Nr.3). Der jeweilige Kanal wird über einen Dreiwegehahn geöffnet bzw. geschlossen und die Substanz über ein Schlauchsystem, das in ein Perfusionsfilament mündet, appliziert.

Auf dem Oszilloskop (s. Abb.6, Nr.13) wird in Kanal eins das Pulsprotokoll und in Kanal zwei die Stromantwort sichtbar. Als besonders nützlich erweist sich das Oszilloskop bei der Suche nach Artefakt- und Rauschquellen.

Zur Steuerung des Verstärkers sowie zur Datenspeicherung sind Verstärker und Kamera an einen PC mit Monitoren (s. Abb.6, Nr.14) angeschlossen.

Eines der zentralen Elemente des Patch-Clamp Aufbaus ist der hochempfindliche Vorverstärker, auch "headstage" genannt (s. Abb.6, Nr.9). Dieser ist auf dem Mikromanipulator befestigt und mit dem Pipettenhalter verbunden. Er hat die Aufgabe

das Stromsignal zu messen und gibt diese Information an den Hauptverstärker (s. Abb.6, Nr.15) weiter. Letzterer besteht aus einer Hard- und einer Softwarekomponente. Die Hardware dient der Filterung und Verstärkung des Signals, die Software (s. Abb.6, Nr.14, zeigt die Bedienoberfläche der HEKA Software "PatchMaster") der Steuerung des Verstärkers. So kann über die Software das gewünschte Pulsprotokoll an den Verstärker weitergeleitet werden, der das digitale Signal mittels eines integrierten DA-Wandlers in Spannungskommandos umwandelt. Diese werden dann über den Vorverstärker auf die Zelle übertragen und die resultierenden Signale werden über den ebenfalls im Verstärker integrierten AD-Wandler an die Datenerfassungssoftware im Computer weitergegeben. Auch der sogenannte "low-pass" (dt. Tiefpass) Bessel Filter ist in den Verstärker integriert. Er dient dazu hochfrequentes Rauschen bestmöglich zu reduzieren.

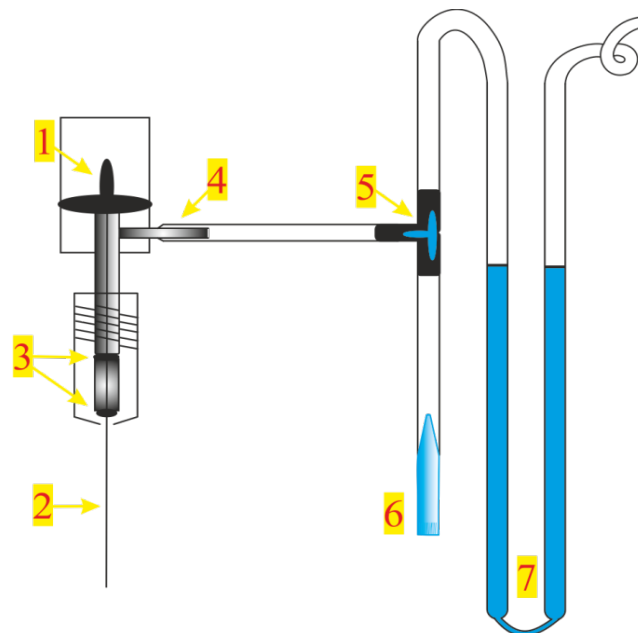


Abb.7: Schema eines Pipettenhalters mit Druckanzeige und Druckmodulation.

- 1: Elektrischer Anschluss;
- 2: Chlorierte Silberdrahtelektrode;
- 3: Dichtringe;
- 4: Öffnung für Luftstrom;
- 5: Drei-Wege-Hahn;
- 6: Mundstück;
- 7: Druckmesser

1.3 Durchführung und Untersuchungsmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neben murinen Neuronen auch heterologe Zellen für die elektrophysiologischen Messungen herangezogen. Für die Messungen des $\text{Na}_v1.7$ stand eine HEK293 Zelllinie zur Verfügung, die stabil den gewünschten $\text{Na}_v1.7$ exprimiert. Das Gen für den Na_v ist hierbei an eine Antibiotikaresistenz gekoppelt. Dem Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium; kurz: DMEM, Gibco-Life technologies, New York, USA), welches die Zellen umgibt, ist das entsprechende selektierende Antibiotikum Geneticin (kurz: G418, Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) in einer Konzentration von 500mg/l zugesetzt. Somit überleben nur jene Zellen, die das Plasmid mit dem Ionenkanal- und Antibiotikaresistenzgen in sich tragen. Um den murinen $\text{Na}_v1.6$ untersuchen zu können, musste die TTX-resistent mutierte Ionenkanal-DNA ($\text{mNa}_v1.6r$) in Neuroblastomzellen (kurz: N1E-115 Zellen) transfiziert werden. Hierzu wurde der Transfektionssatz "Nanofectin" (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verwendet. Dieser besteht aus zwei Komponenten: zum einen aus einem DNA-bindenden, positiv geladenen Polymer, zum anderen aus der das Polymer umgebenden Kapsel. Die $\text{mNa}_v1.6r$ DNA wird in einer Konzentration von $1\mu\text{g}$ zusammen mit $0,5\mu\text{g}$ des grün fluoreszierenden Proteins EGFP (Clontech Laboratories, Mountain View, USA) der Nanofectin-Substanz hinzugefügt. Die DNA wird von dem Polymer gebunden und durch die Kapsel vor Nucleasen geschützt. Der entstandene DNA-Nanopartikel-Komplex kann von den N1E-115 Zellen aufgenommen und die DNA abgelesen werden. Nach 48 bis 72 Stunden ist das $\text{Na}_v1.6$ Kanalprotein in die Zellmembran eingebaut und die unter ultraviolettem Licht grün fluoreszierenden Zellen können mit der Patch-Clamp Methode gemessen werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten murinen DRGs wurden aus Wildtypmäusen des Stammes $\text{SCN8a}^{\text{med}}$ (SCN: "sodium channel"; 8a: Gen-Nummer der α -Untereinheit

Na_v1.6; med: "motor endplate disease") gewonnen, welcher auf dem Black6 Hintergrund gezüchtet wurde. Daher sind diese Wildtypen als den Black6-Mäusen vergleichbar anzusehen. SCN8a^{med}-Mäuse besitzen eine Mutation in dem Gen welches für Na_v1.6 kodiert und die dieses Gen funktionsunfähig macht. Homozygote Mäuse produzieren demnach keine funktionsfähigen Na_v1.6-Proteine. Für diese Arbeit wurden die DRGs von SCN8a^{med}-Wildtypmäusen verwendet. In folgenden Projekten sollen auch die DRGs homozygoter SCN8a^{med}-Mäuse untersucht werden. Um die DRGs isolieren zu können muss zunächst eine Maus in Halothannarkose (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland) dekapitiert werden. Dann wird mit möglichst geringem Zeitverlust die Wirbelsäule entnommen und in eine Petrischale mit eisgekühlter Pufferlösung (PBS; engl. phosphate buffered saline, PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich) verbracht. Nach Längsteilung der Wirbelsäule und vorsichtiger Entfernung des Rückenmarks sind die Ganglien unter dem Mikroskop in den lateralen Vertiefungen des Wirbelkanals zu erkennen. Nun werden zwischen 20 und 30 Ganglien mit Hilfe zweier Pinzetten aus den Vertiefungen entfernt und in eine mit DMEM gefüllte Petrischale überführt. Anschließend wird das DMEM durch eine Enzymkombination aus Collagenase und Protease ersetzt und der Zellverband der Ganglien in den folgenden 45min bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank enzymatisch angedaut. Die so vorbehandelten Ganglien lassen sich mechanisch mit einer Pasteurpipette vereinzeln. Die entstandene DRG Suspension wird auf Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich GmbH, München, Deutschland) beschichtete coverslips pipettiert (jeweils 30µl). Schließlich werden die Zellen mit speziellem Nährmedium für primäre, neuronale Zellen (500µl TNB Medium, Biochrom AG, Berlin, Deutschland) bedeckt und erneut in den Inkubator (37°C, 5% CO₂) verbracht. Die Beschichtung mit dem polykationischen Protein dient dazu den Zellen die Adhäsion an die Glasoberfläche des Deckglases zu erleichtern. Die einzelnen DRGs setzen sich innerhalb von

12-16 Stunden auf den coverslips ab und können dann elektrophysiologisch untersucht werden.

Die zu untersuchenden Zellen werden in der Messkammer von der jeweils benötigten Badlösung umgeben und die chlorierte Silberdraht-Badelektrode wird in die Messkammer gesetzt.

Jetzt wird mit Hilfe des Pipettenziehgerätes aus einer Borosilikatglaskapillare eine Pipette mit einem Spitzenwiderstand von 1,7 bis 2,0M Ω hergestellt.

Im Mikroskop wird eine für die Messung geeignete, vitale Zelle gesucht. Sollte eine Perfusion benötigt werden, wird diese in einem Abstand zur Zelle von < 800 μ m positioniert, um zu garantieren, dass die Substanzen korrekt die Zelle umspülen.

Eine geeignete Pipette wird mittels Filament luftblasenfrei mit der Intrazellulärlösung befüllt.

Die befüllte Borosilikatglaspipette wird vorsichtig über die Pipettenelektrode in den Pipettenhalter geschoben und dort befestigt. Es wird etwas Überdruck auf die Pipette gegeben, diese in die Badlösung gebracht und unter mikroskopischer Sichtkontrolle mit Hilfe des Mikromanipulators dicht über der Zelle positioniert. Nachdem mit der am Mikroskop befindlichen Kamera ein Bild der Zelle erstellt wurde, wird die Pipettenspitze mit der Zellmembran in Kontakt gebracht und der Überdruck zügig abgelassen. Um die Sealbildung zu begünstigen, wird ein Unterdruck auf die Pipette gelegt. Ist ein stabiler Seal entstanden, wird die Kapazität der Pipette und des Pipettenhalters über C-fast kompensiert. Nach Herstellung der whole-cell Konfiguration kann die Intrazellulärflüssigkeit aus dem Pipetteninneren ins Zellinnere fließen, was durch das darin enthaltene Fluorid zur weiteren Stabilisierung des Seals beiträgt. Über die C-slow Kompensation werden die Kapazität der Zelle und der Zugangswiderstand ermittelt. Letzterer wird nun mit der Rs-Kompensation soweit wie möglich minimiert,

wobei darauf geachtet wird, dass im Oszilloskop kein Schwingen als Zeichen einer Überkompensation zu erkennen ist. Sobald stabile Messbedingungen herrschen, wird zum wiederholten Male ein gleichbleibend depolarisierender Rechteckpuls appliziert, um möglichst alle Kanäle der Zelle zu aktivieren. Idealerweise zeigt die Zelle einen konstanten Strom, der nicht weiter anwächst und die Strommessungen werden gestartet (zu den Messprotokollen s. u. a. S. 32f im Abschnitt V. Veröffentlichung).

2 Psychophysik

Die in Abb.8a abgebildeten Materialien dienen der Erhebung von humanen Psychophysik-Daten durch Messung von sensorischen Empfindungen am Unterarm.

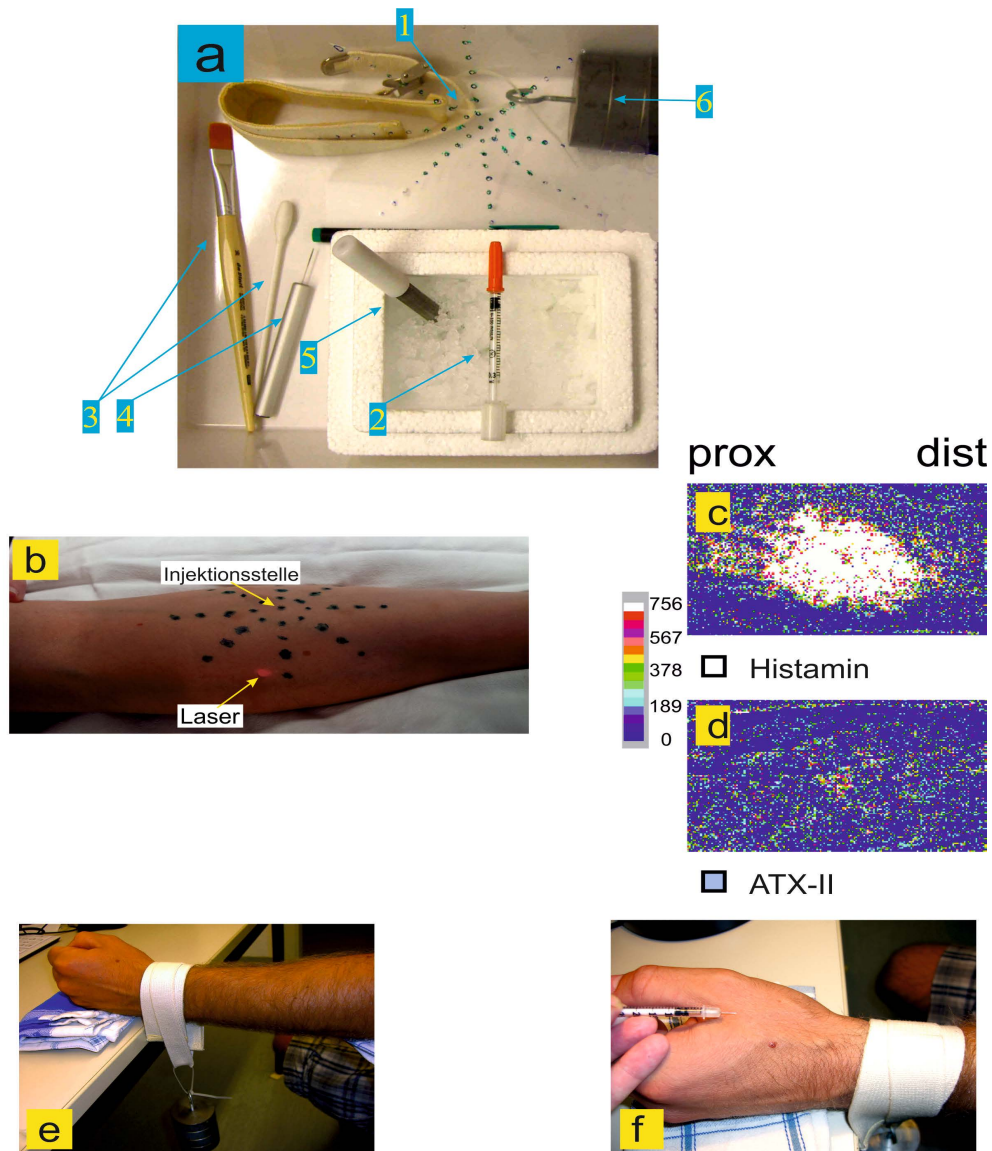


Abb.8: Material der humanen Psychophysikuntersuchungen

- Zubehör für die Psychophysikuntersuchungen;
- Darstellung des Versuchsaufbaus für die Laser-Doppler-Messung am Unterarm einer Versuchsperson;
- Laser-Doppler Bild eines typischen "Axon Reflex Erythems" nach Histaminapplikation;
- Laser-Doppler Bild nach ATX-II-Applikation;
- Darstellung des Nervenkompressionsblocks mittels Gewichten;
- Darstellung des Injektionsbereiches im Innervationsgebiet des geblockten *N. radialis*

Als Probanden stellten sich neun gesunde, adulte Freiwillige im Alter zwischen 25 und 45 Jahren zur Verfügung. Die drei männlichen und sechs weiblichen Probanden wurden genau über den Ablauf der Versuche sowie die Möglichkeit diese jederzeit, ohne Angabe von Gründen abbrechen zu können, informiert. Alle Probanden erklärten anschließend schriftlich ihr Einverständnis zu den Versuchen, die stets unter der Aufsicht eines Humanmediziners durchgeführt wurden. Mit Hilfe der Spinnennetz-Schablone (s. Abb.8a, Nr.1) wurden zunächst Punkte in regelmäßigem Abstand auf die Palmarseite des Unterarmes übertragen (s. Abb.8b). Dieses Netz dient dazu eventuell auftretende Rötungen und Missempfindungen in ihrer Ausbreitung quantifizieren zu können. Im Zentrum des Netzes wurden mit einer Insulinspritze (s. Abb.8a, Nr.2) 70µl einer 100nM ATX-II Lösung oder die gleiche Menge einer Kontrolllösung intrakutan injiziert. In den folgenden zehn Minuten bewerteten die Probanden Schmerz und Juckreiz alle 15s auf einer Skala von null bis zehn, wobei eine Bemessung (engl. rating) von null keinerlei Schmerz bzw. Juckreiz und eine Bewertung von zehn größten vorstellbaren Schmerz bzw. größten vorstellbaren Juckreiz bedeutete (sog. numeric rating scale - NRS). Parallel wurde alle zwei min der relevante Unterarmbereich auf einer Fläche von 7cm mal 10,8cm von einem Laser abgetastet (s. Abb.8b). Dieses sogenannte "Laser-Doppler Imaging" dient dazu vermehrte oberflächliche Hautdurchblutung, das sogenannte "Axon Reflex Erythem", wie es beispielsweise nach Histaminapplikation auftritt (s. Abb.8c), zu detektieren. In Abb.8d ist das Scanbild unter ATX-II Einfluss zu sehen. Die gleichbleibend blaue Farbcodierung deutet auf ein Ausbleiben eines Axon Reflex Erythems hin. Auf mechanische Allodynie wurde mit einem Baumwolltupfer sowie einem Pinsel getestet (s. Abb.8a, Nr.3) und Kältemissempfindung mittels eines in Eiswasser auf 0°C gekühlten Metallstabes (s. Abb.8a, Nr.5) untersucht. Um eine Differenzierung zwischen A-Faser vermittelten und C-Faser vermittelten Empfindungen durchführen zu können,

wurde ein sogenannter Nervenkompressionsblock angelegt. Hierfür wurde ein 2,5kg schweres Gewicht (s. Abb.8a, Nr.6) über eine gepolsterte Schlinge am Handgelenk oberhalb des *N. radialis* angebracht (s. Abb.8e). Nun wurde mit Hilfe des gekühlten Metallstabes auf den Verlust der Kälteempfindung hin untersucht. Sobald der kalte Metallstab lediglich als Druckempfindung wahrgenommen wird, ist von einer ausreichenden Blockade der A-Fasern auszugehen und ATX-II wurde im Innervationsgebiet des *N. radialis* (s. Abb.8f) intrakutan injiziert. Wiederum bewertete der Proband über einen Zeitraum von zehn min Schmerz und Juckreiz auf der NRS von null bis zehn. Während der gesamten Zeit wurde in regelmäßigen Abständen mit Hilfe der in Abb.8a, Nr.4 gezeigte Metallspitze (sog. pinprick) sichergestellt, dass die C-Faser Funktionalität noch erhalten ist. Hierbei wird die Metallspitze auf die Hautoberfläche gesetzt und überprüft ob die Empfindung noch wahrgenommen wird. Anschließend wurde der Block entfernt und noch einmal für zehn und nach 20min Schmerz und Juckreiz auf der NRS bewertet. Die zunächst geblockten A-Fasern erholen sich während dieser Zeitspanne und erlangen ihre Funktionalität zurück. So kann die Aussage über faserspezifische Antworten noch einmal bestätigt werden, da Effekte die vor dem Block vorhanden, währenddessen jedoch verschwunden waren nun wieder auftreten.

3 Zellvorbereitung für RT-qPCR-Experimente

Nach der Entnahme der DRGs aus der Wirbelsäule der Maus werden sie mittels einer Pasteurpipette vereinzelt. Die in Pufferlösung befindlichen Zellen werden mit dem Zellkern-Markerfarbstoff Hoechst 33258 (Invitrogen, Life technologies, Darmstadt, Deutschland) sowie dem Avital-Markerfarbstoff 7AAD (Invitrogen) für mindestens 30min auf Eis gekühlt inkubiert. Die so gefärbten Neurone werden in einen sog. "FACS" Zellsortierer (Fluoreszenz aktivierte Zellsortierung, engl. fluorescence activated cell sorting) der Firma BD science (FACS Aria II) überführt, der die Zellsuspension aufnimmt und die Neurone entsprechend ihrer Größe sortiert. Die als "klein" eingestuften DRGs wiesen durchschnittlich einen \varnothing von 18 μ m auf, die Gruppe der "großen" Neurone einen durchschnittlichen \varnothing von 35 μ m. Nachdem die verschiedenen Gruppen in Eppendorf-Tubes (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) sortiert waren, wurde ihre RNA mit Trizol ("Qiazol", Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert und schließlich mit RT-qPCR Experimenten (in Kooperation im Labor Alzheimer durchgeführt) die mRNA (messenger RNA; Boten-RNS) Menge der größensortierten DRGs bestimmt. Diese erlaubt es, Rückschlüsse auf das Expressionslevel von $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$ und $\beta 4$ zu ziehen.

V. VERÖFFENTLICHUNG

Molecular Pain

This Provisional PDF corresponds to the article as it appeared upon acceptance. Fully formatted PDF and full text (HTML) versions will be made available soon.

Sea-anemone toxin ATX-II elicits A-fiber-dependent pain and enhances resurgent and persistent sodium currents in large sensory neurons

Molecular Pain 2012, **8**:69 doi:10.1186/1744-8069-8-69

Alexandra B Klinger (alexandrakl@yahoo.de)
Mirjam Eberhardt (eberhardt@physiologie1.uni-erlangen.de)
Andrea S Link (aerdna.knil@gmail.com)
Barbara Namer (Namer@physiologie1.uni-erlangen.de)
E Theresa Schuy (theresa_schuy@yahoo.de)
Ruth Sittl (Ruth.Sittl@med.uni-muenchen.de)
Tali Diskin (diskin@physiologie1.uni-erlangen.de)
Christian Alzheimer (Christian.Alzheimer@physiologie1.med.uni-erlangen.de)
Tobias Huth (Tobias.Huth@physiologie1.med.uni-erlangen.de)
Richard W Carr (Richard.Carr@medma.uni-heidelberg.de)
Angelika Lampert (AngelikaLampert@web.de)
Lisa K Kutsche (Lisa.Kutsche@med.stud.uni-erlangen.de)

ISSN 1744-8069

Article type Research

Submission date 8 May 2012

Acceptance date 16 August 2012

Publication date 15 September 2012

Article URL <http://www.molecularpain.com/content/8/1/69>

This peer-reviewed article can be downloaded, printed and distributed freely for any purposes (see copyright notice below).

Articles in *Molecular Pain* are listed in PubMed and archived at PubMed Central.

For information about publishing your research in *Molecular Pain* or any BioMed Central journal, go to

<http://www.molecularpain.com/authors/instructions/>

© 2012 Klinger *et al.*; licensee BioMed Central Ltd.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Sea-anemone toxin ATX-II elicits A-fiber-dependent pain and enhances resurgent and persistent sodium currents in large sensory neurons

Alexandra B Klinger¹
Email: alexandrakl@yahoo.de

Mirjam Eberhardt¹
Email: eberhardt@physiologie1.uni-erlangen.de

Andrea S Link¹
Email: aerdna.knil@googlemail.com

Barbara Namer¹
Email: Namer@physiologie1.uni-erlangen.de

Lisa K Kutsche¹
Email: Lisa.Kutsche@med.stud.uni-erlangen.de

E Theresa Schuy¹
Email: theresa_schuy@yahoo.de

Ruth Sittl^{2,3}
Email: Ruth.Sittl@med.uni-muenchen.de

Tali Hoffmann¹
Email: diskin@physiologie1.uni-erlangen.de

Christian Alzheimer¹
Email: Christian.Alzheimer@physiologie1.med.uni-erlangen.de

Tobias Huth¹
Email: Tobias.Huth@physiologie1.med.uni-erlangen.de

Richard W Carr⁴
Email: Richard.Carr@medma.uni-heidelberg.de

Angelika Lampert^{1*}
* Corresponding author
Email: Lampert@physiologie1.uni-erlangen.de

¹ Institute of Physiology and Pathophysiology, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Universitätsstraße 17, 91054 Erlangen, Germany

² Department of Anesthesiology, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

³ Department of Physiological Genomics, Ludwig-Maximilians University, Munich, Germany

⁴ Department of Anesthesiology, Medical Faculty Mannheim, Heidelberg University, Mannheim, Germany

Abstract

Background

Gain-of-function mutations of the nociceptive voltage-gated sodium channel Nav1.7 lead to inherited pain syndromes, such as paroxysmal extreme pain disorder (PEPD). One characteristic of these mutations is slowed fast-inactivation kinetics, which may give rise to resurgent sodium currents. It is long known that toxins from *Anemonia sulcata*, such as ATX-II, slow fast inactivation and skin contact for example during diving leads to various symptoms such as pain and itch. Here, we investigated if ATX-II induces resurgent currents in sensory neurons of the dorsal root ganglion (DRGs) and how this may translate into human sensations.

Results

In large A-fiber related DRGs ATX-II (5 nM) enhances persistent and resurgent sodium currents, but failed to do so in small C-fiber linked DRGs when investigated using the whole-cell patch-clamp technique. Resurgent currents are thought to depend on the presence of the sodium channel β 4-subunit. Using RT-qPCR experiments, we show that small DRGs express significantly less β 4 mRNA than large sensory neurons. With the β 4-C-terminus peptide in the pipette solution, it was possible to evoke resurgent currents in small DRGs and in Nav1.7 or Nav1.6 expressing HEK293/N1E115 cells, which were enhanced by the presence of extracellular ATX-II. When injected into the skin of healthy volunteers, ATX-II induces painful and itch-like sensations which were abolished by mechanical nerve block. Increase in superficial blood flow of the skin, measured by Laser doppler imaging is limited to the injection site, so no axon reflex erythema as a correlate for C-fiber activation was detected.

Conclusion

ATX-II enhances persistent and resurgent sodium currents in large diameter DRGs, whereas small DRGs depend on the addition of β 4-peptide to the pipette recording solution for ATX-II to affect resurgent currents. Mechanical A-fiber blockade abolishes all ATX-II effects in human skin (e.g. painful and itch-like paraesthesias), suggesting that it mediates its effects mainly via activation of A-fibers.

Keywords

Patch-clamp, Psychophysics, Differential nerve block, Sensory neurons, Itch, Sodium channels, RT-qPCR, *SCN4b*

Background

The voltage-gated sodium channel subtype Nav1.7 plays a major role in human pain perception: Patients who lack functional Nav1.7 due to loss of function mutations are incapable of feeling pain [1]. Patients carrying mutations that lead to a gain of function of Nav1.7, on the other hand, suffer from inherited pain syndromes, such as the paroxysmal extreme pain disorder (PEPD, [2,3]). In humans nine different subtypes of sodium channels are expressed (Nav1.1 to Nav1.9), and six of them can be found in sensory neurons (the tetrodotoxin sensitive (TTXs) channels Nav1.1, 1.2, 1.3, 1.6 and 1.7, and the TTX resistant (TTXr) channels Nav1.8 and 1.9).

Voltage-gated sodium channels are responsible for action potential (AP) initiation in neurons and propagation along axons [4]. Upon depolarization, sodium channels open rapidly and inactivate within milliseconds, supporting membrane repolarization. On a molecular level, the inactivation gate, which is situated on the linker between the channel's domains III and IV, swings into the open pore and thereby blocks the permeation pathway for sodium ions [5]. An endogenous blocking particle, most probably the C-terminus of the β 4-subunit, may interfere with this process, allowing the induction of resurgent currents [6], that increase neuronal excitability. Resurgent currents are enhanced by conditions that slow fast inactivation, as this increases the possibility for the blocking particle to bind to the open channel. PEPD mutations have a slowed fast inactivation and exhibit resurgent currents when expressed in DRGs [7]. This also holds for HEK293 cells, provided that parts of the β 4-subunit are present in the intracellular solution [8,9].

Several toxins are known to interact with the gating properties of voltage-gated sodium channels. ATX-II from the sea anemone *Anemonia sulcata* was shown to slow fast inactivation [10-12], and is therefore likely to induce resurgent currents. When divers get in contact with sea anemone, they report symptoms such as pain and itch. In order to learn more about the potentially painful effects of ATX-II on nociceptive sodium channel gating, we investigated small and large diameter DRGs with the whole-cell patch-clamp method. We can indeed show that ATX-II enhances persistent and resurgent currents in large diameter sensory neurons of the dorsal root ganglia (DRGs), which are thought to be linked to A-fibers of peripheral nerves [13]. Small DRGs on the other hand, which give rise to C-fibers, were not reported to display any endogenous resurgent currents [14] and also application of ATX-II failed to induce them. In order to correlate our findings with human sensations, we injected small amounts of ATX-II intradermally and examined the evoked sensations in healthy human subjects. Our results suggest that ATX-II may selectively activate A-fibers and thereby mediate itch-like sensations and pain.

Results

ATX-II increases resurgent and persistent currents in large diameter DRGs

Large DRGs are known to display resurgent currents [14]. As ATX-II impairs fast inactivation of sodium channels [10,15,16], we set out to test whether it might favor binding of the blocking particle and therefore enhance resurgent currents in DRGs. Upon repolarization following a strong depolarizing pulse (to +30 mV) we evoked resurgent currents in large DRGs that are clearly distinguishable from tail currents by their slower activation and decay kinetics (Figure 1). At the end of the 500 ms repolarizing pulse, a persistent current component was obvious (Figure 2a).

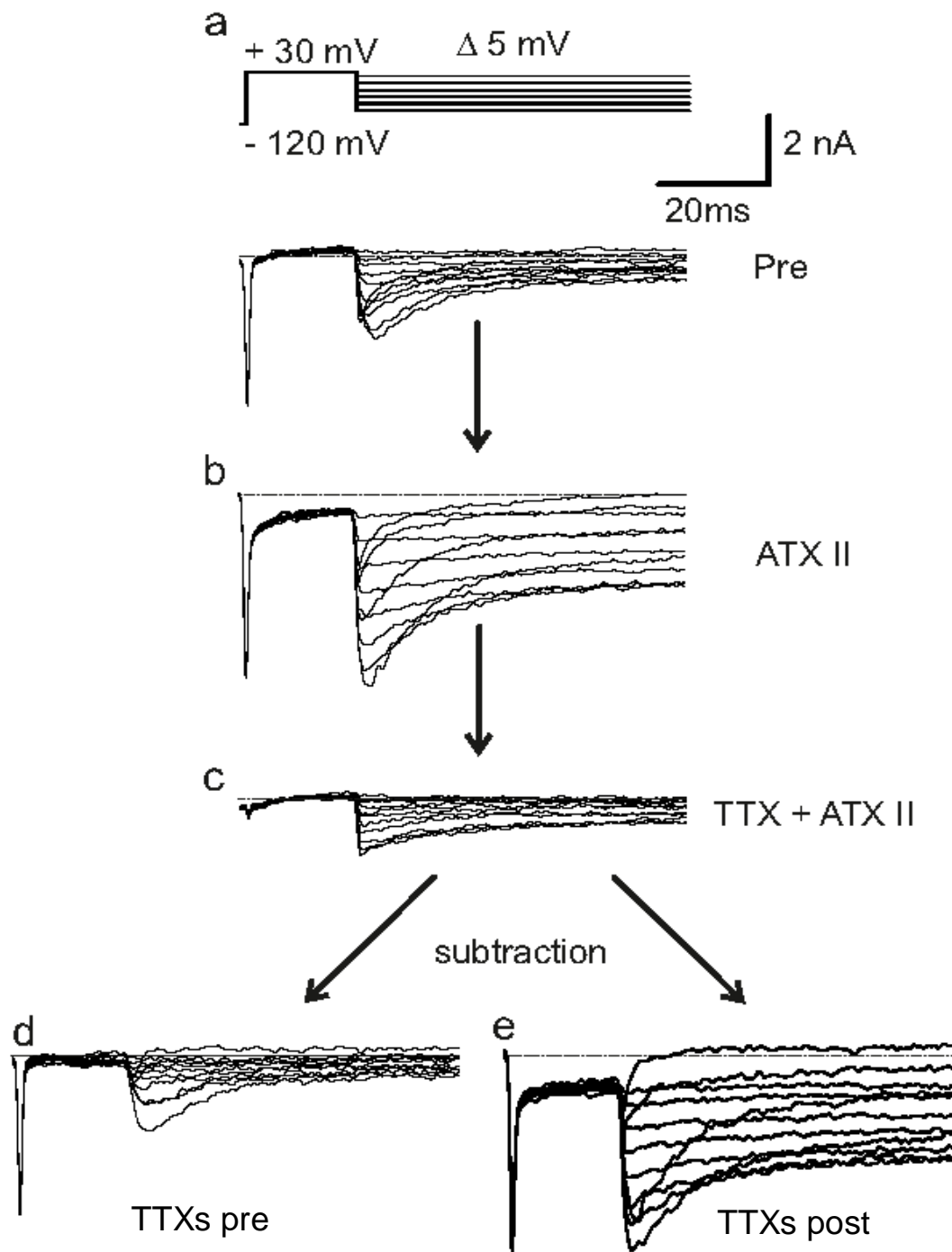


Figure 1 Example traces for the isolation of ATX-II enhanced TTXs resurgent currents.

Representative recordings from one large diameter DRG neuron using the protocol shown in the upper panel in a.

(a) Traces recorded under control conditions without any toxin present.

(b) Traces recorded with 5nM ATX-II in the extracellular recording solution. (c) shows recordings in the presence of 5 nM ATX-II and TTX with no resurgent currents present. This trace was subsequently subtracted from the ones shown in (a) and (b), revealing the TTXs resurgent current pre (d) and post (e) application of ATX-II, respectively. Eight out of eight large DRGs recorded at 22 °C showed resurgent currents.

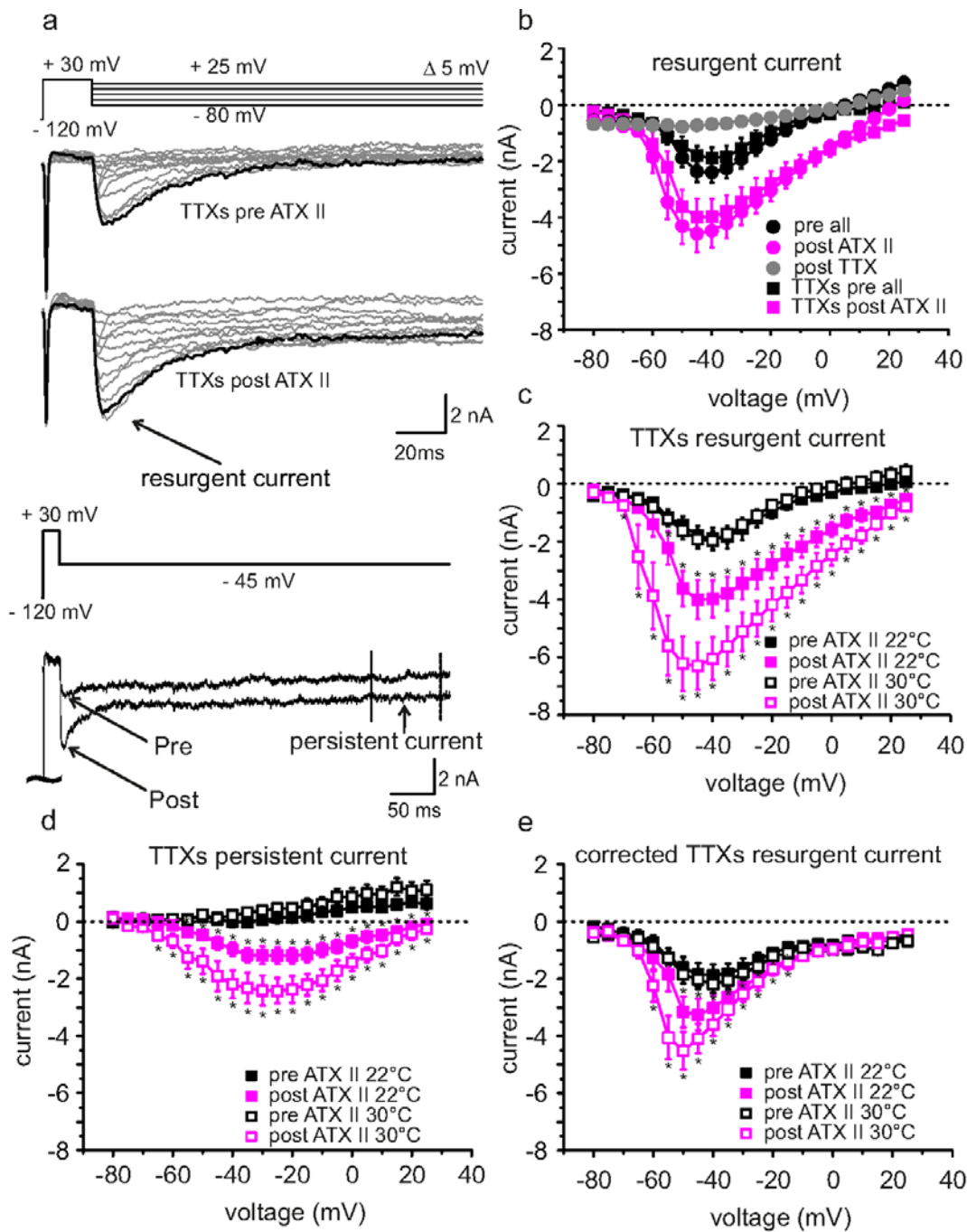


Figure 2 ATX-II induces resurgent currents in large diameter DRGs.

(a) Voltage protocol and representative TTXs resurgent current traces (black traces represent recordings at -45 mV) pre and post application of ATX-II in large diameter DRGs. Lower lane shows an overlay of traces recorded pre and post ATX-II at -45 mV on a longer time scale. Arrows illustrate resurgent current and the region of mean persistent current measurements. (b) Peak resurgent current as a function of voltage recorded at 22 °C (n = 8). Total current (TTXs and TTXr, black circles), peaked around -40 mV. Absolute total resurgent current (black circles) increased following application of 5 nM ATX-II (pink circles), and is mostly carried by TTXs sodium currents (square symbols). The overall resurgent current was dramatically reduced by application of TTX (grey circles). (c) TTXs resurgent current at 22 °C (filled squares, n = 8) and 30 °C (open squares, n = 14) is increased by application of ATX-II. Data points for 22 °C are the same as in (b) and shown for better comparison. (d) Mean persistent TTXs current (black squares, determined as shown in (a) lower panel) is increased by ATX-II exposure (pink squares), whereas an increase in temperature has a smaller effect (22 °C: filled squares, n = 8; 30 °C: open squares, n = 14). (e) Corrected TTXs resurgent current amplitudes as a function of voltage. Corrected traces were obtained by subtraction of TTXs persistent current (shown in d) from TTXs peak resurgent current (shown in c) of each trace. At 22 °C (filled symbols, n = 8) as well as at 30 °C (open symbols, n = 14) corrected resurgent currents are increased by ATX-II application. * p < 0.05, paired-sample T-test.

Resurgent currents were clearly increased in large DRGs by addition of 5 nM ATX-II to the bath solution (Figures 1 and 2a and b). As expected for a fast binding toxin like ATX-II, the effect was clearly visible after a few seconds, and we started recordings 1.5 min after toxin application. Although ATX-II most likely increases tail current as well, the slow kinetics of the ATX-II induced current strongly suggests that ATX-II affects resurgent currents. TTX application reduced the total inward current, and resurgent currents were abolished, leaving only a marginal component (Figure 2b, grey circles). This indicates that resurgent currents are mainly mediated by TTXs channel-subtypes. Therefore in the following we isolated the TTXs sodium current by subtracting the TTXr component (Figure 1).

We have previously shown that resurgent currents are modified by the anticancer agent oxaliplatin in a temperature dependent manner [17], and therefore tested the effect of ATX-II on large diameter DRGs at 22 °C and 30 °C. Native TTXs resurgent or persistent currents were not affected by temperature (Figure 2c and d, black and white symbols). In the presence of ATX-II resurgent and persistent currents tended to be larger at 30 °C compared to 22 °C (Figure 2c and d, statistically not significant, peak current densities: At 30 °C, resurgent 92.2 ± 8.8 pA/pF, persistent 37.4 ± 5.9 pA/pF, $n = 14$. At 22 °C, resurgent 67.6 ± 9.9 pA/pF, persistent 20.4 ± 3.4 pA/pF, $n = 8$). From Figure 2c the activation of the TTXs resurgent current seems to be shifted to more negative potentials. However, when calculated as relative conductance, this shift is no longer detectable, suggesting that ATX-II solely enhances resurgent currents, and does not alter its voltage-dependence (Additional file 1: Figure S1).

ATX-II induces a prominent persistent current component (Figure 2d), which may also affect the absolute resurgent current amplitude. In order to evaluate the ATX-II induced resurgent current amplitude in isolation, we subtracted the mean persistent currents measured at the end of the hyperpolarizing pulse from the peak inward resurgent currents (see Figure 2a, lower traces). It is evident, that a large component of the ATX-II effect is due to an increase in persistent currents (Figure 2e compared to Figure 2c). Nonetheless, corrected resurgent currents (Figure 2e) are enhanced by ATX-II at both temperatures tested (corrected resurgent current densities: 22 °C pre: 35.5 ± 7.7 pA/pF; 22 °C post: 57.0 ± 9.7 pA/pF, $n = 8$. 30 °C pre: 47.6 ± 5.4 pA/pF; 30 °C post: 106.9 ± 9.2 pA/pF, $n = 14$).

Steady-state fast inactivation of TTXs Navs in large DRGs was shifted to more hyperpolarized potentials by application of 5 nM ATX-II (V_{half} pre: -62.5 ± 1.2 mV, post: -66.8 ± 1.2 mV, $p < 0.001$), as was the voltage dependence of activation (V_{half} pre: -42.6 ± 1.1 mV, post: -45.0 ± 0.9 mV, $p < 0.01$, Additional file 2: Figure S2a). Surprisingly, a double-exponential fit to current decay did not reveal significant changes when cells were exposed to 5 nM ATX-II (Additional file 2: Figure S2b and 2c). It may be that the changes remained small and under our detection level, or that the underlying TTXs channel subtypes are affected to a different extent.

ATX-II is unable to induce resurgent currents in small DRGs

Up to now, no resurgent currents were described in small diameter DRGs [14], and accordingly, we were unable to detect any significant resurgent or persistent sodium currents in sensory neurons $<25 \mu\text{m}$ (Figure 3a, upper traces, for criteria for resurgent current detection see Methods section). Addition of 5 nM ATX-II at 22 °C or 30 °C did not induce any detectable resurgent or persistent sodium currents (Figure 3b and c), although application of higher concentrations, such as 25 nM induced a significant persistent current in small DRG neurons (Additional file 3: Figure S3). In contrast, voltage dependence of activation and steady-state fast inactivation were shifted to more negative potentials by 5 nM ATX-II (Activation: $V_{\text{half pre}}: -34.9 \pm 1.0 \text{ mV}$, $\text{post}: -40.7 \pm 0.8 \text{ mV}$, steady-state fast inactivation: $V_{\text{half pre}}: -74.7 \pm 2.4 \text{ mV}$, $\text{post}: -80.5 \pm 2.0 \text{ mV}$, both $p < 0.001$, Additional file 2: Figure S2a). A double-exponential fit of current decay did not reveal any significant changes when 5 nM ATX-II was applied to small DRGs (see Additional file 2: Figure S2b and c). Our results suggest that either small DRGs possess a set of sodium channels less sensitive to ATX-II, or that they express insufficient amounts of the key components necessary for the generation of resurgent currents. Resurgent currents are thought to rely on the presence of an endogenous blocking particle, which is most likely formed by the $\beta 4$ -subunit, or at least parts of it [9].

Different types of DRGs were suggested to express separate sets of sodium channel α - and β -subunits. In situ hybridization and functional studies suggest that Nav1.6 is predominantly found in large DRGs, whereas Nav1.7 is reported to be functionally responsible for AP propagation in C-fibers [18-20], which are the neurites of small DRGs [13]. $\beta 4$ was described to be expressed at a higher level in large diameter DRGs than in small [21]. In order to assess the expression of $\beta 4$, Nav1.6 and Nav1.7 in our preparation, we sorted dissociated DRGs according to their size using FACS (see Methods). The mRNA of size-sorted cells was isolated and we confirmed by RT-qPCR that in our preparation mRNA of the $\beta 4$ -subunit is twice as strongly expressed in large compared to small DRGs (Figure 3d). Nav1.6 mRNA levels were more prevalent in large DRGs compared to small DRGs whereas Nav1.7 mRNA was expressed at comparable levels between the two groups. Thus, the lack of resurgent currents in small DRGs might be due to insufficient amounts of $\beta 4$ -subunits, as there is evidence that the $\beta 4$ -subunit plays an important role in the generation of resurgent currents [9,22].

We added a 14 amino acid peptide of the $\beta 4$ -subunit C-terminus to the pipette solution, which enables the recording of resurgent currents in heterologously expressed sodium channels [8,23,24]. With the $\beta 4$ -peptide added to the pipette solution, we were able to record very small, hardly detectable, resurgent currents in one small diameter DRG out of four (example trace in Figure 4a, upper lane). When 5 nM ATX-II was present in the bath solution, resurgent currents were recorded from four out of six cells. The amount of induced persistent current was small, and correction for it (compare to Figure 2e) still revealed a robust enhancement of resurgent currents in small diameter DRGs by ATX-II when the $\beta 4$ -peptide was added to the pipette solution (Figure 4c).

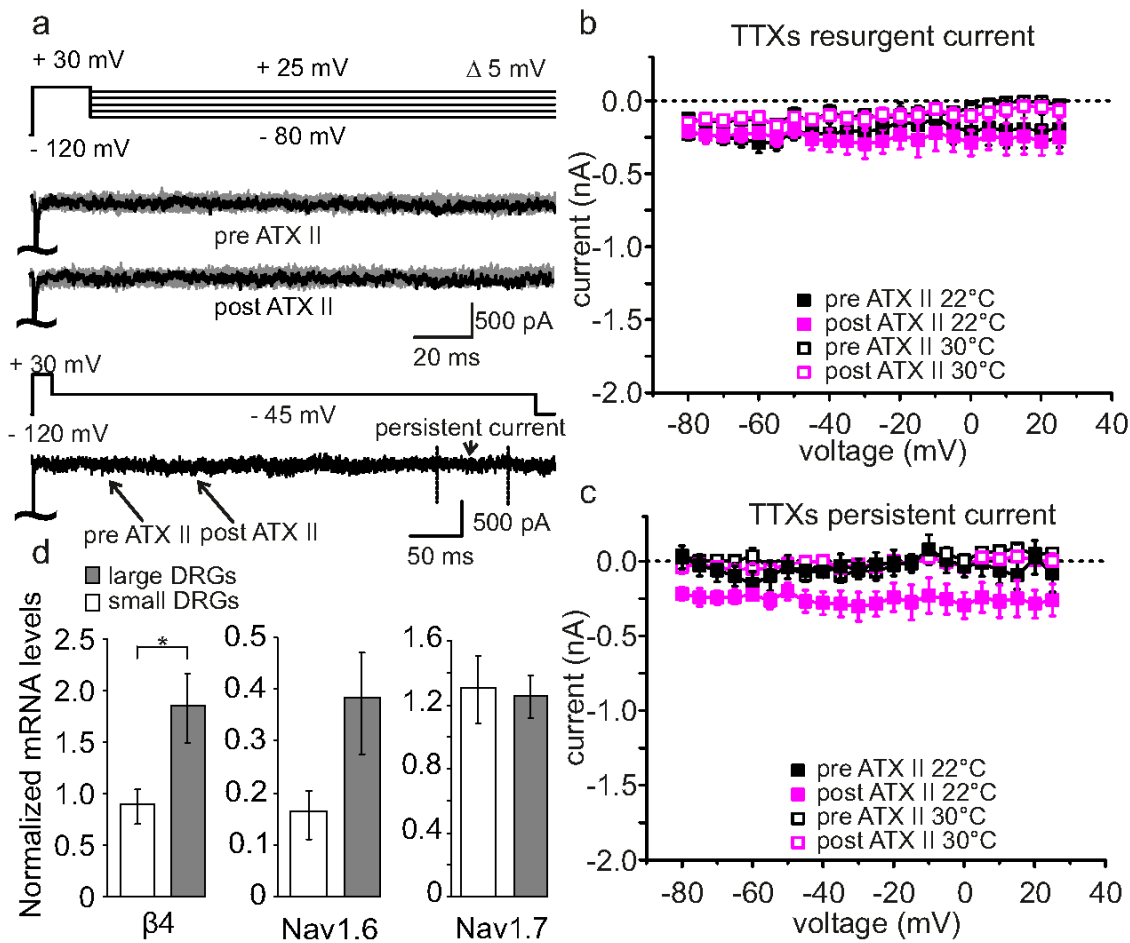


Figure 3 Small diameter DRGs are unaffected by ATX-II or increased temperature.

(a) The same stimulation protocol as used in large diameter DRGs was applied to small DRGs (upper lane). Example traces of TTXs sodium currents pre and post 5 nM ATX-II application are shown. Lower lane displays an overlay of pre and post ATX-II traces at a voltage of -45 mV. (b) TTXs peak current at the time point at which resurgent currents would be expected as a function of voltage in small diameter DRGs. Neither at 22 °C (filled symbols, $n = 7$) nor at 30 °C (open symbols, $n = 4$) a significant ATX-II-induced resurgent current is evident (paired-sample T-test). (c) Mean persistent current as a function of voltage pre (black symbols) and post (pink symbols) ATX-II application. In small diameter DRGs there is no significant increase in persistent current detectable due to ATX-II exposure or heating to 30 °C (paired-sample T-test). (d) Expression levels of β 4, Nav1.6 and Nav1.7 mRNA normalized to the mean of two house-keeping genes in FACS-sorted small (white bars) and large (grey bars) DRGs determined by RT-qPCR. In large DRGs β 4 and Nav1.6 expression is twice as high compared to small neurons. On the contrary, Nav1.7 mRNA is evenly expressed in small and large DRGs ($n = 3$; * $p < 0.05$).

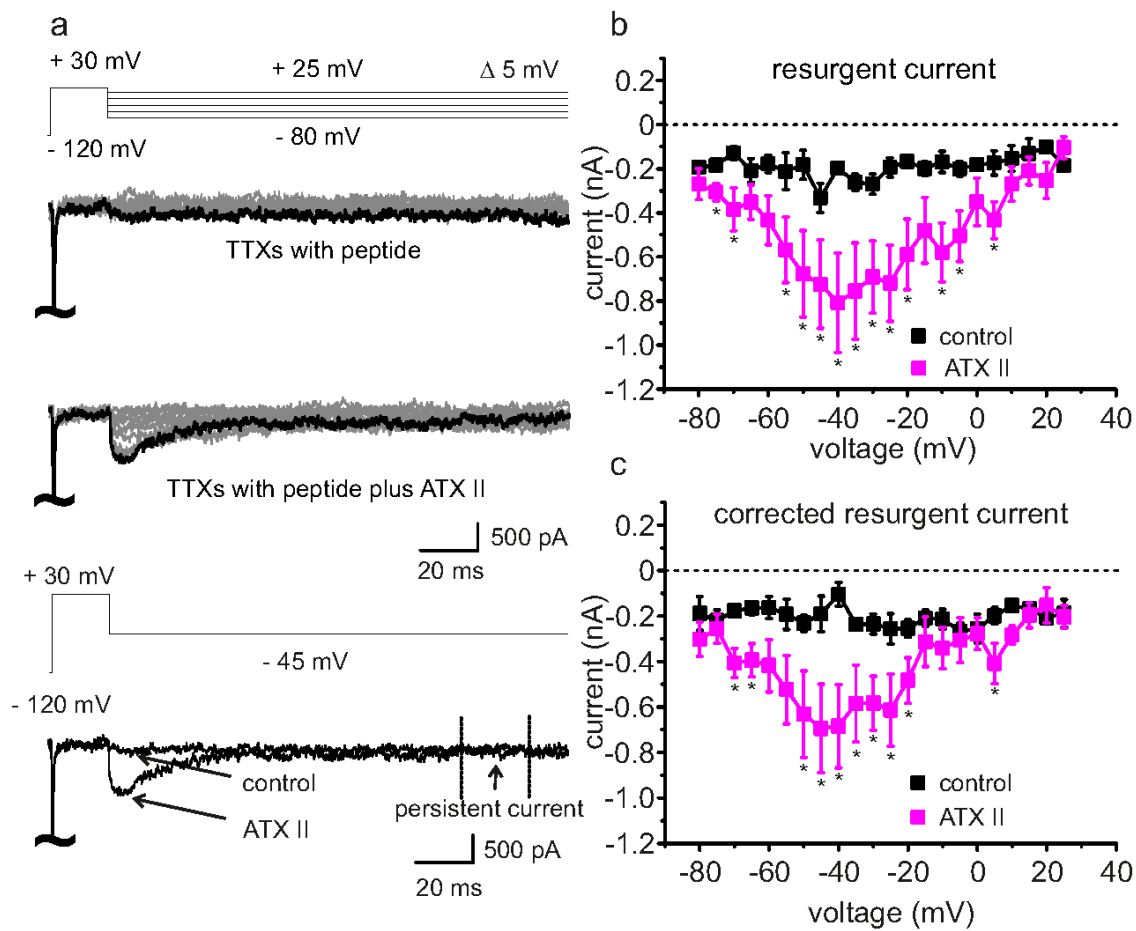


Figure 4 ATX-II induces resurgent currents in small diameter DRGs with the $\beta 4$ -C-terminus peptide in the pipette solution.

(a) Voltage protocol (top panel) and representative current traces of recordings from small diameter DRGs with the $\beta 4$ -peptide added to the pipette solution. Lower lane shows an overlay of recordings from control and ATX-II (5 nM) treated cells at -45 mV. (b) TTXs peak current within the first 10 ms after repolarization of control (black symbols, $n = 4$) and ATX-II exposed (pink symbols, $n = 6$) small DRGs. Under ATX-II exposure a distinct resurgent current can be recorded, when the $\beta 4$ -peptide is present in the pipette solution. (c) The increase of resurgent current is not due to a persistent current component, as subtraction of the persistent current (determined at the end of the hyperpolarizing pulse, see lower panel in a) from peak current reveals a clear corrected TTXs resurgent current component. * $p < 0.05$, independent-sample T-test.

Nav1.7 and Nav1.6-mediated resurgent currents are enhanced by extracellular ATX-II

Our results suggest that it is the amount of $\beta 4$ present in the cell that determines whether ATX-II can increase resurgent currents in DRGs or not. mRNA of Nav1.7 in small DRGs is three to seven times more strongly expressed than Nav1.6, and its expression level does not vary much between large and small DRGs (Figure 3d, [18]). We used a HEK293 cell line stably expressing Nav1.7 and tested for resurgent currents (Figure 5, left column). Up to date no resurgent currents could be evoked when Nav1.7 was transfected either alone or in combination with the $\beta 4$ -subunit, also shown before for Nav1.1 and Nav1.6 [17,23,25]. We were able to record very small resurgent currents in three out of 15 Nav1.7 expressing cells (20.0 %) when the $\beta 4$ -peptide was added to the pipette solution. With ATX-II in the recording solution, about half of the cells exhibited resurgent currents (17 out of 32, 53.1 %), and their mean resurgent currents were larger than that without ATX-II (Figure 5). ATX-II also increased persistent currents of these cells, but correction for it did not alter the ATX-II effect on Nav1.7 mediated resurgent currents much (Figure 5c, d).

Our RT-qPCR data indicate that Nav1.6 shares its expression pattern between large and small DRGs with $\beta 4$ and this Nav subtype is linked to resurgent currents in the literature [26-28]. We heterologously expressed Nav1.6 in N1E115 cells and tested for its ATX-II sensitivity with the $\beta 4$ -peptide present in the pipette (Figure 5, right column). In seven out of 17 cells (41.2 %) a resurgent current was detectable without ATX-II, which increased significantly when the toxin was applied (twelve cells out of 17, 70.6 %). Although the persistent current was enhanced in the presence of ATX-II, too, correction for it still revealed a significant increase of ATX-II induced resurgent currents in Nav1.6 (Figure 5d), which is in accordance with our findings in large DRGs (Figure 2).

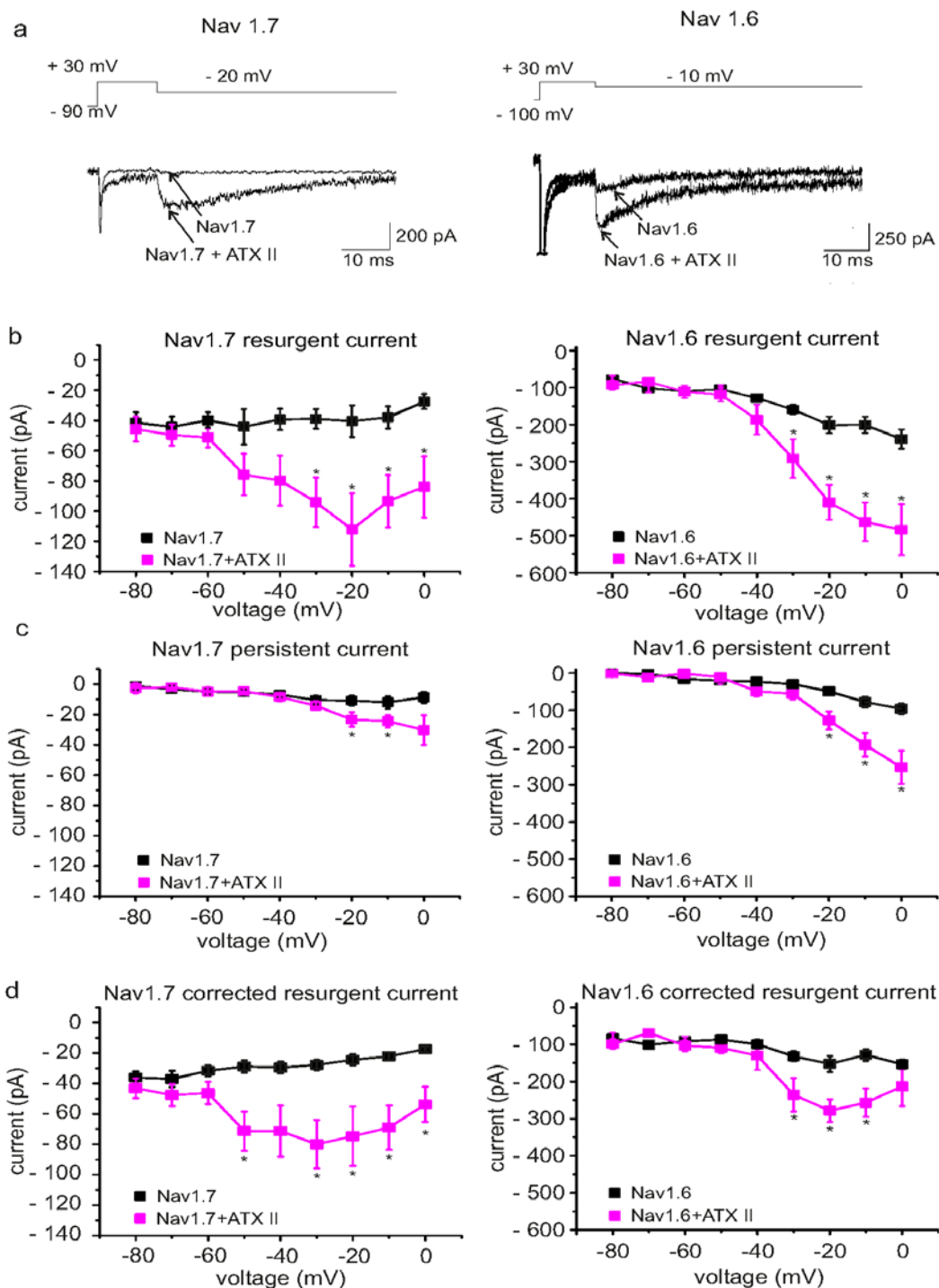


Figure 5 ATX-II induces resurgent currents in Nav1.7 and Nav1.6 expressing cells when β 4-peptide is present in the pipette solution.

(a) Voltage protocol (top panel) and representative current recordings with the β 4-peptide added to the pipette solution (lower panel): *left*: stable HEK cell line expressing Nav1.7; *right*: Nav1.6 transfected N1E115 cells. An overlay of recordings under control conditions and ATX-II (5 nM) exposure at -20 mV (for Nav1.7) and -10 mV (for Nav1.6) is shown. (b) Peak current within the first 10 ms after repolarization of control (black symbols) and ATX-II exposed cells (pink symbols, *left*: Nav1.7, $n = 15, 17$; *right*: Nav1.6, $n = 11, 11$ for control and ATX-II, respectively). Resurgent currents are enhanced by the presence of ATX-II, when the β 4-peptide is present in the pipette solution. (c) Mean persistent currents at the end of the repolarizing pulse are affected in Nav1.6 (right) and in Nav1.7 (left) by addition of extracellular ATX-II to the bath solution (pink symbols). (d) The increase of resurgent current is not due to a persistent current component, as subtraction of the persistent current from peak current reveals a clear corrected resurgent current component in both Nav1.7 (left) and Nav1.6 (right) expressing cells. * $p < 0.05$, independent-sample T-test for Nav1.7, paired-sample T-test for Nav1.6.

Like the resurgent currents, the inactivation kinetics of Nav1.6 seem to be more sensitive to ATX-II than those of Nav1.7 (Figure 6a). A double-exponential fit of current decline revealed that in both channels τ_2 , the slower time constant is affected by application of 5 nM ATX-II (Figure 6c). Unlike Nav1.7, the relative A1 of Nav1.6 is significantly decreased (Figure 6b), thereby increasing the importance of the slow component in current decay. Slowing the process of inactivation may increase the likelihood of the β_4 -peptide to bind to the open channel.

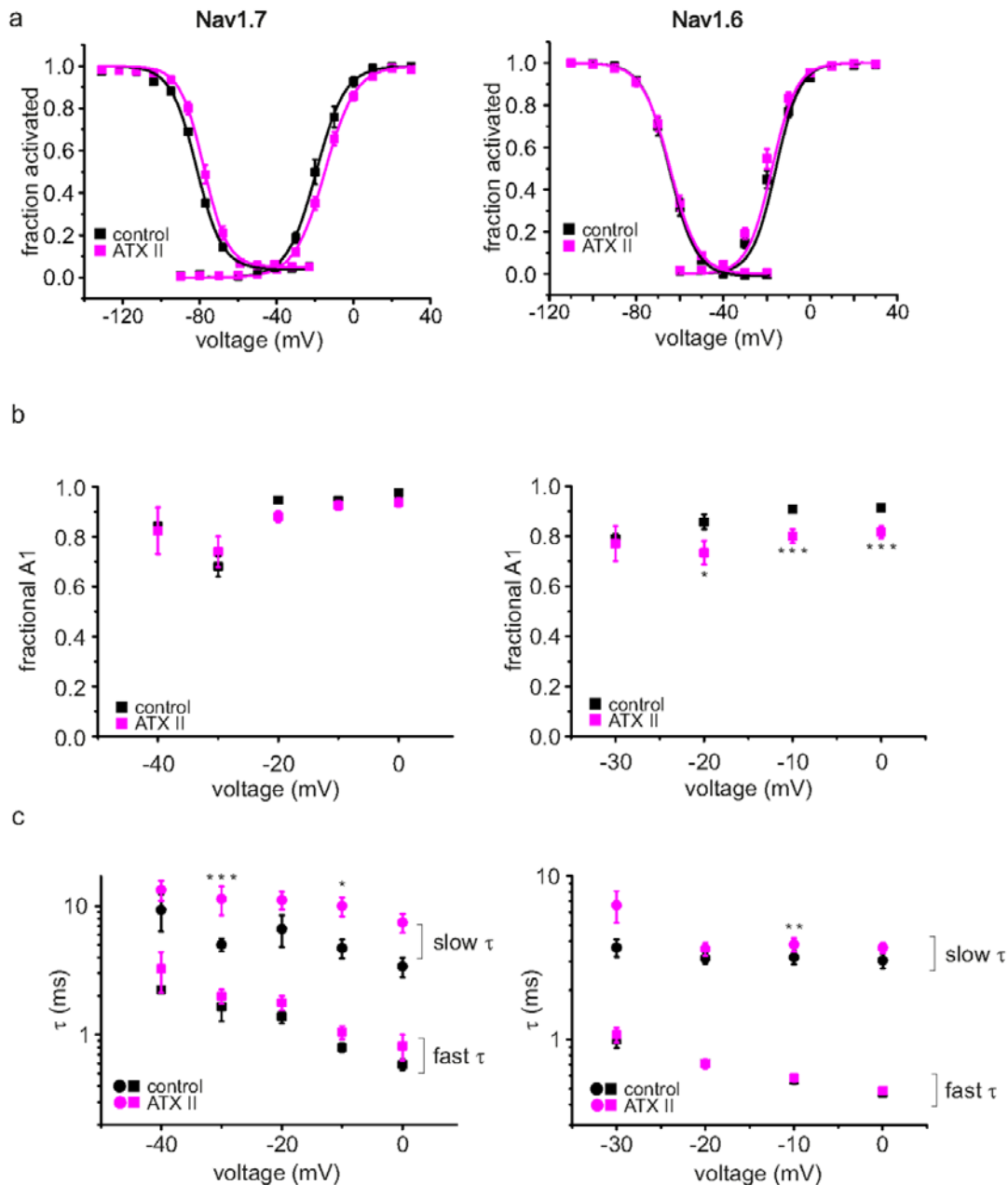


Figure 6 ATX-II prolongs slow time constant of inactivation of Nav1.7 and Nav1.6.

(a) Voltage-dependence of activation and steady-state fast inactivation of heterologously expressed Nav1.7 (left, control $n = 8$, ATX-II $n = 22$) and Nav1.6 (right, $n = 17$), both recorded with the β_4 -peptide in the pipette. For results of Boltzmann-fits see text. (b) and (c): Results from a double-exponential fit to current decay of traces evoked by the activation protocol from cells expressing Nav1.7 (left, $n = 4-22$) or Nav1.6 (right, $n = 7-17$). (b) Fractional A1 ($A1/(A1 + A2)$) is shown as a function of voltage. (c) Fast and slow time constants τ of current decay are shown as a function of voltage. In both channel subtypes (Nav1.7 left column, Nav1.6 right column) only slow time constants (circles) are significantly prolonged, whereas fast time constants (squares) are unaffected by ATX-II. Independent-sample T-test for Nav1.7, paired-sample T-test for Nav1.6, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

In the presence of the $\beta 4$ -peptide, ATX-II shifts the activation of Nav1.6 and Nav1.7 in opposite directions (V_{half} for Nav1.6 pre: -18.2 ± 1.1 mV, post: -20.6 ± 1.2 mV, $n = 17$; for Nav1.7 control: -19.4 ± 1.6 mV, $n = 8$, ATX-II: -14.8 ± 1.1 mV, $n = 22$, $p < 0.05$, Figure 6a). This opposite effect of ATX-II on Navs suggests that the shift of activation that we see in small DRGs (Additional file 2: Figure S2a) may be due to ATX-II effects on other Na_v subtypes than Nav1.7, or due to the absence of the interacting $\beta 4$ -subunit. The slope of activation remained unchanged (for Nav1.7 control: 6.75 ± 0.41 , ATX-II: 7.4 ± 0.29 , for Nav1.6 control: 6.3 ± 0.2 ATX-II: 5.9 ± 0.3 , both not significantly different).

Steady-state fast inactivation of Nav1.6 and Nav1.7 remained largely unaffected by 5 nM ATX-II, and only the slope of Nav1.6 fast inactivation became marginally less steep (V_{half} for Nav1.7 control: -75.3 ± 2.9 mV, ATX-II: -70.8 ± 1.5 mV, for Nav1.6 control: -64.9 ± 1.2 mV, ATX-II: -64.5 ± 1.2 mV, both not significantly different. Slope for Nav1.7 control: 7.0 ± 0.6 , ATX-II: 6.6 ± 0.5 , $n = 3-8$, for Nav1.6 control: 6.3 ± 0.2 , ATX-II: 5.9 ± 0.3 , $n = 17$, Figure 6a).

Small DRGs give rise to C-fibers, whereas large DRGs were reported to be linked to A-fibers [13]. As 5 nM ATX-II affected large DRGs and did not induce a resurgent current in small DRGs, we predict that in humans ATX-II should preferentially affect A-fiber-mediated somatosensation, while leaving C-fiber-dependent sensations largely intact. In order to test for ATX-II evoked sensations, we performed a psychophysical trial with healthy volunteers.

Human sensory response to intradermally injected ATX-II is mediated by A-fibers

Upon intradermal injection of ATX-II on the forearm, all subjects reported unpleasant and painful prickling or tingling sensations, which were not of burning character. These sensations were described to be different to C-fiber mediated pain as it is for example reported following capsaicin injection. The pain was also described as "pulsating" or "cold snowflakes which are hitting the skin". In parallel to pain subjects reported itch-like sensations, which were characterized as "if the skin was tickled with a thin hair", "an insect walked on the skin", or "liquids dropped on the skin". Subjects were asked to rate their sensations on a numerical rating scale (NRS, 0–10, with 0 being no pain and 10 the worst imaginable pain) and mean NRS ratings were 1.3 ± 0.1 for both, pain and itch-like sensations in the first 10 min after the injection (Figure 7a and b show representative examples each), and declined within ~10 min after the end of the experiment. A control group was injected with ATX-II-free buffer solution and did not report any itch or pain, apart from a small immediate short lasting pain which was most likely evoked by mechanical irritation due to the injection needle (mean < 0.3 on the NRS, $n = 9$, 3 male and 6 female).

The AUCs of pain and itch ratings were significantly higher in the ATX-II-injected group compared to the controls (Figure 7a and b, $n = 6$ each, $p < 0.004$; $p < 0.008$, respectively, Mann Whitney U-test). Static or mechanical allodynia was absent (tested by gentle pressure with a cotton swab and stroking with a fine brush 10 min after injection of ATX-II, not shown). NRS pain ratings (0–10) to a 7 s lasting heat stimulus of 47°C were unchanged compared to preinjection conditions ($n = 6$, not shown).

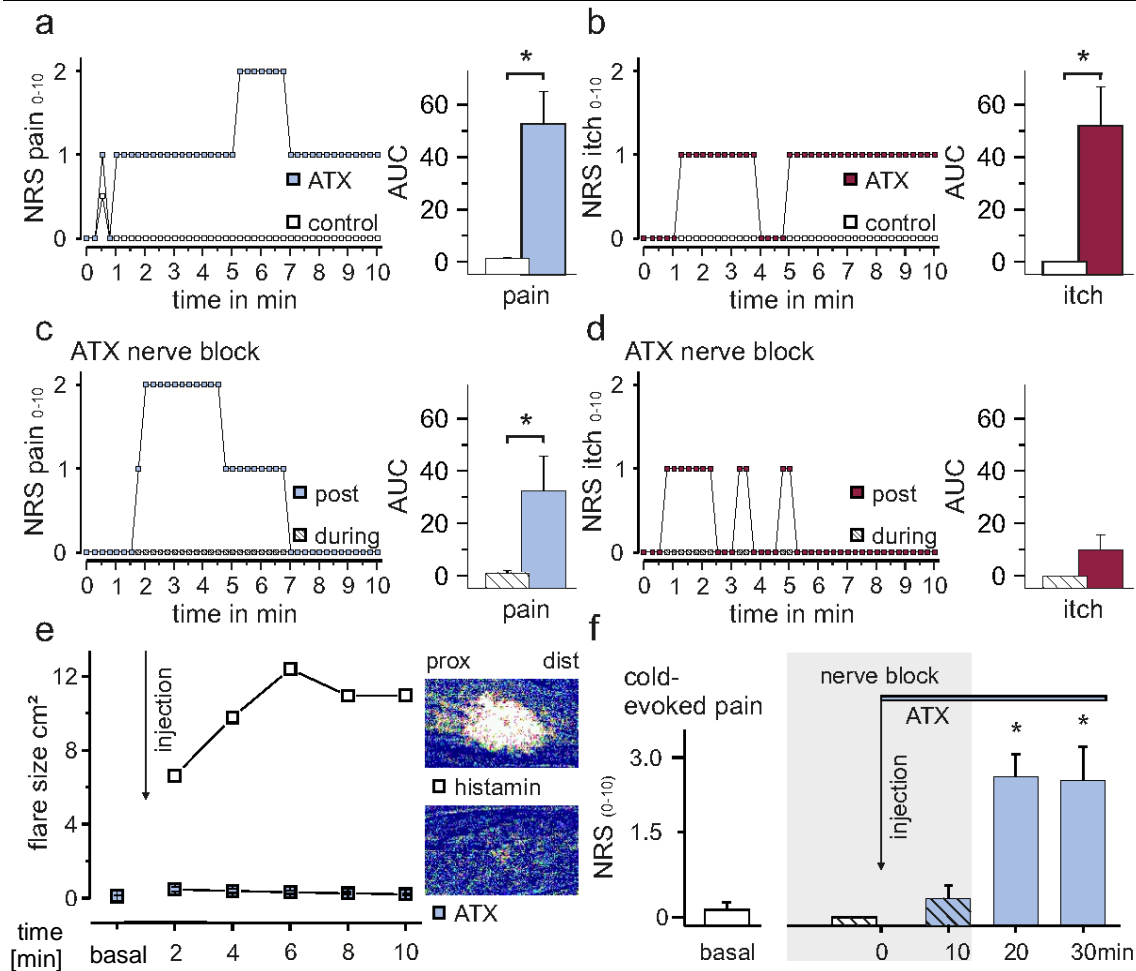


Figure 7 Intradermal injections of ATX-II induces pain and itch-like sensations in human volunteers.

(a) Pain assessment (on a numerical rating scale, NRS 0–10) as a function of time for a subject following injection of saline solution without (control) or with ATX-II. Under control conditions (white symbols) only a short lasting pain is evoked immediately after the injection in agreement with mechanical irritation, whereas ATX-II injection (blue symbols) leads to distinctly augmented ratings. The right panel shows the mean area under the curve (AUC) for $n = 6$ volunteers ($* p < 0.05$). (b) Assessment of itch-like sensations on a NRS ranging from 0–10 following injection (sensation rated as 3 is equivalent to desire to scratch) of one representative subject. While under control conditions (white symbols) no itch is induced following injection, ATX-II (red symbols) evoked itch-like sensations, also reflected in a larger AUC (right, $* p < 0.05$). (c) and (d) Pain (blue squares and bar) and itch (red squares and bar) ratings as a function of time following compression induced nerve block. After 30–40 min of A-fiber block ATX-II was injected and sensations were rated during 10 min (hatched squares). While no pain and itch is evoked by ATX-II under nerve block conditions, pain (blue symbols) and itch (red symbols) recur fast after removal of the block. AUCs of pain ratings increased significantly after removal of the block ($* p < 0.05$). (e) Area of increased blood flow measured by laser doppler imaging every 2 min following ATX-II injection (blue squares, $n = 6$) shows hardly any increase in superficial blood flow. For comparison, a typical histamine-induced axon reflex erythema mediated by activation of C-fibers and concomitant CGRP release is shown (white squares). *Right*: Example images taken 4 min after application of substances. (f) Assessment of cold-evoked ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$, 7 s) pain (NRS 0–10) before (white bar) and during nerve block (hatched bars). 10 min after injection of ATX-II cold-evoked pain is rated and the nerve block removed. Cold-evoked pain 20 and 30 min after injection of ATX-II significantly increases following removal of the nerve block ($* p < 0.05$).

A typical symptom of C-fiber activation is the axon reflex flare [29]. Following application of ATX-II, laser Doppler scanning detected a small increase in local blood flow due to the injection itself, but there was no widespread axon reflex flare ($n = 6$, Figure 7e, blue squares). A classical axon reflex erythema evoked by histamine (1 % applied by iontophoresis) is shown for comparison (Figure 7e, white squares). In humans, histamine activates the group of mechano-insensitive C-fibers, which release calcitonine gene-related peptide (CGRP) upon activation causing widespread vasodilatation [30] when evoked action potentials are antidromically propagated into branching nerve endings.

Our patch-clamp experiments suggest that ATX-II preferably activates A-fibers (connected to large diameter DRGs), whereas its effect on C-fibers (linked to small DRGs) is small or negligible. For further validation of this hypothesis a mechanical differential nerve block was applied prior to ATX-II injection, which mainly affects A-fibers [31,32]. During differential nerve block, no pain (apart from a brief injection pain) or itch-like sensations were reported, revealing a mean AUC during nerve block of 1.3 ± 0.9 and 0.0 ± 0.0 , respectively (hatched squares Figure 7c and d). After removal of the nerve block pain and itch-like sensations immediately arose within seconds and were described as “identical” to those following ATX-II injection without a nerve block by volunteers who had undergone this procedure before. This indicates that mechanical block successfully interfered with ATX-II evoked sensations.

NRS curves for pain and itch were recorded for 10 min following removal of the differential nerve block, and subjects reported spontaneous pain (Figure 7c, blue squares). AUC values for pain ratings post nerve block were significantly higher than during nerve block ($n = 6$, $p < 0.03$; Wilcoxon matched pairs test, Figure 7c, bar graph). However, no itch-like sensations were reported by 50 % of the volunteers following ATX-II injection after removal of the nerve block, indicative of a faster decline of the itch-like component of ATX-II evoked responses over time compared to pain. This further suggests that ATX-II mediates its effects in humans via A-fibers.

NRS pain ratings in response to a cold stimulus (7 s, 0 °C) were used to determine progression of the differential nerve block. Mean ratings before treatment were 0.1 ± 0.1 , and cold sensation was lost under nerve compression before injection of ATX-II (Figure 7f, white bar). During the differential nerve block only very little cold evoked pain was recorded after ATX-II injection (Figure 7f, blue hatched bar). Removal of block, however, lead to a significantly increased cold evoked pain rating and discomforting mechanical sensations 20 and 30 min after ATX-II injection compared to basal ratings (both $p < 0.002^*$, ANOVA ($p < 0.001$), following HSD post hoc test). This phenomenon was limited to the site of ATX-II injection within the area of the differential nerve block. The strongly enhanced cold evoked pain following ATX-II injection most likely depends on A-fiber activation, as it was abolished by differential nerve compression.

Discussion

Here we show, that ATX-II enhances persistent and resurgent currents in large diameter DRGs (Figure 2), but fails to do so in small DRGs (Figure 3). This is most likely due to a lack of sufficient $\beta 4$ -subunit expression in these small neurons (Figure 3d), which is thought to be essential for the generation of resurgent currents. Addition of the $\beta 4$ -peptide to the pipette solution enabled us to record ATX-II-inducible resurgent currents in small DRGs and HEK cells stably expressing Nav1.7. Large DRGs are linked to A-fibers, and supporting our in vitro findings, injection of small amounts of ATX-II into the skin of human volunteers evoked responses in accordance with A-fiber activation.

Large DRGs exhibit endogenous resurgent currents that can be enhanced by ATX-II. This is not the case for small DRGs, even though small DRGs are known to express ATX-II sensitive sodium channels (such as Nav1.1, Nav1.2 and Nav1.6 [16,18,20,33]). Mice lacking functional Nav1.6 (*med* mice) display reduced resurgent currents [34], and there is evidence, that the interaction of the $\beta 4$ -subunit with sodium channels is a major precondition for resurgent currents to occur (e.g. [35]). Our RT-qPCR data of the FACS sorted DRGs show that large DRGs have higher levels of $\beta 4$ mRNA than small neurons (Figure 3d and [21,34]). Considering the primer efficiencies, DRGs of both sizes have ~ 5 times more $\beta 4$ than Nav1.6 (5 and 4.5 times for small and large DRGs, respectively), which would be ample for a simple 1:1 interaction. In small DRGs Nav1.7 is expressed ~ 7 times stronger than Nav1.6, making it more likely for the $\beta 4$ -subunit to interact with Nav1.7 than with Nav1.6 in small DRGs. It may be possible that Nav1.7 has a lower affinity for $\beta 4$, and therefore needs higher concentrations for a successful interaction, which could be provided by addition of $\beta 4$ -peptide to the recording solution (Figures 4 and 5).

Compared to Nav1.7, Nav1.6 shows resurgent currents in a larger population of cells under control condition with the peptide in the pipette (53.1 % vs. 26.7 %, respectively). Nevertheless it might be hard to compare channels expressed in a cell line and draw conclusions to the extent of its modification in its native environment as for example in DRGs. If the peptide was present, seven out of 17 cells transfected with Nav1.6 show resurgent currents, whereas only three out of 15 cells expressing Nav1.7 showed these currents by themselves. Although the cellular background may play a role, these data suggest that Nav1.6 is more prone to interact with the $\beta 4$ -peptide and to produce resurgent currents. It may be possible that the amount of endogenous $\beta 4$ -subunit in small DRGs is simply not sufficient for a robust interaction with any endogenous TTXs sodium channel expressed in these cells and therefore no resurgent currents can be recorded.

An increase in ATX-II concentration up to 25 nM failed to induce resurgent currents in small DRGs (Additional file 3: Figure S3), but only enhanced persistent currents. This finding is comparable to that of the application of the wasp venom β -Pompilidotoxin to CA3 neurons [36], which induced tail and persistent, but no resurgent currents unless the $\beta 4$ -peptide was present in the recording pipette. Our data suggest that small DRGs share this characteristic with CA3 neurons.

An enhanced persistent current may very well increase excitability by its own, and indeed application of 1 μ M ATX-II to IB4 negative small DRG neurons resulted in a broader AP [37]. Interestingly, ATX-II sensitivity seems to be distinct between the different subsets of small DRG neurons, as IB4 positive small DRGs did not change their AP properties in response to ATX-II application. The toxin concentrations that we used in our study induced a shift of TTXs current activation and steady-state fast inactivation (Additional file 2: Figure S2), but failed to have effects on persistent or resurgent currents (Figure 3). Therefore, it is likely that the toxin concentrations used in our experiments remained below threshold for an effect on persistent or resurgent currents in small DRGs, and that in small DRGs persistent and resurgent currents are less sensitive to small amounts of ATX-II than activation and steady-state fast inactivation.

Surprisingly, mRNA for Nav1.7 is expressed in large and small DRGs at comparable levels (Figure 3d, [18]). Patients with the inherited pain syndromes erythromelalgia and PEPD, both due to mutations in Nav1.7, describe their pain mainly as burning - a typical C-fiber associated characteristic. As Nav1.7 seems to be evenly distributed between large and small DRGs, it is likely that associated proteins, such as the β 4-subunit, or cell-background specific channel modifications, may play a major role in the generation of Nav1.7 related pain. The discrepancy may also be due to species differences: We investigated DRGs from mice, but erythromelalgia and PEPD manifest themselves in humans. Knowledge about the developmental regulation of β 4 expression is still lacking. PEPD mutations of Nav1.7 were shown to induce resurgent currents by slowing fast inactivation [7,8]. We show in this study, however, that even in the presence of ATX-II no resurgent current could be evoked in small DRGs or Nav1.7 expressed in HEK293 cells unless the β 4-peptide is present. Patients with PEPD are severely affected during their first year of life but symptoms become somewhat milder later in life. It remains speculative if this might be due to a down regulation of β 4 with age, for which data are currently not available.

ATX-II alone was unable to induce resurgent currents in heterologously transfected Nav1.7 or Nav1.6, which was reported before [38]. Up to now, only one toxin, the β -scorpion peptide Cn2, was able to induce resurgent currents in a heterologous expression system without the addition of an intracellular peptide in Nav1.6 [38]. These currents were enhanced by ATX-II. This finding suggests that sodium channels need some kind of modification, like treatment with Cn2 or potentially a disease causing mutation, such as PEPD, in order to be capable to produce resurgent currents.

In the 70s and early 80s of the last century, it was observed that ATX-II broadens the AP of crustea peripheral axons, and not much later it became evident that this was due to a slowing of inactivation properties of voltage-gated sodium channels [10,15,39,40]. When applied to large DRGs in high concentrations (10 μ M), it significantly slowed τ_h of Nav current inactivation [41]. Here, we used concentrations that are an order of magnitude lower and although we used recombinant ATX-II (purity >98 %), which may be more specific in its effects than purified ATX-II, the effect on the peak current decay time constants was no longer detectable (Additional file 2: Figure S2 b,c), but nevertheless resurgent currents were altered significantly. Also, we observed shifts in activation and steady-state fast inactivation. This suggests that even though the effects on inactivation kinetics were small, the concentration of ATX was high enough to enhance resurgent currents, which in large DRGs seem very sensitive to even small channel alterations. Higher concentrations of ATX-II evoked resurgent currents in large DRGs, which were too large to be properly recorded under our conditions. This suggests that 5 nM ATX-II is a concentration at which effects may be evoked in large, but not in small DRGs, thereby allowing a separation of the two groups.

Molecular studies discriminated between sodium channel subtypes in heterologous expression systems for their sensitivity to ATX-II, showing that mainly Nav1.1, Nav1.2 and Nav1.6 are modified at very low concentrations [16,33,38]. These three channels can be found in large and small DRGs [18,20] and in large, but not small DRGs their modification by ATX-II enhances resurgent currents.

ATX-II slows inactivation kinetics for both channels investigated in this study: Nav1.6, which is supposed to be the main carrier of the AP in large DRGs and Nav1.7, which is suggested to play this role in small DRGs [19]. The slower fast inactivation occurs the higher the probability is for a potential open channel blocker to interact with the pore. Consequently, in the presence of the β 4-peptide, we were able to significantly increase resurgent currents in both channel subtypes (Figure 5). These experiments suggest that two requirements are necessary for ATX-II to increase resurgent currents: I) an ATX-II sensitive sodium channel (such as Nav1.7 or Nav1.6, but also other subtypes, [16,33,38]) and II) the availability of an intracellular open channel blocker. Both seem to be present in large DRGs, whereas our experiments suggest that small DRGs are missing at least one of the components. As the TTXs sodium channels that were shown to be expressed in small DRGs are almost all sensitive to ATX-II (Nav1.1, 2, 6 and 7, [16,18,20], Figures 5 and 6), even at the low concentrations that we used here, it is quite likely that

small DRGs are lacking sufficient open channel blocker. Accordingly, when we added the $\beta 4$ -peptide to the intracellular recording solution, resurgent currents were present in small DRGs (Figure 4).

Recently we showed that the anticancer agent oxaliplatin selectively enhances persistent and resurgent currents in large diameter DRGs at low temperatures [17]. Oxaliplatin is highly effective but unfortunately has dose limiting side-effects: acute and chronic neuropathies, which are both characterized by cold-evoked very unpleasant dysaesthesias. These sensations are similar to those experienced by the subjects of the present study following intradermal ATX-II injection. Besides an increased cold perception 20 and 30 min after ATX-II injection a pricking sensation outlasting the cold stimulus was observed (see Figure 6f), indicating ongoing activity in the affected nerve fibers.

ATX-II did not display a marked temperature dependence in its enhancement of resurgent or persistent currents, which is in contrast to oxaliplatin (Figure 2 and [17]). Low temperatures induce a general increase in membrane resistance, which would then allow a small depolarizing current, like resurgent currents, to be potentially sufficient to initiate a following AP. This may explain why the subjects report cold-enhanced sensations after ATX-II injection (Figure 7f); even though resurgent currents were not significantly different at 22 °C compared to 30 °C (Figure 2).

Oxaliplatin failed to affect C-fibers or small diameter DRGs, suggesting that this drug, too, relies on the presence of the $\beta 4$ -subunit for its effects, or displays some degree of subtype specificity. The presence or absence of the endogenous blocking particle might thus render certain types of neurons susceptible for activation by toxins or drugs which act via voltage-gated sodium channels. Thus, focusing only on specific sodium channel subtypes for the treatment e.g. of pain might not be reaching far enough, but the channels functions in their cellular context need to be considered.

Pain sensations *in vivo* may be transmitted via two main types of fibers: the myelinated fast conducting A-fibers, which are connected to large DRGs, and the slower and unmyelinated C-fibers which are linked to small diameter DRGs [13]. We have shown that low concentrations of ATX-II activate large DRGs suggesting that A-fibers convey the ATX-II evoked sensations of the volunteers. Accordingly, mechanical nerve fiber block abolished the ATX-II evoked sensations. Most likely A δ -fibers mediate the ATX-II induced pain symptoms but may also participate in the itch-like sensations. Recently it was shown that the effects of intradermal insertion of spicules from the pods of a cowhage plant induce intense itching. A δ -fibers seem to be involved in transmitting this itch [42]. In some subjects, these sensations were markedly reduced by mechanical nerve block. Intradermal injection of ATX-II, on the other hand, evoked itch-like sensations, that were not described as common itch, but unpleasant sensation, for which there is no adequate word. "Tingling" was used by some subjects, which may be an overlapping sensation induced by ATX-II and cowhage spicules. Apart from A δ -fibers it is likely that A β -fibers are activated by ATX-II since sensations of mechanical character were described, such as "like punctured by many thin needles". Possibly, the uncommon simultaneous activation of A δ - and A β -fibers may generate the unique ATX-II mediated perception.

In our *in vivo* experiments the A-fiber block may induce paraesthesias itself, both during and upon recovering from the block. However no paraesthesias were described prior to and after ATX-II injection. Nonetheless, the reported sensations after ATX-II injections and relief of block were comparable to those described when no prior block was applied. The fact that cold evoked pain, which strongly increased after removal of the block, was closely restricted to the injection site (Figure 7f) argues against a general block-induced fiber irritation. Nevertheless, an irritation of the fibers cannot be ruled out, but we estimate it to be rather small in comparison to the effects evoked by ATX-II alone.

Intradermal injection of ATX-II did not evoke a large axon reflex flare (Figure 7e), arguing against a major activation of mechano-insensitive C-fibers [29]. Nevertheless, mechanosensitive C-fibers may mediate itch without the induction of a major axon reflex flare [43,44]. Subjects tested with cowhage spicules, which activate only mechano-sensitive C-fibers vigorously and A δ -fibers, report quite different

sensations than those injected with ATX-II (burning pain, severe itch, which was also clearly labeled as such). As mechano-sensitive C-fibers are also resistant to differential nerve block and should therefore have transmitted the ATX-II-mediated sensations, we assume that mechano-sensitive C-fibers are not a major target of ATX-II in humans.

Conclusions

ATX-II enhances persistent and resurgent sodium currents in large diameter DRGs, whereas small DRGs depend on the addition of β 4-peptide to the pipette recording solution for ATX-II to affect resurgent currents. Mechanical A-fiber blockade abolishes all ATX-II effects in human skin (e.g. painful and itch-like sensations), suggesting that it mediates its effects mainly via activation of large diameter A-fibers.

We thus established low concentrations of ATX-II as a tool for A-fiber activation, which induces pain and itch-like symptoms in humans. We show that activation mainly of A-fibers can be crucial for unpleasant pain and itch-like sensations, which are not extremely painful but could be distressing and reducing quality of life. We also showed for the first time, that this toxin is able to enhance resurgent currents of large DRGs, and of small DRGs or heterologously expressed Nav1.7, when the β 4-peptide is present.

Methods

Animals and cell culture

Adult C3HeB/FeJ mice were anaesthetized with halothane (Sigma-Aldrich GmbH, Steinheim, Germany) and decapitated in accordance with ethical guidelines established by German animal protection law, approved by the animal protection committee of Regierung Mittelfranken, Germany. After decapitation, the backbone was removed rapidly and bisected longitudinally in ice-cold PBS (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria). DRGs were removed, desheated, cleaned and enzymatically dissociated in Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco-Life technologies, New York, USA) supplemented with collagenase/protease for 45 min at 37 °C. Cells were mechanically triturated with small diameter pasteur pipettes in TNB medium (Biochrom AG, Berlin, Germany). Poly-D-Lysin (Sigma-Aldrich GmbH, Munich, Germany) coated cover slips were loaded with the cell suspension and after cells settled for 5–10 min TNB medium was added. DRGs were incubated at 37 °C and 5 % CO₂ until experiments were performed at the following day. A stable HEK293 cell line expressing hNav1.7 was cultured under same conditions as DRGs in DMEM containing 500 mg/l G418 (Sigma-Aldrich GmbH). N1E115 neuroblastoma cells were maintained in DMEM medium (Gibco-Life technologies) including 4.5 g/l Glucose, 10 % fetal bovine serum (Biochrom AG) and 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA Laboratories GmbH). One day before transfection N1E115 cells were plated on 3.5 cm dishes (Falcon Corning, IBD) and transfected with Nanofectin (PAA Laboratories GmbH) according to the manufacturers protocol using 1 μ g mNav1.6R (TTX resistant [45,46], in pCDNA3) and 0.5 μ g EGFP-C1 (Clontech Laboratories,

Inc., Mountain View, USA) in order to detect transfected cells via green fluorescence. Cells were recorded 2 to 3 days after transfection.

Whole-cell patch-clamp recordings and electrophysiology

Whole-cell voltage clamp recordings were performed using glass electrodes with tip resistances of 1.5-2.0 M Ω , manufactured with a DMZ puller (Zeitz Instruments GmbH, Martinsried, Germany) and filled with an internal solution comprising for DRGs (in mM): 140 CsF, 10 NaCl, 10 HEPES, 1 EGTA and 5 TEA-Cl (adjusted to pH 7.4 with CsOH), for HEK cells (in mM): 135 CsCl, 5 NaCl, 2 MgCl₂ATP, 10 HEPES and 5 EGTA (adjusted to pH 7.4 with CsOH) and for N1E115 cells (in mM): 125 CsCl, 5 NaCl, 2 Mg₂ATP, 10 HEPES and 5 EGTA (adjusted to pH 7.4 with CsOH). For recordings of activation and steady-state fast inactivation of DRGs, an internal solution with reduced sodium chloride (2 mM NaCl) was used. The external bathing solution contained for DRGs (in mM): 140 NaCl, 3 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 5 Glucose, 20 TEA-Cl, 0.1 CdCl₂ (adjusted to pH 7.4 with NaOH), except for recordings of activation and steady-state fast inactivation, where NaCl was reduced to 10 mM, substituted with CholinCl, for HEK cells (in mM): 150 NaCl, 3 KCl, 2 MgCl₂, 1.6 CaCl₂, 0.4 CdCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose, 10 TEA-Cl (pH = 7.4, adjusted with NaOH) and for N1E115 cells (in mM): 145 NaCl, 4 KCl, 2 MgCl₂, 2 CaCl₂, 10 HEPES, 10 Glucose, 10 TEA (adjusted to pH 7.4 with NaOH).

DRGs were classified according to their cell size as large (> 35 μ m) or small (< 25 μ m). Size was measured as the maximal diameter of the cells on a digital image taken with an EC3 Camera (Leica, Wetzlar, Germany) connected to a Leica-DCMI3000B microscope with a 64 x objective. Recordings were performed at either room temperature (22 \pm 1 $^{\circ}$ C) or 30 \pm 1 $^{\circ}$ C, controlled by an inline solution heater (Warner Instruments, Hamden, USA) with a feedback thermocouple positioned less than 800 μ m from the recorded cell. A HEKA EPC-10USB (Lambrecht, Germany) was used for signal recording, low-pass (10 kHz) filtering and digitizing (100 kHz).

For substance application the tip of a perfusion system was positioned within 800 μ m of the recorded DRG neuron. Pipette potential was zeroed prior to seal formation and capacitive transients were compensated using C-fast for pipette-capacity correction and subsequently C-slow for cell-capacity compensation (PatchMaster, HEKA, Lambrecht, Germany), the series resistance was compensated by about 50 % leaving a mean resistance of 3.8 \pm 0.4 M Ω . The absolute peak current (pA) was divided by the capacitance as determined by C-slow compensation to obtain current densities. Leak pulses were applied following the test pulse, and mean leak current was subtracted digitally online corresponding to the P/4 test pulse procedure.

To measure resurgent currents in DRGs an initial 20 ms voltage step from a holding potential of -120 mV to +30 mV was applied followed by 500 ms steps from -80 mV to +25 mV (steps of 5 mV). In HEK293 cells a 12.5 ms depolarizing voltage step from -90 mV to +30 mV preceded 50 ms steps from -80 mV to +20 mV (steps of 10 mV). In N1E115 cells a 12.5 ms depolarizing voltage step from -100 mV to +30 mV preceded 150 ms steps from -90 mV to 0 mV (steps of 10 mV). The resurgent current quantity was measured by detecting the peak inward current following the pre-pulse. Persistent current was determined as the mean current between 400 ms and 515 ms of the voltage protocol. To show resurgent current in isolation, not affected by the persistent current, the latter was subtracted from the peak inward resurgent current to obtain the isolated resurgent current.

Persistent currents give rise to tail currents upon repolarization. Special care was taken in order not to confound the slower activating and decaying resurgent currents with tail currents. Especially its different voltage dependence and kinetics allowed us to clearly discriminate between the

two. Current trajectories were only accepted as resurgent currents, if they clearly showed slowly rising and falling kinetics. In small diameter DRGs only tail currents were visible under control conditions. By choosing the relevant area for analysis, the peak inward resurgent currents could reliably be distinguished from tail currents, although a small contamination cannot be excluded.

By subtracting the TTXr component (Figure 1) we eliminated all TTXr currents including potassium and calcium currents, which may also have tail currents. In accordance with the literature, we were unable to detect any TTXr resurgent currents ([14,17]).

Protocols were recorded while the bath perfusion was constantly running, and repeated with ATX-II and TTX in the external solution. TTXs components were isolated by subtraction using Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, USA).

For recordings of DRGs and HEK293 cells with β 4-peptide in the internal pipette solution, cover slips were incubated either in bath solution (control) or in bath solution containing 5 nM ATX-II for 7 to 10 min before begin of the protocol.

N1E115 cells intrinsically express TTX-sensitive Nav1.1 and Nav1.2 (Benzinger et al., 1997), which were suppressed in our experiments by adding 1 μ M TTX (Biotrend, Wangen/Zurich, Switzerland) to the bath solution. Cells were mounted on the stage of Axiovert 40 fluorescence microscope (Zeiss, Jena, Germany). TTX and ATX-II were applied using a gravity driven Y-filament. Current signals were recorded in whole-cell voltage-clamp mode at room temperature (22 ± 1 °C). Recordings were sampled at 20 kHz (low-pass filter 6 kHz) using an Multiclamp 700B amplifier in conjunction with a Digidata 1322A interface and pClamp10 software (all from Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Electrodes were made as stated above. Access resistance in whole-cell configuration was <4 M Ω before series resistance compensation (≥ 75 %).

FACS sorting and RT-qPCR

For each experiment 20–25 DRGs from two adult mice each were pooled, filtered using a 100 μ m cell strainer (BD Falcon) and incubated for at least 30 min on ice with both the nuclei labeling agent Hoechst 33258 (Invitrogen) and the avital marker 7AAD (Invitrogen, labels all dead cells). Using a BD-FACSAria-II cell sorter (Special Order System, BD Biosciences, Core Unit Cell Sorting and Immunomonitoring Erlangen), neurons were sorted for viability and size via their fluorescence and the forward-side-scatter plot.

In order to correlate the categories retrieved from the forward-side-scatter plots with the actual cell size, sorted DRGs were cultured for 2–3 h and the mean size of cells in each group was determined via digital images taken with an EC3 Camera (Leica, Wetzlar, Germany) connected to a LeicaDCMI3000B microscope.

Cells survived sorting well and had a healthy appearance still several hours after FACS sorting. Cells categorized as small had diameters ranging from 13 to 27 μ m (the majority around 18 μ m), whereas those categorized as large ranged from 27 μ m to 43 μ m (the majority around 35 μ m). Overall DRGs appeared slightly smaller after FACS sorting compared to those cultivated for 24 h, which might also be due to better attachment of the cells to the cover slip in the latter case.

DRGs for each size-category were collected in PBS, centrifuged and dissolved in Qiazol (Qiagen, Hilden, Germany) for RNA isolation according to manufacturer's protocol.

Potentially remaining DNA was digested with RQ1 RNase-free DNase (Promega, Mannheim, Germany). RNA concentration and purity was assessed with the Nanodrop 2000c spectrophotometer (Peqlab, Erlangen, Germany). RNA was subsequently reverse transcribed with random hexamer primers using the cDNA synthesis kit from Peqlab (Erlangen, Germany). Approximately 5 ng of cDNA was added to the 2x SensiMix SYBR No-ROX Kit (Peqlab, Erlangen, Germany) and mixed with 600 nM of target primer for detection of either β 4-subunit (Scn4b), Nav1.6 (Scn8a) or Nav1.7 (Scn9a) cDNA. To avoid amplification of genomic DNA, exon-spanning primers were designed using Primer3Plus and analyzed by IDT OligoAnalyzer 3.1. BLAST search was applied to ensure specificity.

Primer characteristics are shown in Table 1. Reactions were performed in duplicates and carried out using an Eppendorf realplex4 cycler (Eppendorf, Hamburg, Germany). An initial denaturation step at 95 °C for 10 min was followed by 40 cycles of denaturation at 95 °C for 15 s, annealing at 60 °C for 30 s and extension at 72 °C for 20 s. The generation of specific PCR products was confirmed by melting curve analysis and gel electrophoresis. Differences in expression levels of target genes in small and large neurons were determined using the $\Delta\Delta Cq$ method. HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase) and Rpl13a (ribosomal protein L13a) were used as reference genes to generate a mean value for relative quantification of target gene expression.

Table 1 Primer pairs for real-time qPCR

Genes	Accession number	Target sites	Product size (bp)	Efficiency
Scn8a (Nav1.6)	[NCBI:NM_001077499]		153	93%
for: 5'-CGTACTATTTGACGCAGAAAACCTT-3'		Exon 2-3		
rev: 5'-TCATGCTGAAGACTGAATGTATCA-3'		Exon 3-4		
Scn9a (Nav1.7)	[NCBI:NM_018852.2]		142	95%
for: 5'-CAGCAAAGAGAGACGGAACC-3'		Exon 18-19		
rev: 5'-TCTCCTCACACAGCCATCTG-3'		Exon 19-20		
Scn4b (β 4)	[NCBI:NM_001013390]		116	96%
for: 5'-CGAAACATCCAGGATTCTCAT-3'		Exon 2-3		
rev: 5'-TCGTCTTCTCCTTGGTGGA-3'		Exon 3		
Rpl13a	[NCBI:NM_009438.5]		59	99%
for: 5'-GCCTACCAGAAAGTTTGCTTACC-3'		Exon 6-7		
rev: 5'-GGTACTTCCACCCGACCTC-3'		Exon 7-8		
HPRT	[NCBI:NM_013556]		132	94%
for: 5'-TGGAAAGAATGTCTTGATTGTTG-3'		Exon 4-5		
rev: 5'-CGAGAGGTCCTTTTCACCAG-3'		Exon 7		

Psychophysics

Informed written consent was obtained from all subjects (n = 9; 3 male and 6 female) in accordance with the requirements of the Declaration of Helsinki and experimental procedures for this study on human volunteers were passed by the ethics committee of the University of Erlangen. 70 μ l of a sterile control solution (buffer) or solution containing ATX-II (100 nM) were intradermally injected at the volar forearm or to the innervation territory of the superficial radial nerve at the back of the hand of the volunteer. Pain and itch-like sensations were assessed on a numerical rating scale (NRS), ranging from 0 (no pain/itch sensation) to 10 (worst imaginable pain/itch) in 15 s intervals for a period of 10 min. For thermal stimulation metal rods of 1 cm in diameter were placed in a preheated water bath at 47 °C or ice water.

Numerical ratings to a 7 s lasting heat stimulus of 47 °C and to a 7 s lasting cold stimulus of 0 °C were compared before and after application of substances. The skin was tested for static and dynamic mechanical allodynia by applying gentle pressure with a cotton swab and stroking with a fine brush. Laser-Doppler imaging (LDI, Moore, London, UK) was used to record changes in superficial skin blood flow. Two baseline scans of 0.5 mm spatial resolution on a 10.8 cm x 7.0 cm area were taken, followed by scans every 2.0 min starting right after the injections. The skin blood flow was analyzed with MLDImg 3.08 software (LDI, Moore, London, UK) and the area of vasodilatation was defined as those pixels in which intensity exceeded the mean of basal values plus two standard deviations [47].

Differential conduction blockade of myelinated nerve fibers was achieved by placing a padded sling connected to a 2.5 kg weight at the proximal wrist of the volunteers for 30–40 min to apply pressure to the superficial radial nerve (also see [48]). Preferential A-fiber blockade induced by nerve compression has been shown by Torebjork et al. [31] and Mackenzie et al. [32] in microneurography studies. In the case of the superficial radial nerve the impaired A-fiber function with preserved C-fiber function is limited to the autonomous zone of the superficial radial nerve distal the metacarpophalangeal joints I + II. The progress of the differential block following compression of the *N. radialis superficialis* was monitored by decrease of touch and cold detection and was considered to be sufficient when a cold stimulus applied by a metal rod immersed in ice water (7 s, 0 °C) was not to be distinguished from a mechanical stimulus. During the whole duration of the block subjects were able to feel pin-prick stimulation as painful sharp pricking, which was interpreted as maintained C-fiber function [49]. When nerve block was established 70 µl of a 100 nM ATX-II containing sterile buffer solution was injected and subjects were asked to rate pain-like and itch-like sensations for 10 min before removal of the block and 10 and 20 min thereafter together with ratings of cold-evoked pain (0 °C, 7 s, Figure 7). For the NRS curves of each subject the area under the curve (AUC) was calculated (Figure 7a + b, bar graphs).

Chemicals

A 5, 25 or 100 nM recombinant ATX-II (*Anemonia sulcata* toxin, Alomone Labs, Jerusalem, Israel or Sigma-Aldrich, USA) solution was prepared in saline solution (either extracellular recording solution or sterile buffer for injections, which was additionally sterile filtered). TTX (Tetrodotoxin, Biotrend AG, Wangen, Switzerland) was diluted to a final concentration of 500 nM in the extracellular recording solution. For recordings with β 4-peptide an internal solution containing 100 µM β 4-peptide (KKLITFILKKTREK, PSL GmbH, Heidelberg, Germany, [50]) was prepared and stored on ice during the process of the experiments

Statistics

All data are presented as mean \pm standard error of the mean (SEM). Paired-sample T-test was used for statistical analysis of DRG paired patch clamp recordings and for N1E115 and DRG activation and steady-state fast inactivation analysis. For temperature effect analysis nonpaired Mann Whitney U-test was used for group comparison. For experiments performed on HEK cells and preincubated DRGs independent-sample T-test was used to test for significance. For psychophysics experiments a Wilcoxon matched pairs test was used for intra-individual comparisons and Mann Whitney U-test for the comparison of groups. For RT-qPCR one-tailed Mann Whitney U-test was used for group comparison. Statistical significances are indicated with * for $p < 0.05$, ** for $p < 0.01$ and *** for $p < 0.001$.

Abbreviations

Nav: Voltage-gated sodium channel; DRGs: Dorsal root ganglion sensory neurons; TTX: Tetrodotoxin; PEPD: Paroxysmal extreme pain disorder; RT-qPCR: Real time quantitative polymerase chain reaction; ATX-II: Sea anemone toxin II; AUC: Area under the curve; CGRP: Calcitonine gene-related peptide; AP: Action potential; ns: Statistically not significant

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

ABK carried out the patch-clamp recordings and analysis, participated in the acquisition and coordination of psychophysical experiments, carried out FACS sorting data acquisition and interpretation and wrote the manuscript draft. ME planned, coordinated and acquired psychophysical studies, analyzed psychophysical data and participated in writing the manuscript. ASL designed, performed and analyzed the RT-qPCR experiments and critically revised the manuscript. BN planned and participated in acquiring and analyzing psychophysical data and critically revised the manuscript. LKK carried out patch-clamp recordings of Nav1.6 and data analysis. ETS contributed to conception and design and carried out patch-clamp recordings and analysis. RS contributed to conception and design of the study, participated in data acquisition and critically revised the manuscript. THo participated in planning the experiments and critically revised the manuscript. CA participated in analyzing the patch-clamp data. THu contributed to conception and design, participated in analyzing the patch-clamp data. RWC contributed to conception and design of the study. AL conceived and designed the patch-clamp recordings, participated in acquisition and coordination of patch-clamp, FACS sorting and psychophysical data and their analysis and interpretation, and wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

The authors thank C. Forster for help analyzing the psychophysical data, K. Kistner and R. DeCol for helpful discussions, A. Wirth-Hücking and I. Izydorczyk for technical assistance. The FACS analysis was performed at the Core Unit Cell Sorting and Immunomonitoring Erlangen. Research was supported by the German Research Council (DFG, NA 970/1-1 to BN, CA853/1-2 to RWC, LA2740/2-1 to AL), Ernst-und-Anita-Bauer-Stiftung (to ME), Jürgen Manchot Foundation (to ASL), ELAN of the FAU Erlangen-Nürnberg (11.05.30.1) and the German Israeli Foundation (GIF, 1091–27.1/2010 to AL).

References

1. Cox JJ, Reimann F, Nicholas AK, Thornton G, Roberts E, Springell K, Karbani G, Jafri H, Mannan J, Raashid Y, *et al*: **An SCN9A channelopathy causes congenital inability to experience pain.** *Nature* 2006, **444**:894–898.

2. Lampert A, O'Reilly AO, Reeh P, Leffler A: **Sodium channelopathies and pain.** *Pflugers Arch* 2010, **460**:249–263.
3. Dib-Hajj SD, Cummins TR, Black JA, Waxman SG: **Sodium channels in normal and pathological pain.** *Annu Rev Neurosci* 2010, **33**:325–347.
4. Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG: **International Union of Pharmacology. XXXIX. Compendium of Voltage-Gated Ion Channels: Sodium Channels.** *Pharmacol Rev* 2003, **55**:575–578.
5. Akopian AN, Ruparel NB, Jeske NA, Hargreaves KM: **Transient receptor potential TRPA1 channel desensitization in sensory neurons is agonist dependent and regulated by TRPV1-directed internalization.** *J Physiol* 2007, **583**:175–193.
6. Raman IM, Bean BP: **Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons.** *J Neurosci* 1997, **17**:4517–4526.
7. Jarecki BW, Piekarz AD, Jackson JO 2nd, Cummins TR: **Human voltage-gated sodium channel mutations that cause inherited neuronal and muscle channelopathies increase resurgent sodium currents.** *J Clin Invest* 2010, **120**:369–378.
8. Theile JW, Jarecki BW, Piekarz AD, Cummins TR: **Nav1.7 mutations associated with paroxysmal extreme pain disorder, but not erythromelalgia, enhance Navbeta4 peptide-mediated resurgent sodium currents.** *J Physiol* 2011, **589**:597–608.
9. Bean BP: **The Molecular Machinery of Resurgent Sodium Current Revealed.** *Neuron* 2005, **45**:185–187.
10. Schmidtmyer J, Stoye-Herzog M, Ulbricht W: **Rate of action of Anemonia sulcata toxin II on sodium channels in myelinated nerve fibres.** *Pflugers Arch* 1982, **394**:313–319.
11. Bergman C, Dubois JM, Rojas E, Rathmayer W: **Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone.** *Biochim Biophys Acta* 1976, **455**:173–184.
12. Cannon SC, Corey DP: **Loss of Na⁺ channel inactivation by anemone toxin (ATX II) mimics the myotonic state in hyperkalaemic periodic paralysis.** *J Physiol* 1993, **466**:501–520.
13. Lawson SN: **Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Delta- or Aalpha/beta-fibres.** *Exp Physiol* 2002, **87**:239–244.
14. Cummins TR, Dib-Hajj SD, Herzog RI, Waxman SG: **Nav1.6 channels generate resurgent sodium currents in spinal sensory neurons.** *FEBS Lett* 2005, **579**:2166.
15. Hartung K, Rathmayer W: **Anemonia sulcata toxins modify activation and inactivation of Na⁺ currents in a crayfish neurone.** *Pflugers Arch* 1985, **404**:119–125.

16. Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E: **Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop.** *J Biol Chem* 2004, **279**:33323–33335.
17. Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, Fleckenstein J, Alzheimer C, Grafe P, Carr RW: **Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype NaV1.6-resurgent and persistent current.** *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)* 2012, doi:10.1073/pnas.1118058109.
18. Ho C, O'Leary ME: **Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons.** *Mol Cell Neurosci* 2011, **46**:159–166.
19. Wilson MJ, Yoshikami D, Azam L, Gajewiak J, Olivera BM, Bulaj G, Zhang MM: **mu-Conotoxins that differentially block sodium channels NaV1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:10302–10307.
20. Felts PA, Yokoyama S, Dib-Hajj S, Black JA, Waxman SG: **Sodium channel alpha-subunit mRNAs I, II, III, NaG, Na6 and hNE (PN1): different expression patterns in developing rat nervous system.** *Brain Res Mol Brain Res* 1997, **45**:71–82.
21. Ho C, Zhao J, Malinowski S, Chahine M, O'Leary ME: **Differential expression of sodium channel beta subunits in dorsal root ganglion sensory neurons.** *J Biol Chem* 2012, **287**:15044–15053.
22. Grieco TM, Malhotra JD, Chen C, Isom LL, Raman IM: **Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel [beta]4 as a mechanism for resurgent sodium current.** *Neuron* 2005, **45**:233–244.
23. Aman TK, Grieco-Calub TM, Chen C, Rusconi R, Slat EA, Isom LL, Raman IM: **Regulation of persistent Na current by interactions between beta subunits of voltage-gated Na channels.** *J Neurosci* 2009, **29**:2027–2042.
24. Wang GK, Edrich T, Wang SY: **Time-dependent block and resurgent tail currents induced by mouse beta4(154–167) peptide in cardiac Na⁺ channels.** *J Gen Physiol* 2006, **127**:277–289.
25. Chen Y, Yu FH, Sharp EM, Beacham D, Scheuer T, Catterall WA: **Functional properties and differential neuromodulation of Na(v)1.6 channels.** *Mol Cell Neurosci* 2008, **38**:607–615.
26. Raman IM, Sprunger LK, Meisler MH, Bean BP: **Altered subthreshold sodium currents and disrupted firing patterns in Purkinje neurons of Scn8a mutant mice.** *Neuron* 1997, **19**:881–891.
27. Do MTH, Bean BP: **Sodium currents in subthalamic nucleus neurons from Nav1.6-null mice.** *J Neurophysiol* 2004, **92**:726–733.

28. Rush AM, Dib-Hajj SD, Waxman SG: **Electrophysiological properties of two axonal sodium channels, Nav1.2 and Nav1.6, expressed in mouse spinal sensory neurones.** *J Physiol* 2005, **564**:803–815.
29. Schmelz M, Michael K, Weidner C, Schmidt R, Torebjork HE, Handwerker HO: **Which nerve fibers mediate the axon reflex flare in human skin?** *Neuroreport* 2000, **11**:645–648.
30. Mayer KH, Mimiaga MJ: **Resurgent syphilis in the United States: urgent need to address an evolving epidemic.** *Ann Intern Med* 2011, **155**:192–193.
31. Torebjork HE, Hallin RG: **Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves.** *Exp Brain Res* 1973, **16**:321–332.
32. Mackenzie RA, Burke D, Skuse NF, Lethlean AK: **Fibre function and perception during cutaneous nerve block.** *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1975, **38**:865–873.
33. Wanke E, Zaharenko AJ, Redaelli E, Schiavon E: **Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms.** *Toxicon* 2009, **54**:1102–1111.
34. Lewis AH, Raman IM: **Cross-species conservation of open-channel block by Na channel beta4 peptides reveals structural features required for resurgent Na current.** *J Neurosci* 2011, **31**:11527–11536.
35. Bant JS, Raman IM: **Control of transient, resurgent, and persistent current by open-channel block by Na channel β 4 in cultured cerebellar granule neurons.** *Proc Natl Acad Sci* 2010, **107**:12357–12362.
36. Grieco TM, Raman IM: **Production of resurgent current in Nav1.6-null Purkinje neurons by slowing sodium channel inactivation with beta-pompilidotoxin.** *J Neurosci* 2004, **24**:35–42.
37. Snape A, Pittaway JF, Baker MD: **Excitability parameters and sensitivity to anemone toxin ATX-II in rat small diameter primary sensory neurones discriminated by *Griffonia simplicifolia* isolectin IB4.** *J Physiol* 2010, **588**:125–137.
38. Schiavon E, Sacco T, Cassulini RR, Gurrola G, Tempia F, Possani LD, Wanke E: **Resurgent Current and Voltage Sensor Trapping Enhanced Activation by a beta-Scorpion Toxin Solely in Nav1.6 Channel: SIGNIFICANCE IN MICE PURKINJE NEURONS.** *J Biol Chem* 2006, **281**:20326–20337.
39. Rathmayer W: **Anemone toxin discriminates between ionic channels for receptor potential and for action potential production in a sensory neuron.** *Neurosci Lett* 1979, **13**:313–318.
40. Ulbricht W, Schmidtmayer J: **Modification of sodium channels in myelinated nerve by *Anemonia sulcata* toxin II.** *J Physiol* 1981, **77**:1103–1111.

41. Salceda E, Garateix A, Soto E: **The sea anemone toxins BgII and BgIII prolong the inactivation time course of the tetrodotoxin-sensitive sodium current in rat dorsal root ganglion neurons.** *J Pharmacol Exp Ther* 2002, **303**:1067–1074.
42. Ringkamp M, Schepers RJ, Shimada SG, Johaneck LM, Hartke TV, Borzan J, Shim B, LaMotte RH, Meyer RA: **A Role for Nociceptive, Myelinated Nerve Fibers in Itch Sensation.** *J Neurosci* 2011, **31**:14841–14849.
43. Johaneck LM, Meyer RA, Hartke T, Hobelmann JG, Maine DN, LaMotte RH, Ringkamp M: **Psychophysical and physiological evidence for parallel afferent pathways mediating the sensation of itch.** *J Neurosci* 2007, **27**:7490–7497.
44. Namer B, Carr R, Johaneck LM, Schmelz M, Handwerker HO, Ringkamp M: **Separate peripheral pathways for pruritus in man.** *J Neurophysiol* 2008, **100**:2062–2069.
45. Leipold E, Hansel A, Borges A, Heinemann SH: **Subtype specificity of scorpion beta-toxin Tz1 interaction with voltage-gated sodium channels is determined by the pore loop of domain 3.** *Mol Pharmacol* 2006, **70**:340–347.
46. Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, Fleckenstein J, Alzheimer C, Grafe P, Carr RW: **Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype NaV1.6-resurgent and persistent current.** *P Natl A Sci* 2012, **109**:6704–6709.
47. Huth T, Rittger A, Saftig P, Alzheimer C: **beta-Site APP-cleaving enzyme 1 (BACE1) cleaves cerebellar Na⁺ channel beta4-subunit and promotes Purkinje cell firing by slowing the decay of resurgent Na⁺ current.** *Pflugers Archiv: European journal of physiology* 2011, **461**:355–371.
48. Ziegler EA, Magerl W, Meyer RA, Treede RD: **Secondary hyperalgesia to punctate mechanical stimuli. Central sensitization to A-fibre nociceptor input.** *Brain* 1999, **122**(Pt 12):2245–2257.
49. Alenmyr L, Hogestatt ED, Zygmunt PM, Greiff L: **TRPV1-mediated itch in seasonal allergic rhinitis.** *Allergy* 2009, **64**:807–810.
50. Theile JW, Cummins TR: **Inhibition of Nav β 4 Peptide-mediated Resurgent Sodium Currents in Nav1.7 Channels by Carbamazepine, Riluzole and Anandamide.** *Mol Pharmacol* 2011, **80**:724–734.

Additional files

Additional_file_1 as PDF

Additional file 1: Figure S1. Activation properties of resurgent currents of large diameter DRGs. (a). Resurgent current–voltage curve normalized to peak inward TTXs resurgent currents for large diameter DRGs. (b). Relative resurgent conductance of peak inward TTXs resurgent currents, pre (black squares) and post (pink squares) ATX-II application at 22 °C (filled squares, n = 8) and 30 °C (open squares n = 14) for large diameter DRGs. Midpoints of activation of relative resurgent conductance were retrieved from a Boltzmann fit and are not

significantly different (control 22 °C: -57.5 ± 1.4 mV, post ATX-II 22 °C: -57.5 ± 1.7 mV, control 30 °C: -53.9 ± 1.2 mV, post ATX-II 30 °C: -57.7 ± 1.7 mV; Wilcoxon matched pairs test for ATX-II effect: 22 °C $p = 0.889$, 30 °C $p = 0.099$; Mann–Whitney-U-test for temperature dependent effect: pre 22 °C vs. 30 °C $p = 0.054$, post 22 °C vs. 30 °C $p = 0.758$).

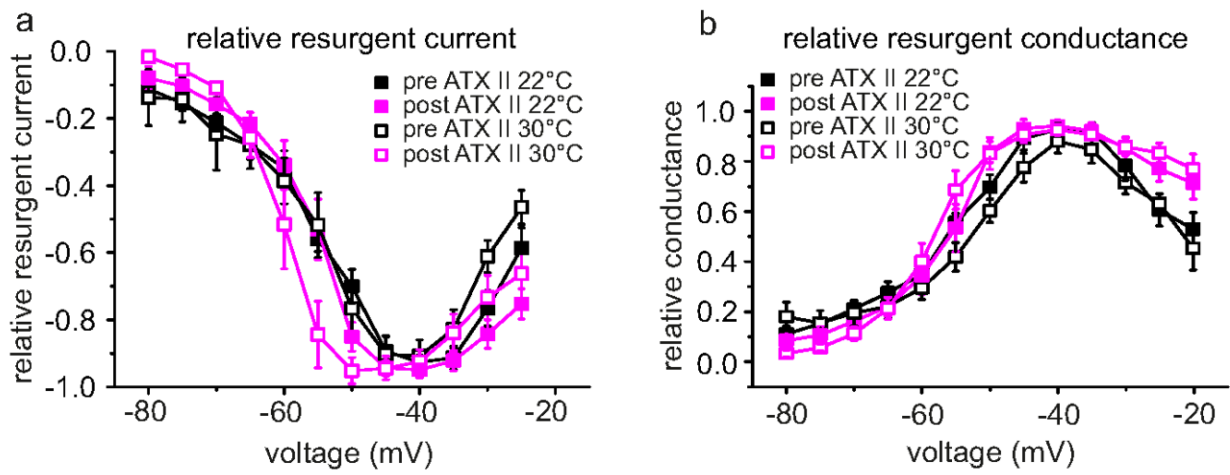
Additional_file_2 as PDF

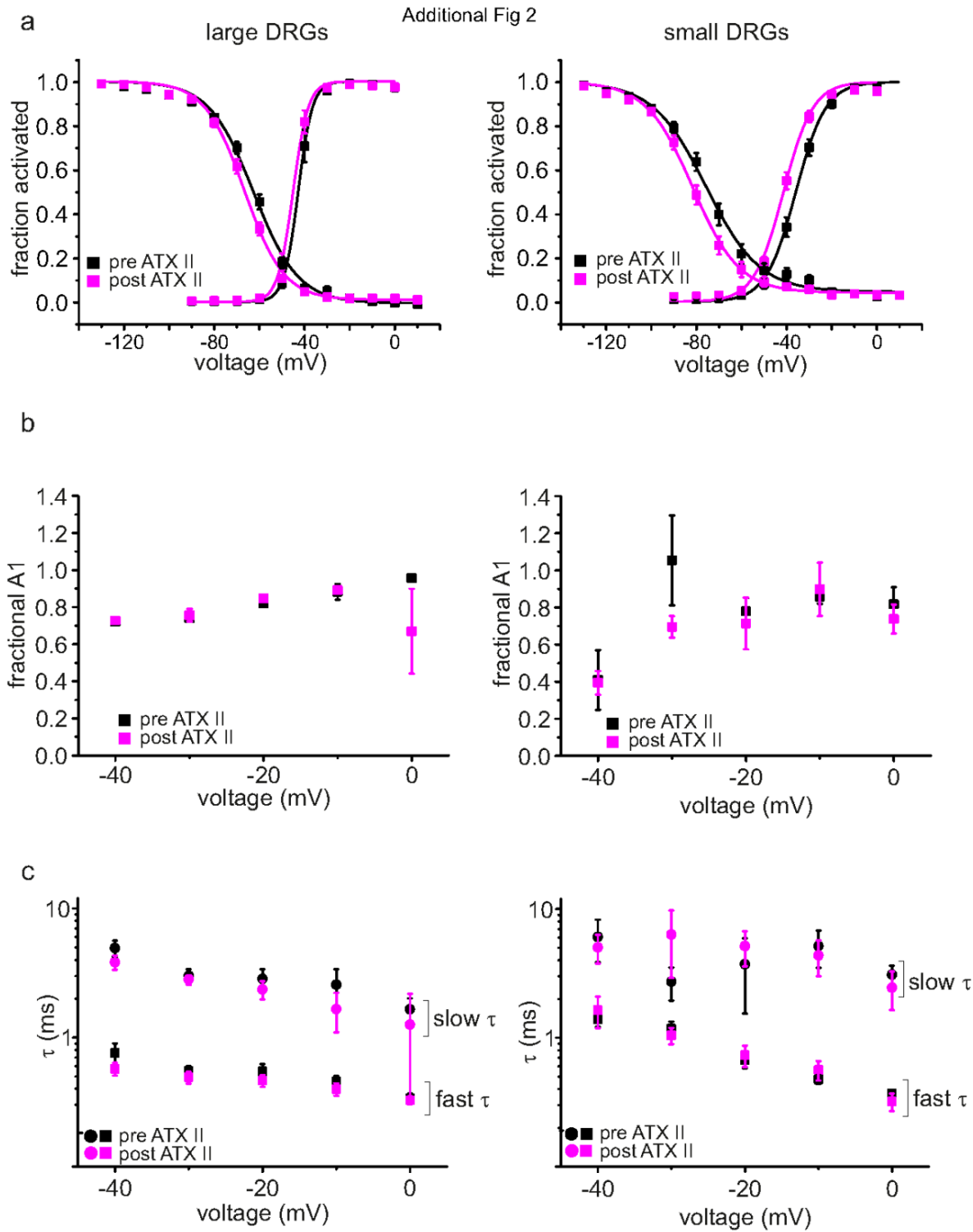
Additional file 2: Figure S2. ATX-II shifts voltage-dependence of activation and steady-state fast inactivation to more hyperpolarized potentials in both large and small DRGs. (a). Voltage-dependence of activation and steady-state fast inactivation of large (left, $n = 11-17$) and small (right, $n = 21-22$) DRGs. V_{half} of activation of both cell types is shifted due to exposure to ATX-II significantly (large control: -42.6 ± 1.1 mV, ATX-II: -45.0 ± 0.94 mV, $p < 0.01$, small control: -34.9 ± 1.0 mV, ATX-II: -40.7 ± 0.8 mV, $p < 0.001$, paired-sample T-test) whereas slope is not significantly different from control (large control: 2.76 ± 0.22 ATX-II: 2.96 ± 0.23 , $p = 0.23$, small control: 5.66 ± 0.3 , ATX-II: 5.7 ± 0.4 , $p = 0.84$, paired-sample T-test). For inactivation, V_{half} of both cell types is shifted significantly (p large < 0.001 , p small < 0.001 , paired-sample T-test), V_{half} for steady-state inactivation was for large DRGs control: -62.5 ± 1.2 mV, ATX-II: -66.8 ± 1.2 mV, $p < 0.001$, small DRGs control: -74.7 ± 2.4 mV, ATX-II: -80.5 ± 2.0 mV, $p < 0.001$, paired-sample T-test). (b) and (c): Results from a double exponential fit to current decay of traces evoked by the activation protocol from large and small DRGs. (b). Fractional A1 ($A1/(A1 + A2)$) is shown as a function of voltage. (c). Fast τ_1 and slow τ_2 time constants of current decay are shown as a function of voltage. We could not detect any significant changes in the decay time constants of small or large DRGs.

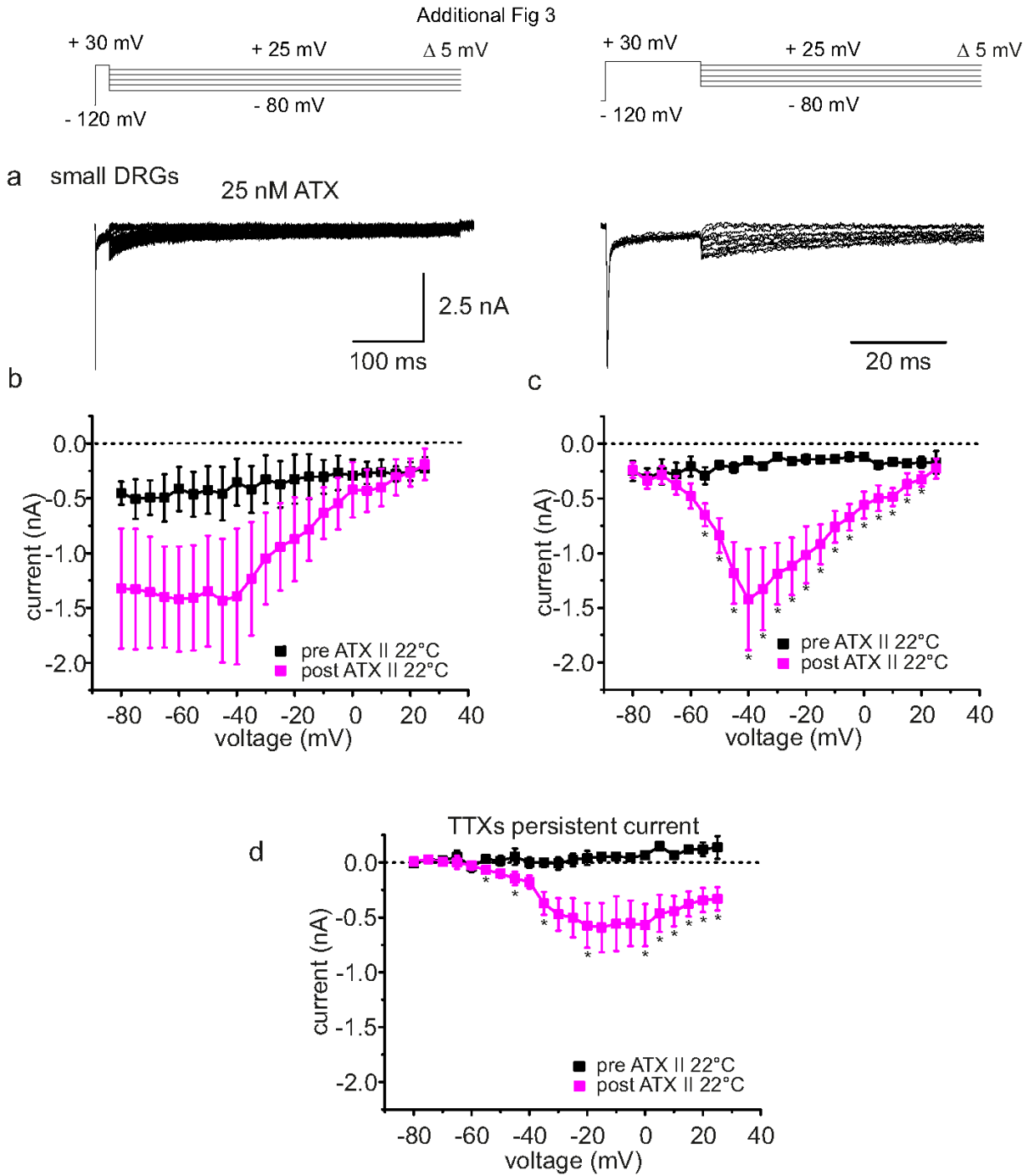
Additional_file_3 as PDF

Additional file 3: Figure S3. ATX-II fails to evoke resurgent currents in small diameter DRGs also at higher concentrations. (a) Recordings of small DRGs after application of 25 nM ATX-II to the bath solution. Representative resurgent current traces, shown on a magnified time scale on the right. There was no resurgent current detectable although persistent and tail currents are induced by 25 nM ATX-II. (b) TTXs peak current at the time point at which resurgent currents would be expected as a function of voltage. While there is nearly no tail current under control conditions (black squares), application of 25 nM ATX-II increased tail currents, albeit not significantly (pink squares, not significant in a paired-sample T-test, $n = 5$). (c) Same test setting as shown in (b) but tail currents were excluded in the analysis, leaving only the first part of the slowly declining persistent current detectable ($* p < 0.05$, paired-sample T-test). (d) Persistent current seems to be affected by application of 25nM ATX-II (pink squares, $* p < 0.05$, paired-sample T-test, $n = 5$).

Additional Fig 1







VI. DISKUSSION

Dieser Abschnitt stellt die Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit heraus und soll die Anwendbarkeit der Ergebnisse im Bereich der Tiermedizin erläutern.

Einer der Hauptbefunde dieser Arbeit ist die Erkenntnis, dass ATX-II den resurgent current in murinen Neuronen verstärkt. Dies findet jedoch nur in großen DRGs, nicht in kleinen statt. Ein verstärkter resurgent current kann zu Schmerzen und verminderter Lebensqualität führen. Dies zeigen uns Neuropathien beim Menschen, sei es als Reaktion auf Medikamente wie Oxaliplatin (SITTL et al., 2012), oder wegen zugrunde liegender Na_v -Mutationen (LAMPERT, 2011). Umso bedeutender ist es diese Mechanismen genau zu verstehen. Wieso wirkt ATX-II nur auf große DRGs? Sowohl große als auch kleine DRGs sind per se mit ATX-II sensiblen Kanälen ($\text{Na}_v1.1$, $\text{Na}_v1.2$, $\text{Na}_v1.6$ und $\text{Na}_v1.7$) ausgestattet (OLIVEIRA et al., 2004; WANKE et al., 2009). Daher kann die "falsche" Kanalausstattung nicht der Grund für die fehlenden Ströme in kleinen DRGs sein. Vielmehr ist vermutlich das Fehlen an ausreichenden Mengen blocking particle in kleinen Neuronen ursächlich für den nicht vorhandenen resurgent current. Kleine DRGs besitzen weniger $\beta 4$ mRNA als große Neurone (s. Abb.3d der Veröffentlichung). Wird das $\beta 4$ -Peptid sowohl in kleinen Neuronen, als auch bei Messungen an heterolog exprimierten $\text{Na}_v1.6$ und 1.7 über die Intrazellulärlösung hinzugefügt, kann resurgent current induziert werden (s. Abb.4 und 5 der Veröffentlichung). Auch wenn $\text{Na}_v1.6$ häufiger resurgent current zeigt als $\text{Na}_v1.7$, was für eine bessere Interaktion des vor allem in großen Neuronen zu findenden $\text{Na}_v1.6$ (HO & O'LEARY, 2011) mit dem Peptid spricht, fehlt es den kleinen DRGs höchstwahrscheinlich an ausreichend bzw. entsprechend prozessierter $\beta 4$ -Untereinheit. Die β -Untereinheiten können folglich eine wichtige Rolle für die Aktivität erregbarer Zellen spielen.

Welche Relevanz haben diese Befunde für das Schmerzempfinden von Säugetieren? Unterschiedlich große DRGs sind mit verschiedenen Schmerzfasern assoziiert. Die Erkenntnisse dieser Arbeit auf Zell-Ebene korrelieren mit Empfindungen auf Schmerzfaserebene. Dies zeigen die im Rahmen der Dissertation durchgeführten Humanversuche (s. Abb.7 der Veröffentlichung). Oftmals dient in der Forschung das Tier, insbesondere die Maus, als Modell für den Menschen. In dem vorliegenden Fall ermöglichen uns die Ergebnisse der Humanversuche Rückschlüsse auf die Wirkung des ATX-II Toxins zu ziehen, die auch für das Tier relevant sind. Da im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden sollte, ob das Toxin selektiv bestimmte Schmerzfasern beeinflusst und hierfür eine Aussage über die Qualität der Empfindung (z. B. stechend, brennend, dumpf, juckend) notwendig ist, wurde von Tierversuchen abgesehen. Diese hätten uns zwar die Aussage ermöglicht, ob durch das Toxin Schmerz induziert wird, nicht jedoch auf welche Schmerzfasertypen dies zurückzuführen ist, da Tiere keine Aussage über die Qualität des Schmerzes machen können. Durch den mechanischen Block der mit den großen DRGs assoziierten A-Fasern kann die durch ATX-II induzierte schmerzhaft und Juckreiz-ähnliche Empfindung nahezu vollständig gehemmt werden. Ein bedeutendes Ergebnis der vorliegenden Arbeit besteht in der Erkenntnis, dass mit niedrigen ATX-II Konzentrationen spezifisch A-Fasern aktiviert werden können. Dies und die Feststellung, dass es nicht zufriedenstellend sein kann bei der künftigen Suche nach spezifischeren Schmerzmitteln für Tier und Mensch die Na_v -assoziierten β -Untereinheiten außer Acht zu lassen, sind besonders hervorzuhebende Befunde dieser Dissertation.

Ein vermehrter resurgent current muss nicht ausschließlich pathologische Auswirkungen für den Organismus haben. Im Herzen beispielsweise finden wir $Na_v1.5$ und die $\beta4$ -Untereinheit, also alle Voraussetzungen für das Auftreten von resurgent current. Es ist möglich, dass die von Isenberg und Ravens (ISENBERG & RAVENS,

1984) in Rinder und Meerschweinchenmyozyten beobachtete, durch ATX-II vermittelte, gesteigerte Kontraktilität auf einer Verstärkung des resurgent current beruht. Wäre man nun durch die Gabe niedriger ATX-II Konzentrationen in der Lage diesen resurgent current lokal im Herzen zu verstärken, könnte man damit einer verminderten Kontraktilität entgegenwirken.

Insbesondere die Erkenntnisse aus den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten in vitro Versuchen leisten einen essentiellen Beitrag zur Entwicklung neuer veterinär- und humanmedizinischer Medikamente beispielsweise im Bereich der Kardiologie oder Neurologie.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Wirkung des Seeanemonen Toxins II (ATX-II) auf spannungsgesteuerte Natriumionenkanäle neuronaler Zellen und zu den dadurch erreichten Änderungen im Schmerzempfinden

ATX-II wurde ursprünglich aus dem Gift der Seeanemone *Anemonia sulcata* isoliert und ist als potenter Aktivator spannungsgesteuerter Natriumionenkanäle (Na_vs) bekannt, da es einen persistierenden Na^+ -Strom induziert. Vor Kurzem wurden bestimmte Na_v -Subtypen mit menschlichem Schmerz in Verbindung gebracht. Somit liegt es nahe, dass detaillierte Kenntnisse über die Regulierung von Na_vs für die Entwicklung neuer Pharmaka im Bereich der Schmerztherapie von Vorteil sind. Auch der durch einen alternativen Inaktivierungsmechanismus entstehende resurgent current spielt nach Erkenntnissen der jüngsten Zeit eine Rolle im Schmerzgeschehen. Er kann einen Angriffspunkt für neue Analgetika darstellen, so man seine Entstehung und mögliche Modifikationen entschlüsseln kann.

Das Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob ATX-II resurgent currents von Na_vs in großen und kleinen murinen DRGs verändern bzw. induzieren kann. Zudem sollte beleuchtet werden, ob und wenn ja, welche Wirkung das Toxin auf periphere A- und C-Schmerzfasern hat.

Die Auswirkungen von ATX-II auf Na_vs wurden in großen und kleinen DRGs der Maus sowie in Zelllinien mit whole-cell voltage-clamp Messungen untersucht. Gesunde humane Probanden bewerteten Empfindungsänderungen (Schmerz und Juckreiz) nach intrakutaner Injektion von ATX-II. Mit Hilfe des "Laser Doppler Imagers" wurde das mögliche Auftreten eines Axon Reflex Erythems untersucht. Die mittels des FACS Zellsortierers nach Zellgröße sortierten DRGs wurden mit RT-qPCR auf ihren Gehalt an $\text{Na}_v1.6$, $\text{Na}_v1.7$ und $\beta4$ mRNA untersucht.

ATX-II verstärkte resurgent currents in großen DRGs, zeigte in kleinen jedoch keinen Effekt. Im heterologen Expressionssystem trat ein resurgent current erst auf, wenn β 4-Peptid über die Intrazellulärflüssigkeit zur Verfügung stand. Korrelierend zu den Befunden auf Zellebene rief ATX-II bei intrakutaner Injektion im Menschen nur solange stechenden Schmerz und veränderte mechanische Empfindung hervor, wie die A-Fasern für die Schmerzleitung verfügbar waren. Nachdem ein Nervenkompressionsblock angelegt und die Leitung via A-Fasern blockiert war, waren die ATX-II vermittelten Effekte verschwunden. Zudem konnte kein Axon Reflex Erythem gefunden werden, das ein Zeichen für eine C-Schmerzfasern-Aktivierung wäre.

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass geringe Konzentrationen von ATX-II eine selektive Wirkung auf große DRGs haben. Erst durch Hinzufügen von β 4-Peptid ist es möglich mit dem Toxin resurgent current in kleinen DRGs sowie Zelllinien mit heterolog exprimierten $Na_v1.6$ und $Na_v1.7$ zu induzieren. Dies lässt darauf schließen, dass es kleinen DRGs an β 4 in ausreichender Menge mangelt und deshalb kein resurgent current sichtbar ist. Ebenso übt ATX-II einen Effekt auf A-Fasern aus, die mit großen DRGs verbunden sind, wohingegen C-Fasern weitgehend unbeeinflusst bleiben. Die intrakutane Injektion von ATX-II führt zu stechendem Schmerz und einer Juckreiz-ähnlichen Empfindung, die sich durch A-Faser-Block verhindern lässt. Daraus kann man schließen, dass ATX-II in niedrigen Konzentrationen als spezifischer A-Faser Aktivator fungiert.

VIII. SUMMARY

On the effect of the sea anemone Toxin II (ATX-II) on sodium ion channels of neuronal cells and on the resulting variations in pain sensation

ATX-II was originally isolated from the venom of the sea anemone *Anemonia sulcata* and is characterized as a potent voltage-gated sodium channel (Na_v) activator, as it induces a persistent sodium current. Recently specific sodium channel subtypes have been linked to human pain. Thus, detailed knowledge of Na_v modulation may prove advantageous for the development of new pain treatments. As recently published resurgent current, as a result of an alternative inactivation, also plays a role in pain perception. It could represent a target for new analgesics, if we are able to elicit its origin and possible modifications.

The aim of this work was to examine whether ATX-II can induce or change resurgent currents of Na_v s of large and small murine, sensory dorsal root ganglia neurons (DRGs). It was also to be determined if the toxin has an effect on peripheral A- and C-pain fibers.

The effects of ATX-II on Na_v s have been studied in large and small DRGs of mice and in cell lines with whole-cell voltage-clamp measurements. Healthy subjects rated sensation changes (pain and itch) after intracutaneous injection of ATX-II. A Laser Doppler Imager was used for analysis of the occurrence of an axon reflex erythema. Using a FACS sorter DRGs were sorted according to their cell size and were examined by RT-qPCR for their content of 1.6, 1.7 and $\beta 4$ mRNA.

ATX-II increased resurgent currents in large DRGs, but failed to influence small DRGs. In heterologous expression systems, resurgent currents only occurred if the $\beta 4$ -peptide was available intracellularly. ATX-II accordingly produced sharp pain and altered mechanical sensitivity in intracutaneously injected humans only as long as A-fibers

were available for the transmission of pain. After a nerve compression block was applied and the A-fibers were blocked, this effect disappeared. In addition, no axon reflex erythema was observed, which would have been a sign for C-fiber activation.

The results of this work suggest that low concentrations of ATX-II have a selective effect on large DRGs. Only by adding β 4-peptide to the intracellular solution, it is possible to induce resurgent current in small DRGs and cell lines heterologously expressing Nav1.6 and Nav1.7. This suggests that small DRGs lack sufficient amounts of β 4 and therefore no resurgent current is detectable. Likewise, ATX-II exerts an effect in large DRG-related A-fibers, whereas C-fibers remain largely unaffected. The intradermal injection of ATX-II causes a sharp pain and itch-like sensation, which can be prevented by selective A-fiber block. This suggests that ATX-II at low concentrations acts as a specific A-fiber activator.

IX. LITERATURVERZEICHNIS

Bear M, Connors B, Paradiso M (2007) Neuroscience - Exploring the brain. Lippincott Williams & Wilkins

Beress L, Beress R, Wunderer G. Isolation and characterisation of three polypeptides with neurotoxic activity from *Anemonia sulcata*. FEBS Lett 1975; 50: 311-4.

Bergman C, Dubois JM, Rojas E, Rathmayer W. Decreased rate of sodium conductance inactivation in the node of Ranvier induced by a polypeptide toxin from sea anemone. Biochim Biophys Acta 1976; 455: 173-84.

Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. Neuron 2000; 26: 13-25.

Catterall WA, Goldin AL, Waxman SG. International Union of Pharmacology. XLVII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated sodium channels. Pharmacol Rev 2005; 57: 397-409.

DiSclafani A, Wilkin JK. The axon reflex flare. Cutis 1983; 31: 523-30.

Grieco TM, Malhotra JD, Chen C, Isom LL, Raman IM. Open-channel block by the cytoplasmic tail of sodium channel beta4 as a mechanism for resurgent sodium current. Neuron 2005; 45: 233-44.

Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. Pflugers Arch 1981; 391: 85-100.

Ho C, O'Leary ME. Single-cell analysis of sodium channel expression in dorsal root ganglion neurons. Mol Cell Neurosci 2011; 46: 159-66.

Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. J Physiol 1952; 117: 500-44.

Isenberg G, Ravens U. The effects of the *Anemonia sulcata* toxin (ATX II) on membrane currents of isolated mammalian myocytes. *J Physiol* 1984; 357: 127-49.

Jarecki BW, Piekarczyk AD, Jackson JO, 2nd, Cummins TR. Human voltage-gated sodium channel mutations that cause inherited neuronal and muscle channelopathies increase resurgent sodium currents. *J Clin Invest* 2010; 120: 369-78.

Lampert A. Resurgent currents turn painfully exciting. *J Physiol* 2011; 589: 773-4.

Lawson SN. Phenotype and function of somatic primary afferent nociceptive neurones with C-, Aδ- or Aα/β-fibres. *Exp Physiol* 2002; 87: 239-44.

Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976; 260: 799-802.

Oliveira JS, Redaelli E, Zaharenko AJ, Cassulini RR, Konno K, Pimenta DC, Freitas JC, Clare JJ, Wanke E. Binding specificity of sea anemone toxins to Nav 1.1-1.6 sodium channels: unexpected contributions from differences in the IV/S3-S4 outer loop. *J Biol Chem* 2004; 279: 33323-35.

Raman IM, Bean BP. Resurgent sodium current and action potential formation in dissociated cerebellar Purkinje neurons. *J Neurosci* 1997; 17: 4517-26.

Sigworth FJ. The patch clamp is more useful than anyone had expected. *Fed Proc* 1986; 45: 2673-7.

Sittl R, Lampert A, Huth T, Schuy ET, Link AS, Fleckenstein J, Alzheimer C, Grafe P, Carr RW. Anticancer drug oxaliplatin induces acute cooling-aggravated neuropathy via sodium channel subtype Na(V)1.6-resurgent and persistent current. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 6704-9.

Torebjork HE, Hallin RG. Perceptual changes accompanying controlled preferential blocking of A and C fibre responses in intact human skin nerves. *Exp Brain Res* 1973; 16: 321-32.

Wang GK, Edrich T, Wang SY. Time-dependent block and resurgent tail currents induced by mouse beta4(154-167) peptide in cardiac Na⁺ channels. *J Gen Physiol* 2006; 127: 277-89.

Wanke E, Zaharenko AJ, Redaelli E, Schiavon E. Actions of sea anemone type 1 neurotoxins on voltage-gated sodium channel isoforms. *Toxicon* 2009; 54: 1102-11.

Wilson MJ, Yoshikami D, Azam L, Gajewiak J, Olivera BM, Bulaj G, Zhang MM. mu-Conotoxins that differentially block sodium channels NaV1.1 through 1.8 identify those responsible for action potentials in sciatic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 10302-7.

X. ANHANG

Vorveröffentlichung: Poster präsentiert auf der Tagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft im März 2012, ausgezeichnet mit dem Posterpreis.

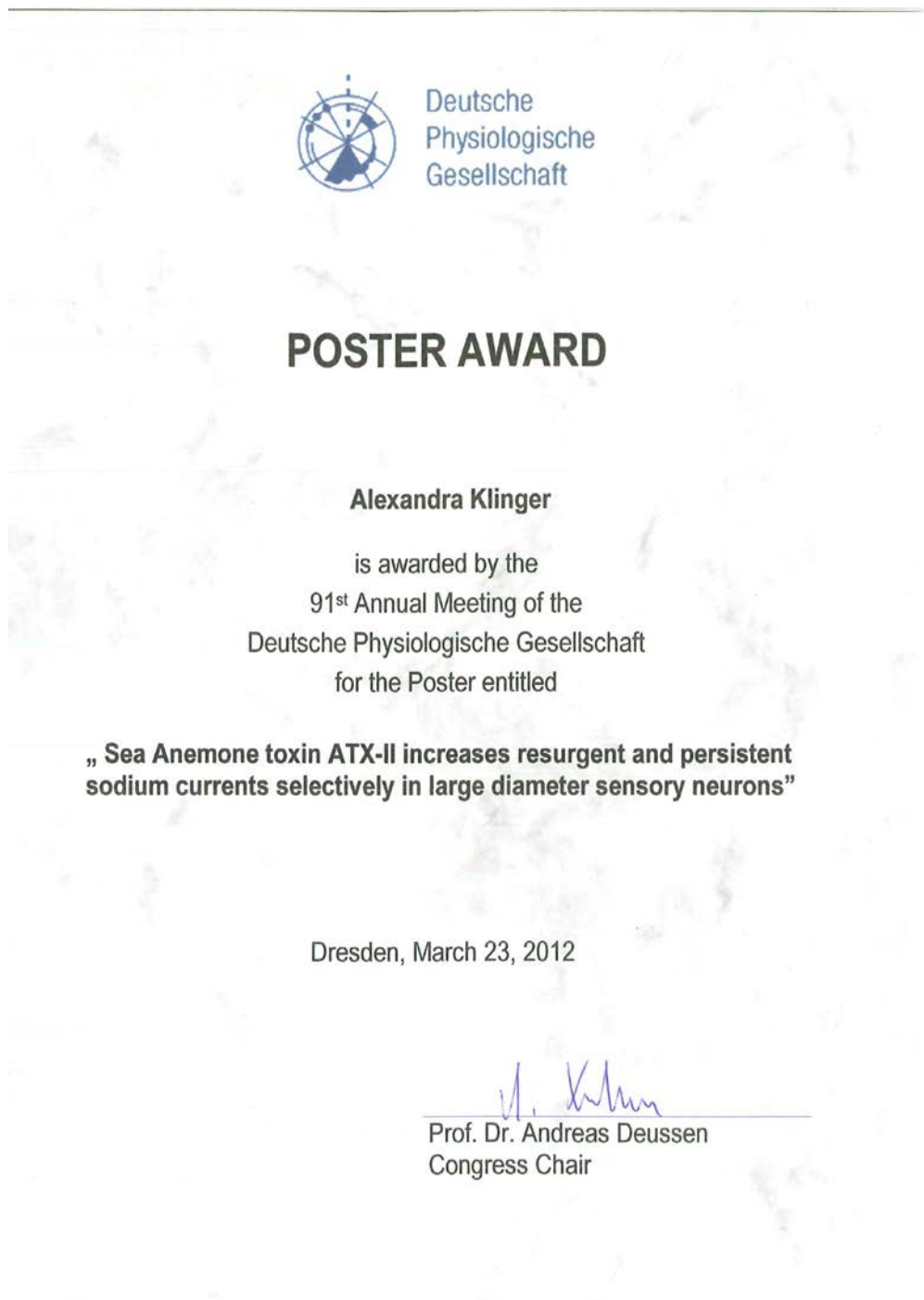


Abb.10: Urkunde für den Posterpreis der DPG.

XI. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt PD Angelika Lampert, die meine Betreuung in Erlangen übernommen hat und so die Anfertigung dieser Arbeit auch durch die Bereitstellung einer Finanzierung erst möglich machte. Sie koordinierte meine Projekte und gab hilfreiche Hinweise zu wissenschaftlichen Arbeitsmethoden. Sie war jedoch nicht nur meine Betreuerin, sondern hatte stets ein offenes Ohr für persönliche Belange.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Stangassinger besonders danken. Zum einen für die Möglichkeit, die Dissertation über ihn an der veterinärmedizinischen Fakultät der Universität München einreichen zu können, zum anderen dafür, dass er durch seine Arbeit in der Tierphysiologie den Anstoß für diese Dissertation gab. Auch für seine Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit meinen herzlichen Dank.

Bei Esther und Mirjam möchte ich mich für die Tipps und Hilfestellungen, die Unterstützung und die zahlreichen gemeinsamen, bereichernden Stunden inner- und außerhalb der Physiologie Erlangen herzlich bedanken.

Andreas, Martin und Andy danke ich für das beste Arbeitsklima, dass man sich wünschen kann.

Bei Anette, Iwona und Birgit möchte ich mich für die besonders erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken.

Allen Kooperationspartnern danke ich für die inspirierenden Projektgespräche und die gute Zusammenarbeit.

Bei den lieben Mitarbeitern und Professoren der Physiologie Erlangen, insbesondere bei Herrn Prof. Alzheimer, möchte ich mich für ein hervorragendes Arbeitsklima und viele neue wissenschaftliche Eindrücke herzlich bedanken.

Aus tiefstem Herzen möchte ich mich bei meiner Schwester Gabi, meinen Eltern Maria und Roland für die immerwährende Bestärkung bedanken. Desweiteren gilt mein allerbesten Dank Philipp und Monik für ihre allgegenwärtige Unterstützung. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Danke an meine Verwandten und Freunde, die mich auf diesem Weg begleitet und stets unterstützt haben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Laika, Abbie und Duke für ihr nichtwissenschaftliches Ausgleichsprogramm bedanken.